

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

### **Badania histologiczne i histochemiczne nadnerczy kurcząt po jednorazowej dawce testosteronu**

Гистологические и гистохимические исследования надпочечника цыплят после однократной дозы тестостерона

Histological and Histochemical Studies of the Chicken Adrenal Glands after a Single Administration of Testosterone

Zagadnieniem rzadkim, ale aktualnym, jest występowanie objawów zespołu nadnerczowo-płciowego u noworodków płci żeńskiej i przedwczesnego dojrzewania płciowego u chłopców na skutek stosowania u matki w pierwszym trymestrze ciąży hormonów, np. progesteronu, testosteronu (7). W zespole nadnerczowo-płciowym przyczyną wirylizacji jest między innymi nadmierna produkcja androgenów w nadnerczach, a wada ta jest spowodowana niedoborem lub brakiem enzymów koniecznych do biosyntezy kortykosterydów (8, 17, 2, 24). Udział nadnerczy w przemianach wprowadzanego testosteronu jest dosyć dokładnie poznany (17). Dużo prac jest poświęconych wpływowi testosteronu na nadnercza zwierząt dojrzających i niedojrzałych płciowo w różnych warunkach doświadczalnych (14, 13, 2, 24).

Celem naszej pracy jest wyjaśnienie, czy wprowadzenie testosteronu w drugim dniu rozwoju, a więc przed wykształceniem regulacji hormonalnej zarodka, wywoła zauważalne zmiany w obrazie histologicznym i histochemicznym gruczołu w dniu wylęgu. Najdogodniejszym modelem badań był zarodek kurczęcia, któremu wprowadzano testosteron w drugim dniu rozwoju (20).

## MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Badania przeprowadzone na 225 zarodkach kurzych rasy „Brojler” (Zakłady Wylęgu Drobiu w Lublinie), które inkubowano w temp. 37°C, zachowując równocześnie odpowiednią wilgotność powietrza. Zarodkom podawano *Testosteronum propionatum* produkcji Jeleniogórskich Zakładów Farmaceutycznych w postaci roztworu olejowego metodą dożółtkową (11). Zarodki podzielono na 3 grupy: 2 kontrolne i 1 doświadczalną.

Grupa I kontrolna „czysta” obejmowała 50 zarodków, którym nie podawano żadnych substancji, a inkubację przeprowadzano celem oceny warunków wylęgu i jakości jaj.

Grupa II kontrolna „olejowa” liczyła 50 zarodków, którym wprowadzano dożółtkowo 0,03 ml *oleum olivarium* w drugiej dobie inkubacji.

Grupa III — doświadczalna obejmowała 125 zarodków kurzych, którym dożółtkowo podawano w drugiej dobie inkubacji *Testosteronum propionatum* w dawce 300  $\gamma$  w 0,03 ml rozpuszczalnika (*oleum olivarium*).

Po 21 dobach inkubacji, czyli w dniu wylęgu kurczęta wszystkich grup dekapiowano i pobierano nadnercza. Materiał przeznaczony do badań na skrawkach parafinowych (grubości ok. 7  $\mu$ ) utrwalano w 10% formalinie przez 48 godz., natomiast do wykrywania lipidów i oznaczania aktywności dehydrogenazy 3- $\beta$ -ol-hydroksysteroidowej utrwalano w płynie Bakera w temp. +4°C w ciągu 5 min. Skrawki grubości ok. 12  $\mu$  sporządzano na mikrotomie mrozeniowym. W każdej z badanych grup wykonano preparaty przeglądowe barwione hematoksyliną Mayera oraz 0,5% wodnym roztworem eozyiny, a także wg metody van Giesona (1). Substancje PAS dodatnie w torebce łącznotkankowej narządu, w naczyniach krwionośnych i komórkach wykrywano metodą McManusa (1), pironinochłonność cytoplazmy i jąderek określano wg metody Bracheta (3). Ilość lipidów określano po wybarwieniu sudanem III wg metody Daddiego (1), zaś aktywność dehydrogenazy 3- $\beta$ -ol-hydroksysteroidowej oznaczano wg metody, którą podaje G a b e (6).

