

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Irena Królikowska-Prasał

Barbara CISZEWSKA-POPIOŁEK,
Barbara JODŁOWSKA-JĘDRYCH,
Irena KRÓLIKOWSKA-PRASAŁ

Wpływ progestagenów podawanych w okresie ciąży na odczyn histochemiczne w wątrobie płodowej

The Effect of Progestagens Administered During Pregnancy on Histochemical Reaction in Fetal
Liver

Wpływ hormonów sterydowych na przebieg ciąży i rozwój płodu był przedmiotem badań licznych autorów, którzy otrzymali wyniki często kontrowersyjne. Progesteron podawany ciężarnym królicom powodował między innymi wrylizację płodów (13). Wprowadzenie do terapii syntetycznych progestagenów było dużym postępem, ponieważ przewyższają one wielokrotnie siłą działania naturalny progesteron i nie ulegają inaktywacji w wątrobie po podaniu doustnym. Badano wpływ różnych syntetycznych progestagenów na narządy rozwijającego się płodu, między innymi jajniki, przysadkę mózgową, nadnercza. Obserwowano powstawanie różnego stopnia wad rozwojowych zewnętrznych narządów rodnych (12).

Allioloestranol (17α -allylo-3 dezoksy-19-nortestosteron) jest lekiem z wyboru w przypadku grożącego poronienia. Nie wywiera on działania wrylizującego, nie ulega biotransformacji w ustroju do substancji o działaniu estrogennym (4), nie hamuje funkcji gonad ani nadnerczy. Przez swoje działanie placentotropowe ma dużą skuteczność w utrzymaniu ciąży (14). Poprzez łożysko oddziałuje także na tkanki płodowe.

W naszej pracy badając aktywność niektórych enzymów oraz zawartość glikogenu w wątrobie starano się przeanalizować, w jaki sposób hormon ten wpływa na metabolizm wątroby płodowej.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 9 samicach (szczurach rasy Wistar) ciężarnych, w wieku 4—5 mies. Zwierzęta przebywały w klatkach drucianych, przyjmowały dietę standaryzowaną. Podzielono zwierzęta na 3 grupy: kontrolną (3 samice — 36 płodów) i 2 grupy doświadczalne:

Grupa I doświadczalna (3 samice — 31 płodów) otrzymywała Turinal (firmy: Chemical Works of Gedeon Richter LTD Budapest, Hungary), począwszy od dziesiątego dnia trwania ciąży w dawce 0,5 mg/kg m.c. przez okres 10 dni.

Grupa II doświadczalna (3 samice — 33 płody) otrzymywała lek w dawce 1 mg/kg m.c. przez okres 10 dni, od dziesiątego dnia trwania ciąży.

Lek podawano w zawiesinie wodnej sondą dożołądkowo. Dwudziestego pierwszego dnia trwania ciąży zwierzęta dekapitowano i pobierano do badań wątroby płodowe.

Skrawki utrwalone w 10% formalinie barwiono przeglądowo hematoksyliną i eozyną (1). Na skrawkach utrwalonych w płynie Carnoya wykonano barwienie metodą PAS według McManusa (10). Na skrawkach świeżych, krojonych w kriostacie, wykonywano odczyny histochemiczne na dehydrogenazę bursztynianową według metody Nachlasa i wsp. (18) i dehydrogenazę mleczanową według metody Pearsa (18). Na skrawkach utrwalonych w płynie Bakera, krojonych na mikrotomie mrozeniowym, wykonywano odczyny na aktywność fosfatazy kwaśnej według metody Gomoriego (1) i glukozo-6-fosfatazy według metody Wachsteina i Meisel (18). Zdjęcia wykonywano w mikroskopie Ergaval aparatem fotograficznym Exacta Varex.

