

**MODIFICIRAJUĆI UTICAJ STRESA NA NEKE ENDOKRINE ŽLEZDE
MIŠA KOD KASNIH POSLEDICA SUBLETALNOG
JONIZACIONOG ZRAČENJA***

Kališnik, M., O. Vraspir-Porenta, M. Logonder-Mlinšek, M. Zorc,
T. Lejko-Zupanc, A. Rus, D. Štiblar, J. Škrk

Sažetak: Za studij interakcije stresa i zračenja na miševima oba spola bila su napravljena dva eksperimenta. U prvom pokusu, 6 meseci nakon početka zračenja zracima s dvadeset dnevnih doza po 50 rada, bile su stereološki analizirane neke endokrine žlezde u 24 miša, od kojih je polovina bila dražena u pravilnim intervalima s kombinacijom optičkog signala i blagog električnog udara. U drugom pokusu 120 miševa živelo je do spontane smrti nakon što su bili draženi i/ili zračeni. Stres i zračenje smanjili su aktivaciju štitnjače, te sinergistički uzrokovali atrofiju Leydigovih intersticijskih ćelija. U ovariju je interakcija obiju faktora okrepila hiperplaziju intersticijskih ćelija. U nadbubrežni žlezdi draženje je povećalo, a zračenje smanjilo vakuolizaciju ćelija. Oba faktora zajedno smanjila su pojavu involutivnih gigantskih ćelija u kori. Životinje ispostavljene zračenju bile su lakše, a draženju teže. Zračenje im je skratilo preživljavanje, draženje produžilo. Prema tome je eustres ublažio štetne, katabolične posledice zračenja.

UDK 616-092.9-001.2

Deskriptori: miši, učinci sevanja, stres, električna stimulacija, endokrine žlezde, stereološka analiza.

Radiol. lugosl., 13; 507—512, 1979

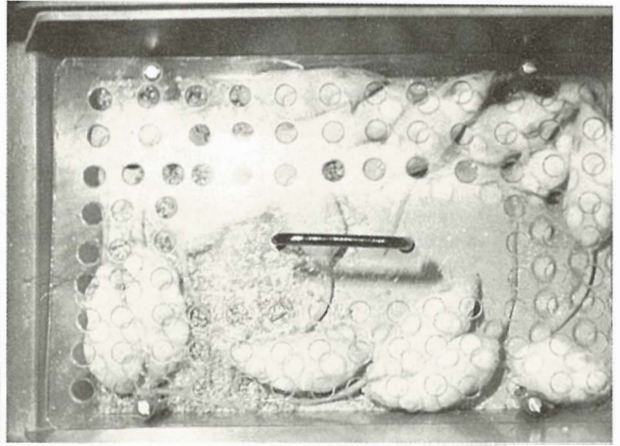
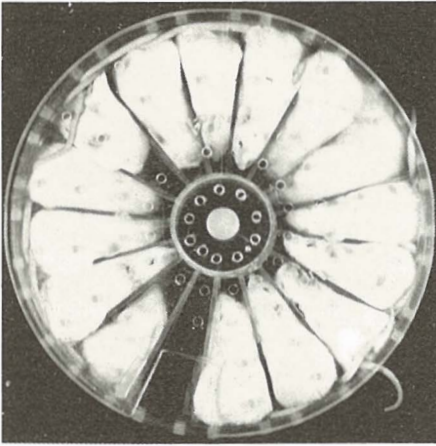
Uvod — O dejstvu stresa na endokrine žlezde izvestili smo u seriji članaka (1, 2, 3, 4, 5, 6). Pokazali smo, s kvantificiranim histološkim podacima, da stres aktivira nadbubrežnu žlezdu i deprimira štitnjaču kao i gonade. O kasnom dejstvu subletalnog ionizacionog zračenja na iste organe izvestili smo u drugoj studiji (7) i prikazali prilično različite efekte, koji su pre svega posledica veće ili manje destrukcije, kojoj je sledila više ili manje uspešna regeneracija odnosno rediferencijacija. Neke strukturne promene nakon iradijacije mogli bi tumačiti kao posledicu promjene centralne neuroendokrine regulacije ili postradijacionog stresa. Tako je glandula thyroidea bila manje aktivirana. Testis je bio jedva alteriran. Najveće promene pokazale su se na ovariju: bio je bez oocita i folikla, uključno atretičnih, intersticijske ćelije bile su hipertrofične i hiperplastične. Kora nadbubrežne žlezde bila je zadebljana. Zona fasciculata bila je manje vakuolizirana nego normalno i hipertrofična, pre svega na račun drugih dviju zona.

