

Zmiany w strukturze mikroskopowej jajników suk po podaniu estradiolu

Maria Katkiewicz, Piotr Jurka¹

z Katedry Chorób Małych Zwierząt z Kliniką, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie¹

W wyniku rozwoju badań w zakresie patologii molekularnej, który ma miejsce w ostatnich dziesięcioleciach, obserwuje się wielki postęp w poznawaniu etiopatogenezy zmian chorobowych zachodzących w komórkach i tkankach. Patomorfologia, jako dziedzina opisowych nauk morfologicznych, przekształca się w naukę, w której przyczyny rozwoju zmian chorobowych są interpretowane w oparciu o znajomość uszkodzenia procesów biochemicznych w komórkach organizmu ludzi i zwierząt.

Jajniki są narządami, których funkcja jest regulowana działaniem licznych czynników, z których podstawową rolę odgrywają hormony. Celem tej skoordynowanej stymulacji komórek jajników jest stworzenie optymalnych warunków dla przebiegu procesu oogenezy i owulacji. Oogeneza pozostaje w bezwzględnej zależności od prawidłowego rozwoju pęcherzyka jajnikowego. Ten zaś jest strukturą powstałą w wyniku różnicowania się komórek zrębu jajnika. Ten krótki zarys współzależności między komórkami gonady pokazuje, że uszkodzenie jednego ogniwa pociąga za sobą kaskadę zmian patologicznych w łańcuchu funkcji współzależnych struktur komórkowych.

Wiadomo, że zmiany patologiczne występujące w fazie początkowej uszkodzenia jajnika nie są czytelne przy zastosowaniu powszechnie używanych metod badania klinicznego. Są to mianowicie zmiany

w strukturze komórkowej gonady, których prawidłowe rozpoznanie jest możliwe wyłącznie po wykonaniu badania mikroskopowego. W związku z tym celem niniejszej pracy było badanie struktury mikroskopowej jajników suk, które otrzymały benzoosan estradiolu, w dawkach powszechnie zalecanych w zapobieganiu niepożądanego ciąży suki.

Materiał i metody

Badania zostały przeprowadzone na 14 sukach, mieszańcach w wieku od 1 do 3 lat, o masie ciała od 10 do 14 kg. Estradiol (Oestradiolum benzoicum, Polfa) podawano dwukrotnie, w iniekcjach domięśniowych, w dawce 100 µg/kg m.c., w trzecim i piątym dniu po wystąpieniu odruchu tolerancji. Zabieg usunięcia jajników wykonano u połowy suk w 17 i 31 dniu od momentu wystąpienia odruchu tolerancji, co odpowiadało 14. (n=7) lub 28. dniowi (n=7) po pierwszej iniekcji estradiolu. Jajniki utrwalano w 10% buforowanej fosforanami formalinie, zatapiano w parafinie, i skrawki parafinowe barwiono metodą rutynową hematoksyliną i eozyną. Preparaty oceniano w mikroskopie świetlnym.

Wyniki badania mikroskopowego jajników

Badanie struktury mikroskopowej obu jajników, prawego i lewego, suk, które pobrano po upływie 14 dni od podania

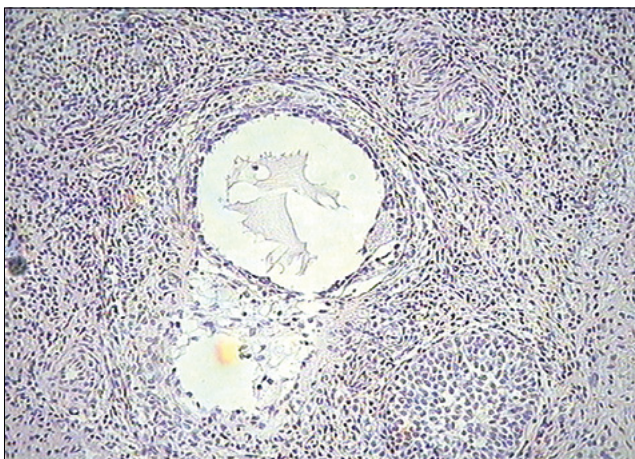
Changes in ovaries microscopic structure after estradiol administration in bitches

