
Zakład Histologii i Embriologii. Instytut Biologiczno-Morfologiczny.
Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. Józef Staszyc
I Klinika Ginekologii Operacyjnej. Instytut Położnictwa i Chorób Kobiectych.
Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: doc. dr hab. Henryk Żrubek

Tamara MAJSTRUK-MAJEWSKA, Ewa JACH,
Marian SEMCZUK

Odczyny histochemiczne w wątrobie szczura pod wpływem hormonów płciowych i długotrwałej intoksykacji alkoholowej

Гистохимические реакции в печени крысы под влиянием половых гормонов и продолжительной алкогольной интоксикации

Histochemical Responses in the Rat Liver due to Administration of Sex Hormones and to Long-term Alcohol Intoxication

Dzięki wielokierunkowym funkcjom biologicznym i różnorodności budowy, hormony sterydowe wywierają specyficzne działanie na metabolizm wewnątrzkomórkowy wątroby. Wykazano między innymi, że testosteron wywołuje w hepatocytach zwierząt doświadczalnych wzrost aktywności wielu enzymów, a estrogeny wpływają na metabolizm RNA, lipidów i glikogenu (2, 5, 6, 7, 15). Przewlekła intoksykacja alkoholowa zaburza, jak wiadomo, strukturę i funkcję wielu narządów wewnętrznych — szczególnie wątroby, uszkodzenie więc tego narządu jest najczęstszą przyczyną zaburzeń w transporcie i magazynowaniu hormonów.

Obecne badania są kontynuacją pracy nad wpływem hormonów płciowych oraz etanolu na układ rozrodczy męski zwierząt doświadczalnych (9, 10, 11) i dotyczą przebadania histochemicznego mięszu wątroby dojrziałych płciowo szczurów-samców, u których przez podanie stilbestrolu wywoływano regresję nabłonka plemnikotwórczego, a następnie podawaniem testosteronu przywracano spermatogenezę, jak również zachowania się wątroby po podawaniu wymienionych hormonów i alkoholu etylowego.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 48 szczurach samcach szczepu Wistar w wieku 3—4 mies. i początkowym c.c. 150—200 g. Podzielono je na trzy grupy: dwie doświad-

czalne i jedną kontrolną. Zwierzętom grupy I doświadczalnej podawano drogą iniekcji dootrzewnowej dwa razy w tygodniu po 1 mg dwupropionianu stilbestrolu oraz codziennie po 3 mg propionianu testosteronu. Zwierzęta grupy II doświadczalnej, oprócz wymienionych wyżej hormonów, otrzymywały codziennie na czczo sondą dożołądkowo alkohol etylowy w dawce 3 g/kg c.c. Grupie kontrolnej podawano wodę destylowaną.

Po 102 dniach trwania doświadczenia (tzn. po ok. 8 cyklach nabłonka plemnikotwórczego) zwierzęta uśmiercano drogą dekapitacji, pobierając między innymi wątrobę do badań histologicznych (metoda barwienia hematoksyliną i eozyną oraz metoda Massona) i histochemicznych. Materiał utrwalano w płynie Carnoya oraz w płynie Bakera. Wykonano następujące testy histochemiczne: fosfatazę kwaśną (Fk) wykrywano według metody Gomoriego, adenozynotrójfosfatazę (ATP-azę) według metody Wachsteina i Meisel, glukozo-6-fosfatazę (G-6-P) metodą według Pearse'a, glikogen metodą PAS z kontrolnym trawieniem diastazą, RNA — według metody Bracheta.

WYNIKI

Grupa I doświadczalna

Standardowe barwienie wykazało, że w porównaniu z obrazem kontrolnym, w mięszu wątrobowym tej grupy zwierząt uwidoczniły się szerokie pasma tkanki łącznej wiotkiej, rozlewiska krwi oraz znaczna ilość powiększonych hepatocytów. Te ostatnie leżały bądź samotnie, bądź tworzyły skupiska.