BADANIA WŁASNE

Grupa kontrolna

Zraziki wątroby płodowej wykazywały prawidłową strukturę. Barwienie hematoksyliną i eozyną ujawniło obecność hepatoblastów ze słabo barwiącą się cytoplazmą oraz duże, silnie zasadochłonne jądra komórkowe (ryc. 1). Pomiedzy hepatoblastami obserwowano intensywnie wybarwione liczne elementy morfotyczne krwi. Największe skupiska krwinek obserwowano w pobliżu naczyń krwionośnych. Wśród elementów układu białokrwinkowego najwyraźniej uwidaczniały się limfocyty. Obserwowano także nieliczne wielojądrowe komórki olbrzymie. Reakcja PAS wypadła pozytywnie w hepatoblastach. Miała ona charakter drobnoziarnisty. Rozmieszczona była nierównomiernie w obrębie zrazików. Obserwowano zraziki z intensywną reakcją PAS obok zrazików z reakcją słabą. W elementach morfotycznych krwi reakcja PAS była słaba i miała charakter dyfuzyjny. Dodatni odczyn na dehydrogenazę bursztynianową obserwowano w cytoplazmie hepatoblastów oraz w elementach morfotycznych krwi (ryc. 2). Jego intensywność wzrastała w sąsiedztwie żył środkowych i naczyń zatokowych, gdzie miał charakter gruboziarnisty. Silny odczyn na aktywność dehydrogenazy mleczanowej obserwowano w hepatoblastach (ryc. 3). Na obwodzie komórek miał on charakter gruboziarnisty. Intensywność odczynu wzrastała wokół żył centralnych. W obrębie elementów morfotycznych krwi intensywność reakcji na dehydrogenazę mleczanową była bardzo duża. Dodatnią reakcję na fosfatazę kwaśną obserwowano zarówno w hepatoblastach, jak i elementach morfotycznych krwi (ryc. 4). Reakcja była silna wokół żył centralnych. Intensywny, gruboziarnisty odczyn wykazywały komórki Browicza-Kupffera. Dodatnią reakcję na glukozo-6-fosfatazę obserwowano w hepatoblastach, komórkach Browicza-Kupffera oraz elementach morfotycznych krwi (ryc. 5). Intensywny odczyn obserwowano w komórkach wątroby układających się wokół kanalików żółciowych oraz żył centralnych.

Grupa I doświadczalna

Barwienie hematoksyliną i eozyną nie ujawniło zmian morfologicznych w wątrobie płodowej tej grupy w porównaniu z grupą zwierząt kontrolnych. Zaobserwowano nierównomierny, niewielki wzrost intensywności reakcji PAS w hepatoblastach na terenie niektórych zrazików oraz wzrost intensywności odczynu w elementach układu białokrwinkowego. Stwierdzono zwiększenie intensywności reakcji na dehydrogenazę bursztynianową w hepatoblastach, gdzie odczyn miał charakter gruboziarnisty (ryc. 6). W elementach morfotycznych krwi odczyn był o wiele silniejszy niż w krwinkach wątroby płodowej zwierząt kontrolnych. Zaobserwowano także ogniskowe nasilenie aktywności dehydrogenazy mleczanowej w hepatoblastach w porównaniu z grupą kontrolną (ryc. 7). Na obwodzie komórek odczyn był bardzo intensywny, gruboziarnisty, w centrum zaś miał charakter dyfuzyjny. W elementach morfotycznych krwi zaobserwowano osłabienie odczynu na dehydrogenazę mleczanową. Reakcja na fosfatazę kwaśną ogniskowo malała w hepatoblastach. Wzmocnienie reakcji obserwowano natomiast w komórkach Browicza-Kupffera. W elementach morfotycznych krwi intensywność reakcji była podobna jak w grupie zwierząt kontrolnych. W obrębie hepatoblastów wzrosła intensywność odczynu na glukozo-6-fosfatazę wzdłuż przebiegu kanalików żółciowych (ryc. 8). W elementach morfotycznych krwi natomiast odczyn był słabszy niż w wątrobie płodów kontrolnych.

Grupa II doświadczalna

Nie obserwowano zmian morfologicznych w wątrobie płodowej zwierząt tej grupy. Barwienie hematoksyliną i eozyną wykazywało duże skupienia komórek krwi w pobliżu żył centralnych. Reakcja PAS ogniskowo silniej zaznaczyła się w hepatoblastach położonych w obwodowej części zrazików. W elementach morfotycznych krwi intensywność reakcji była podobna jak w grupie I zwierząt doświadczalnych. Zaobserwowano ogniskowe nasilenie odczynu na dehydrogenazę bursztynianową w hepatoblastach położonych wokół żył centralnych oraz w pobliżu naczyń zatokowych (ryc. 9). Miał on charakter gruboziarnisty, zwłaszcza na obwodzie komórek. Elementy morfotyczne krwi wykazywały także bardzo intensywny odczyn. Reakcja na aktywność dehydrogenazy mleczanowej wyraźnie zmniejszyła się w hepatoblastach w porównaniu do zwierząt z grupy kontrolnej i grupy I doświadczalnej (ryc. 10). Na obwodzie komórek miała charakter gruboziarnisty, w centrum ziarenka enzymopoztywne były drobniejsze. Nasilenie odczynu na dehydrogenazę mleczanową w elementach morfotycznych krwi było podobne jak w grupie I doświadczalnej. Aktywność fosfatazy kwaśnej wyraźnie wzrosła w hepatoblastach w porównaniu z wątroba zwierząt

