

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XVII, 20

SECTIO D

1962

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii. Wydział Lekarski.
Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr med. Stanisław Grzycki

Grażyna RZESZOWSKA

Histochemiczne badania nad kwaśnymi mukopolisacharydami w nabłonku i gruczołach błony śluzowej macicy szczurów białych w warunkach doświadczalnych

Гистохимические исследования над кислыми мукополисахаридами в эпителии и железах слизистой оболочки матки белых крыс в опытных условиях

Histochemical Investigation on Acid Mucopolysaccharides in the Epithelium and Glands of the Uterus Mucosa of White Rats under Experimental Conditions

Grabowska (1960) i Kozdrój (1960) omawiając ogólnie biochemię mukopolisacharydów, szeroko rozpowszechnionych w tkankach zwierzęcych, zwrócili uwagę na trudności poznania metabolizmu tych związków, polegające głównie na wielkocząsteczkowym ich charakterze, oraz na możliwości tworzenia związków kompleksowych z białkami, które są mało rozpuszczalne w wodzie. Biochemia jednak w porównaniu z histochemią rozporządza dokładnymi metodami oznaczania tego typu związków. Nad wykrywaniem i różnicowaniem kwaśnych mukopolisacharydów w tkankach toczą się jednak nadal dyskusje, przy czym istnieje szereg sprzecznych zdań dotyczących wartości współcześnie stosowanych odczynów histochemicznych.

Steedman w r. 1950 podał metodę wykrywania kwaśnych mukopolisacharydów, stosując Alcian blue 8GS, zawierający ftalocyjaninę w połączeniu z miedzią. Zasadowość tego barwnika, jak również zdolność tworzenia trwałych połączeń z substratem stanowią o jego użyteczności przy wykrywaniu nawet niewielkiej ilości kwaśnych mukopolisacharydów. W r. 1957 Pioch wprowadził do techniki histologicznej barwnik o jeszcze silniejszych własnościach zasadowych niż Alcian blue, nazwany przez producenta Astrablau. Według Piocha jest on prawdopodobnie najbardziej wybiórczym dla kwaśnych mukopolisacharydów, ale przy zachowaniu odpowiednich warunków barwienia (stężenie i pH barwnika). Astrablau nie barwi lipidów, kwasów nukleinowych oraz substancji ujętych w grupę

się po zastosowaniu próby ślinowej. Acetylacja i metylacja wywołała minimalne odchylenie w kierunku osłabienia odczynu PAS. Na uwagę zasługiwała dobrze widoczna PAS dodatnia błona podstawowa nabłonka (ryc. 2). Hialuronidaza jądrowa powodowała zupełne zniknięcie niebieskiego zabarwienia górnego rąbka nabłonka, pozostawiając gdzieś tam maleńkie niebieskie wysepki. Metoda kombinowana PAS-Astrablau wykazywała znaczną przewagę metody PAS przy nikłym niebieskim zabarwieniu niektórych miejsc rąbka nabłonkowego.

Grupa doświadczalna I.

Dwudziestu kastrowanym samicom szczurów białych podawano domięśniowo 1,2 μ g benzoesanu oestradiolu. Materiał do badań pobierano po 12, 24, 48, 72, 96 godzinach od chwili wykonania iniekcji.

Odczyn histochemiczny komórek barwionych błękitem alcjanowym i Astrablau po upływie 12 i 24 godzin był nieco intensywniejszy w porównaniu z grupą kontrolną. Po 12 godzinach wartość ekstynkcji wyrażała się liczbą 1,37, a po 24 godzinach 1,39, czyli praktycznie można powiedzieć, że te dwie podgrupy doświadczalne minimalnie różniły się od siebie. Nie można było dopatrzeć się różnic pomiędzy odczynami barwnymi grupy kontrolnej, a omawianych grup doświadczalnych po zastosowaniu metody Müllera reakcji PAS, metachromazji, prób kontrolnych do tych metod i trawienia hialuronidazą jądrową.

Po upływie 48 godzin wystąpiła wyraźna różnica w odczynach barwnych w porównaniu z podgrupami poprzednimi (12 i 24 godz.). Błękit alcjanowy i Astrablau dawał bardzo podobne obrazy do kontrolnych, a zatem obserwowano intensywne zabarwienie górnych obszarów cytoplazmy komórek nabłonka rogów i szyjki macicy. W gruczołach wszystkie komórki posiadały słabszy lub silniejszy odczyn barwny. Odczyny barwne występujące w szczytowych częściach komórek nabłonka, występowały pod postacią grubych, niebieskich ziarenek (ryc. 3). Reakcja barwna uzyskana wg metody Müllera była znacznie intensywniejsza (ryc. 4). Ekstynkcja po 48 godzinach wynosiła 1,47. Nikły ślad metachromazji γ wystąpił najwyraźniej przy pH 6,4 i 7,8 w rąbku niektórych komórek nabłonka i gruczołów. Reakcja PAS była nieco słabsza w porównaniu z wynikami po 24 godzinach w komórkach nabłonka i gruczołów, natomiast błona podstawowa nabłonka była nadal PAS dodatnia. Po 72 godzinach można było obserwować spadek intensywności zabarwienia w komórkach nabłonka i gruczołów po zastosowaniu błękitu alcjanowego i Astrablau, natomiast wyniki barwienia wg metody Müllera nie pozwoliły zauważyć różnic w porównaniu z podgrupami poprzednimi. Fakt ten może świadczyć o większej specy-

ficzności odczynów z błękitem alcjanowym i Astrablau na kwaśne mukopolisacharydy. Ekstynkcja po 72 godzinach równała się 1,42. Śladowa metachromazja γ widoczna po 48 godzinach, po 72 godzinach znikła; można ją było zauważyć tylko w nielicznych komórkach nabłonka i gruczołów. Reakcja PAS pozostała bez zmian.

Po upływie 96 godzin dał się zauważyć dalszy spadek stężenia kwaśnych mukopolisacharydów, o czym świadczyły odczyny barwne jak i wartość ekstynkcji wynoszącej 1,36.

Dawka 1,2 μg podawanego hormonu w żadnej podgrupie nie wywołała rui. Po 72 godzinach w rozmazie pochwowym można było zauważyć liczne komórki płaskie i wieloboczne, a tylko kilka komórek zrogowaciałych. Można było również stwierdzić, że zabarwione substancje były wrażliwe na hialuronidazę jądrową, prawdopodobnie więc stanowiły one mieszaninę kwaśnych mukopolisacharydów.

Grupa doświadczalna II.

Zwierzęta drugiej grupy doświadczalnej otrzymały domięśniowo 2,5 μg benzoesanu oestradiolu czyli najmniejszą dawkę wywołującą ruję u kastrowanej samicy po upływie 72 godzin od chwili podania hormonu. Wystąpienie rui potwierdzono przy pomocy rozmazów pochwoowych, w których komórki zrogowaciałe pokrywały całe pole widzenia.

Już po 12 godzinach w preparatach barwionych błękitem alcjanowym i Astrablau można było obserwować intensywne zabarwienie górnego rąbka cytoplazmy komórek nabłonka rogów i szyjki macicy (ryc. 5). W gruczołach nie wszystkie komórki dawały jednakowo nasilony odczyn barwny, a można było również znaleźć komórki zupełnie nie zabarwione. Metoda Müllera, podobnie zresztą jak w opisywanych grupach poprzednich, dawała intensywniejsze zabarwienie niż błękit alcjanowy i Astrablau. Wartość ekstynkcji po 12 godzinach wynosiła 2,08. Reakcja PAS w nabłonku i gruczołach wypadła słabo dodatnio. Kontrola po acetylowaniu skrawków była ujemna, natomiast po acetylowaniu i zmydłaniu — dodatnia. W nielicznych komórkach gruczołowych obserwowano ślady metachromazji γ .

Ocena mikroskopowa preparatów po 24 godzinach pozwoliła stwierdzić znikome różnice w porównaniu z podgrupą poprzednią, natomiast wartość ekstynkcji nieco wzrosła, wynosiła 2,15.

Po 48 godzinach, stosując opisywane metody barwienia, dało się zauważyć największe nagromadzenie kwaśnych mukopolisacharydów rozmieszczonych w prawie całej komórce, a najbardziej w rąbku nadłonkowym, zarówno komórek nabłonka, jak i gruczołów rogów i szyjki macicy (ryc. 6). Zabarwienie metachromatyczne (metachromazja γ) wy-

obojętnych mukopolisacharydów. Używana również metoda żelazowa Hale, polega na odłożeniu koloidalnego żelaza na kwaśnej cząsteczce mukopolisacharydu i na wtórnym jego uwidocznieniu przez wytrącenie osadu błękitu pruskiego. W r. 1955 Müller opracował modyfikację tej metody i ta znalazła szerokie zastosowanie w badaniach histochemicznych.