W badaniach zwrócono uwagę na płęć i liczbę wylęgających się kurcząt.

Grupa I kontrolna: 50 zarodków — wykuło się 25 kurcząt, co stanowi 50%, w tym 12 kur i 13 kogutów.

Grupa II kontrolna: 50 zarodków — wykuło się 23 kurczęta, co stanowi 46%, w tym 9 kur i 14 kogutów.

Grupa III doświadczalna: 125 zarodków — wykuło się 58 kurcząt, co stanowi 46,6%, w tym 20 kur i 38 kogutów.

## OBSERWACJE HISTOLOGICZNE I HISTOCHEMICZNE

## Grupy I i II kontrolne

Barwienie hematoksyliną i eozyną oraz wg metody van Giesona wykazało obecność pasm i gniazd komórkowych o różnej barwliwości cytoplazmy. Pomiedzy grupami komórek obserwowano delikatne włókienka tkanki łącznej oraz liczne naczynia krwionośne. Komórki śródnadnerczowe cechowały się jaśniejszą cytoplazmą w porównaniu z komórkami chromafinowymi.

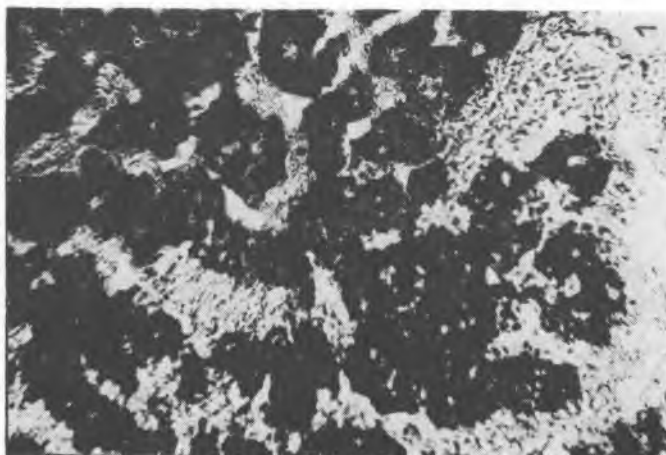
Barwienie sudanem III wykazało silną sudanofilność cytoplazmy komórek śródnadnerczowych w odróżnieniu od komórek chromafinowych, gdzie brak było reakcji. Wydaje się, że u kur reakcja na tłuszcze była nieco silniejsza niż u kogutów (ryc. 1). Reakcja PAS w grupie kontrolnej była podobna, niezależnie od płci kurcząt. Odczyn PAS dodatni wykazywała torebka gruczołu nadnerczowego, delikatne włókienka wnikające od niej w głąb narządu oraz ściany naczyń krwionośnych. Komórki śródnadnerczowe oraz chromafinowe posiadały śladowe ilości substancji PAS dodatnich. Barwienie wg metody Bracheta ujawniło, że zawartość ziarnistości, świadczących o obecności kwasu rybonukleinowego w cytoplazmie i jąderkach, komórek śródnadnerczowych i chromafinowych kogutów i kur była podobna. Dokładna analiza preparatów pozwoliła stwierdzić intensywne zabarwienie pironiną jąderek komórek nadnerczy oraz ich ziarnistości cytoplazmatycznych. Oznaczanie dehydrogenazy 3- $\beta$ -ol-hydroksysterydowej nie wykazało różnic w aktywności enzymu między płcią kurcząt. Bardzo intensywną reakcję na dehydrogenazę obserwowano w komórkach śródnadnerczowych (ryc. 3).