Odczyn na Fk był znacznie zwiększony, choć podobnie jak u zwierząt kontrolnych lokalizował się w postaci drobnych ziarnistości przy kanalikach żółciowych; wystąpił ponadto w cytoplazmie odczyn dyfuzyjny. Silniejszą reakcję wykazywały również komórki gwiazdziste (ryc. 1).

Aktywność ATP-azy okazała się słabsza niż w wątrobie kontrolnej, ujawniając się przy sinusoidach i kanalikach żółciowych (ryc. 3 i 4).

G-6-P wykazywała nieco inną lokalizację dodatnich ziarnistości w porównaniu z kontrolą, reakcja bowiem występowała równomiernie w całym zraziku wątrobowym i tylko nieliczne zraziki przypominały obraz prawidłowy, tj. zwiększoną aktywność w strefie obwodowej. W cytoplazmie hepatocytów natomiast więcej było aktywnych ziarnistości w rejonach przy kanalikach żółciowych (ryc. 5).

Intensywna reakcja PAS dodatnia występowała na terenie całych zrazików wątrobowych, a tylko nieliczne komórki wykazywały odczyn dyfuzyjny (ryc. 7). Brak było charakterystycznej mozaiki w układzie ziaren glikogenu w zrazikach. Obserwowano też dość duże obszary ze znaczną ilością ziaren PAN dodatnich, w których granice między komórkami nie były widoczne.

RNA występował w hepatocytach tej grupy zwierząt w postaci ziaren i blaszek ułożonych głównie w pobliżu jąder komórkowych, ryc. 9 (w preparatach kontrolnych uwidaczniał się w całej cytoplazmie). Jądra komórkowe były powiększone z silnie wybarwionymi jąderkami, których ilość zwiększyła się w porównaniu z obrazem kontrolnym. W strefach obwodowych zrazików odczyn na RNA był nieco silniejszy niż w pozostałych strefach.

Grupa II doświadczalna

Barwienie histologiczne wykazało, że, oprócz zmian zauważonych w preparatach poprzedniej grupy doświadczalnej, w żyłach środkowych zrazików występowało duże nagromadzenie limfocytów.

Aktywność Fk była nieco słabsza niż w grupie I doświadczalnej i lokalizowała się na terenie całej cytoplazmy hepatocytów. Intensywną reakcję natomiast wykazywały komórki gwiaździste (ryc. 2).

Odczyn na ATP-azę był bardzo słaby, podobny do grupy I doświadczalnej, natomiast na G-6-P silniejszy niż w grupie kontrolnej i grupie I doświadczalnej. Enzym ten wykrywany był głównie w hepatocytach leżących przy przestrzeniach bramnych i strefach obwodowych zrazików. Na terenie komórek aktywne ziarnistości występowały bądź równomiernie w całej cytoplazmie, bądź w pobliżu kanalików żółciowych (ryc. 6).

Reakcja PAS okazała się silna i zlokalizowana podobnie jak w grupie kontrolnej, w pobliżu żył środkowych. Oprócz komórek zawierających dużo barwnych ziarnistości, występowały również ziarnistości z odczynem dyfuzyjnym. Podobnie jak w grupie poprzedniej, w mięszu wątroby spotykano obszary bezkomórkowe, w których jednak było wiele ziaren PAS pozytywnych (ryc. 8).

Aktywność RNA w grupie tej (podobnie jak w grupie I doświadczalnej) była mocniejsza w komórkach strefy obwodowej zrazików. Barwne ziarna i blaszki układały się wokół jąder komórkowych lub przy błonach komórkowych. Jądra wykazywały zatartą strukturę, ale jąderka były silnie zabarwione. W naczyniach zatokowych obserwowano dużo komórek tkanki łącznej — prawdopodobnie plazmatycznych, których cytoplazma wykazywała silną pironinochłonność.