Katkiewicz M., Jurka P.¹, Department of Small Animal Diseases with Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences – SGGW¹

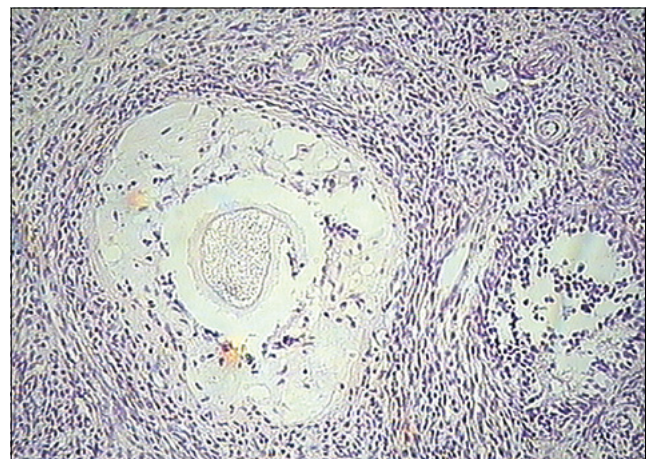
This histopathological research was performed on the bitches ovaries after 14th and 28th day of the intramuscular estradiol benzoate administration. The hormone dose was 100 µg/kg body weight, given in 3rd and 5th day after clinical manifestation of tolerance effect. In the ovaries, the following pathological changes were found: oocytes necrobiosis with the thickening of zona pellucida, follicular cells necrobiosis with the development of small, follicular cysts. Corpus luteum cells have shown features of apoptosis. In the ovarian stroma, small areas of secondary interstitial cells were identified. The ovarian epithelial cells have proliferated with the epithelial cysts formation. Also, proliferation of rete ovarii cells was found. These pathological changes were more pronounced at 28th day after estradiol administration.

Keywords: ovaries, estradiol benzoate, histopathology, bitches.

estradiolu, wykazało obecność zmian patologicznych w budowie pęcherzyków jajnikowych, oocytów, zrębu jajnika, sieci jajnika oraz nabłonka jajnikowego. Zmiany w strukturze pęcherzyków jajnikowych miały charakter znacznego ich uszkodzenia, niezależnie od fazy rozwojowej pęcherzyka. Czytelną cechą tego uszkodzenia była nekrobioza komórek pęcherzykowych, przy równoczesnym zamieraniu oocytów. W wyniku tych zmian powstawały małe torbiele pęcherzykowe (ryc. 1). Uszkodzenie pęcherzyków jajnikowych było także związane ze zgrubieniem osłonek przejrzystych (ryc. 2), których liczne złogi można było spotkać w zrębie jajników. W rzadkich przypadkach stwierdzano pęcherzyki



Ryc. 1. Jajnik suki 14 dni po podaniu estradiolu – zamieranie oocytów i komórek pęcherzykowych z powstawaniem małych torbieli pęcherzykowych. Barwienie: hematoksylina-eozyna, pow. 20×



Ryc. 2. Jajnik suki 14 dni po podaniu estradiolu – widoczne zgrubienie osłonek przejrzystych w pęcherzyku ulegającym nekrobiozie. Barwienie: hematoksylina-eozyna, pow. 20×

wielojajowe. W jajnikach, w których były obecne ciała żółte, komórki lutealne wykazywały cechy apoptozy (ryc. 3). W zrębie jajników u 3 suk stwierdzono obecność pól wtórnych komórek zrębu o charakterystycznie żółtobrazowo zabarwionej ziarnistej cytoplazmie (ryc. 4). Komórki nabłonka jajnikowego ulegały rozrostowi, czemu towarzyszyło powstawanie dość licznych torbieli nabłonkowych (ryc. 5), niekiedy osiagających duże rozmiary.

Na szczególną uwagę zasługują zmiany patologiczne zaobserwowane w budowie sieci jajników. U wszystkich badanych suk występowała proliferacja komórek sieci jajnika, przy czym jej stopień był osobniczo zróżnicowany. U jednej suki ogniska rozrostu sieci jajnika osiągnęły część korową gonady (ryc. 6).