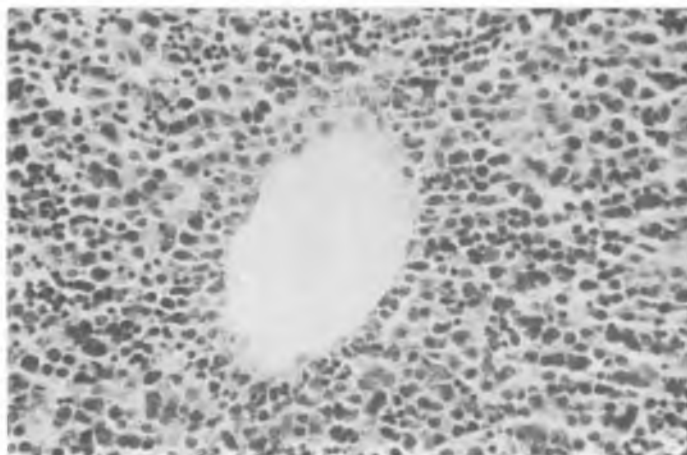
kontrolnych i z grupy I doświadczalnej. Silniejszy odczyn występował wokół żył centralnych i w komórkach Browicza-Kupffera (ryc. 11). W elementach morfotycznych krwi reakcja była podobna jak w poprzednich grupach. Reakcja na glukozo-6-fosfatazę wykazywała nierównomierne rozmieszczenie (ryc. 12). Ogniskowo odczyn był nasilony w hepatoblastach wzdłuż kanalików żółciowych. Miał on charakter dyfuzyjny. W elementach morfotycznych krwi aktywność odczynu nie zmieniła się w porównaniu z kontrolą.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

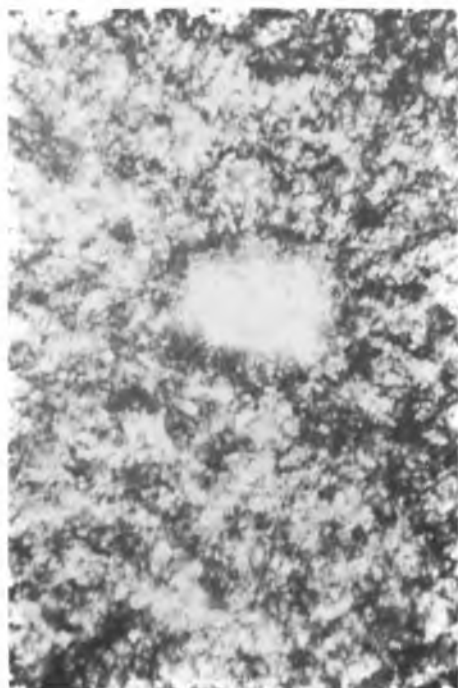
Podawanie hormonów w okresie ciąży powinno być ostrożne, ponieważ może zaburzyć równowagę hormonalną 3 układów. W okresie postimplantacyjnym współdziała ze sobą już 3 producentów hormonów: matka, łożysko i płód (6, 7, 15—17). Wzajemne ich oddziaływanie zależy od grubości bariery łożyskowej. Hormony sterydowe przechodzą przez łożysko prawdopodobnie na drodze dyfuzji, a przepuszczalność bariery łożyskowej wzrasta pod koniec ciąży.