DYSKUSJA I WNIOSKI

Wprowadzenie do organizmu hormonów płciowych prowadzi do zaburzeń w prawidłowej czynności wydzielniczej gruczołów dokrewnych i korelacji między nimi (5, 6). Poznanie więc mechanizmu ich działania po-

siada doniosłe znaczenie, czego dowodem jest wiele publikacji poświęconych temu zagadnieniu (3, 13 i in.).

Wiadomo z piśmiennictwa (7 i in.), że estrogeny syntetyczne mogą wzmacniać sekrecję hormonów przez korę nadnerczy, a testosteron — może hamować produkcję kortykosteronu. Oczywiście, efekty te uzależnione są od dawki leku, czasu podawania i płci. Nie jest jasny dotąd wpływ etanolu na metabolizm hormonów sterydowych (7, 8). Według Stiasnej i wsp. (14), niektóre siarczany sterydów stanowiącą mogą pulę, z której pod wpływem alkoholu uwalniane są hormony biologicznie aktywne, działające jako inhibitory enzymów wątrobowych, uczestniczących w metabolizmie wolnych sterydów. Natomiast kortykosteron, będący aktywnym regulatorem metabolizmu lipidów i węglowodanów, spełnia prawdopodobnie rolę pośrednika w niektórych toksycznych efektach etanolu na terenie komórek wątrobowych.

Otrzymane wyniki świadczą, że hormony sterydowe, zarówno stilbestrol, jak i testosteron, a także podawany równocześnie etanol, powodują w wątrobie zwierząt doświadczalnych zauważalne zmiany histologiczne i histochemiczne.

Po 102 dniach podawania hormonów zwiększyła się w wątrobie ilość tkanki łącznej wiotkiej, spotykano również powiększone hepatocyty, a po podawaniu alkoholu — wiele limfocytów.

Odczyn na Fk, silniejszy od kontrolnego w obu grupach doświadczalnych, świadczyć może o zwiększonym zapotrzebowaniu na hydrolazy w komórkach wątrobowych.

ATP-aza, enzym zaangażowany w transporcie przez błony komórkowe, zmniejszyła swą aktywność w obu grupach doświadczalnych. Mimo danych z piśmiennictwa (4) mówiących, że etanol wywiera hamujący wpływ na czynność ATP-azy, aktywność jej nie uległa zmianie w porównaniu z grupą I doświadczalną.

Zmiany w odczynie na G-6-P nie były duże, zmieniła się raczej lokalizacja enzymu na terenie zrazików wątrobowych, co zgodne jest z danymi Shula i wsp. (12).

Największe zaburzenia zaobserwowano w reakcji PAS na glikogen. Według niektórych autorów (5, 6) po stilbestrolu i testosteronie zmniejsza się ilość glikogenu w wątrobie. W naszych doświadczeniach natomiast ilość glikogenu wzrastała, co z kolei zgodne było z danymi Miętkiego (wg 5). Wzmoczone wydzielanie ACTH przez przysadkę i glikoproteidów przez korę nadnerczy powoduje pobudzenie odczynu na glikogen w wątrobie. Należy zaznaczyć, że w równoległe badanych przysadkach mózgowych zauważono znacznie więcej komórek β niż w kontrolnych, a więc więcej wydzielilo się ACTH. Etanol, działając bezpośrednio na metabolizm wątroby, upośledza syntezę glikogenu (1), jednak w na-

szych doświadczeniach szczególnych różnic w porównaniu z grupą I doświadczalną nie zauważono.

Aktywność RNA zwiększyła się w obu badanych grupach. Estrogeny, jak podaje Bochińska (2), wpływają na wzrost aktywności RNA, poziom DNA natomiast ulega zredukowaniu. Badania autoradiograficzne tej autorunki wykazały, że hormony sterydowe gromadzą się głównie w chromosomach, które ulegają jakby „rozpulchnieniu” — następuje w nich bowiem rozluźnienie wiązań. Spadek aktywności DNA w naszych badaniach można by tłumaczyć właśnie tym zjawiskiem.