U toj studiji zanimala nas je interakcija stresa i jonizirajućeg zračenja: da li su učinci sinergi-

stični ili antagonistični i da li se mogu pojaviti nove kvalitete kod učinka oba faktora? Ako se radi o disocijaciji učinaka na razne endokrine žlezde, kakav je efekat kombinovanog delovanja stresa i zračenja na vitalne funkcije organizma kao celine?

Materijal i metode — Na miševima oba spola napravili smo dva eksperimenta. U prvome smo 24 miša soja CBA, od kojih je bila polovica muškog i polovica ženskog spola u starosti 1,5 meseci, razdelili u tri grupe po 8 životinja. U svakoj grupi bila je polovica životinja dražena u pravilnim intervalima kombinacijom optičnog signala i blagog električnog udara na dno kaveza; druga polovina bila je nedražena kontrola. Prva takva grupa bila je žrtvovana nakon jednomesečnog draženja u starosti 2,5 meseca. Ujedno smo počeli s totalnim zračenjem gama zracima sa 20 uzastopnih dnevnih doza po 50 rada (140 rad/min) tako, da je ukupna doza dostigla 1000 rada. Životinje su bile zračene u šupljim kotačima iz pleksi stakla, koji su bili podeljeni u 16 odvojenih, 2,7 cm visokih i 7 cm dugih prostora. Od stajice do mesta zračenja konfinirali smo i prevozili i nezračene životinje tako, da su sve bile zatvorene u tim kotačima približno jedan sat dnevno (sl. 1). Zra-

* Prikazano na Simpoziju o nervnom i endokrinom sistemu Društva anatoma SR Srbije 10. novembra 1978 u Beogradu.



Slika 1 — Šuplji kotači iz pleksi stakla u kojima se konfiniraju miševi za vreme zračenja.

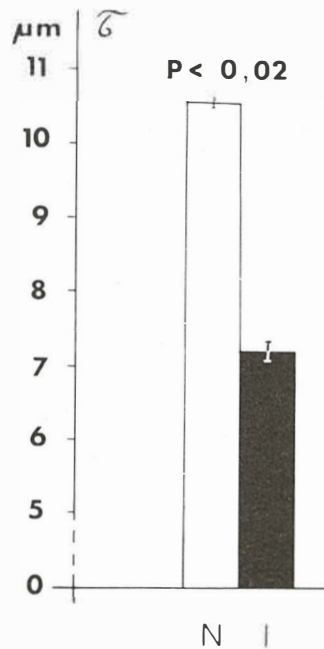
Slika 2 — Kavez za miševe ureden za zračenje. Omogućava proizvoljno kretanje u vodoravnom smeru, a sprečava puzanje.

čenu, kao i nezračenu skupinu miševa žrtvovali smo 6 meseci nakon početka zračenja u starosti od 8,5 meseci. Nakon žrtvovanja u eterovoj narkozi oduzeli smo nadbubrežnu žlezdu, štitnjaču, ovarij i testis, te ih fiksirali u Bouinovi tekućini, zalili parafinom, rezali u stepenaste serije ca. 6 μm debelih rezova i bojili hematoxilinom-eozinom. Sa sistematičkom stereološkom analizom kod povećanja objektiva 10 \times i 63 \times odredili smo volumensku gustoću i apsolutni volumen, površinsku gustoću i apsolutnu površinu, dužinsku gustoću i apsolutnu dužinu, te brojnu gustoću i apsolutni broj pojedinih tkivnih i ćelijinih sastojaka u proučavanim organima. Analizom varijance studirali smo uticaj draženja, zračenja i njihove interakcije; o poslednjem izveštavamo u ovom članku.