Do głównie obecnie stosowanych metod należy barwienie fuksyną aldehydową Gomoriego i metachromazja (Lison (1953), Pearse (1957), Schubert i Hammerman (1956)). Krygier (1956) wspomina także o możliwości ilościowego oznaczania kwaśnych mukopolisacharydów na cytofotometrze. Autorka zastrzega, że pomiary te są dokładną metodą porównawczą względnych poziomów badanych składników komórki. Winogradow (1962), Fasske (1957), Godlewski (1960) oraz Zugibe i Brown (1960) jednak oceniając metodykę używaną do wykrywania kwaśnych mukopolisacharydów wyrazili pogląd, że najważniejsze jest równoległe stosowanie kilku metod.

Współczesna histochemia mukopolisacharydów, posługuje się różnymi metodami postępowania laboratoryjnego, pozwala na przeanalizowanie tych związków w tkankach zwierzęcych prawidłowych, chorobowo zmienionych i pozostających pod wpływem różnych czynników farmakologicznych, przede wszystkim hormonów płciowych. Wpływ tych ostatnich na występowanie, umiejscowienie i zachowanie się mukopolisacharydów w komórkach nabłonka i gruczołów błony śluzowej macicy, jakoteż próby ilościowego oznaczania ich przy pomocy cytofotometru oraz analizy statystycznej — umożliwiły przeprowadzenie dokładniejszych obserwacji i wyjaśnienie analizowanego zagadnienia.

MATERIAŁ I METODY

Obserwacje dotyczyły nabłonka i gruczołów błony śluzowej macicy 67 kastrowanych samic szczurów białych (*Rattus rattus* L. *albino*) z własnej, wsobnej 10-letniej hodowli i 17 kastrowanych *Wistar* wagi od 170—200 g.

Doświadczenia rozpoczynano w 4—5 tygodniu po obustronnym usunięciu jajników, sprawdzwszy uprzednio metodą rozmazów pochwoowych czy zwierzęta, znajdując się w stanie spoczynku płożowego. Rozmazy pochwoowe utrwalano w mieszaninie eteru i alkoholu bezwodnego w stosunku objętościowym 1:1, następnie barwiono hematoksyliną Ehrlicha i eozyną. Zwierzętom doświadczalnym podawano jednorazowo, domięśniowo benzoesan oestradiolu produkcji Warszawskich Zakładów Farmaceutycznych. Na podstawie rozmazów pochwoowych ustalono, że 2,5 µg benzoesanu oestradiolu jest najmniejszą dawką, wywołującą ruję u kastrowanych samic wagi ok. 200 g po upływie 72 godz.

Zwierzęta podzielono na pięć grup, z których pierwsza stanowiła grupę kontrolną (4 szczury), a inne — grupy doświadczalne po 20 szczurów w każdej. Pierwsza grupa doświadczalna otrzymała 1,2 µg benzoesanu oestradiolu, druga 2,5 µg, trzecia 5 µg, a czwarta 10 µg.

Materiał do badań pobierany od czterech samic z każdej grupy doświadczalnej po 12, 24, 48, 72, 96 godz., utrwalano w mieszaninie alkoholu 95% i formolu obojętnego w stosunku objętościowym 9:1, oraz w płynie Gendre. Skrawki mikrotomowe grubości 4—5 µ barwiono przeglądowo hematoksyliną i eozyną, według metody PAS, według metody Müllera, błękitem alcjanowym według Steedmana, Astrablau według Piocha, metachromatycznie błękitem toluidyny przy pH 4,4, 5,4, 6,4, 7,8 w buforach fosforanowych. Wykonywano również metody

kombinowane PAS-Alcian blue i PAS-Astrablau. Jako próby kontrolne stosowano próbę ślinową, acetylowanie i zmydlanie skrawków oraz metylowanie. Również w celach kontrolnych skrawki poddawano trawieniu w hialuronidazie jądrowej produkcji Warsz. Wytwórni Surowic i Szczepionek — 300 j. hialuronidazy na 1 ml buforu Sørensen'a o pH 6. Do oznaczeń stężenia kwaśnych mukopolisacharydów w nabłonku rogów i szyjki macicy wybrano skrawki jednakowej grubości barwione Astrablau i użyto mikrofotometru II C. Zeiss (Jena) przy zachowaniu stałej wielkości szczeliny. Wartość ekstynkcji obliczano wg wzoru Sandrittera. Otrzymane wartości sprawdzono rachunkiem statystycznym, w którym zastosowano test F, test Studenta i test von Neumanna. Analizując krzywe obrazujące wpływ dawki i czasu na otrzymane wyniki zastosowano krzywą Mitscherlicha o równaniu:

$$\gamma = \alpha (1 - e^{-K(\chi + \xi)})$$

gdzie γ oznacza mierzony efekt, X = dawka, zaś parametry α , K i ξ równały się: α = maksymalnej możliwości reakcji, K = współczynnikowi charakteryzującemu szybkość reakcji przy wzroście dawki, a ξ = fizjologicznemu stężeniu preparatu tego lub innego o działaniu podobnym. Parametry K dla różnych czasów doświadczenia wyznaczono z równości:

$$\frac{y_3 - y}{y_2 - y_0} = e^{-KX_0} \cdot \frac{e^{-6KX_0} - 1}{e^{3X_0} - 1} = a$$

co pozwoliło na rozwiązanie równania czwartego stopnia:

$$z^4 + z - a = 0, \text{ gdzie } z = e^{-KX_0}$$

BADANIA WŁASNE

Grupa kontrolna

Barwienie hematoksyliną pozwoliło obserwować u szczurów kastrowanych zmiany spowodowane brakiem hormonów jajnikowych, wyrażające się nieznacznym uwstecznieniem błony śluzowej macicy. Zastosowanie błękitu alcyanowego spowodowało bladoniebieskie zabarwienie bardzo wąskiego, górnego obrzeża cytoplazmy komórek nabłonka rogów i szyjki macicy, oraz nielicznych komórek gruczołowych. Stężenie substancji będącej prawdopodobnie kwaśnymi mukopolisacharydami przedstawiało wartość ekstynkcji 1,02 (ryc. 1). Metoda żelazowa wg Müller'a wykazała nieco większy obszar i natężenie barwy niebieskiej, co mogło wskazywać na mniejszą jej specyficzność.

Nie zauważono wystąpienia metachromazji γ , a brak jej nie świadczył o nieobecności kwaśnych mukopolisacharydów, ponieważ bardzo istotnym warunkiem powstania metachromatycznego zabarwienia jest odpowiednie stężenie substancji chromotropowej, stopień jej jonizacji i dysocjacji. Reakcja PAS była dodatnia w komórkach nabłonka i w niektórych gruczołach rogów i szyjki macicy. Odczyn ten wyraźnie osłabił

stąpiło w tej podgrupie wyraźniej w gruczołach. Barwienie kombinowane PAS-Astrablau wykazało znaczną przewagę odczynu z barwnikiem Astrablau zarówno w nabłonku, jak i w gruczołach. Przy zastosowaniu metody PAS-Müller wystąpiło tylko zabarwienie intensywnie niebieskie, a nie można się było doszukać nawet śladów reakcji PAS. Hialuronidaza jądrowa powodowała znaczne zmniejszenie ilości, a nawet zupełny brak substancji barwiącej się na niebiesko. Ekstynkcja w tej podgrupie doświadczalnej osiągnęła liczbę 2,83, najwyższą z dotychczas uzyskanych.

Po 72 godzinach czyli w okresie rui, ekstynkcja wynosiła 2,79 co może być wyrazem minimalnego spadku poziomu kwaśnych mukopolisacharydów. Odczyny barwne zachowywały się podobnie jak w grupie poprzedniej. Wyraźne jednak zmniejszenie się ilości kwaśnych mukopolisacharydów wystąpiło po upływie 96 godzin zarówno w komórkach nabłonka rogów, jak i szyjki macicy, przy czym nie wszystkie komórki dawały odczyn barwny (ryc. 7). Ślady metachromazji γ dostrzegano się w bardzo nielicznych komórkach gruczolowych.

Grupa doświadczalna III i IV

Kastrowanym samicom grupy trzeciej podano domięśniowo 5 μ g, a grupy czwartej 10 μ g benzoesanu oestradiolu. Grupy te zestawiono wspólnie, ponieważ zarówno uzyskane wyniki odczynów barwnych jak i pomiary cytofotometryczne wykazały szereg podobieństw. Jak wydaje się jednak podwójne i poczwórne dawki hormonów w stosunku do dawki rujowej nie powodują już znamiennych różnic w zachowaniu się kwaśnych mukopolisacharydów. Po 12 godzinach w trzeciej grupie doświadczalnej wartość ekstynkcji wynosiła 2,13, a w czwartej natomiast 2,10. Po zabarwieniu błękitem alcjanowym i Astrablau obserwowano istnienie wyraźnego rąbka w komórkach nabłonka rogów i szyjki oraz gruczołów macicy (ryc. 8). Podobnie jak w grupach poprzednich barwienie według metody Müllera, umożliwiło wykazanie intensywniejszego niebieskiego zabarwienia nie ograniczającego się tylko do rąbka, ale i do przypodstawnej cytoplazmy komórek nabłonka. Reakcja PAS wypadła słabo dodatnio, wyraźnie zaznaczona była błona podstawowa nabłonka.