Badanie mikroskopowe jajników pobranych po 28 dniach od podania estradiolu wykazało obecność tego samego typu zmian patologicznych, które występowały po upływie 14 dni od podania hormonu, lecz miały znacznie wyższy stopień nasilenia. W warstwie korowej jajnika

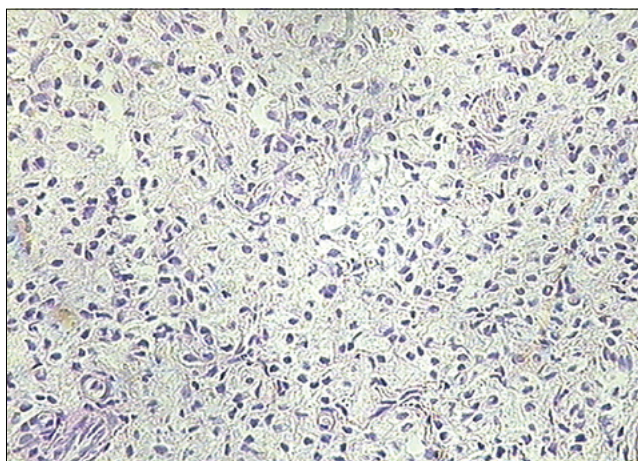
występowały bardzo liczne pęcherzyki jajnikowe, w różnych fazach rozwoju. Oocyty tych pęcherzyków miały zgrubiałe osłonki przejrzyste i ulegały nekrobiozie. Podobnie jak w poprzedniej grupie suk, złoży zgrubiałych osłonek przejrzystych zalegały w zrębie gonady. Sporadycznie obserwowano pęcherzyki wielojajowe. Wyrazem uszkodzenia różnicowania pęcherzyków jajnikowych była obecność zwykle małych, liczniejszych niż w poprzednio opisanej grupie suk, torbieli pęcherzykowych. Tylko u jednej suki torbiele pęcherzykowe osiągnęły duże rozmiary. U tej samej suki występowały torbiele, których ścianę tworzyły komórki lutealne jako wynik transformacji komórek pęcherzykowych (ryc. 7). Taki obraz torbieli jest charakterystyczny dla zespołu luteinizacji niepełnego pęcherzyka jajnikowego. Komórki lutealne ciałek żółtych ulegały apoptozie lub też występowała organizacja ciałek żółtych. U suk tej grupy stwierdzono, że osłonka pęcherzykowa wewnętrzna otaczająca większe pęcherzyki jajnikowe była szeroka i silnie przekrwiona. Podobnie jak

w jajnikach uprzednio opisanej grupy suk – komórki nabłonka jajnikowego ulegały proliferacji. Jednak u tej grupy suk ta proliferacja miała nieco odmienny charakter, ponieważ następowało piętrzenie się komórek do światła torbieli pęcherzykowych, co nosi pewne znamiona dysplazji tych komórek (ryc. 8). Rozrost dotyczył także komórek sieci jajnika. Była to znaczne stopnia proliferacja, z tendencją do powstawania torbieli sieci (ryc. 9).

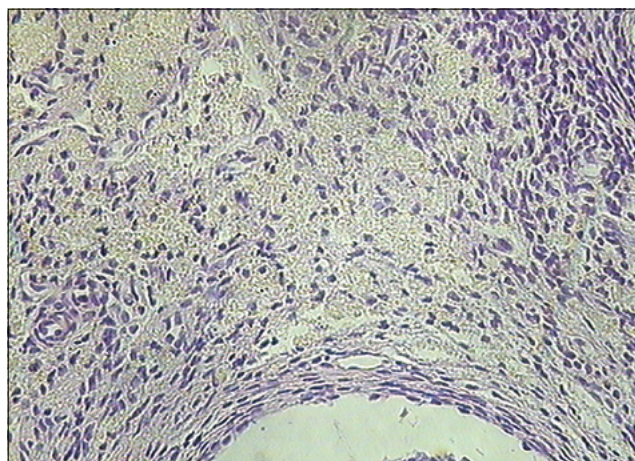
Omówienie wyników

Uzyskane rezultaty badania mikroskopowego jajników suk, które otrzymywały estradiol, jednoznacznie wskazują na obecność poważnego uszkodzenia ich struktury jako wynik działania podanego hormonu. Jakkolwiek typ zmian patologicznych obserwowanych u wszystkich badanych suk był podobny, jednak należy podkreślić, że wraz z upływem czasu stopień uszkodzenia gonad ulegał wyraźnemu nasileniu.

