

Wpływ dojądrowo wszczepionego krystalicznego cholesterolu na jądro i nadnercze szczura białego w doświadczalnej awitaminozie B₁ (beri-beri)

Krystaliczny cholesterol wszczepiony dojądrowo wywiera wybitny wpływ na jądro, pobudzając spermatogenezę, a nadto komórki gruczołu śródmiąższowego, wydzielającego androgeny, czyli hormony samcze. Równocześnie można stwierdzić wzmożenie popędu płciowego doświadczalnych zwierząt, co niewątpliwie jest spowodowane wzmożonym wydzielaniem androgenów. Badania histochemiczne wykazały w jądrze z wszczepionym cholesterolem zwiększenie stężenia hormonów ketosteroidowych, do których należą typowe androgeny. Ciekawy jest fakt, że u osobnika, u którego do jednego jądra wszczepiono kryształki cholesterolu, także i jądro drugie wykazywało cechy pobudzenia swojej czynności wewnątrzwydzielniczej, co można było szczególnie wyraźnie zauważyć posługując się reakcjami histochemicznymi na obecność hormonów ketosteroidowych. Zauważono też, że cholesterol wszczepiony w obręb jajnika powoduje charakterystyczne zmiany. Wszystkie te spostrzeżenia i doświadczenia zostały wykonane w Zakładzie Biologii Krakowskiej Akademii Medycznej (Kuna—Woliczko, Niweliński). Obecnie wykonywane są dalsze badania łącznie z Zakładem Hodowli Zwierząt Uniw. Jagiell. z myślą praktycznego ich zastosowania w zootechnice. Z punktu widzenia teorii wyniki dotychczasowych poszukiwań nawiązują do szeregu prac (Bloch, Sayers, Claesson i Hillarp), według których cholesterol należy uznać za ciało wyjściowe dla biosyntezy hormonów płciowych.

Celem obecnej pracy było histochemiczne zbadanie wpływu wszczepionego dojądrowo krystalicznego cholesterolu na jądro i korę nadnercza białego szczura z rozwiniętymi objawami awitaminozy B₁ (polineuritis, beri-beri). Jak wynika z prac Julesza zastosowanie diety ketogennej, względnie wystąpienie ketozy wskutek głodzenia, powoduje wzmożenie wydzielania przez przedni płat przysadki mózgowej hormonu gonadotropowego, pobudzającego rozrost pęcherzyków Graafa w jajniku (hormon FSH lub gonadotropina A). U kobiet otrzymujących dietę ketogenną występowały też zaburzenia w menstruacji na skutek wzmożenia wydzielania gonadotropiny A.

W moich doświadczeniach awitaminozę B₁ u szczurów wywoływano przez podawanie im pokarmu nie zawierającego witaminy B₁. Dieta ta za-

wierała znaczne ilości cukru. Zaburzona wskutek witaminy B₁ przemiana węglowodanów powodowała nagromadzenie się w organizmie kwasu mlekowego i kwasu pirogronowego, czyli ketokwasu, co wywoływało ketozę. Ketozę powodowało również wygłodzenie zwierząt na skutek wadliwej przemiany materii, jak i wskutek braku apetytu spowodowanego awitaminozą.

Za materiał doświadczalny służyły białe szczury, samce w wieku trzech miesięcy. Wszystkie zwierzęta otrzymywały pokarm pozbawiony witaminy B₁. Po około 30 dniach wystąpiły wyraźne objawy awitaminozy. Zwierzęta były wychudzone, serce pracowało wolno, chód ich był chwiejny i pojawiał się niedowład tylnych odnóży. W tym czasie u części zwierząt wszczepiono do prawego jądra krystaliczny cholesterol w ilości 0,5—1 mg. Zarówno zwierzęta, którym cholesterolu nie wszczepiono (kontrolne), jak i zwierzęta z wszczepionym cholesterolem (doświadczalne) zabijano do badań histochemicznych po 20 i 40 dniach od chwili wszczepienia, czyli po 50 i 70 dniach otrzymywania diety bezwitaminowej. Zaznaczyć bowiem należy, że po wszczepieniu cholesterolu w dalszym ciągu stosowano dietę pozbawioną witaminy B₁. Ponieważ we wszystkich przypadkach cholesterol wszczepiano tylko do jednego z jąder (prawego), jądro to w dalszym opisie nazywam jądrem doświadczalnym a jądro lewe, jądrem kontroli względnej. Kontrolę bezwzględną stanowiły jądra zwierząt awitaminozowanych, którym nie wszczepiano cholesterolu.