Metabolizm gestagenów zachodzi głównie w wątrobie (3). Niektóre sterydy, w szczególności posiadające grupy alkilowe C-17, mogą mieć w niektórych przypadkach właściwości hepatotoksyczne. Przy stosowaniu 19-norsterydów nie stwierdzono jednak uszkodzenia komórek wątroby, a przejściowy wzrost cholesterolu i hiperbilirubinemia cofały się po 4 tygodniach od zaprzestania podawania gestagenów (2). Nasze badania dotyczyły wątroby płodowej, która odmiennie reaguje na różne czynniki szkodliwe. Rozmieszczenie aktywności poszczególnych enzymów zmieniało się w zraziku w zależności od położenia w stosunku do naczyń krwionośnych, podobnie jak w wątrobie dojrzalej (8, 9, 15).

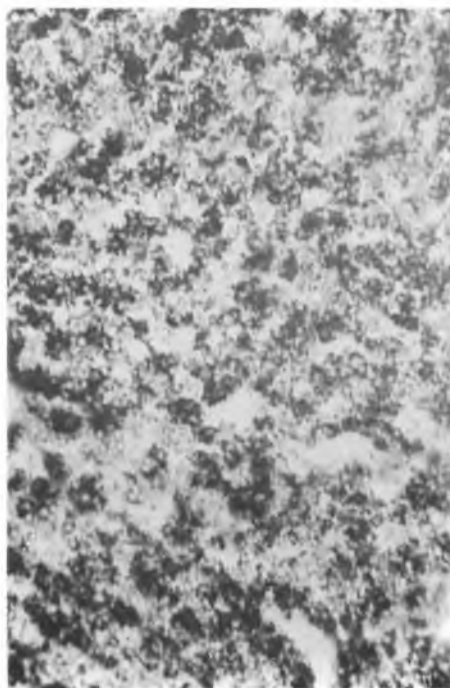
Na podstawie badań stwierdzono, że podawanie Turinalu w dawce 0,5 mg/kg m.c. spowodowało w hepatoblastach niewielki wzrost intensywności reakcji PAS, wzrost intensywności dehydrogenazy bursztynianowej, dehydrogenazy mleczanowej i glukozo-6-fosfatazy, ogniskowe osłabienie reakcji na fosfatazę kwaśną, lecz wzmoczenie tego odczynu w komórkach Browicza-Kupffera. W elementach morfotycznych krwi zwiększyła się intensywność reakcji PAS i aktywność odczynu na dehydrogenazę bursztynianową. Zmniejszyła się natomiast aktywność reakcji na dehydrogenazę mleczanową i glukozo-6-fosfatazę, a nie uległa zmianie na fosfatazę kwaśną. Podawanie Turinalu w dawce 1 mg/kg m.c. spowodowało wzrost intensywności odczynu na dehydrogenazę bursztynianową, glukozo-6-fosfatazę, reakcji PAS, wyraźny wzrost intensywności odczynu na fosfatazę kwaśną oraz spadek aktywności dehydrogenazy mleczanowej. W elementach morfotycznych krwi reakcja PAS i wszystkie badane odczyny enzymatyczne były podobne jak w wątrobie płodowej zwierząt z grupy I doświadczalnej.