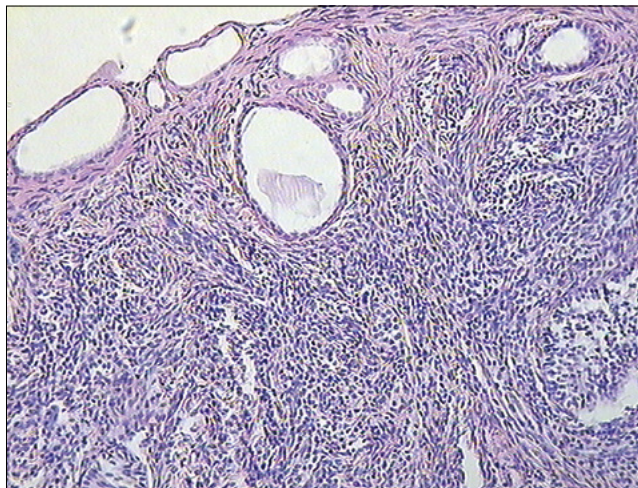
Podany hormon powodował zaburzenie równowagi w stymulacji hormonalnej



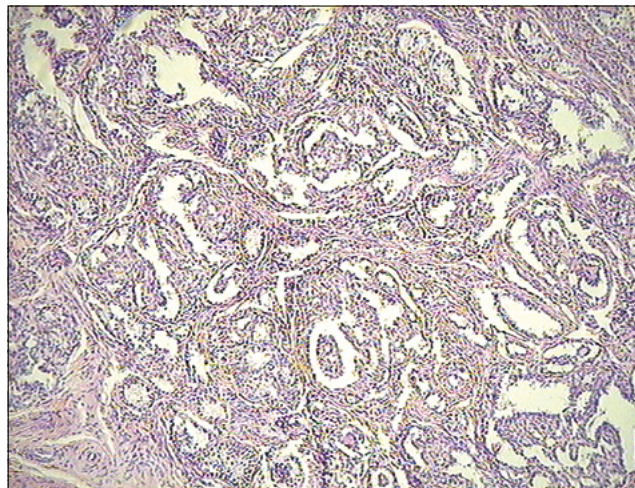
Ryc. 3. Jajnik suki 14 dni po podaniu estradiolu – apoptoza komórek lutealnych ciała żółtego. Barwienie: hematoksylina-eoizyna, pow. 40×



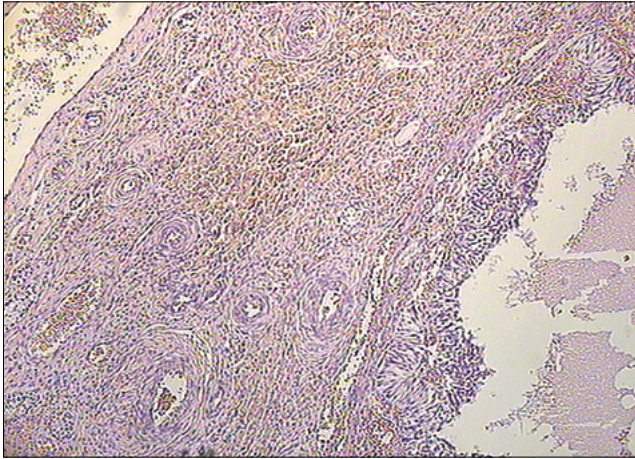
Ryc. 4. Jajnik suki 14 dni po podaniu estradiolu – fragment ściany małej torbieli pęcherzykowej, w zrębie gonady obecne pole komórek wtórnych zrębu. Barwienie: hematoksylina-eoizyna, pow. 40×