Do badań histochemicznych utrwalano jądra w 10% formalinie. W ten sam sposób utrwalano i nadnercza. Skrawki mikroskopowe sporządzano na mikrotomie do zamrażania i badano je następującymi metodami:

1. Mikroskopem polaryzacyjnym na obecność dwójłomnych skupień cholesterolu.
2. Rozczynem kwasu siarkowego z wodą, w stosunku 5 części objętościowych kwasu na jedną część wody w celu wykrycia całkowitej ilości obecnych w tkankach związków steroidowych z nienasyconymi wiązaniami.
3. Metodą Schultza na obecność cholesterolu i jego estrów.
4. Metodą Ashbel-Seligmana, wykazującą w tkankach hormony 3- 17- i 20-ketosteroidowe.

Badania histochemiczne jąder i nadnerczy zwierząt doświadczalnych i kontrolnych dały następujące wyniki:

Jądra zwierząt kontrolnych, tj. z awitaminozą, lecz bez wszczepionego cholesterolu, wykazały po 50 dniach od chwili podania im pokarmu pozbawionego witaminy B₁ znaczny spadek wagi, dochodzący do 50%. W kanalikach nasiennych wystąpiły zmiany degeneracyjne I — III stopnia według klasyfikacji Slotopolsky'ego. Ciał dwójłomnych o własnościach cholesterolu nie dostrzeżono. Reakcja Schultza na obecność cholesterolu dała wynik ujemny. Reakcja z kwasem siarkowym dała tylko słaby odczyn w gruczole śródmiąższowym. Reakcja Ashbel-Seligmana wykazała bardzo małą ilość hormonów steroidowych w niektórych tylko częściach gruczołu śródmiąższowego. Komórki Sertoliego, jak i pierwsze warstwy komórek nasieniotwórczych, leżące tuż przy błonie podstawowej, nie wykazały zabarwienia.

Po 70 dniach od chwili zastosowania diety bezwitaminowej waga jąder zmniejszyła się jeszcze bardziej, procesy degeneracji w jądrach wzmogły się, a reakcja Ashbel-Seligmana dała wynik właściwie ujemny.

Nadnercza zwierząt badanych w 50 i 70 dniu były znacznie powiększone w stosunku do nadnerczy zwierząt spożywających pełnowartościowy pokarm. Warstwa kłębkowa kory dała reakcję ujemną metodą Ashbel-Seligmana, co wskazywało na brak lub znikomą ilość hormonów ketosteroidowych w tej warstwie. Wyraźne, chociaż niezbyt intensywne, fioletowe zabarwienie przyjęła natomiast warstwa pasmowa, od której warstwa siateczkowa odcinała się jako jednolicie wybarwiony, bladofioletowy pas. Wolny cholesterol pojawił się w dość dużych ilościach w warstwie pasmowej. Mało go było natomiast w warstwie kłębkowej a brak zupełny w warstwie siateczkowej.

U zwierząt doświadczalnych, tj. z wszczepionym cholesterolem wielkość jąder po 20 dniach od chwili wszczepienia była podobna do wielkości jąder kontrolnych. W badaniu natomiast mikroskopowym wystąpiły bardzo znaczne różnice. W około 30% kanalików światło ich wypełniały olbrzymie komórki Sertoliego. Oprócz komórek Sertoliego występowały w takich kanalikach nieliczne tylko komórki nasieniotwórcze i plemniki. W innych kanalikach światło ich było wypełnione bardzo dużą ilością plemników tkwiących nie tylko przy komórkach Sertoliego, ale także między komórkami plemnikotwórczymi. Komórki przylegające do wszczepionego kryształka cholesterolu po zastosowaniu metody Ashbel-Seligmana miały intensywne zabarwienie niebieskofioletowe, wskazujące na obfitość hormonów ketosteroidowych. Gruczoł śródmiąższowy zabarwiony był bardzo intensywnie, szczególnie w pobliżu wszczepionego kryształka cholesterolu. Podobnie komórki linii spermatogenetycznej znajdujące się w pobliżu błony podstawowej wybarwiały się wyraźnie metodą Ashbel-Seligmana. Reakcja z kwasem siarkowym ujawniła także najintensywniejsze zabarwienie w pobliżu wszczepionego kryształka cholesterolu.

W jądrach doświadczalnych natomiast można było zauważyć drobne skupienia cholesterolu, których nie dostrzega się w jądrach normalnych (Mac Eney).

Zbliżone do powyższych zmiany histologiczne i histochemiczne można było dostrzec i w jądrach kontroli względnej, z tą tylko różnicą, że zabarwienie było równomierne.

Po 40 dniach od chwili wszczepienia cholesterolu jądra doświadczalne wykazywały podobne zmiany. Ilość jednak uwstecznionych kanalików nasiennych była tu mniejsza. Wyniki badania histochemicznego nie odbiegały od opisanych poprzednio. Zauważyłem, że jądra doświadczalne wykazywały mniejszy stopień degeneracji niż jądra kontroli względnej.