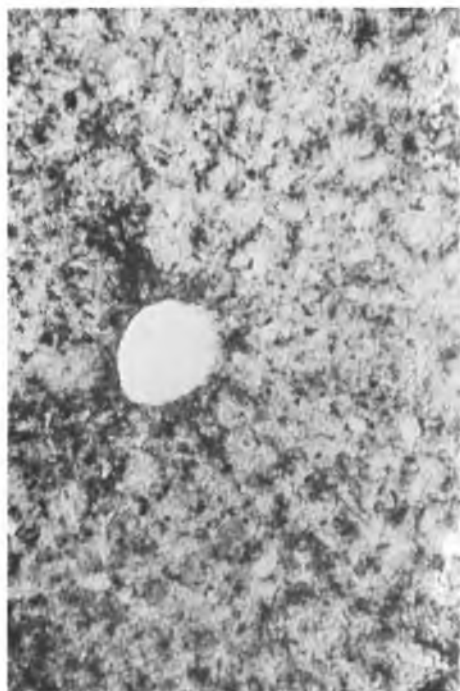
Ryc. 1



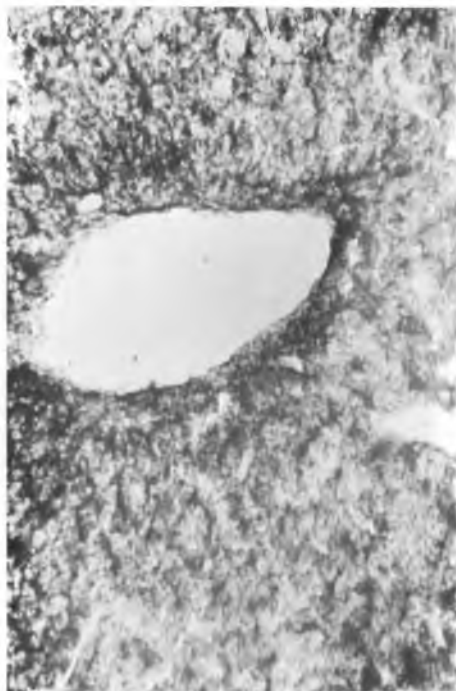
Ryc. 2



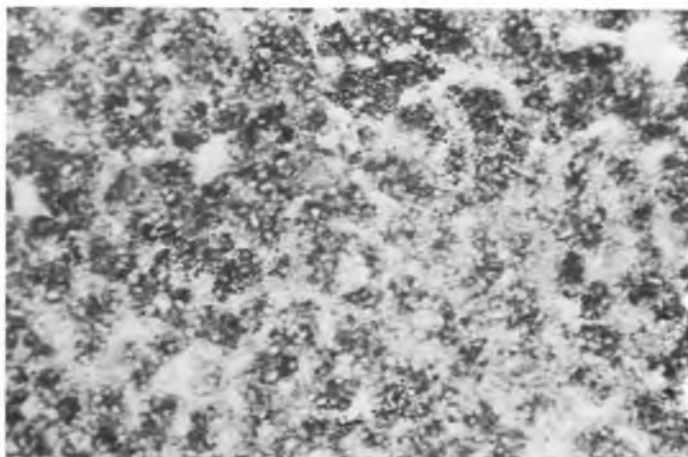
Ryc. 3



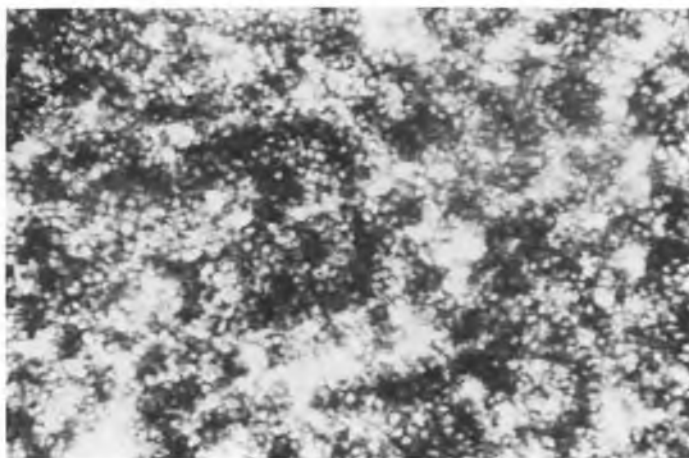
Ryc. 4



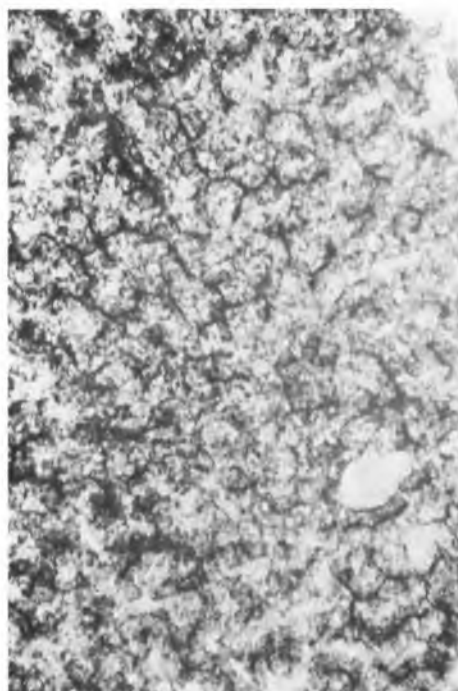
Ryc. 5



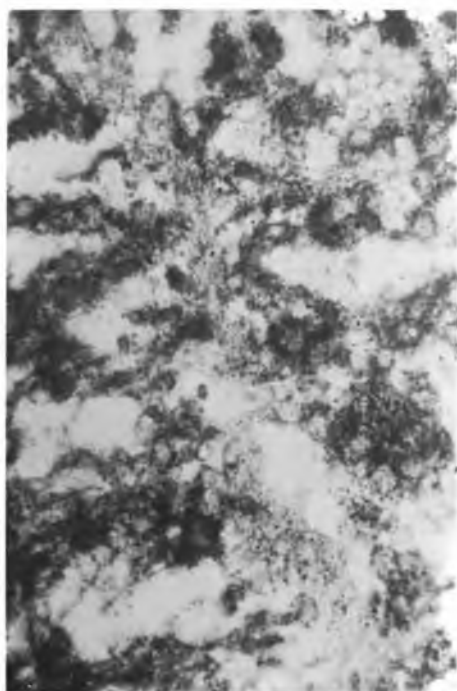
Ryc. 6



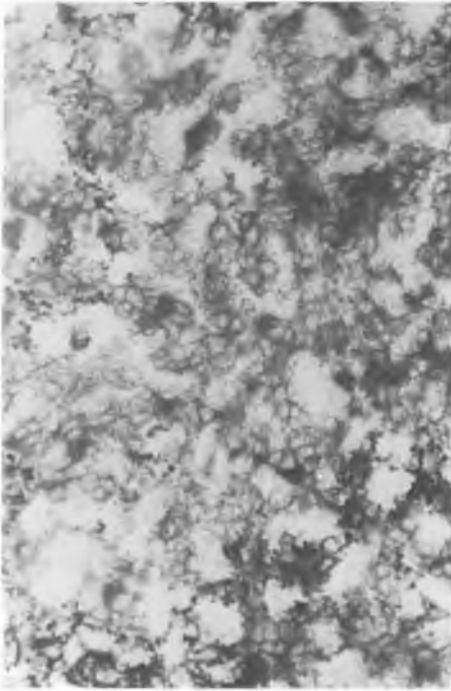
Ryc. 7



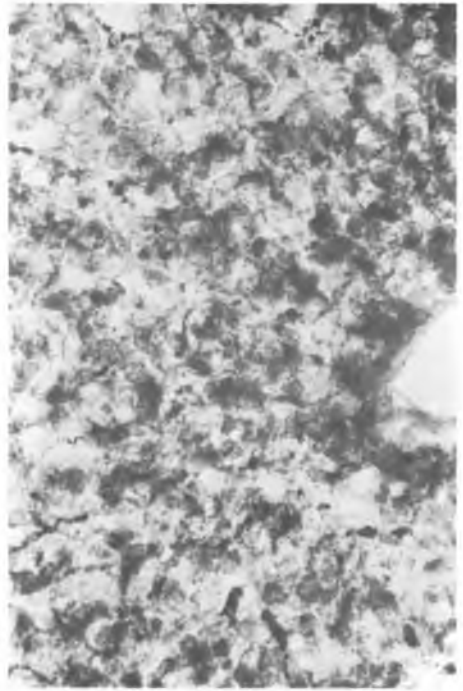
Ryc. 8



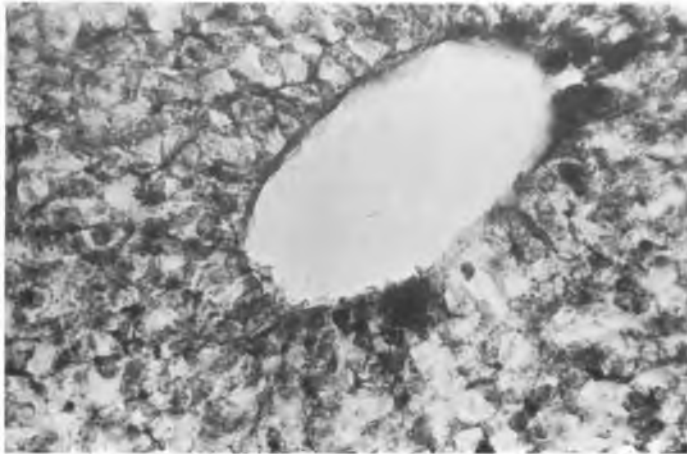
Ryc. 9



Ryc. 10



Ryc. 11



Ryc. 12

Odmienne reagowanie wątroby płodowej na różne czynniki związane jest z niekompletnym zróżnicowaniem niektórych struktur w obrębie komórek płodowych. Metabolizowanie leków i hormonów związane jest z siateczką śródplazmatyczną gładką, tymczasem końcowy etap życia płodowego jest dopiero okresem różnicowania się siatki gładkiej. Pod wpływem Turinalu zaobserwowano wzrost intensywności reakcji PAS oraz silniejszą reakcję na aktywność glukozo-6-fosfatazy, enzymu związanego z siateczką śródplazmatyczną gładką. Enzym ten zaangażowany jest przy uwalnianiu glukozy z glukozo-6-fosforanu. W obrębie siatki śródplazmatycznej następuje też polimeryzacja glukozy w glikogen. Można również przypuszczać, że Turinal, pobudzając rozwój siateczki śródplazmatycznej gładkiej, wpływa korzystnie na metabolizm węglowodanów. Progesteron i jego pochodne należą do labilizatorów błon