Po 24 godzinach stężenia kwaśnych mukopolisacharydów zwiększyły się, uzyskując w grupie trzeciej wartość ekstynkcji 2,23, a 2,25 w grupie czwartej. Po zabarwieniu skrawków barwnikiem Astrablau obserwowano się gruby rąbek w komórkach nabłonka i gruczołów macicy (ryc. 9).

Największe stężenie kwaśnych mukopolisacharydów dało się zauważyć w obydwu opisywanych grupach po upływie 48 godzin. Intensywny odczyn barwny zajmował około $\frac{2}{3}$ górnych części komórek nabłonka, natomiast w gruczołach dotyczył $\frac{1}{3}$ górnej części komórki (ryc. 10 i 11).

Kombinowane metody barwne PAS-Astrablau i PAS błękit alcjanyowy wykazały znikomą ilość ciał PAS dodatnich zarówno w nabłonku, jak i w gruczołach rogów i szyjki macicy. Ekstynkcja wynosiła 2,94 w grupie trzeciej, a 2,93 w grupie czwartej. Wartości te były wyższe w porównaniu z drugą grupą doświadczalną.

Po 72 godzinach większy spadek ilości kwaśnych mukopolisacharydów zaobserwowano w grupie trzeciej w porównaniu z grupą czwartą. Komórki gruczołowe dawały intensywny odczyn barwny w części szczytowej, ale pośród nich były także komórki nie zabarwione (ryc. 12 i 13). Po trawieniu hialuronidazą jądrową i zabarwieniu barwnikiem Astrablau w niektórych komórkach nabłonka i gruczołów wystąpił bladoniebieski bardzo wąski rąbek, świadczący o istnieniu kwaśnych mukopolisacharydów opornych na działanie hialuronidazy jądrowej (ryc. 14).

Po 96 godzinach zaznaczył się dalszy spadek stężenia kwaśnych mukopolisacharydów. W grupie trzeciej wartość ekstynkcji równała się 1,98, w grupie czwartej zaś 2,01. Odczyn metachromatyczny zachowywał się podobnie jak w drugiej grupie doświadczalnej. Najsilniejszy był po 48 godzinach, a zniknął po 96 godzinach.

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ I WNIOSKI

Zawistowski i Zielska (1962) uważają, że mukopolisacharydy należą do stałych składników komórki i w porównaniu z innymi są mało wrażliwe na bodźce zewnętrzne. Liczne prace doświadczalne jednak dowodzą, że substancje chemiczne wprowadzone z zewnątrz, a zwłaszcza hormony mogą mieć wpływ na metabolizm kwaśnych mukopolisacharydów. Dorfman i Schiller (1960) wykazali, że niedobór insuliny, a także cukrzyca wywołana u szczurów podawaniem aloksanu, hamuje syntezę mukopolisacharydów w tkance łącznej. Hormon wzrostu ma znaczny wpływ na przemianę zwłaszcza kwasu chondroitynosiarkowego. Kortizon hamuje syntezę sulfomukopolisacharydów zarówno *in vivo* jak i *in vitro*. Testosteron natomiast ma własności pobudzające syntezę mukopolisacharydów, które wg Torzeckiego (1961) mogą nawet odgrywać bardzo ważną rolę w kształtowaniu obrazu morfologicznego macicy. Torzecki (1961) opisując zmiany morfologiczne i histochemiczne w macicach królic ciężarnych i połogowych, zwrócił również uwagę na różnice ilościowe i jakościowe mukopolisacharydów zarówno obojętnych, jak i kwaśnych. Ostatnie badania wykazały także, że zawartość mukopolisacharydów w narządach płciowych zmienia się wraz z cyklem rujowym, a więc jest ściśle uzależniona od wpływów hormonalnych.

Wpływ hormonów, a szczególnie estrogenów na ultrastrukturę nabłonków narządów płciowych *in vivo* i *in vitro* był przedmiotem prac wielu autorów. Dux i Koziorowska (1958) przeprowadzając badania na nabłonku pochwy w hodowli tkankowej nie stwierdzili zmian pod wpływem estrogenów. Bartoszewicz i Feltynowski (1961) wykonując podobne badania, ale na myszkach kastrowanych, obserwowali zmiany w ultrastrukturze komórek nabłonka pochwy. Zych (1958) badając wrażliwość kastrowanych myszy na estrogeny, stwierdził, że jest ona bardzo indywidualna i zależy od pór roku (w maju jest największa, w grudniu najmniejsza), a także od stanu czynnościowego tarczycy i nadnerczy. Niedojrzałe zwierzęta reagują wzmożoną wrażliwością narządów płciowych na estrogeny. Mikołajczyk i Zieleniewski (1960) natomiast wykazali, że wydalanie kwaśnych mukopolisacharydów z moczem jest również uzależnione od wpływów hormonalnych.

Zachariae i Bensley (1958) stosując autoradiografię i metachromazję, stwierdzili, że u kastrowanych królic nie ma kwaśnych mukopolisacharydów w zrębie endometrium. Po wstrzyknięciu estrogenów, a następnie po podaniu znakowanej siarki zauważyli, że gromadzi się ona po 12 godz. w zrębie, a po 72 godz. znika. W nabłonku znakowana siarka ukazywała się po 48 godz. w nieco mniejszym stężeniu niż w zrębie. Gonadotropina łożyskowa prawdopodobnie lekko hamuje tworzenie się substancji metachromatycznych w zrębie, a zwiększa w komórkach nabłonka. Według Zachariae (1959) szyjka macicy królika podlega mniejszym zmianom hormonalnym niż trzon, co jednocześnie odzwierciedla się w zachowaniu kwaśnych mukopolisacharydów. Schiller (1959) oraz Simkiss i Tyler (1958) na podstawie własnych badań przyjęli, że jajowody i pochwa pod wpływem estrogenów wytwarzają kwaśne mukopolisacharydy typu siarkowego. Wyniki podane przez Shettles, Dische i Bergmana (1959) wskazywały, że śluzówka ludzkiej szyjki macicy nie zawierała kwaśnych mukopolisacharydów. Natomiast Nowicki i Ackerman (1960) wykonując analizę śluzu szyjki macicy ludzkiej, wykazali, że stanowi on mieszaninę zarówno kwaśnych, jak i obojętnych mukopolisacharydów. Charakter fizyczny i chemiczny wydzieliny uzależniony był od cyklu menstrualnego. Zebracki (1962) zaś, badając zachowanie się kwaśnych mukopolisacharydów w błonie śluzowej macicy klaczy, doszedł do wniosku, że gromadzą się one w znacznej ilości w nabłonku pod wpływem wlewk jodowych, stosowanych szeroko w lecznictwie weterynaryjnym.

W pracy naszej starano się wykazać wpływ benzoesanu oestradiolu na występowanie, umiejscowienie i ilość kwaśnych mukopolisacharydów

w komórkach nabłonka i gruczołów błony śluzowej macicy kastrowanych szczuryc, uwzględniając wpływ dawki i czasu, a także obliczenia statystyczne. Przeprowadzone odczyny barwne i próby kontrolne, pozwoliły przypuszczać, że wykrywane substancje stanowią mieszaninę kwaśnych mukopolisacharydów. Porównując używane w pracy metody barwienia, stwierdzało się zbieżność wyników przy użyciu błękitu alcjanoowego i Astrablau, a różnice natomiast (intensywniejsze zabarwienie) w wynikach barwienia wg metody Müllera. Biorąc jednak pod uwagę tylko metodę Müllera można było wnioskować o względnych wahaniami ilości kwaśnych mukopolisacharydów. Oceniając PAS dodatnią reakcję przy stosowaniu prób kontrolnych, wydawało się być prawdopodobne, że w nabłonku i gruczołach macicy znajdują się obojętne mukopolisacharydy. U zwierząt kastrowanych można było znaleźć bardzo niewielkie ilości ciał chemicznych, mających powinowactwo do Astrablau, błękitu alcjanoowego i dających dodatnią reakcję Müllera, co pozwoliło sądzić, że należą do kwaśnych mukopolisacharydów.

Torzecki (1961) wspominał o ujemnym odczynie z dializowanym żelazem i brakiem metachromazji γ u królic. Bartoszewicz i Zych (1960), posługując się jedynie metachromazją nie wykryli w nabłonku macicy kwaśnych mukopolisacharydów. Wyniki odnośnie braku metachromazji γ są wprawdzie zgodne z naszymi spostrzeżeniami, jednak z samego ujemnego odczynu metachromatycznego, jak się wydaje, nie można wnioskować o nieobecności kwaśnych mukopolisacharydów, ponieważ metachromazja uzależniona jest od całego szeregu czynników.

Różnice uzyskane przy stosowaniu prób żelazowych, prawdopodobnie wynikały zarówno z pewnych rozbieżności w sposobie utrwalania, barwienia, jak również z użycia do doświadczeń innego gatunku zwierząt, a mianowicie szczurów (Torzecki stosował metodę Hale, a jako zwierząt doświadczalnych — króliki).