U zwierząt doświadczalnych wszystkie warstwy kory nadnercza wykazywały silniejszą niż u zwierząt kontrolnych zdolność barwienia się zarówno przy badaniu kwasem siarkowym, jak i przy użyciu metody Ashbel-Seligmana. Najsilniej wybarwiała się warstwa pasmowa. Cholesterol występował obficie w warstwie kłębkowej i pasmowej. Ciała dwójłomne występowały w warstwie pasmowej, rzadko tylko w warstwie kłębkowej.

Wszystkie nadnercza, tak u zwierząt doświadczalnych jak i kontrolnych, w preparatach z 20- i 40-dniowych grup zwierząt wykazały znaczny spadek zdolności barwienia się w metodzie Ashbel-Seligmana w warstwie kłębkowej, silniej zaznaczony u zwierząt grupy 40-dniowej. W tej grupie wyraźnie obniżoną zdolność barwienia się wykazała również warstwa pasmowa.

Warstwa siatkowa, silnie barwiąca się u zwierząt doświadczalnych grupy dwudziestodniowej i cokolwiek słabiej u zwierząt doświadczalnych grupy czterdziestodniowej, w nadnerczach zwierząt kontrolnych była zupełnie bezbarwna, z wyjątkiem wąskiego rąbka graniczącego bezpośrednio z rdzeniem nadnercza. Zapasy cholesterolu za pomocą reakcji Schultza dostrzeżono w warstwie kłębkowej i pasmowej kory, nigdy natomiast nie napotkano ich w warstwie siatkowej.

Omówienie wyników

Szkodliwy wpływ głodzenia na jądro znany jest od dawna (Selye). Zarówno komórki Leydiga jak i komórki nasienne ulegają atrofii wskutek długotrwałego głodzenia lub niedożywienia.

Dostrzeżone w jądrach zwierząt doświadczalnych i kontrolnych zmiany wsteczne i objawy atrofii komórek nasiennych i gruczołu śródmiąższowego przypisać należy zarówno wpływowi głodzenia, wynikłego z przyczyn podanych we wstępie, jak i brakowi witaminy B₁.

Z drugiej strony Julesz stwierdził pobudzający wpływ ketozy na wytwarzanie hormonu gonadotropowego A (FSH) w przednim płacie przysadki mózgowej, którego działanie na jądro wyraża się wzrostem i rozwojem kanalików nasiennych. Jest prawdopodobne, że opisane zmiany wsteczne posunęłyby się znacznie dalej, gdyby nie ochronne działanie hormonu gonadotropowego A, wytwarzanego w zwiększonej ilości przez przysadkę pod wpływem ketozy wynikłej ze zwiększonego stężenia kwasu pirogronowego w ustroju.

W pracach Pazdro i Pokorny nad histochemią jądra szczura z wszczepionym krystalicznym hormonem pęcherzykowym, uwstecznienie jąder na skutek obniżenia wydzielania hormonów przysadki wyrażało się zmniejszeniem wagi jąder doświadczalnych o blisko 90% w stosunku do wagi jądra normalnego, mimo że dieta zwierząt doświadczalnych była pełnowartościowa i ilość przyjmowanego przez zwierzęta pokarmu prawidłowa.

Co się tyczy wpływu wszczepionego cholesterolu na jądra, to należy stwierdzić, że jądra doświadczalne z wszczepionym cholesterolem oraz jądra kontroli względnej wykazują obok uwstecznienia i atrofii komórek nasiennych — pobudzenie spermatogenezy i wzrost zawartości hormonów ketosteroidowych. Cofanie się zmian wstecznych pod wpływem cholesterolu zaznacza się przy tym silniej w jądrach doświadczalnych niż w jądrach kontroli względnej.

Obecność dodatniego odczynu Schultza w sąsiadujących z wszczepionym kryształem częściach jądra doświadczalnego i brak takiegoż odczynu w jądrach kontroli względnej świadczą o prawidłowej, choć nieco powolnej,

przemianie wszczepionego cholesterolu w hormony steroidowe. W jądrach zwierząt pozostających na pełnowartościowej diecie wszczepienie kryształu cholesterolu nie powodowało ukazania się wolnego, dającego się wykazać reakcją Schultza cholesterolu w najbliższej nawet z kryształem sąsiadujących komórkach jąder (Niweliński).

Wstrzymanie procesu wytwarzania hormonów steroidowych spowodowałoby ukazanie się znacznych ilości cholesterolu w postaci dodatniego odczynu Schultza w obu jądrach, tak doświadczalnym jak i kontroli względnej (Jurand, Pazdro, Pokorny).