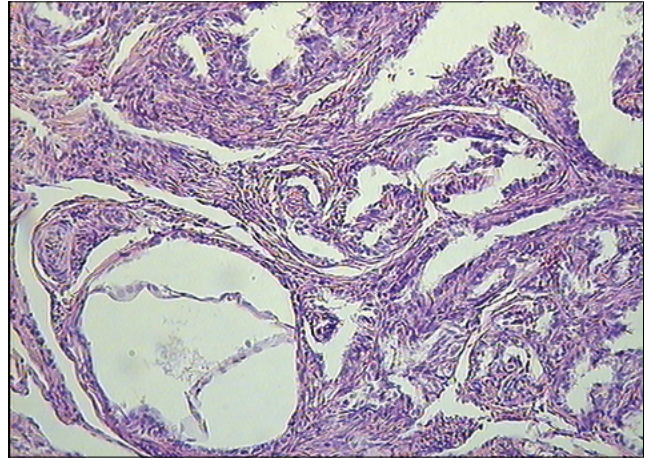
Ryc. 5. Jajnik suki 14 dni po podaniu estradiolu – małe torbiele nabłonkowe. Barwienie: hematoksylina-eoizyna, pow. 20×



Ryc. 6. Jajnik suki 14 dni po podaniu estradiolu – proliferacja komórek sieci jajnika. Barwienie: hematoksylina-eoizyna, pow. 10×



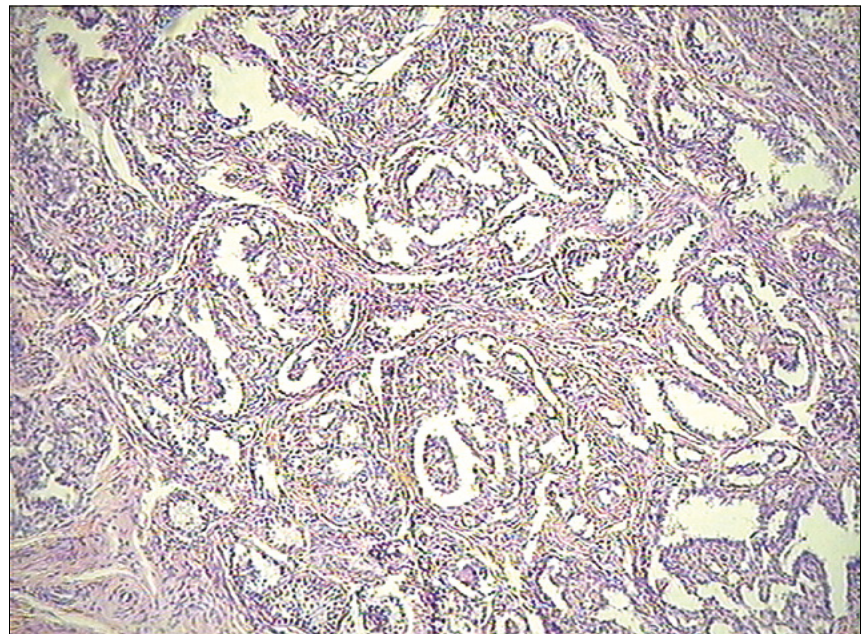
Ryc. 7. Jajnik sukki po 28 dniach od podania estradiolu – w zrębie obecne pole wtórnych komórek zrębu i fragment torbieli pęcherzykowej, w której komórki pęcherzykowe ulegają luteinizacji (cecha charakterystyczna zespołu luteinizacji niepełniętego pęcherzyka jajnikowego). Barwienie: hematoksylina-eozyna, pow. 20×



Ryc. 8. Jajnik sukki po 28 dniach od podania estradiolu – torbiele nabłonkowe, zwraca uwagę dysplazja i piętrowy układ komórek nabłonka do światła torbieli. Barwienie: hematoksylina-eozyna, pow. 20×