lizosomalnych. Zaobserwowane przez nas zwiększenie aktywności fosfatazy kwaśnej po zastosowaniu Turinalu w większych dawkach potwierdza te dane z piśmiennictwem. Małe dawki hormonu nie wpływają na lizosomy lub nawet ogniskowo mogą stabilizować ich błony. Zmiany w aktywności reakcji na dehydrogenazę bursztynianową i mleczanową, nasilające się po podawaniu większych dawek hormonu, przemawiają za wpływem Turinalu na ogniwa glikolizy beztlenowej oraz łańcucha oddechowego.

Wszystkie opisane przez nas zmiany histochemiczne świadczą o tym, że Turinal podawany samicom ciężarnym w drugiej połowie ciąży wywiera duży wpływ na metabolizm rozwijającej się wątroby płodowej.

PIŚMIENNICTWO

1. Bagiński S.: Technika histologiczna. PWN, Warszawa 1969.
2. Bossak-Feldman E., Carter A. C.: Endocrinologic and Metabolic Effects of 17- α -ethynyl-19-nortestosterone in Woman. *J. Clin. End. and Metab.* **20**, 842, 1960.
3. Chodera A., Herman Z. S.: Farmakologia kliniczna. PZWL, Warszawa 1986.
4. Danysz A., Gryglewski R.: Farmakologia. PZWL, Warszawa 1982.
5. De Valck i wsp.: Localization of Four Phosphatases in Rat Liver Sinusoidal Cells. An Enzyme Cytochemical Study. *Histochemistry* **89**, 357, 1988.
6. Dziadkowiec I. i wsp.: Biosynteza progesteronu w łożysku szczura. *Endokryn. Pol.* **33**, 201, 1982.
7. Dziadkowiec I. i wsp.: Biosynteza estrogenów w ciąży u szczura. *Endokryn. Pol.* **33**, 169, 1982.