#### Grupa III doświadczalna

U kurcząt płci męskiej i żeńskiej barwienie hematoksyliną i eozyną oraz metodą van Giesona nie wykazało różnic w budowie nadnerczy doświadczalnych i kontrolnych. Obserwowano układ pasm i kłębków komórek śródnadnerczowych i pomiędzy nimi rozmieszczonej tkanki chromafinowej. Zmianie nie uległa również barwliwość cytoplazmy. W barwieniu PAS wg metody McManusa intensywność reakcji była podobna do grup kontrolnych. W komórkach, podobnie jak w kontroli, nie obserwowano substancji PAS dodatnich. Ilość kwasu rybonukleinowego, uwidoczniona wg metody Bracheta, nie uległa zmianie w porównaniu z kontrolą. Pironinochłonność jąderek i ziarnistości w cytoplazmie była jednako intensywna. Barwienie sudanem III wykazało natomiast, że testosteron wprowadzany w drugiej dobie rozwoju powodował zmniejszenie się materiału sudanofilnego w komórkach śródnadnerczowych niezależnie od płci wyklutych kurcząt. Obserwowano tylko nieliczne skupiska o silnie wyrażonej reakcji barwnej. W komórkach chromafinowych odczyn był ujemny (ryc. 2). Również zwraca uwagę mniejsza aktywność enzymatyczna dehydrogenazy 3- $\beta$ -ol-hydroksysterydowej w komórkach śródnadnerczowych u kurcząt zarówno płci męskiej, jak i żeńskiej. Ilość ziarenek formazanu w komórkach śródnadnerczowych była mniejsza, ale nie obserwowano zmniejszenia ilości komórek śródnadnerczowych. W porównaniu z kontrolą komórki chromafinowe pozostawały nadal bez odczynu (ryc. 4).

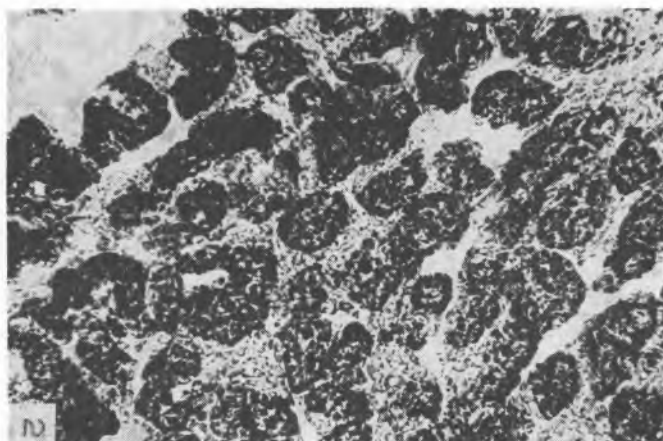
## OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Testosteron w rozwoju ontogenetycznym odgrywa wiodącą rolę w procesie różnicowania się płciowego, a gonady pozostają w ścisłej zależności od czynności kory nadnerczy (7), ale wprowadzone do organizmu androgeny nie działają na gruczoł nadnerczowy poprzez przysadkę mózgową ani warunkiem ich wpływu na korę nie jest obecność gonad (17, 20). W przeprowadzonych badaniach testosteron nie wpływał na zmniejszenie wylęgu kurcząt ani na ich płęć. Budowa nadnerczy kurcząt doświadczalnych nie odbiegała od opisywanej w piśmiennictwie traktującym szczegółowo ich morfologię w rozwoju oraz w dniu wylęgu (2, 5, 16, 23). Barwienie hematoksyliną i eozyną metodą van Giesona nie wykazało różnic w budowie histologicznej nadnerczy kurcząt kontrolnych i doświadczalnych, nie zaobserwowano różnic w ilości komórek z jasną i ciemną cytoplazmą. Należy jednak zaznaczyć, że u kurcząt takie same bodźce wywołują znacznie mniejszy efekt niż u ssaków, których organizm silniej reaguje na różnego rodzaju czynniki stresowe, jakimi są także hormony (20, 21). Ilość substancji PAS dodatnich w torebce łącznotkankowej narządu, naczyniach krwionośnych nie uległa zmianie niezależnie od płci kurcząt. Komórki śródnadnerczowe oraz chromafinowe wykazywały śladowe ilości substancji PAS dodatnich. Podobnie słaby odczyn PAS dodatni w komórkach kory nadnerczy opisywał Kuński (10) u płodów ludzkich tuż przed urodzeniem. Podawanie testosteronu w drugim dniu rozwoju nie wpłynęło również na zmianę zawartości kwasów nukleinowych w komórkach nadnerczy. Bardzo istotna jest ilość materiału sudanofilnego w nadnerczach. Bergstrand i Roy uważają, że lipidy obecne w korze nadnerczy, między innymi i cholesterol, są prekursorami hormonów kory nadnerczy, a ich ilość obrazuje stan czynnościowy gruczołu — zmniejszona ilość substancji sudanofilnych towarzyszy wzmoczonej funkcji gruczołu. W komórkach śródnadnerczowych zwierząt kontrolnych stwierdzono duże ilości materiału sudanofilnego. W doświadczeniu testosteron podawany w drugiej dobie rozwoju powodował w gruczole nadnerczowym znacznie mniejszą sudanofilność komórek śródnadnerczowych, nie obserwowano jednak powiększenia ani zaniku kłębow i pasm komórek z odczynem. Ilość materiału sudanofilnego była niezależna od płci. Liczne prace Malendowicza, Miętkiewskiego i Bergstranda (14, 2, 13, 12) wykazują, że podawanie testosteronu zwierzętom dorosłym powoduje inwolucję kory nadnerczy, połączoną z zanikiem lipidów. W tym doświadczeniu obserwowano tylko zmniejszenie ilości materiału sudanofilnego. W nadnerczach kurcząt doświadczalnych zaobserwowano również spadek aktywności dehydrogenazy 3- $\beta$ -ol-hydroksysteroidowej. Według danych z piśmiennictwa, u 1-, 2- i 3-dniowych nowo-