Na podstawie wyników z przeprowadzonych przez nas doświadczeń można przypuszczać, że już niewielka dawka hormonu (1,2 μ g), powoduje podwyższenie się poziomu kwaśnych mukopolisacharydów. We wszystkich grupach doświadczalnych zauważono, że najwyższy poziom kwaśnych mukopolisacharydów wystąpił po 48 godzinach od chwili iniekcji hormonu i — niezależnie od wysokości — utrzymywał się na nieco innym poziomie do 72 godz., następnie obniżał się (ryc. 15 i 16). Wydaje się więc, że zmiany biochemiczne w komórce, dotyczące poziomu kwaśnych mukopolisacharydów w tym wypadku wyprzedzają, czyli morfologiczny wyraz hormonalnych przemian śluzówki macicy.

Wpływ dawki i czasu na uzyskane wyniki jest statystycznie istotny wg analizy przy dwóch zasadach klasyfikacji: wielkości dawki i czasu obserwacji (test F). Obliczony test F dla wielkości dawki $F = 33,2$ przy krytycznych $F_{0,05} = 3,49$ dla 5% ryzyka błędu, zaś dla czasu obserwacji $F = 11,2$ przy krytycznym $F_{0,05} = 3,26$ także dla 5% ryzyka błędu.

źródło zmienności	stopień swobody	suma kwadratów	średni kwadrat	F	$F_{0,05}$
dawki	3	36583	12194	33,2	3,49
czas	4	16377	4094	11,2	3,26
reszta	12	4401	367	—	—
całość	19	57361	—	—	—

Statystyczna znamienność uzyskanych wyników świadczy, że obserwowane reakcje nie mogły być przypadkowe. Wielkość dawki miała większy wpływ niż czas obserwacji. Dla parametrów (α) obserwowano istotną zależność od czasu pomiaru. Pod wpływem benzoesanu oestradiolu reakcja wzrosła do 48 godzin od chwili iniekcji, a następnie wykazała dążność do spadku.

Istnieją pewne rozbieżności, dotyczące czasu pojawienia się kwaśnych mukopolisacharydów w badanych tkankach po podaniu hormonu. Bartoszewicz i Zych (1960) znajdowali bowiem już po 2, 4 i 6 godz. nieznaczny odczyn metachromatyczny w błonie śluzowej macicy i pochwy myszy. Po 12 i 24 godz. odczyn nasilał się, natomiast po 72 godz. wyraźnie malał. Zachariae zaś, używając do badań znakowanej siarki, wykazał, że ukazuje się ona w nabłonku dopiero po 48 godzinach, a zaczyna znikać po 72 godzinach. W naszych obserwacjach można było zauważyć, że dopiero po 12 godzinach wystąpiły dodatnie odczyny na kwaśne mukopolisacharydy.

Analiza wyników z sumy wartości ekstynkcji w poszczególnych grupach doświadczalnych (II, III, IV) pozwala zatem wyciągnąć wniosek, że dwukrotna i czterokrotna dawka rujowa nie powoduje wystąpienia znamiennych różnic w zmianie ilości kwaśnych mukopolisacharydów w porównaniu z pojedynczą dawką rujową. Statystycznie dla dawki 5 i 10 μg obserwowane różnice wyników mieszczą się prawdopodobnie w granicach błędu pomiaru, stąd możemy przyjąć, że dla tych dawek została osiągnięta granica maksymalnej reakcji (test Studenta $t = 1,03$). Można w tym wypadku znaleźć pewne podobieństwo z wynikami uzyskanymi

przez Bartoszewicza i Zycha, którzy wprowadzając myszkom 1 μ g i 10 μ g benzoesanu oestradiolu nie zauważyli różnic w nasileniu metachromazji.

Obliczone wartości K, które mierzą szybkość przyrostu efektu na jednostkę dawki wypadły w granicach 0,37—0,63. Wartość K nie wykazywała zależności od czasu pomiaru. Średnia K dla wszystkich czasów pomiaru wynosiła 0,50. Wartości ξ dla różnych czasów, które mieściły się w granicach 0,90—2,64, także nie wykazywały zależności od czasu. (test von Neumana = 2,52 przy krytycznej wartości 1,03 dla 5% ryzyka błędu).

Trawienie hialuronidazą jądrową pozwoliło przypuszczać, że w nabłonku i w gruczołach macicy znajduje się mieszanina kwaśnych mukopolisacharydów. Wynik ten był niezależny od tego czy skrawki pobierano z rogu czy z szyjki macicy.

Analizując zestawione wyniki naszych doświadczeń, doszliśmy do przekonania, że przy ocenie zmian zachodzących w kwaśnych mukopolisacharydach pod wpływem jakichkolwiek bodźców, należy zawsze stosować przynajmniej dwie metody barwne, jak również obliczenia cytofotometryczne, ponieważ analiza mikroskopowa odczynów barwnych może być subiektywna.

P I S M I E N N I C T W O

1. Bartoszewicz W., Feltynowski A.: Wpływ estrogenów na ultrastrukturę nabłonka pochwy myszy. *Fol. Morph.* 4, 235—246, 1961.
2. Bartoszewicz W., Zych F.: O wpływie estrogenów na mukopolisacharydy i aktywność fosfataz zasadowych w pochwie i macicy myszy. *Endokr. Pol.* 11, 91—104, 1960.
3. Dorfman W., Schiller R.; cyt. wg Zabłockiego: Znaczenie układu hialuronidaza kwas hialuronowy w odporności naturalnej. *Post. Hig. i Med. Dośw.* 14, 463—474, 1960.
4. Dux K., Koziorowska J.: Czy nabłonek pochwy w hodowli *in vitro* reaguje na estrogeny? *Endokr. Pol.* 9, 161—167, 1958.
5. Fasske E.: Zur Darstellung der sauren Mukopolisacchariden im Bereich der Zwischensubstanz mezenchymaler Gewebe. *Z. für Algem. Path. und Path. Anat.* 97, 174—179, 1957.
6. Godlewski H.: Histochemiczne metody wykrywania wielocukrów i ich ocena. *Post. Hig. i Med. Dośw.* 14, 155—177, 1960.
7. Grabowska M.: Chemiczne metody oznaczania kwaśnych mukopolisacharydów. *Post. Hig. i Med. Dośw.* 14, 145—154, 1960.
8. Lison L.: *Histochimie et Cytochimie animales.* Gauthier—Villars, Paris, 1953, ss. 103—113, 332—341.
9. Krygier A.: Zastosowanie mikrofotometru w badaniach histochemicznych i cytochemicznych. *Rocznik Pom. Akad. Med.* 2, 381—389, 1956.

10. Kozdrój H.: Biochemia mukopolisacharydów. Post. Hig. i Med. Dośw. **14**, 123—145, 1960.
11. Mikołajczyk H., Zieleniewski J.: Wydalanie mukopolisacharydów kwaśnych i 17-ketosterydów z moczem pod wpływem hormonów gonadotropowych i preparatu tarczycy. Endokr. Pol. **11**, 191—201, 1960.
12. Müller G.: Über eine Vereinfachung der Reaktion nach Hale (1946). Acta Histochem. **2**, 68—70, 1955.
13. Nowicki Z., Ackerman J.: Histochemiczne i reologiczne właściwości śluzu szyji macicy. Post. Hig. i Med. Dośw. **14**, 216—224, 1960.
14. Pioch W.: Über die Darstellung saurer Mukopolisaccharide mit dem Kupferphthalocyaninfarbstoff Astrablau. Virch. Arch. für Path. Anat. und Phys. und für Klin. Med. **3**, 337—346, 1957.
15. Pearse R. G. E.: Histochemia teoretyczna i stosowana. PZWL, Warszawa 1957, ss. 15, 157—160, 338—341.
16. Schiller R.: Mucopolisaccharides of the Estrogen Stimulated Chick Oviduct. Biochim. Biophys. Acta. **32**, 315—319, 1959.
17. Shettles L. B., Dische Z., Bergman P.; cyt. wg Zachariae F.: Acid Mucopolisaccharides in the Female Genital System and Their Role in the Mechanism of Ovulation. Acta Endocr. suppl. **47**, 42—43, 1959.
18. Schubert M., Hamerman D.: Metachromasia (Chemical Theory and Histochemical Use). J. of Histochem. and Cytochem. **4**, 159—184, 1956.
19. Steedman H. F.: Alcian blue 8GS a New Stain for Mucin. Quart. J. Micr. Sci. **91**, 477—479, 1950.
20. Simkiss, Tyler: cyt. wg Zachariae F.: Autoradiographic (35S) and Histochemical Studies of Sulfomucosaccharides in the Rabbit Uterus, Oviductus and Vagina. Acta Endocr. **29**, 118—134, 1958.
21. Torzecki Z.: Doświadczalne badania dynamiki rozwoju zmian morfologicznych i histochemicznych w macicy podczas ciąży i porodu. Część IV. Histochemia mukopolisacharydów. Ginek. Pol. **32**, 627—638, 1961.
22. Winogradow B. B., Donski N. B., Subotkin M., Czeretnych L. A.: Srawnitelnaja ocenka metodow gistochemiczeskogo wyjawlenija mukopolisacharidow w tkaniach prowizornych organow czelowieka i mleko-pitajuszczich. Arch. Anat. Gist. i Embr. **1**, 103—109, 1962.
23. Zachariae F.: Acid Mucopolisaccharides in the Female Genital System and Their Role in the Mechanism of Ovulation. Acta Endocr. (suppl. **47**), **33**, 13—44, 1959.
24. Zachariae F., Bensley: cyt. wg Zachariae F.: Autoradiographic (35S) and Histochemical Studies of Sulfomucopolisaccharides in the Rabbit Uterus, Oviductus and Vagina. Acta Endocr. **29**, 118—134, 1958.
25. Zych F.: Z badań nad wrażliwością kastrowanych myszy na estrogeny. Endokr. Pol. **9**, 161—167, 1958.
26. Zabłocki B.: Znaczenie układu hialuronidaza kwas hialuronowy w odporności naturalnej. Post. Hig. i Med. Dośw. **14**, 463—474, 1960.
27. Zawistowski S., Zielska: Badania cytochemiczne nad wpływem stanów niedocukrzenia na procesy resorbcyjne w jelicie myszy. Fol. Morph. **1**, 94—99, 1962.