8. Ebert S. i wsp.: Sinusoidal Profiles of Lactate Dehydrogenase Activity in Rat Liver. *Histochemistry* **87**, 371, 1987.
9. Hildebrand R., Schleicher A.: Image Analysis of the Histochemical Demonstration of Glucose-6-phosphatase Activity in Rat Liver. *Histochemistry* **86**, 181, 1986.
10. Krygier-Stojałowska A., Godlewski H. G.: Topochemiczne metody badań komórek i tkanek. PWN, Warszawa 1975.
11. Okła J.: Efektywność i działanie uboczne nowoczesnych środków antykoncepcyjnych. *Pol. Tyg. Lek.* **28**, 135, 1973.
12. Okła J.: Progestageny w antykoncepcji i w chorobach kobiecych. PZWL, Warszawa 1969.

13. Piotrowski J.: Badania doświadczalne nad wpływem progesteronu na rozwój embrionalny królika. *Endokryn. Pol.* **21**, 175, 1970.
14. Podlewski J. K., Chwalibogowska-Podlowska A.: *Leki współczesnej terapii*. PZWL, Warszawa 1986.
15. Rembieszka R. i wsp.: Ovarioplacental Dependency in Rat. Biotransformation of C21 Steroids to Androgens by Rat Placenta *in vitro*. *Steroids* **19**, 65, 1972.
16. Szukalski B.: Przemiany hormonów sterydowych w jednostce płodowo-łożyskowej. *Endokryn. Pol.* **27**, 6, 1976.
17. Ślebodzińska A.: *Zarys endokrynologii zwierząt użytkowych*. PWN, Warszawa 1983.
18. Zawistowski S.: *Technika histochemiczna. [w:] Histologia oraz podstawy histopatologii*. PZWL, Warszawa 1983.