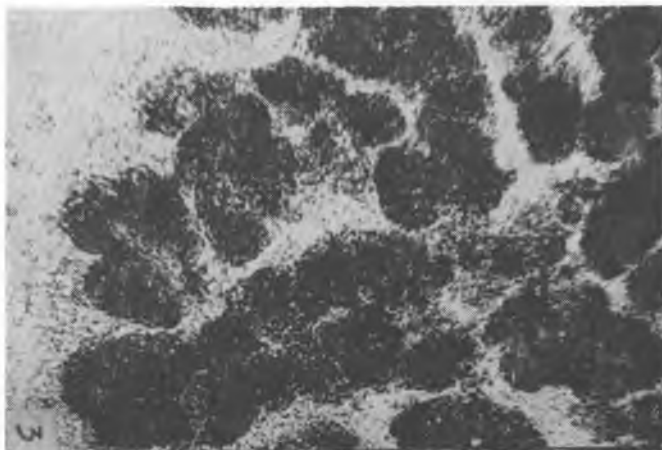
Ryc. 1. Grupa kontrolna. Barwienie sudanem III. Intensywny odczyn na tłuszcze w komórkach śródnadnerzowych, brak reakcji w komórkach chromafinowych. Pow. ok. 80×

Control group. Colouring with sudane III. Intensive reaction to fats in mesosuprarenal cells, no reaction in chromaphine cells. Magn. ca 80×