28. Zubige F. T., Brown K., Last J. H.: A New Technique for the Simultaneous Demonstration of Lipid and Acid Polysaccharides on the same Tissue Section, *Jour. of Histochem. and Cytochem.* 7, 135—137, 1960.
29. Zembracki A.: Hyperplasia glandularis cystica des Stutenuterus, analysiert mittels „Biopsia uteri“. *Wien, Tierärztl. Monatschrift.* 49, 135—148, 1962.

РЕЗЮМЕ

Гистохимические исследования над кислыми мукополисахаридами в эпителии и железах слизистой оболочки матки белых крыс показали, что у кастрированных животных можно обнаружить небольшие количества химических веществ, обладающих сродством к альциановому синему и Азраблау, обнаруживая положительную реакцию Мюллера, что позволило отнести их к кислым мукополисахаридам. На основе полученных результатов проведенных опытов можно полагать, что уже небольшая доза гормона 1,2 мг (бензоат эстрадиола) вызывает повышение уровня кислых мукополисахаридов. Во всех опытных группах, т.е. после подачи 1,2 мкг, 2,5 мкг, 5 мкг, 10 мкг бензоата эстрадиола наиболее высокий уровень кислых мукополисахаридов отмечен после истечения 48 часов с момента инъекции гормона и удерживался на несколько пониженном уровне до 72 часов независимо от величины дозы, затем снижался. Можно, таким образом, считать, что изменения уровня кислых мукополисахаридов опережали течку, которая наступала после 72 часов при дозе 2,5 мкг, 5 мкг, 10 мкг бензоата эстрадиола. Влияние дозы и времени подачи на полученные результаты статистически существенные (тест F).

Рис. 1. Слизистая оболочка шейки матки кастрированной крысы. Контрольный препарат. Окрашивание с помощью Азраблау. Заметная цветная реакция в некоторых местах эпителиального ободка. Микроскоп Nf. Ц. Цейсс (Иена), Объектив 40 ×, окуляр 15 ×. Микрофото Practina FX.

Рис. 2. Эпителий слизистой оболочки из рога матки кастрированной крысы. Контрольный препарат. Слабо-положительная реакция PAS (по слюнной пробе) в клетках эпителия при отчетливо положительной реакции PAS основной перепонки. Микроскоп Nf. Ц. Цейсс (Иена). Объектив 40 ×, окуляр 15 × К. Микрофото Practina FX.

Рис. 3. Слизистая оболочка из рога матки кастрированной крысы вместе с железой. 1,2 мкг бензоата эстрадиола после 48 часов. Окрашивание Азраблау. Отчетливый, зернистый ободок в клетках эпителия и железы. Микроскоп Nf. Ц. Цейсс (Иена). Объектив 40 ×, окуляр 15 × К. Микрофото Practina FX.

Рис. 4. Слизистая оболочка из шейки матки кастрированной крысы 1,2 мкг бензоата эстрадиола после 48 часов. Окрашивание по методу Мюллера. Интенсивная реакция на кислые мукополисахариды в апикальных частях клеток эпителия. Микроскоп Nf. Ц. Цейсс (Иена). Объектив 40 ×, окуляр 15 × К. Микрофото Practina FX.

Рис. 5. Слизистая оболочка вместе с железами из рога матки кастрированной крысы. 2,5 μ бензоата эстрадиола после 12 часов. Окрашивание альциановым синим. Отчетливая цветная реакция в клетках эпителия и в железистых клетках. Микроскоп Nf. Ц. Цейсс (Иена). Объектив 40 \times , окуляр 15 \times К. Микрофото Practina FX.

Рис. 6. Эпителий шейки матки кастрированной крысы. 2,5 μ бензоата эстрадиола после 48 часов. Окрашивание Астраблау. Интенсивная окраска клеток эпителия. Микроскоп Nf. Ц. Цейсс (Иена). Объектив 40 \times , окуляр 15 \times К. Микрофото Practina FX.

Рис. 7. Слизистая оболочка из шейки матки кастрированной крысы. 2,5 μ бензоата эстрадиола после 96 часов. Окрашивание Астраблау. Заметно ослабленная цветная реакция в клетках эпителия. Микроскоп Nf. Ц. Цейсс (Иена). Объектив 40 \times , окуляр 15 \times К. Микрофото Practina FX.

Рис. 8. Эпителий слизистой оболочки из рога матки кастрированной крысы. 10 μ бензоата эстрадиола после 12 часов. Окрашивание альциановым синим. Заметный очень узкий ободок в клетках эпителия. Микроскоп Nf. Ц. Цейсс (Иена). Объектив 40 \times , окуляр 15 \times К. Микрофото Practina FX.

Рис. 9. Эпителий слизистой оболочки из рога слизистой оболочки кастрированной крысы. 5 μ бензоата эстрадиола после 24 часов. Окрашивание Астраблау. Окрашенный ободок в клетках эпителия похож на такой же на рис. 8. Микроскоп Nf. Ц. Цейсс (Иена). Объектив 40 \times , окуляр 15 \times К. Микрофото Practina FX.

Рис. 10. Эпителий слизистой оболочки из рога матки кастрированной крысы. 5 μ бензоата эстрадиола после 48 часов. Окрашивание Астраблау. Видна интенсивная окраска большинства клеток эпителия. Только в некоторых клетках можно наблюдать очень слабое сродство к красителю. Микроскоп Nf. Ц. Цейсс (Иена). Объектив 40 \times , окуляр 15 \times К. Микрофото Practina FX.

Рис. 11. Железа из рога матки кастрированной крысы. 10 μ бензоата эстрадиола после 48 часов. Окрашивание альциановым синим. Отчетливая цветная реакция в верхних частях железистых клеток. Микроскоп Nf. Ц. Цейсс (Иена). Объектив 40 \times , окуляр 15 \times К. Микрофото Practina FX.

Рис. 12. Железы из шейки матки кастрированной крысы. 5 μ бензоата эстрадиола после 72 часов. Окрашивание Астраблау. В апикальных частях железистых клеток заметна отчетливая цветная реакция. Объектив 40 \times , окуляр 15 \times К. Микрофото Practina FX.

Рис. 13. Железа из шейки матки кастрированной крысы. 10 μ бензоата эстрадиола после 72 часов. Толстый цветной ободок в железистых клетках обнаруживает сродство к альциановому синему. Микроскоп Nf. Ц. Цейсс (Иена). Объектив 40 \times , окуляр 15 \times К. Микрофото Practina FX.

Рис. 14. Железы из шейки матки кастрированной крысы. 5 μ бензоата эстрадиола после 72 часов и обработки ядерной гиалуронидазой. Окрашивание Астраблау. В апикальных частях железистых клеток заметен очень узкий перемежающийся цветной ободок. Микроскоп Nf. Ц. Цейсс (Иена). Объектив 40 \times , окуляр 15 \times К. Микрофото Practina FX.

Рис. 15. Зависимость экстинции от времени с момента подачи 1,2 μ г, 2,5 μ г, 5 μ г, 10 μ г бензоата эстрадиола.

Рис. 16. Зависимость экстинции от доз 1,2 μ г, 2,5 μ г, 5 μ г, 10 μ г бензоата эстрадиола при измерениях после истечения 12, 24, 48, 72, 96 часов с момента инъекции.

SUMMARY

Histochemical investigations on acid mucopolysaccharides in the epithelium and glands of the uterus mucosa of white rats revealed that in castrated animals there can be found small amounts of chemical substance which show a positive reaction to alcyan blue, Astrablau, and which give a positive Müller's reaction. This may lead to the conclusion that these substances belong to acid mucopolysaccharides.