Otrzymano 1990.09.21.

OBJAŚNIENIA RYCIN

Ryc. 1. Wątroba płodowa. Barwienie hematoksyliną i eozyną. Grupa kontrolna. Pow. ca 200 × .

Ryc. 2. Wątroba płodowa. Odczyn na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej. Grupa kontrolna. Pow. ca 100 × .

Ryc. 3. Wątroba płodowa. Odczyn na dehydrogenazę mleczanową. Grupa kontrolna. Pow. ca 100 × .

Ryc. 4. Wątroba płodowa. Reakcja na aktywność fosfatazy kwaśnej. Grupa kontrolna. Pow. ca 100 × .

Ryc. 5. Wątroba płodowa. Odczyn na glukozo-6-fosfatazę. Grupa kontrolna. Pow. ca 100 × .

Ryc. 6. Odczyn na dehydrogenazę bursztynianową w wątrobie płodowej. Grupa I doświadczalna. Pow. ca 100 × .

Ryc. 7. Wątroba płodowa. Odczyn na aktywność dehydrogenazy mleczanowej. Grupa I doświadczalna. Pow. ca 100 × .

Ryc. 8. Wątroba płodowa. Odczyn na glukozo-6-fosfatazę. Grupa I doświadczalna. Pow. ca 100 × .

Ryc. 9. Wątroba płodowa. Odczyn na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej. Grupa II doświadczalna. Pow. ca 200 × .

Ryc. 10. Odczyn na dehydrogenazę mleczanową w wątrobie płodowej. Grupa II doświadczalna. Pow. ca 200 × .

Ryc. 11. Reakcja na aktywność fosfatazy kwaśnej w wątrobie płodowej. Grupa II doświadczalna. Pow. ca 200 × .

Ryc. 12. Wątroba płodowa. Odczyn na aktywność glukozo-6-fosfatazy. Grupa II doświadczalna. Pow. ca 200 × .

SUMMARY

Fetal liver was examined in rats, whose mothers during pregnancy received Turinal (firm: Chemical Works of Gedeon Richter LTD Budapest, Hungary) in a dosage of 0.5 mg/kg BW in the experimental group I and 1 mg/kg BW in the experimental group II. Reaction to the activity of succinate dehydrogenase, lactic dehydrogenase, acid phosphatase, glucose-6-phosphatase, PAS-reaction (Periodic acid Schiff reaction) and hematoxylin-eosin staining were carried out. Changes in the activity of examined enzymes and PAS-reaction in fetal liver depending on dosage were observed. These changes testify to a large influence of administered hormone on metabolism of developing fetal liver.

EXPLANATION TO FIGURES

Fig. 1. Fetal liver. Hematoxylin-eosin stained. Control group. Magn. ca 200 × .

Fig. 2. Fetal liver. Reaction to the activity of succinate dehydrogenase. Control group. Magn. ca 100 × .

Fig. 3. Fetal liver. Reaction to lactic dehydrogenase. Control group. Magn. ca 100 × .

Fig. 4. Fetal liver. Reaction to the activity of acid phosphatase. Control group. Magn. ca 100 × .

Fig. 5. Fetal liver. Reaction to glucose-6-phosphatase. Control group. Magn. ca 100 × .

Fig. 6. Reaction to succinate dehydrogenase in fetal liver. Experimental group I. Magn. ca 100 × .

Fig. 7. Fetal liver. Reaction to the activity of lactic dehydrogenase. Experimental group I. Magn. ca 100 × .

Fig. 8. Fetal liver. Reaction to glucose-6-phosphatase. Experimental group I. Magn. ca 100 × .

Fig. 9. Fetal liver. Reaction to the activity of succinate dehydrogenase. Experimental group II. Magn. ca 200 × .

Fig. 10. Reaction to lactic dehydrogenase in fetal liver. Experimental group II. Magn. ca 200 × .

Fig. 11. Reaction to the activity of acid phosphatase in fetal liver. Experimental group II. Magn. ca 200 × .

Fig. 12. Fetal liver. Reaction to the activity of glucose-6-phosphatase. Experimental group II. Magn. ca 200 × .