Należy zaznaczyć, że pomnożenie zarówno ilości komórek gwiazdzistych, jak i plazmatycznych w badanym narządzie sugeruje, że podawane hormony wywierają także wpływ na tkankę łączną.

Jak widać z powyższych danych, zagadnienie wpływu stilbestrolu, testosteronu oraz wraz z nimi alkoholu etylowego jest bardzo złożone. Wydaje się jednak, że podawany alkohol nie potęgował zaistniałych w mięszu wątrobowym zmian po lekach hormonalnych.

PIŚMIENNICTWO

1. Barry H., Wallgeren H.: *Actions of Alcohol*. Elsevier Publ. Comp. Amsterdam 1970.
2. Bochińska K.: Wpływ hormonów sterydowych, a szczególnie estrogenów na syntezę kwasów nukleinowych. *Wiad. Lek.* **21**, 13, 1968.
3. Filipiak B. i wsp.: Stężenie białek wiążących androgeny w gonadzie szczura traktowanego estrogenami i testosteronem. *Endokr. Pol.* **30**, 265, 1979.
4. Israel R. i wsp.: Effect of Ethanol on Na, K, Mg-stimulated Microsomal ATP-ase Activity. *Biochem. Pharmacol.* **14**, 1803, 1965.
5. Limanowski A., Brzeziński R.: Wpływ gonadektomii i testosteronu na stan niektórych odczynów histochemicznych w wątrobie szczura. *Endokr. Pol.* **27**, 387, 1966.
6. Limanowski A., Brzeziński R.: Wpływ dwupropionianu stilbestrolu na niektóre reakcje histochemiczne w wątrobie szczura samca. *Folia Morph.* **25**, 523, 1966.
7. Małolepszy E., Małolepszy A.: Rola wątroby w metabolizmie hormonów. *Wiad. Lek.* **21**, 13, 1968.
8. Rubin E., Lieber C. S.: Early Fine Structural Changes in the Human Liver Induced by Alcohol. *Gastroenter.* **52**, 1, 1967.
9. Semczuk M., Majewska T., Jach E.: Wpływ intoksykacji alkoholowej na stan morfologiczny jądra białego po podaniu estrogenów, testosteronu i gonadotropiny. *Gin. Pol.* **51**, 1063, 1980.
10. Semczuk M., Majewska T., Jach E.: Wpływ alkoholu etylowego na stan morfologiczny dodatkowych gruczołów płciowych szczura białego traktowanego estrogenami, testosteronem i gonadotropiną. *Pat. Pol.* **32**, 53, 1981.
11. Semczuk M., Majewska T.: Wpływ intoksykacji alkoholowej na stan morfologiczny gonady szczura białego traktowanego estrogenami, testosteronem i gonadotropiną. *Endokr. Pol.* **22**, 79, 1981.

12. Shul K., Bautiste E.: Glucose-6-Phosphatase Activities in Normal and in Testosterone-Treated Rats. *Endocrin.* **70**, 842, 1962.
13. Składziński J., Beskid M.: Combined Action of Pyrazole and Ethanol on a Rat Liver: Histochemical and Ultrastructural Study. *Folia Histochem. Cytochem.* **16**, 13, 1978.
14. Stiasna I. i wsp.: Metabolizm alkoholu etylowego w wątrobie. *Post. Bioch.* **26**, 29, 1980.
15. Żak T.: Wpływ glikokortykosterydów, androgenów i estrogenów na aktywność utajoną karbamoiltransferazy asparaginowej (EC 2.1.3.2.) w wątrobie wołu. *Endokr. Pol.* **21**, 341, 1970.

Otrzymano 29 IX 1982.

OBJAŚNIENIA RYCIŃ

Ryc. 1. Aktywność Fk w wątrobie szczura grupy I doświadczalnej. Metoda Gomoriego. Pow. ok. 400X.