U drugom eksperimentu 120 miševa soja Balb/C, polovicu mužjaka i polovicu ženki, podelili smo na 4 jednake grupe od kojih su 2 bile dražene od trećeg meseca starosti dalje na isti način kao u prvom eksperimentu, a 2 nedražene kontrole. Po jedna dražena i nedražena grupa u starosti od 4 meseci, bila je ispostavljena zračenju na jednak način kao u prvom eksperimentu s tom razlikom, da životinje nisu bile konfinirane u šuplje kotače, već u kavezima pokrivenim perforiranom pločom iz pleksi stakla, koje je omogućavalo kretanje životinja samo u vodoravnom pravcu, dok je penjanje po kavezu bilo sprečeno. Po jedna dražena i nedražena grupa bile su prividno zračene (sl. 2). Životinje su jednom sedmično vagane, a određivana je

i potrošnja hrane. Živele su do spontane smrti, nakon koje smo ih obducirali. Za statističku analizu upotrebili smo Studentov test.

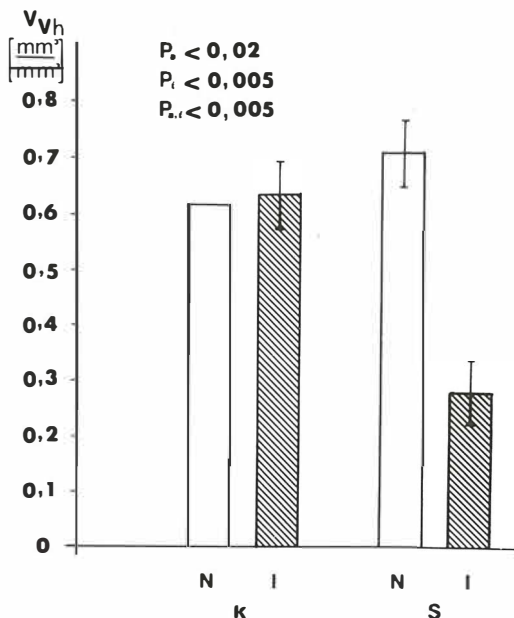
Rezultati — Na štitnu žlezdu delovali su stres kao i iradijacija (sl. 3) u istom smislu tj.



Slika 3 — Zračenje (I) signifikantno snizuje ($P < 0,02$) prosečnu visinu epitela štitnjače ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) u poređenju sa nezračenim životinjama (N).

smanjili su aktiviranost; interakcija oba faktora nije imala signifikantnog dodatnog uticaja.

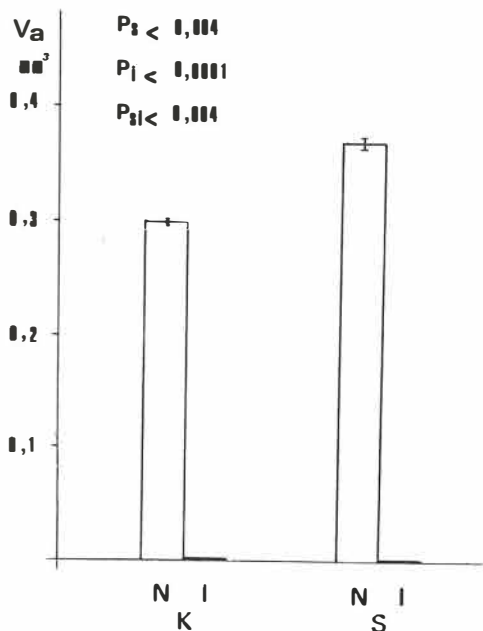
Na Leydigove intersticijske ćelije testisa stres i iradijacija imali su sinergističko dejstvo, njihova volumenska gustoća dodatno se je smanjila u grupi, koja je dražena i iradiirana (sl. 4).



