

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii z Pracownią Cytologii Doświadczalnej. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. Irena Królikowska-Prasał

Alicja ZARĘBSKA, Irena KRÓLIKOWSKA-PRASAŁ

Morfometryczne badania przyuszniczy szczura po doświadczalnym podawaniu Encortonu

Morphometrical Investigations of Rat Parotid Gland After Experimental Encortone Treatment

Znany jest wpływ glikokortykoidów na fizjologię różnych narządów (4—7, 13). Odpowiedź na te hormony zależy od dawki, okresu podawania oraz wieku organizmu (9). Badano reakcję sekrecyjną komórek trzustki w przypadku zarówno nadmiaru, jak i niedoboru glikokortykoidów (9, 11). Gruczoł ten wykazuje wiele cech wspólnych z przyuszną.

Ze względu na powszechne stosowanie w klinice glikokortykoidów w leczeniu licznych schorzeń oraz brak dokładnych danych dotyczących reakcji przyuszniczy na te hormony, postanowiono zbadać ilościowo zmiany niektórych parametrów komórek wydzielniczych tej ślinianki.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenie przeprowadzono na szczurach samcach rasy Wistar, hodowli wsobnej, o masie ciała 250—270 g. Zwierzęta podzielono na 2 grupy doświadczalne i równoległe 2 grupy kontrolne, uwzględniając wiek zwierząt oraz wpływ stresu. Każda grupa liczyła po 5 zwierząt.

Grupa I kontrolna — zwierzęta otrzymywały przez 7 dni codziennie rano sondą wodę destylowaną.

Grupa I doświadczalna — zwierzęta otrzymywały przez 7 dni codziennie rano przed karmieniem sondą zawiesinę Encortonu (firmy Polfa) w wodzie destylowanej w dawce 1 mg/kg m.c.

Grupa II kontrolna — zwierzęta otrzymywały przez 30 dni wodę destylowaną w podobny sposób jak zwierzęta grupy I kontrolnej.

Grupa II doświadczalna — zwierzęta otrzymywały przez 30 dni Encorton w identyczny sposób jak zwierzęta grupy I doświadczalnej. Podawanie leku w przypadku obu grup doświadczalnych rozpoczynano pełną dawką, tj. 1 mg/kg m.c., następnie zmniejszono ją do połowy, a pod koniec okresu podawania — do 1/3. Każde zwierzę z grupy I doświadczalnej otrzymało łącznie 1,4 mg Encortonu, a z grupy II doświadczalnej — 5,1 mg Encortonu. Szczury były karmione standardową paszą granulowaną i miały pod dostatkiem wody do picia. Zabijano je przez usypianie eterem.

U zwierząt doświadczalnych obserwowano w początkowym okresie podawania leku kilkuniedniowy wzmoczony apetyt, a przyrost ciężaru ciała u zwierząt otrzymujących Encorton 1 tydzień i 1 miesiąc w porównaniu z kontrolą był taki sam — równy 100—110 g.

Na fragmentach ślinianki przyusznej utrwalonej w 4% formalinie i barwionej hematoksyliną i eozyną wykonano następujące pomiary morfometryczne:

1. Jądra komórkowe mierzono za pomocą mikroskopu projekcyjnego (stosując powiększenie $1000\times$), biorąc pod uwagę najmniejszą i największą średnicę jądra, a następnie obliczano powierzchnię przekroju stosując wzory πr^2 na pole koła i πab na pole elipsy. Na skrawkach przyusznicy każdego ze zwierząt mierzono 100 jąder w komórkach losowo wybranych pęcherzyków. Następnie ustalano średnią powierzchnię przekroju jąder dla każdej grupy.

2. Powierzchnię przekroju pęcherzyków (na skrawkach przyusznicy każdego ze zwierząt mierzono powierzchnię 100 pęcherzyków) za pomocą planimetru biegunowego po uprzednim odbiciu pęcherzyków na kalce technicznej. Uwzględniając powiększenie kwadratowe $1000 \times 1000 = 1\,000\,000$ obliczano właściwą powierzchnię przekroju.

3. Średnią powierzchnię przekroju komórki obliczano biorąc pod uwagę liczbę komórek w mierzonych pęcherzykach.