Ryc. 2. Aktywność Fk w wątrobie szczura grupy II doświadczalnej. Metoda Gomoriego. Pow. ok. 200X.

Ryc. 3. Aktywność ATP-azy w wątrobie szczura kontrolnego. Metoda Wachsteina i Meisel. Pow. ok. 400X.

Ryc. 4. Aktywność ATP-azy w wątrobie szczura grupy I doświadczalnej. Metoda Wachsteina i Meisel. Pow. ok. 400X.

Ryc. 5. Aktywność G-6-P w wątrobie szczura grupy I doświadczalnej. Metoda według Pearse'a. Pow. ok. 200X.

Ryc. 6. Aktywność G-6-P w wątrobie szczura grupy II doświadczalnej. Metoda według Pearse'a. Pow. ok. 200X.

Ryc. 7. Wątroba szczura grupy I doświadczalnej. Odczyn na glikogen według metody McManusa. Pow. ok. 400X.

Ryc. 8. Wątroba szczura grupy II doświadczalnej. Odczyn na glikogen według metody McManusa. Pow. ok. 200X.

Ryc. 9. Wątroba szczura grupy I doświadczalnej. Metoda Bracheta. Pow. ok. 400X.

Р Э З Ю М Е

Крысы (самцы) получали половой гормон (дипропиониан стильбестрола и тестостерона), а также половой гормон и этиловый спирт. По истечении 102 дня были взяты вырезки печени и гистологически исследованы методом гематоксилина и эозина. Проведено также гистохимические исследования, определяя активность кислой фосфатазы, аденозинотрифосфатазы, глюкозо-6-фосфатазы, а также гликогена и нуклеиновых кислот. Исследования показали, что слабую активность по сравнению с контрольной группой проявляла аденозинотрифосфатаза. Реакции остальных энзимов были усиленные. Продолжительное применение алкоголя не увеличивало выступающих изменений.

SUMMARY

Male rats were given sex hormones (stilbestrol dipropionate and testosterone dipropionate) and sex hormones plus ethyl alcohol. After 102 days liver samples were taken for histological examinations by the hematoxylin and eosin method. The liver samples were also examined to detect acid phosphatase, adenosine triphosphatase, glucose-6-phosphatase activities, the presence of glycogen and of nucleic acids. The examinations showed that adenosine triphosphatase activity was weaker when compared with that in the control group. The responses of other enzymes were increased. Long-term alcohol administration did not increase the changes already produced.

EXPLANATION TO FIGURES

Fig. 1. Acid phosphatase activity in the rat liver, experimental group I. Gomori's method. Magn. 400X.

Fig. 2. Acid phosphatase activity in the rat liver, experimental group II. Gomori's method. Magn. 200X.

Fig. 3. Adenosine triphosphatase activity in the rat liver of control group. Wachstein and Meisel's method. Magn. 400X.

Fig. 4. Adenosine triphosphatase activity in the rat liver, experimental group I. Wachstein and Meisel's method. Magn. 400X.

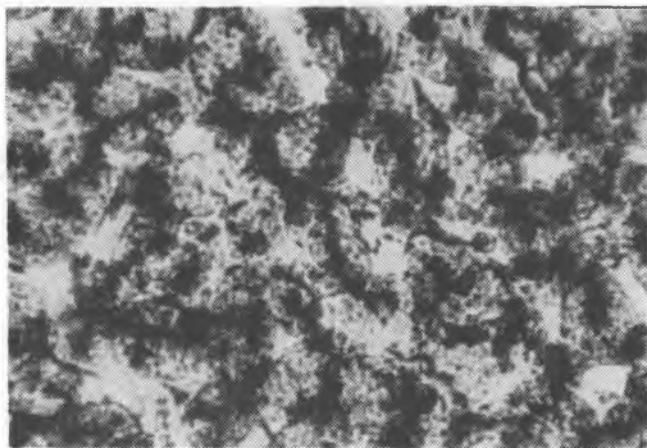
Fig. 5. Glucose-6-phosphatase activity in the rat liver, experimental group I. Pearse's method. Magn. 200X.