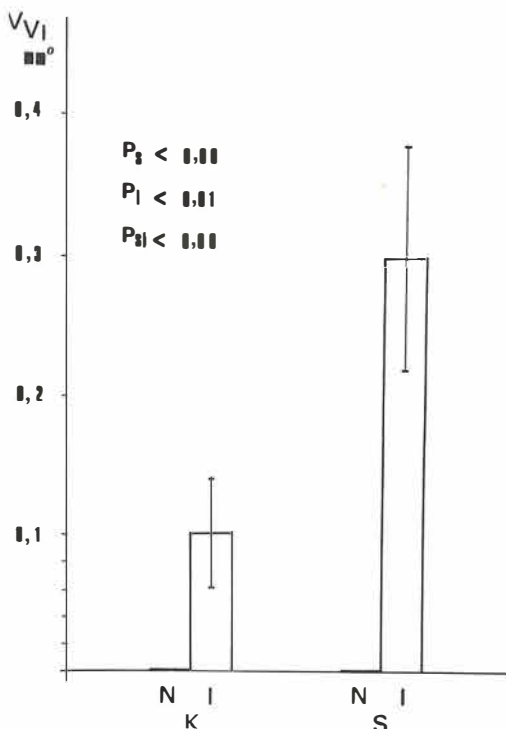
Slika 4 — Volumenska gustoća Leydigovih intersticijskih stanica testisa životinja pod uticajem stresa (S) te kod nedraženih kontrola (K), kao i kod zračenih (I) i nezračenih (N) životinja. Upisani su nivoji rizika za odbijanje nulte hipoteze za učinak stresa (S), iradijacije (I) i interakcije (S, I).

Na ovariju stresor je signifikantno povećao apsolutni volumen atreličkih folikula (što smo tumačili kao posledicu kočenja ovulacije i devijaciju sazrevanja folikula u pravcu atrezije). U jajnicima zračenih miševa, suprotno, uopće nismo našli atrelične folikule (niti druge oblike ovarijskih folikla). Interakcija stresa i radijacije na atreličkim foliklima bila je signifikantno divergentna (sl. 5). Na drugoj strani samo u ovarijima zračenih životinja pojavile su se intersticijske ćelije. Interakcija stresa i iradijacije ovde je delovala sinergistički, tj. zapreminska gustoća intersticijskih ćelija bila je najveća u grupi životinja, koje su bile zračene i dražene (sl. 6).

U nadbubrežnoj žlezdi stresor i iradijacija antagonistički su delovali na volumensku gustoću vakuola u ćelijama nadbubrežne žlezde,

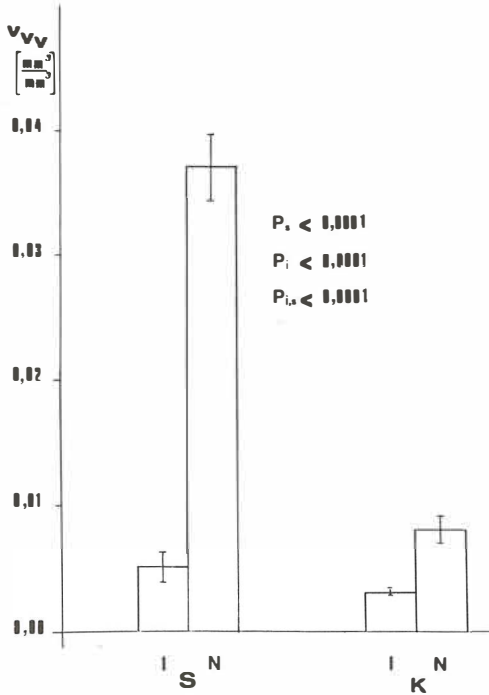


Slika 5 — Apsolutni volumen atreličkih folikula u prvom pokusu (oznake kao na slici 4).



Slika 6 — Volumenska gustoća intersticijskih stanica u prvom pokusu (oznake kao na slici 4).