The results of the author's experiments suggest that even a small dose (1.2 μg) of the hormone (oestradiole benzoate) rises the level of acid mucopolysaccharides. In all experimental groups, i. e. after administering 1.2 μg , 2.5 μg , 5 μg , or 10 μg of oestradiole benzoate respectively, the highest level of acid mucopolysaccharides appeared after 48 hours following the injection of the hormone. Independently of the dosis, this high level continued, though a little reduced, for up to 72 hours, and then decreased. It can be said therefore that changes in the level of acid mucopolysaccharides preceded the oestrus, which appeared after 72 hours with doses of 2.5 μg , 5 μg , or 10 μg of oestradiole benzoate. The influence of dosage and time on the results of the experiments is statistically significant (test F).

Fig. 1. Mucosa of uterine cervix of castrated rat. Control preparation, stained with Astrablau. Colour reaction in some spots of epithelium margin. Microscope Nf., C. Zeiss, Jena; objective 40 x, ocular 15 x K. Microphot. Practina FX.

Fig. 2. Epithelium of mucosa uterine cornu of castrated rat. Control preparation. Slightly positive PAS reaction (after saliva test) in epithelial cells; basal membrane of epithelium is distinctly PAS-positive. Microscope Nf., C. Zeiss, Jena; objective 40 x, ocular 15 x K. Microphot. Practina FX.

Fig. 3. Mucosa from uterine cornu of castrated rat, with gland. 48 hours after administration of 1.2 μg of oestradiole benzoate. Stained with Astrablau. Distinct, granular margin in cells of epithelium and gland. Microscope Nf., C. Zeiss, Jena; objective 40 x, ocular 15 x K. Microphot. Practina FX.

Fig. 4. Mucosa of uterine cervix of castrated rat. 48 hours after administration of 1.2 μg of oestradiole benzoate. Stained according to Müller. Intense reaction for acid mucopolysaccharides in apical parts of epithelium cells. Microscope Nf., C. Zeiss, Jena; objective 40 x, ocular 15 x K. Microphot. Practina FX.

Fig. 5. Mucosa and glands from uterine cornu of castrated rat. 12 hours after administration of 2.5 μg of oestradiole benzoate. Stained with alcyan blue. Distinct colour reaction in cells of epithelium and glands. Microscope Nf., C. Zeiss, Jena; objective 40 x, ocular 15 x K. Microphot. Practina FX.

Fig. 6. Mucosa uterine cervix of castrated rat. 48 hours after administration of 2.5 μg of oestradiole benzoate. Stained with Astrablau. Intense staining of epithelial cells. Microscope Nf., C. Zeiss, Jena; objective 40 x, ocular 15 x K. Microphot. Practina FX.

Fig. 7. Mucosa of uterine cervix of castrated rat. 96 hours after administration of 2.5 μg of oestradiole benzoate. Stained with Astrablau. Distinctly weakened

colour reaction in epithelial cells. Microscope Nf., C. Zeiss, Jena; objective 40 x, ocular 15 x K. Microphot. Practina FX.

Fig. 8. Epithelium of mucosa from uterine cornu of castrated rat. 12 hours after administration of 10 μ g of oestradiole benzoate. Stained with alcyan blue. Distinct, very narrow margin in epithelial cells. Microscope Nf., C. Zeiss, Jena; objective 40 x, ocular 15 x K. Microphot. Practina FX.

Fig. 9. Epithelium of mucosa from uterine cornu of castrated rat. 24 hours after administration of 5 μ g of oestradiole benzoate. Stained with Astrablau. Coloured margin in epithelial cells, resembling that in Fig. 8. Microscope Nf., C. Zeiss, Jena; objective 40 x, ocular 15 x K. Microphot. Practina FX.

Fig. 10. Epithelium of mucosa from uterine cornu of castrated rat. 48 hours after administration of 5 μ g of oestradiole benzoate. Stained with Astrablau. Intense staining of most epithelial cells. Only few cells show a very weak affinity to the stain. Microscope Nf. C. Zeiss, Jena; objective 40 x, ocular 15 x K. Microphot. Practina FX.

Fig. 11. Gland from uterine cornu of castrated rat. 48 hours after administration of 10 μ g of oestradiole benzoate. Stained with alcyan blue. Distinct colour reaction in upper parts of gland cells. Microscope Nf., C. Zeiss, Jena; objective 40 x, ocular 15 x K. Microphot. Practina FX.

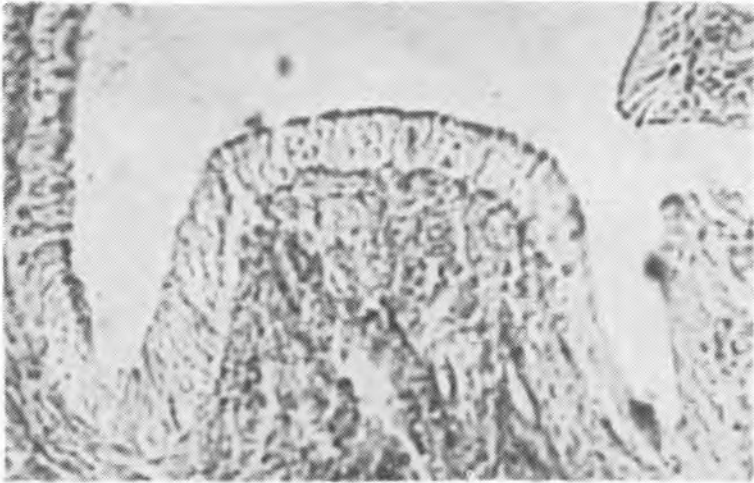
Fig. 12. Glands from uterine cervix of castrated rat. 72 hours after administration of 5 μ g of oestradiole benzoate. Stained with Astrablau. Distinct colour reaction in apical parts of gland cells. Microscope Nf., C. Zeiss, Jena; objective 40 x K. ocular 15 x K. Microphot. Practina FX.

Fig. 13. Gland from uterine cervix of castrated rat. 72 hours after administration of 10 μ g of oestradiole benzoate. Thick coloured margin in gland cells shows affinity to alcyan blue. Microscope Nf., C. Zeiss, Jena; objective 40 x, ocular 15 x K. Microphot. Practina FX.

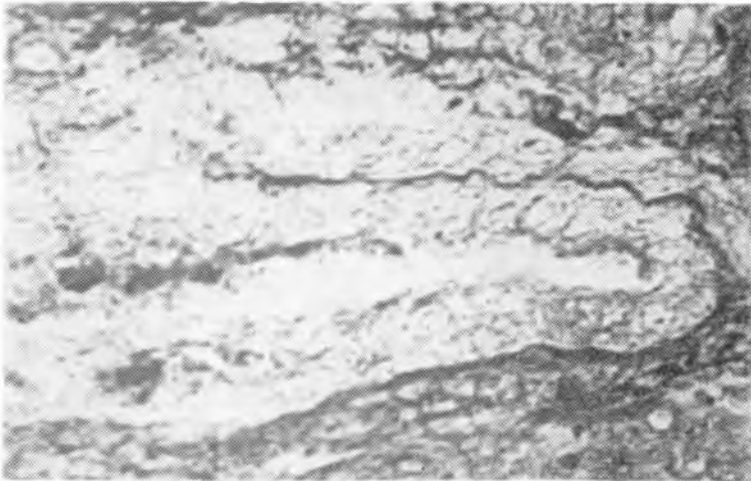
Fig. 14. Glands from uterine cervix of castrated rat. 72 hours after administration of 5 μ g of oestradiole benzoate, treated with testicular hialuronidaze. Stained with Astrablau. Very narrow, interrupted coloured margin in apical parts of gland cells. Microscope Nf., C. Zeiss, Jena; objective 40 x, ocular 15 x K. Microphot. Practina FX.

Fig. 15. Correlation between extinction and length of time after administration of 1.2 μ g, 2.5 μ g, 5 μ g or 10 μ g of oestradiole benzoate.

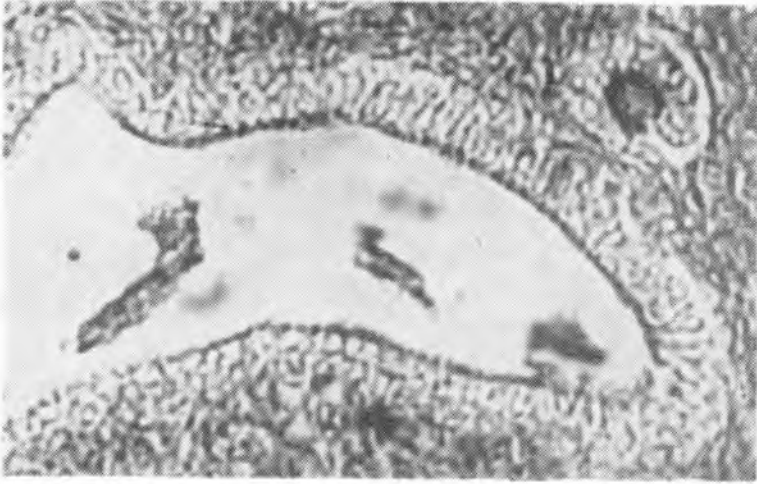
Fig. 16. Correlation between extinction and doses of 1.2 μ g, 2.5 μ g, 5 μ g or 10 μ g of oestradiole benzoate, measured after 12, 24, 48, 72 and 96 hours following the injection.