Obecność plemników w kanalikach nasiennych przy zupełnym nieraz braku spermatogonii i spermatocytów świadczy o anormalnym przebiegu spermatogenezy, raptownie pobudzonej działaniem wszczepionego cholesterolu. Wynika stąd, że poznane w jądrach zwierząt normalnych zjawisko pobudzania spermatogenezy i wydzielania hormonów ketosteroidowych przez wprowadzony do jąder krystaliczny cholesterol daje się również wykazać u zwierząt pozbawionych dowozu witaminy B₁, o jądrach z uszkodzonymi kanalikami nasiennymi.

Ponieważ w jądrach zwierząt doświadczalnych nie zanikają całkowicie zmiany wsteczne i nie zwiększa się ciężar jąder, należy przyjąć, że chodzi tu o wpływ wszczepionego cholesterolu jako ciała wyjściowego dla androgenów na wzmożenie spermatogenezy. Hertz podaje, że atroficzne zmiany w narządach płciowych szczurów pozbawionych dopływu witaminy B₁ i chronicznie niedożywionych znikają po podaniu hormonów płciowych.

Całokształt zmian widocznych w korze nadnerczy zwierząt doświadczalnych i kontrolnych świadczy o wzmożonej czynności tego gruczołu w warunkach doświadczenia. Zjawisko to jest konsekwentnym wynikiem pobudzenia przez ketozę komórek β przysadki mózgowej, wytwarzających obok hormonu gonadotropowego A hormon kortikotropowy (ACTH). Przerost kory oraz widoczne w niej zmiany histochemiczne uważać należy za zjawiska wtórne. Nadnercza bowiem zwierząt pozbawionych przysadki mózgowej nie reagują na chemiczne bodźce (Selye).

Opisany spadek zdolności barwienia się warstw kłębkowej i pasmowej kory przy użyciu metody Ashbel-Seligmana u zwierząt grupy czterdziestodniowej tłumaczyć należy ich wyczerpaniem i słabnącą odpornością. O ile spadek zawartości hormonów ketosteroidowych w warstwie pasmowej daje się powiązać przyczynowo z jej nadczynnością wobec zaburzonej przemiany materii i zatrucia pośrednimi produktami przemiany węglowodanów zwierzęcia doświadczalnego, o tyle słabą zdolność barwienia się, a więc i niską zawartość hormonów ketosteroidowych warstwy kłębkowej odnieść należy do dużej zawartości soli potasu w diecie bezwitaminowej, użytej w niniejszym doświadczeniu (Deane, Shaw, Greep). W innym bowiem doświadczeniu zwierzęta utrzymywane na podobnej, lecz zawierającej wszystkie witaminy diecie wykazały również spadek zdolności barwienia się warstwy kłębkowej przy zastosowaniu metody Ashbel-Seligmana, świadczący o zmniejszonej zawartości hormonów ketosteroidowych tej części kory.

Zmiany zdolności barwienia się warstwy siatkowej w metodzie Ashbel-Seligmana zdają się potwierdzać jej zdolności kompensacyjne wobec niewydolności wydzielniczej jądra (Selye). Równolegle z rozwojem rekonstrukcji wydzielniczej jądra, bardziej zaawansowanym u zwierząt grupy czterdziestodniowej, warstwa ta wykazuje stopniowo malejącą zdolność barwienia się. Prawdopodobne jest również, że spadek zdolności barwienia się warstwy siatkowej stoi w związku z ogólnym wyczerpaniem zwierząt grupy czterdziestodniowej.

Reasumując, cholesterol krystaliczny wszczepiony do jąder zwierząt wykazujących wybitne objawy awitaminozy B₁ (beri-beri) powoduje cofanie się oznak atrofii i degeneracji w jądrach.

L I T E R A T U R A

1. C a m e r o n A. T.: Recent Advances in Endocrinology, London, 1947.
2. D e a n e H. W., S h a w I. H., G r e p R. O.: Endocrinology 43, 133, 1948.
3. H a w k P. B., O s e r B. L., S u m m e r s o n W. H.: Practical Physiological Chemistry, London, 1949.
4. H e r t z R.: Vitamins and Hormones, Vol. IV, 136, 1946.
5. J u l e s z M.: Schweiz. Med. Wochenschrift 20, 541, 1942.
6. J u r a n d A.: Doniesienie osobiste.
7. K u n a M., W o l j e z k o K.: Folia Morphologica, I, 484, 1950.
8. M a c E n e r y W. B., N e l s o n W. O.: The Anat. Record, 106, 221, 1950.
9. N i w e l i ń s k i J.: Folia Morphologica, I, 521, 1950.
10. N i w e l i ń s k i J.: Endokrynologia Polska, II, 195, 1951.
11. P a z d r o H., P o k o r n y K.: cyt. Niweliński, poz. 10.
12. S e l y e H.: Textbook of Endocrinology, Montréal, 1947.
13. S t i e v e H. u. M o e l l e n d o r f: Harn- u. Geschlechtsapparat, 1930.