komórek jajnika, co znalazło jaskrawe odbicie w zaburzeniu procesu oo- i folikulogenezy. Z jednej strony estradiol indukował stymulację do rozwoju bardzo licznych pęcherzyków jajnikowych, a z drugiej nieprawidłowe warunki ich rozwoju i różnicowania były przyczyną uszkodzenia tego procesu, wyrażonego między innymi w formie tworzących się torbieli pochodzenia pęcherzykowego, pęcherzyków wielojajowych oraz masowego obumierania oocytów. Stwierdzenie występowania torbieli pęcherzykowych o budowie charakterystycznej dla zespołu luteinizacji niepełniętego pęcherzyka jajnikowego może stanowić przyczynek do poznania etiopatogenezy tego zespołu. Powstawanie torbieli pęcherzykowych jako wynik uszkodzenia procesu dojrzewania pęcherzyka jajnikowego może być spowodowane zarówno przez podanie estradiolu, jak i progestagenów (2). Postać morfologiczna torbieli wydaje się uwarunkowana fazą rozwoju uszkodzanego pęcherzyka jajnikowego, a sam proces chorobowy może być wynikiem różnorodnych zaburzeń hormonalnych. Ten ostatni wniosek nasuwa się w wyniku obserwacji zmian patologicznych powstających w jajnikach po podaniu zarówno progestagenów (2), jak i estradiolu.

Znacznego stopnia zgrubienie osłonki przejrzystej, obserwowane także w jajnikach suk, które otrzymywały progestageny (2), może stanowić pewien marker wczesnej fazy uszkodzenia pęcherzyka jajnikowego. Natomiast liczebność obecnych w zrębie jajnika złogów zgrubiałych osłonek pęcherzykowych może wskazywać skalę patologicznego procesu zachodzącego w pęcherzykach jajnikowych. Trudno przypuszczać, jaki jest dalszy los tych złogów. Być może zostaną uprzątnięte na drodze fagocytozy przez komórki zrębu, lecz brak jest na to dowodów.



Ryc. 9. Jajnik sukki po 28 dniach od podania estradiolu – dużego stopnia proliferacja komórek sieci jajnika z powstawaniem torbieli sieci. Barwienie: hematoksylina-eozyna, pow. 20×

Komórki zrębu jajnika mają zdolność transformacji w komórki zdolne do steroidogenezy, czego dowodem w warunkach fizjologicznych jest produkcja androgenów w komórkach osłonki wewnętrznej. Androgeny te są następnie transportowane do pęcherzyka, gdzie są dalej aromatyzowane do estrogenów. Proliferacja i przekrwienie osłonki wewnętrznej pod wpływem działania estradiolu, którą obserwowano po upływie 28 dni od jego podania, może być wyrazem wzmożonego zapotrzebowania na androgeny.

Proliferacja komórek jajników, które posiadają receptory estrogenowe, wydaje się być efektem wzmożonej stymulacji hormonalnej. Taką reakcję, w sposób bardzo wyraźnie zaznaczony zaobserwowano w komórkach nabłonka jajnikowego i sieci jajnika. W przypadku komórek

nabłonka jajnikowego, u suk obserwowanych po upływie 28 dni od podania estradiolu, obok powszechnie znanego skutku rozrostu w postaci powstawania torbieli nabłonkowych, na szczególną uwagę zasługuje charakter rozrostu tych komórek. Z punktu widzenia klasyfikacji rozrostów, niepokojącą cechą w diagnostyce patologicznej jest rozrost z piętrzeniem się komórek do światła torbieli. Stanowi to cechę dysplazji ulegających proliferacji komórek, co przyjmuje się jako fazę poprzedzającą wystąpienie metaplastji nowotworowej.

Stosunkowo skąpe są informacje dotyczące zmian patologicznych zachodzących w sieci jajnika suk. Komórki sieci jajnika posiadają receptory dla licznych hormonów, takich jak androgeny i progesteron (9, 10). Pojawienie się dużego stopnia proliferacji sieci jajnika u suk, którym podano

estradiol, jednoznacznie wskazuje, że hormon ten jest odpowiedzialny za indukcję tego typu zmian patologicznych w gonadzie. Informacja ta jest pierwszym oryginalnym doniesieniem mówiącym o tego typu patologicznym efekcie działania estradiolu na komórki sieci jajnika. Podobne zmiany w sieci jajnika obserwowano w badaniach własnych u suk, które otrzymywały progestageny (2).