Wyniki badań opracowano statystycznie stosując Test Studenta (14). Wartości badanych parametrów: powierzchni przekroju jąder komórkowych, powierzchni przekroju pęcherzyków, powierzchni przekroju komórek, liczby komórek w pęcherzykach dla każdej grupy, a także odchylenia standardowe, różnice między grupami i wartość funkcji testowej t zestawiono w tab. 1—4. Obliczoną dla każdego parametru wartość funkcji testowej t dla $n_1 + n_2 = 498$ stopni swobody porównywano z odczytaną wartością krytyczną funkcji testowej t dla 5% i 1% ryzyka błędu ($\alpha_{0,05} = 1,960$) i ($\alpha_{0,01} = 2,576$) (14) i zaznaczono odpowiednio różnice statystycznie istotne.

WYNIKI BADAŃ

Statystycznie istotny wzrost średniej powierzchni przekroju jąder komórkowych w porównaniu z grupami kontrolnymi stwierdzono u zwierząt w grupach I i II doświadczalnych, chociaż w grupie I tylko przy założeniu 5% ryzyka błędu (tab. 1).

Średnia powierzchnia przekroju pęcherzyków wykazywała zmiany statystycznie istotne w grupach I i II doświadczalnych — w grupie I zmalała w porównaniu z kontrolną, w grupie II wzrosła (tab. 2).

Średnia powierzchnia przekroju komórek wzrosła w sposób statystycznie istotny w obu grupach (I i II) doświadczalnych w porównaniu z grupami

Tab. 1. Średnia powierzchnia przekroju jąder komórek wydzielniczych przyusznicy szczura w μ^2
Mean surface section area of secretory cell nuclei of rat parotid in μ^2

Grupy	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Różnica między średnimi	Wartość funkcji testowej t
I kontrolna	18,805	6,945	+ 1,080*	2,375
I doświadczalna Encorton (7 dni)	19,885	7,430	$p < 0,05$ $p > 0,01$	
II kontrolna	15,412	7,695	+ 4,431**	9,784
II doświadczalna Encorton (30 dni)	19,843	6,582	$p < 0,01$	

* Różnica istotna przy założeniu 5% ryzyka błędu.

** Różnica istotną przy założeniu 1% ryzyka błędu.

* Significant difference at the assumption of 5% risk of error.

** Significant difference at the assumption of 1% risk of error.

Tab. 2. Średnia powierzchnia przekroju pęcherzyków wydzielniczych przyusznicy szczura w μ^2
Mean surface section area of secretory acini of rat parotid in μ^2

Grupy	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Różnica między średnimi	Wartość funkcji testowej t
I kontrolna	634,64	291,185	− 75,06**	4,431
I doświadczalna Encorton (7 dni)	559,58	242,225	$p < 0,01$	
II kontrolna	532,72	221,422	+ 66,32**	4,471
II doświadczalna Encorton (30 dni)	599,04	246,999	$p < 0,01$	

** Patrz tab. 1 — See Table 1.

kontrolnymi. Wzrost ten w grupie II doświadczalnej był szczególnie duży i wyniósł 19,836 μ^2 (tab. 3).

Średnia liczba komórek w pęcherzykach wydzielniczych w grupach I i II doświadczalnych wykazywała niewielkie zmniejszenie w porównaniu z grupami kontrolnymi (większa w grupie II aniżeli w I), ale nie było to zmniejszenie statystycznie istotne (tab. 4).

Tab. 3. Średnia powierzchnia przekroju komórek wydzielniczych przyusznicy szczura w μ^2
Mean surface section area of secretory cells in rat parotid in μ^2

Grupy	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Różnica między średnimi	Wartość funkcji testowej t
I kontrolna	108,722	37,167	− 7,219**	2,715
I doświadczalna Encorton (7 dni)	101,503	46,399	$p < 0,01$	
II kontrolna	98,850	33,059	+ 19,836**	7,528
II doświadczalna Encorton (30 dni)	118,686	48,774	$p < 0,01$	

** Patrz tab. 1 — See Table 1.

Tab. 4. Średnia liczba komórek w pęcherzykach wydzielniczych przyusznicy szczura
Mean number of cells in secretory acini of rat parotid