Fig. 6. Glucose-6-phosphatase activity in the rat liver, experimental group II. Pearse's method. Magn. 200X.

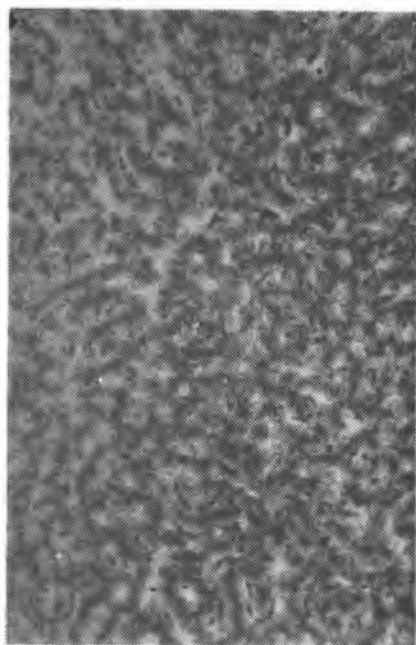
Fig. 7. A rat liver of the experimental group I. Reaction to glycogen by McManus. Magn. 400X.

Fig. 8. A rat liver of the experimental group II. Reaction to glycogen by McManus. Magn. 200X.

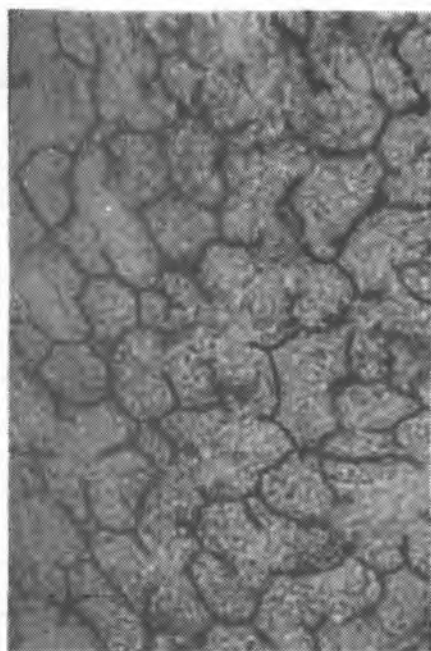
Fig. 9. A rat liver of the experimental group I. Brachet's method. Magn. 400X.