Brak danych na temat znaczenia i funkcji komórek sieci jajnika w gonadzie suk nie pozwala na dokonanie precyzyjnej interpretacji efektu chorobotwórczego obserwowanych w tej strukturze zmian patologicznych. Można jednak z całą pewnością stwierdzić, że zarówno zmiany patologiczne powstałe w strukturze nabłonka jajnikowego, jak i sieci jajnika, które rozwinęły się w wyniku podawania estradiolu, są zmianami nieodwracalnymi. Czy i jaki wpływ ma obecność tych zmian w strukturze jajników suk na zachowanie prawidłowej oogenezy i folikulogenezy? Uzyskane w niniejszej pracy wyniki badań nie pozwalają na przedstawienie odpowiedzi na to pytanie. Jednak wyniki badań immunocytochemicznych jajników krów z torbielami sieci jajnika, przeprowadzone przez Kamyia (3) rzucają pewne światło na znaczenie tych zmian. Autor sugeruje, że zmienne chorobowo komórki ściany torbieli

sieci wykazują cechy produkcji i sekrecji hormonów (3). Z innych doniesień wiadomo, że zaburzenia w rozrodzie odnotowano u świnek morskich, u których występowały torbiele sieci jajnika (4).

Występowanie torbieli sieci jajnika opisano u kotów (1), u suk (6) oraz u myszy szczepu MRL/MpJ. Myszy tego szczepu są genetycznie obciążone chorobą z autoagresji i wykazano, że torbiele sieci jajnika są wynikiem zaburzeń w rozwoju płodowym jajników. Wyniki badań genetycznych wykazały, że powstawanie torbieli jest powiązane z określonym locus w chromosomie 6 (5). Wyniki tych badań wskazują na możliwość występowania genetycznie uwarunkowanych zaburzeń rozwojowych w powstawaniu torbieli sieci jajników.

W klasyfikacji nowotworów jajnika u kobiet (8) ujęte są rozrosty nowotworowe komórek sieci jajnika, natomiast brak jest w klasyfikacji nowotworów u zwierząt. Wydaje się, że wkrótce klasyfikacja nowotworów jajników zwierząt ulegnie weryfikacji, bowiem w ostatnim czasie ukazują się doniesienia o rozrostach sieci, które mają przypuszczalnie charakter nowotworowy (7).

W podsumowaniu należy stwierdzić, że estradiol podany w dawce antykoncepcyjnej u suk jest przyczyną wystąpienia poważnych zmian patologicznych

w strukturze jajników. Przedstawione wyniki badań winny stanowić ostrzeżenie w stosowaniu tych hormonów u suk, które mają być w przyszłości używane do rozrodu.

Piśmiennictwo

1. Gelberg H.B., MacEntee K., Heath E.H.: Feline cystic rete ovarii. *Vet. Pathol.* 1984, **21**, 304–307.
2. Katkiewicz M., Jurka P.: Wpływ proligestonu i octanu megestrolu na strukturę komórkową jajników suk. *W druku.*
3. Kamyia S., Tsukushi M., Yamano S., Daigo M.: S-100 protein-immunoreactive cells in the bovine ovary. *Anat. Rec.* 1989, **223**, 384–386.
4. Keller L.S., Griffith J.W., Lang C.M.: Reproductive failure associated with cystic rete ovarii in quinea pigs. *Vet. Pathol.* 1987, **24**, 335–339.
5. Lee S., Ichii O., Otsuka S.: Identifying a new locus that regulates the development of rete ovarian cysts in MRL/MpJ mice. *Jap. J. Vet. Res.* 2011, **59**, 79–88.
6. Mc Entee M.: *Reproductive Pathology of Domestic Mammals*. Academic Press Inc., San Diego. 2012.
7. Ram M.: Cystadenoma of rete ovarii, a case report with review. *Rare Tumors* 2009, **1**, 22–21.
8. Tavassoli F.A., Devilee P.: *Tumors of the ovary and peritoneum*. W: *World Health Organization Classification of Tumors Pathology and Genetics, Tumors of the Breast and Female Genital Organs*, 2003, IARC Press, Lyon, WHO.
9. Vermeirsch H., Simoons P., Coryn M., Van den Broeck M.: Immunolocalisation of progesterone receptors in the canine ovary and their relation to sex steroid hormone concentration. *Reproduction* 2001, **122**, 73–83.
10. Vermeirsch H., Simoons P., Coryn M., Van den Broeck M.: Immunolocalisation of androgen receptors in the canine ovary and their relation to sex steroid hormone concentration. *Reproduction* 2001, **122**, 711–721.