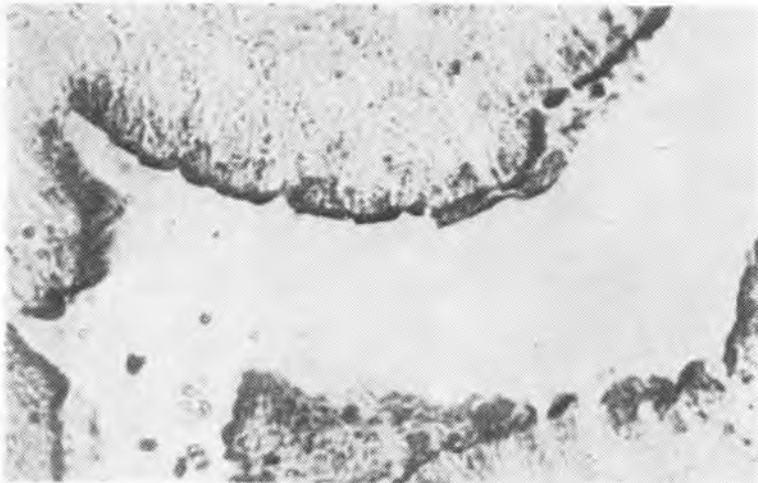
Ryc. 1. Błona śluzowa z szyjki macicy szczura kastrowanego. Preparat kontrolny. Barwienie Astrablau. Widoczny odczyn barwny w niektórych miejscach rąbka nabłonkowego. Mikroskop Nf. C. Zeiss (Jena), obiektyw 40 x, okular 15 x K. Mikrofot. Practina FX.



Ryc. 2. Nabłonek błony śluzowej z rogu macicy szczura kastrowanego. Preparat kontrolny. Słabo dodatnia reakcja PAS (po próbie ślinowej) w komórkach nabłonka z wyraźnie PAS dodatnią błoną podstawową nabłonka. Mikroskop Nf. C. Zeiss (Jena), obiektyw 40 x, okular 15 x K. Mikrofot. Practina FX.



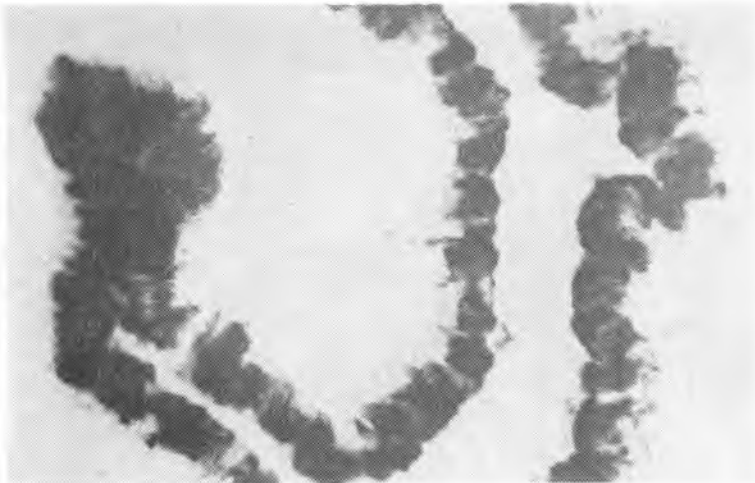
Ryc. 3. Błona śluzowa z rogu macicy szczura kastrowanego wraz z gruczołem. 1,2 μ g benzoesu oestradiolu po 48 godz. Barwienie Astrablau. Wyraźny, ziarnisty rąbek w komórkach nabłonka i gruczołu. Mikroskop Nf. C. Zeiss (Jena), obiektyw 40 x, okular 15 x K. Mikrofot. Practina FX.



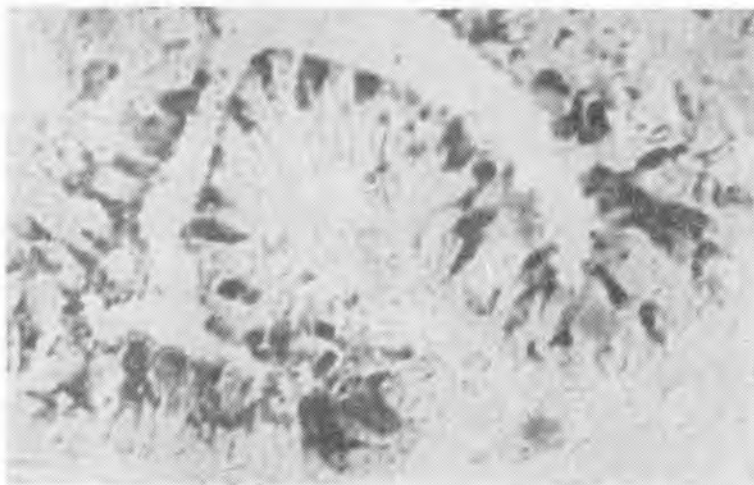
Ryc. 4. Błona śluzowa z szyjki macicy szczura kastrowanego. 1,2 μ g benzoesu oestradiolu po 48 godz. Barwienie wg metody Müllera. Intensywny odczyn na kwaśne mukopolisacharydy w szczytowych częściach komórek nabłonka. Mikroskop Nf. C. Zeiss (Jena), obiektyw 40 x, okular 15 x K. Mikrofot. Practina FX



Ryc. 5. Błona śluzowa wraz z gruczołami z rogu macicy szczura kastrowanego. 2,5 μ g benzoesanu oestradiolu po 12 godz. Barwienie błękitem alcjanowym. Wyraźny odczyn barwny w komórkach nabłonka i gruczołów. Mikroskop Nf. C. Zeiss (Jena), obiektyw 40 x, okular 15 x K. Mikrofot. Practina FX.



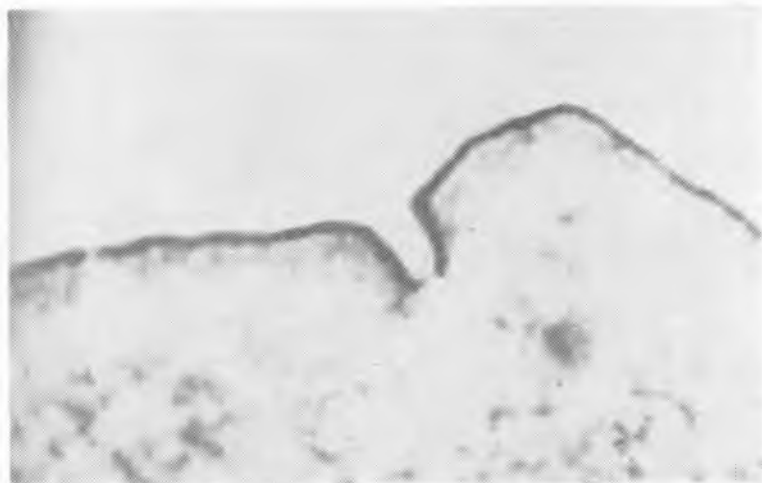
Ryc. 6. Nabłonek szyjki macicy szczura kastrowanego. 2,5 μ g benzoesanu oestradiolu po 48 godzinach. Barwienie Astrablau. Intensywne zabarwienie komórek nabłonka. Mikroskop Nf. C. Zeiss (Jena), obiektyw 40 x, okular 15 x K. Mikrofot. Practina FX.



Ryc. 7. Błona śluzowa szyjki macicy szczura kastrowanego. 2,5 μ g benzoesanu oestradiolu po 96 godz. Barwienie Astrablau. Wyraźnie osłabiona reakcja barwna, w komórkach nabłonka. Mikroskop Nf. C. Zeiss (Jena), obiektyw 40 x, okular 15 x K. Mikrofot. Practina FX.



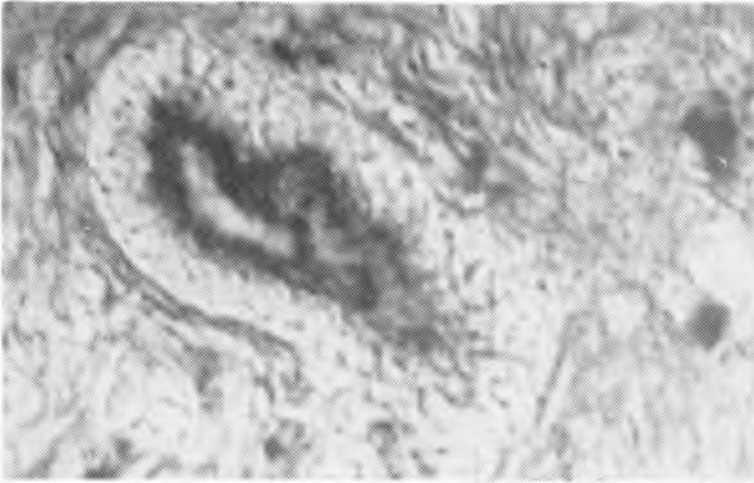
Ryc. 8. Nabłonek błony śluzowej rogu macicy szczura kastrowanego. 10 μ g benzoesanu oestradiolu po 12 godz. Barwienie błękitem alcjanowym. Wyraźny, bardzo wąski rąbek w komórkach nabłonka. Mikroskop. Nf. C. Zeiss (Jena), obiektyw 40 x okular 15 x K. Mikrofot. Practina FX.