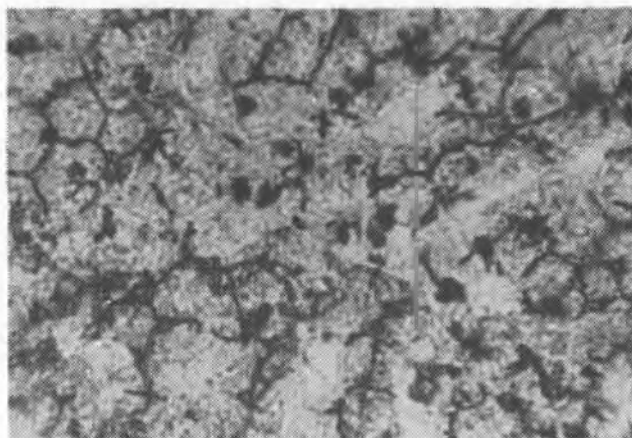
Ryc. 1



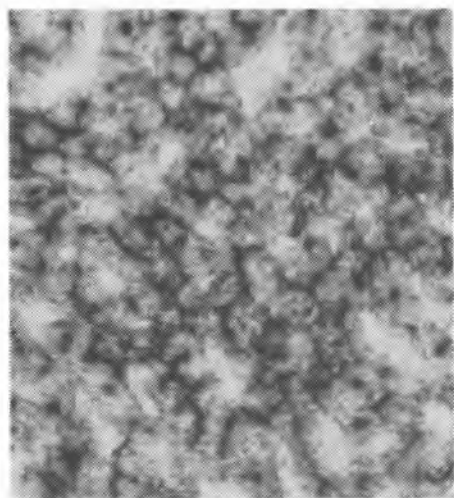
Ryc. 2



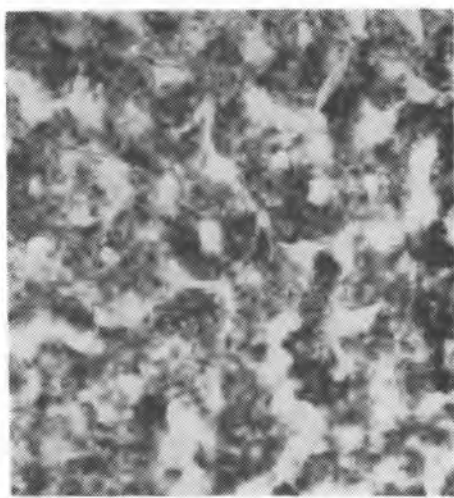
Ryc. 3



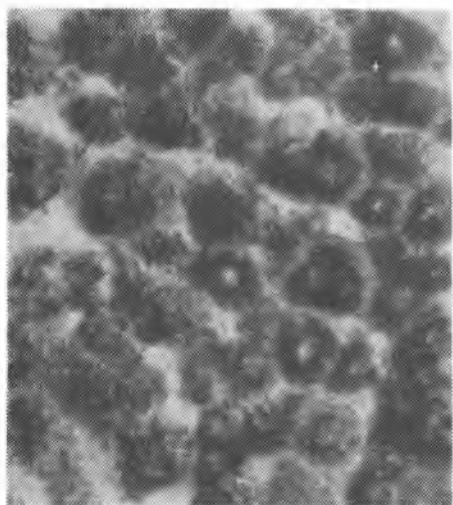
Ryc. 4



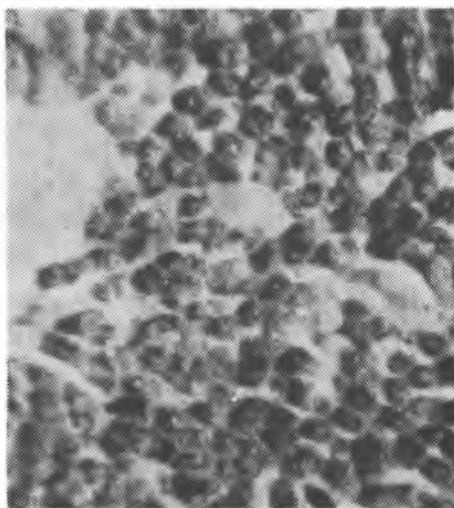
Ryc. 5



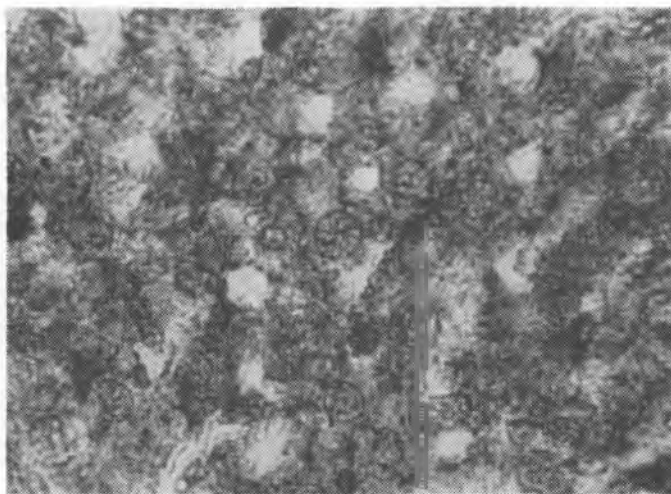
Ryc. 6



Ryc. 7



Ryc. 8



Ryc 9