Grupy	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Różnica między średnimi	Wartość funkcji testowej t
I kontrolna	5,994	2,149	− 0,058	0,388
I doświadczalna Encorton (7 dni)	5,936	2,559	$p > 0,05$	
II kontrolna	5,762	2,440	− 0,24	1,625
II doświadczalna Encorton (30 dni)	5,522	2,226	$p > 0,05$	

DYSKUSJA

Prześledzenie zachowania się komórek wydzielniczych przyusznicy po podaniu glikokortykoidów może być interesujące ze względów klinicznych. Wiadomo, że receptory dla glikokortykoidów są obecne we wszystkich komórkach organizmu (13), ale efekty wywołane przez te hormony są różne (4, 5, 7, 9). Ze względu na to, że szczury są zwierzętami nocnymi i najwyższy poziom steroidów przypada u nich na godz. 6—8 wieczorem (1, 19), nadmiar glikokortykoidów spowodowany podawaniem tych hormonów zwłaszcza w godzinach rannych narusza równowagę hormonalną organizmu. Znany jest wpływ hormonów kory nadnerczy na trzustkę — gruczoł, który wykazuje cechy wspólne z przyusznicą (12, 13).

Przeprowadzone badania morfometryczne wykazały, że przyusznica, podobnie jak trzustka, jest gruczołem bardzo wrażliwym na działanie glikokortykoidów. Fizjologiczna dawka Encortonu, jaką zastosowano, spowodowała statystycznie istotny wzrost średniej powierzchni przekroju jąder w komórkach surowiczych przyusznicy po tygodniowym podawaniu leku, jeszcze większy po miesięcznym (grupa II dośw.) Zmiany te były prawdopodobnie wynikiem zwiększonej wymiany między jądrem i cytoplazmą. Wzrost powierzchni przekroju jąder w komórkach przyusznicy obserwowano po podawaniu testosteronu (16), jednakże wpływał on równocześnie na zwiększenie liczby komórek w pęcherzykach (15), czego nie stwierdzono w naszym doświadczeniu. Również niedobór hormonów androgennych (gonadektomia) powodował wzrost powierzchni przekroju jąder w komórkach przyusznicy i komórkach zewnątrzwydzielniczych trzustki (17, 18). W obu tych przypadkach miała miejsce mobilizacja kory nadnerczy i zwiększone wydzielanie glikokortykoidów w odpowiedzi na stres. Glikokortykoidy wiążą się z miejscami receptorowymi dla androgenów w przypadku ich niedoboru (8), a także modulują pojemność i stężenie receptorów dla EGF (2).

Średnia powierzchnia przekroju pęcherzyków oraz komórek wykazywała zmiany różne w grupach I i II doświadczalnych. W grupie I obserwowano statystycznie istotne jej zmniejszenie, a w grupie II — zwiększenie. Natomiast liczba komórek w pęcherzykach w obu grupach (I i II) doświadczalnych nie wykazywała statystycznie istotnych zmian w porównaniu z grupami kontrolnymi. Podobne zachowanie się komórek gronkowych trzustki po podawaniu glikokortykoidów obserwowali Bourry i wsp. (3), Morriset i wsp. (9, 10) oraz Otsuki i wsp. (12).

Jest bardzo prawdopodobne, że zmniejszenie pęcherzyków i komórek w grupie I doświadczalnej oraz wzrost objętości jąder komórkowych związany był z hiperplazją komórek i tworzeniem nowych pęcherzyków. Natomiast wzrost tych parametrów w grupie II doświadczalnej był wynikiem hipertrofii.

W n i o s k i

1. Podawanie w ciągu 7 dni Encortonu w dawce fizjologicznej (1 mg/kg m.c.) powoduje statystycznie istotny wzrost wielkości jąder komórkowych oraz statystycznie istotne zmniejszenie wielkości komórek i pęcherzyków przyusznicy szczura. Zmiany tych parametrów są wynikiem hiperplazji komórek oraz tworzenia się nowych pęcherzyków.