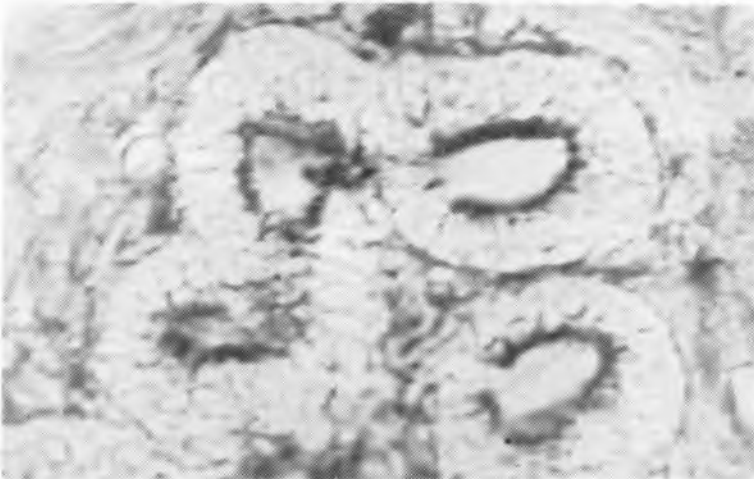
Ryc. 9. Nabłonek błony śluzowej z rogu macicy szczura kastrowanego. 5 µg benzoesu oestradiolu po 24 godz. Barwienie Astrablau. Barwny rąbek w komórkach nabłonka podobny jak na ryc. 8. Mikroskop Nf. C. Zeiss (Jena), obiektyw 40 x, okular 15 x K. Mikrofot. Practina FX.



Ryc. 10. Nabłonek błony śluzowej rogu macicy szczura kastrowanego. 5 µg benzoesu oestradiolu po 48 godzinach. Barwienie Astrablau. Intensywne zabarwienie większości komórek nabłonka. Tylko w nielicznych komórkach można obserwować bardzo słabe powinowactwo z barwnikiem. Mikroskop Nf. C. Zeiss (Jena), obiektyw 40 x, okular 15 x K. Mikrofot. Practina FX.



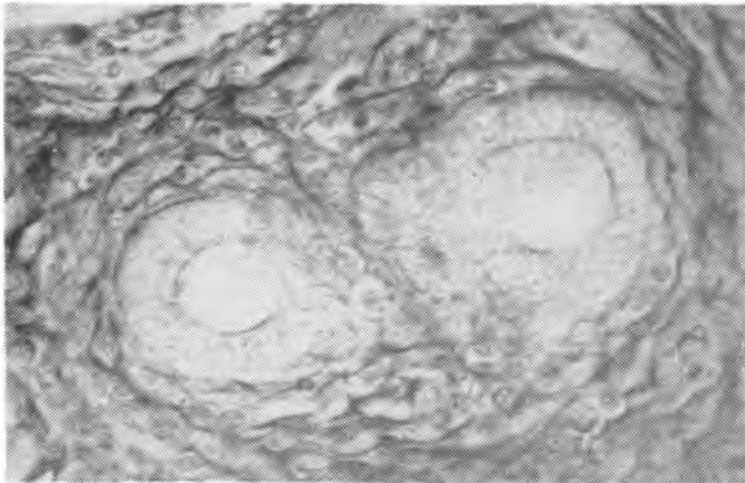
Ryc. 11. Gruczoł z rogu macicy szczura kastrowanego. 10 µg benzoesanu oestradiolu po 48 godz. Barwienie błękitem alcjanowym. Wyraźny odczyn barwny w górnych częściach komórek gruczołowych. Mikroskop Nf. C. Zeiss (Jena), obiektyw 40 x, okular 15 x K. Mikrofot. Practina FX.



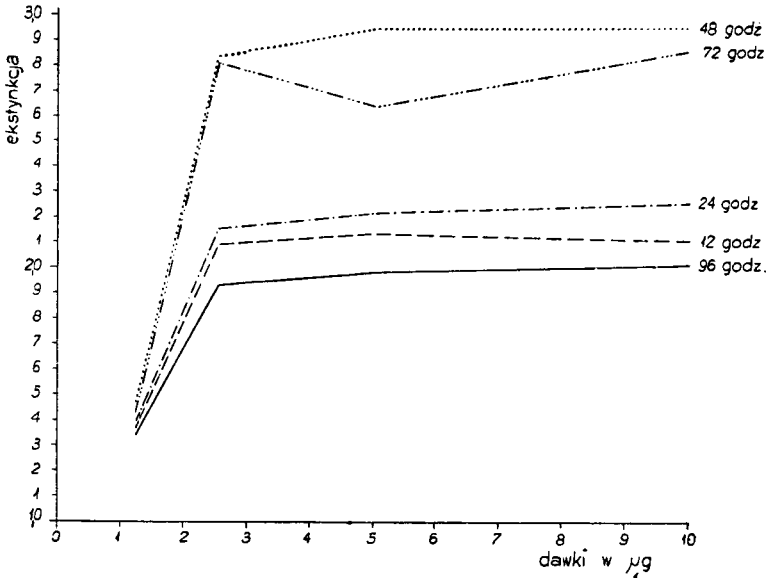
Ryc. 12. Gruczoły szyjki macicy szczura kastrowanego. 5 µg benzoesanu oestradiolu po 72 godz. Barwienie Astrablau. W szczytowych częściach komórek gruczołowych widoczna wyraźna reakcja barwna. Mikroskop Nf C. Zeiss (Jena), obiektyw 40 x, okular 15 x K. Mikrofot. Practina FX.



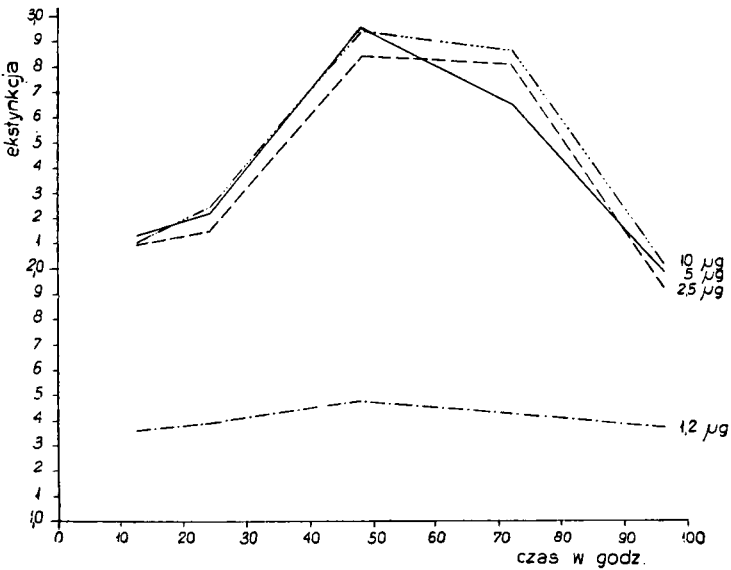
Ryc. 13. Gruczoł szyjki macicy szczura kastrowanego. 10 μ g benzoesanu oestradolu po 72 godz. Gruby rąbek barwny w komórkach gruczołowych wykazuje powinowactwo z błękitem alcjanowym. Mikroskop Nf. C. Zeiss (Jena), obiektyw 40 x, okular 15 x K. Mikrofol. Practina FX.



Ryc. 14. Gruczoły szyjki macicy szczura kastrowanego. 5 μ g benzoesanu oestradolu po 72 godzinach i trawieniu hialuronidazą jądrową. Barwienie Astrablau. W szczytowych częściach komórek gruczołowych widoczny, bardzo wąski, przerywany rąbek barwny. Mikroskop Nf. C. Zeiss (Jena), obiektyw 40 x, okular 15 x K. Mikrofol. Practina FX.



Ryc. 15. Zależność ekstynkcji od czasu, jaki upłynął od chwili podania 1,2 µg, 2,5 µg, 5 µg i 10 µg benzoesu oestradiolu



Ryc. 16. Zależność ekstynkcji od dawek 1,2 µg, 2,5 µg, 5 µg i 10 µg benzoesu oestradiolu przy pomiarach wykonywanych w czasie 12, 24, 48, 72 i 96 godzin od chwili iniekcji.

Grażyna Rzeszowska