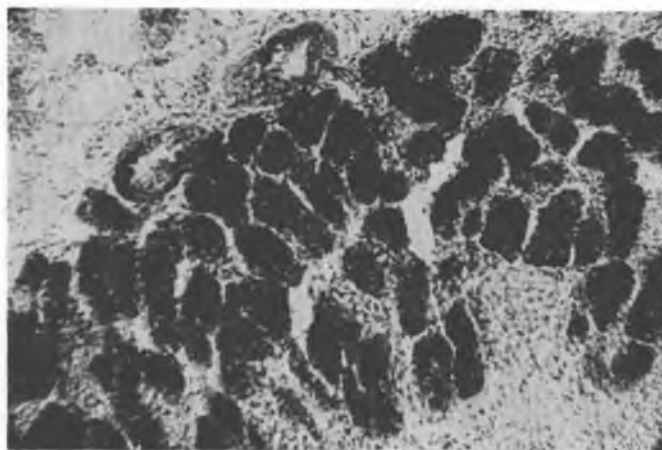
Ryc. 2. Grupa doświadczalna. Barwienie sudanem III. Osłabienie sudanofilności komórek śródnadnerzowych w porównaniu z kontrolą. Pow. ok. 80×

Experimental group. Colouring with sudane III. Decrease in the sudanofily of meso-suprarenal cells as compared with control. Magn. ca 80×



Ryc. 3. Grupa kontrolna. Intensywna reakcja na dehydrogenazę 3-β-ol-hydroksysteroidową w komórkach śródnadnerczowych, brak odczynu w komórkach chromafinowych. Pow. ok. 80×

Control group. Intensive reaction to 3-β-ol-hydroksysteroid dehydrogenase in mesosuprarenal cells, no reaction in chromaphine cells. Magn. ca 80×



Ryc. 4. Grupa doświadczalna. Osłabienie reakcji na dehydrogenazę 3-β-ol-hydroksysteroidową w komórkach śródnadnerczowych. Pow. ok. 80×

Experimental group. Decrease in reaction to dehydrogenase 3-β-ol-hydroksysteroid in mesosuprarenal cells. Magn. ca 80×

rodków szczyrzych obojga płci poziom w korze nadnerczy dehydrogenazy 3- $\beta$ -ol-hydroksysterydowej jest bardzo wysoki (9). Jak wykazał C h a n g (cyt. 17), wprowadzany testosteron jest metabolizowany w całości przez homogenat nadnerczy, w przemianach tych konieczny jest udział dehydrogenazy 3- $\beta$ -ol-hydroksysterydowej (17, 19). M c C a r t h y (1966) udowodnił, że osłabienie aktywności dehydrogenazy 3- $\beta$ -ol-hydroksysterydowej prowadzi do zablokowania przemian pregnenolonu w progesteron, konsekwencją tego jest zmniejszenie się ilości kortyzolu, natomiast pojawienie się znacznych ilości słabego androgeny, jakim jest dehydroepiandrosteron (7, 18, 15, 22). Wśród badanych kurcząt nadnercza nie wykazywały zmian w ilości komórek śródnadnerczowych i ilości skupisk komórek chromafinowych, które pozostawały bez odczynu, aktywność enzymu uległa jednak wyraźnemu zmniejszeniu. W doświadczeniach, jeżeli testosteron podawano zwierzętom dorosłym, obserwowano powiększenie lub zmniejszenie się poszczególnych warstw części korowej (2, 13, 12, 4).

Z przeprowadzonego doświadczenia można wnioskować, że:

1. Testosteron wprowadzany dożółtkowo w drugiej dobie rozwoju nie powoduje zmian w ilości komórek śródnadnerczowych i barwliwości ich cytoplazmy.
2. Nie wywołuje przerostu tkanki łącznej i zmian w pironinochłonności komórek zarówno śródnadnerczowych, jak i chromafinowych.
3. Prowadzi do spadku aktywności dehydrogenazy 3- $\beta$ -ol-hydroksysterydowej i zmniejszenia się ilości tłuszczu w komórkach śródnadnerczowych.
4. Obserwowane zmiany histochemiczne występowały niezależnie od płci kurcząt.