2. Podawanie w ciągu 30 dni Encortonu w dawce fizjologicznej powoduje hipertrofię jąder komórkowych, komórek i pęcherzyków przyusznicy szczura.

PIŚMIENNICTWO

1. Allen C., Kendall J. W.: Maturation of Circadian Rhythm of Plasma Corticosterone in the Rat. *Endocrinology* **80**, 926, 1967.
2. Baker J. B. i wsp.: Dexamethasone Modulates Binding and Action of Epidermal Growth Factor in Serum-Free Cell Culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 1882, 1978.
3. Bourry J., Sarles H.: Secretory Pattern and Pathological Study of the Pancreas of Steroid-Treated Rats. *Dig. Dis. Sci.* **23**, 423, 1978.
4. Chao J., Margolius H. S.: Differential Effects of Testosterone, Thyroxine and Cortisol on Rat Submandibular Gland Versus Renal Kallikrein. *Endocrinology* **113**, 2221, 1983.
5. Kostulak A.: The Effect of ACTH and Cortisone on the Behaviour of Arylsulphatases in the Salivary Glands of White Rat. *Acta Histochem.* **58**, 63, 1977.
6. Lewiński A. P. i wsp.: Diejstwie kallikreina i kortykostieroidow na fermentowydzielitelienuj funkcju slunnych zielez. *Fizjologiczeskij Żurnal SSSR* **70** (6), 842, 1984.
7. Loeb J. N.: Corticosteroids and Growth. *N. Engl. J. Med.* **295**, 547, 1976.
8. Maruyama S., Sato S.: Binding of Glucocorticoids to the Androgen Receptor of Mouse Submandibular Glands. *J. Endocrinol.* **106** (3), 329, 1985.
9. Morriset J., Jolicœur L.: Effect of Hydrocortisone on Pancreatic Growth in Rats. *Am. J. Physiol.* **239**, G95, 1980.
10. Morriset J. i wsp.: Interaction of Hydrocortisone and Caerulein on Pancreatic Size and Composition in the Rat. *Am. J. Physiol.* **241**, G37, 1981.
11. Mozheiko L. A.: Structural Metabolic Aspects of the Adrenocortical Effect Upon the Pancreas. *Probl. Endocrinol. (Mosk.)* **29** (4), 81, 1983.
12. Otsuki M. i wsp.: Hydrocortisone Treatment Increases the Sensitivity and Responsiveness to Cholecystokinin in Rat Pancreas. *Am. J. Physiol.* **251** (3), G364, 1989.
13. Polyakowa T. J.: Synthesis and Excretion of the Pancreatic Secrete in White Rats Under Conditions of Abundant Hydrocortisone. *Arch. anat.* **1**, 65, 1986.
14. Sawicki F.: Elementy statystyki dla lekarzy. PZWL, Warszawa 1982.
15. Zarębska A.: The Effect of Testosterone on Secretory Segments of Rat Parotid Gland. *Folia Morphol. (Warsz.)* **40**, 97, 1981.
16. Zarębska A.: Wpływ testosteronu na morfologię jąder komórkowych i ilość kwasów nukleinowych w komórkach gruczołowych przyusznicy szczura. *Endokr. Pol.* **33**, 151, 1982.
17. Zarębska A.: Wpływ gonadektomii i podawania Mesteronu na komórki części zewnątrzwydzielniczej trzustki szczura białego. *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, Sectio D* **20**, 125, 1987.
18. Zarębska A.: Morfometryczne badania przyusznicy szczura po obustronnej gonadektomii oraz po gonadektomii i podawaniu Mesteronu. *Endokr. Pol.* **40** (5), 271, 1989.

SUMMARY

The influence of Encortone treatment in the dose of 1 mg/kg of body mass on the secretory segments of male rat parotid gland was investigated. The changes of section area of cell nuclei, secretory cells, serous acini and changes of the number of cells in the acini were statistically analyzed.

The observed changes depended upon the period of Encortone treatment. Seven-day Encortone treatment caused a statistically significant increase of the cell nuclei size and decrease of the cell and acini sizes. Changes of these parameters were result of cell hyperplasia and formation of new acini. Thirty-day Encortone treatment caused hypertrophy of cell nuclei, cells and acini of rat parotid.