#### PIŚMIENICTWO

1. B a g i ń s k i S.: Technika mikroskopowa. PWN, Warszawa 1965, 127, 202, 339.
2. B e r g s t r a n d C. G.: Acta Endocrinol. Supp. 8, 1—60, 1952.
3. B u r c k H. Ch.: Technika histologiczna. PZWL, Warszawa 1975.
4. C h a r t I. I., H o w i e N., K r a u s e r F.: Fed. Proc. 20, 177—178, 1961.
5. D a w s o n A. B.: J. Morphol. 92, 572—795, 1953.
6. G a b e M.: Techniques histologiques. Masson et Cie. Paris 1968, 800.
7. G ó r n i c k i B., P a w l i k o w s k i T.: Endokrynologia kliniczna wieku rozwojowego. PZWL, Warszawa 1974, 135—195.
8. H a r t w i g W.: Endokrynologia kliniczna. PZWL, Warszawa 1972, 861—870.
9. K ę d z i a H., K o z ł o w s k a K., Z e g a r s k a Z.: Folia Morphol. 15, 291—296, 1964.
10. K u ń s k i H.: Badania histochemiczne kory nadnerczy płodów ludzkich. Łódzkie Towarzystwo Naukowe 34, Łódź 1961, 1—32.
11. L a r s k i Z.: Wirusologia weterynaryjna. PWRiL, Warszawa 1965, 371—382.
12. M a l e n d o w i c z L. K.: Endokrynoł. Pol. 25, 341—346, 1974.

13. Miętkiewski K., Malendowicz L. K., Fichna P.: *Folia Histochem. et Cytochem.* **12**, 215—232, 1974.
14. Miętkiewski K., Malendowicz L. K., Łukaszczyk A.: *Endokryinol. Pol.* **20**, 437—449, 1969.
15. McCarthy J. L.: *Endocrinol.* **79**, 1123—1132, 1966.
16. Nicander L.: *Acta Anatomica* **14**, 5—85, 1952.
17. Rembiesa R.: *Post. Hig. i Med. Dośw.* **22**, 135—175, 1968.
18. Roy S. N., Mahesh W. B.: *Endocrinol.* **74**, 187—192, 1964.
19. Savarol K., Green A., Lewis L.: *Endocrinol.* **47**, 418—421, 1950.
20. Sturkie P. D.: *Fizjologia ptaków*. PWRiL, Warszawa 1970.
21. Szmidt G. A.: *O rozwoju zarodka*. PWN, Warszawa 1955.
22. Szukalski B.: *Endokryinol. Pol.* **22**, 267—286, 1971.
23. Wołyńska M.: *Folia Morphol.* **7**, 10—15, 1956.
24. Zieleniewski J.: *Endokryinol. Pol.* **19**, 357—385, 1968.

Otrzymano 25 XI 1977.

#### РЕЗЮМЕ

Исследовали кору надпочечников цыплят, которым на 2 сутки эмбриональной жизни подали однократную дозу *Testosteronum propionatum*. Исследования проведено на 225 куриных зародышах расы „бройлер”. Определено, что поданный на второй день эмбрионального развития тестостерон не вызывал изменений в количестве внутринадпочечных клеток и в окраске их цитоплазмы, а также не вызывал гипертрофии соединительной ткани и изменений в пиринино-адсорбционной способности внутринадпочечниковых и хромафиновых клеток. Определено также, что тестостерон вызывает понижение активности 3-бета-оль-гидроксистеридовой дегидрогеназы и уменьшает количество суданофильного материала во внутринадпочечниковых клетках.

#### SUMMARY

Chickens were given one dose of *Testosteronum propionatum* in the second 24 hours of development and then their adrenal cortex was examined. The studies were carried out on 225 hen germs of "Brojler" phylum. Testosterone given in the second day of development did not cause any changes in the number of mesosuprarenal cells and colouring of cytoplasm or hypertrophy of connective tissue and no changes in the pyroninal absorbency of mesosuprarenal cells and chromaphine cells. The administered testosterone results in the decrease of dehydrogenase 3- $\beta$ -ol-hydroksysteroid activity and the reduction of sudanophil material in mesosuprarenal cells.