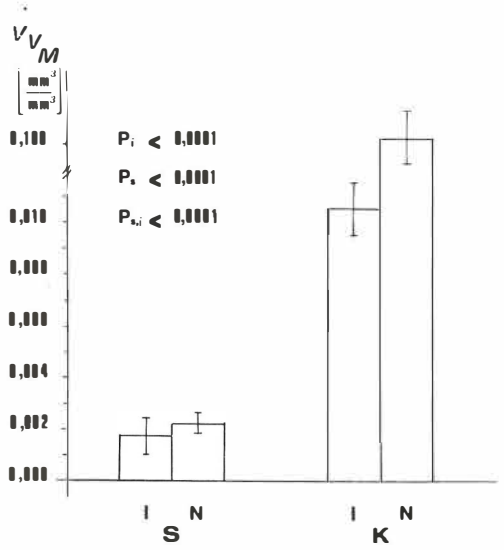
napose kore. Stresor je povećao, a iradijacija smanjila vakuolizaciju, kod čega je dejstvo interakcije također signifikantno (sl. 7). Na drugoj



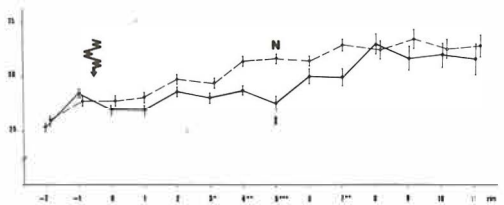
Slika 7 — Volumenska gustoća vakuola u stanicama nadbubrežne žlezde u prvom pokusu (oznake kao na slici 4).

strani sam stres signifikantno je povećao volumensku gustoću žila, dok je iradijacija imala disocijirano dejstvo: kod životinja pod stresom smanjila je, a kod nedraženih povećala irigaciju. Konačno su stres i iradijacija sinergistički signifikantno smanjili volumensku gustoću mnogojezgrenih gigantskih ćelija, kod čega je bila takođe interakcija dodatno signifikantna (sl. 8).

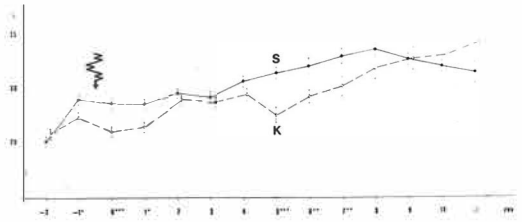
Težina zračenih miševa oba spola, napose ženski, je od 3. meseca nakon zračenja dalje, skoro celo vreme signifikantno zaostajala za težinom nezračenih miševa (sl. 9). Težina draženih životinja oba spola skoro za čitavo vreme eksperimenta, signifikantno je prevazilazila težinu nedraženih kontrola (sl. 10). Kod nedraženih, zračenih životinja težina je zaostajala za težinom nezračenih životinja, dok kod draženih životinja razlika u težini zračenih i nezračenih nije bila tako očita; opisane razlike nisu signifikantne, već su istosmislene kod oba pola.



Slika 8 — Volumenska gustoća mnogojedarnih stanica u kori nadbubrežne žlezde u prvom pokusu (oznake kao na slici 4).



Slika 9 — Težina zračenih (I) i nezračenih (N) životinja za vreme drugog opita. Na apscisi su navedeni meseci nakon završenog zračenja (O). Znak + znači $P < 0,05$, ++ $P < 0,01$, +++ $P < 0,001$.

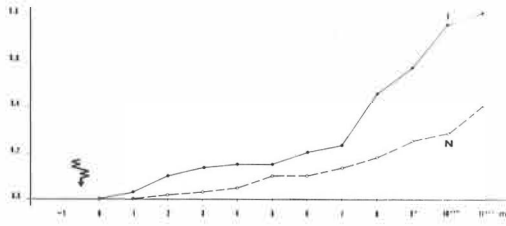


Slika 10 — Težina životinja koje su bile pod uticajem stresa (S) i bez njega (N) u drugom pokusu (oznake kao na slici 9).

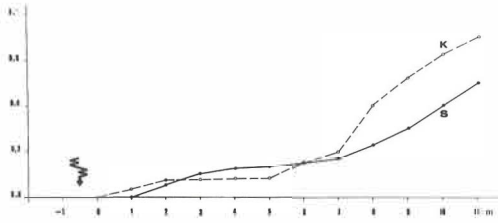
U potrošnji hrane nije bilo signifikantne razlike među grupama.

Preživljavanje zračenih miševa oba spola je od 9. meseca nakon zračenja dalje signifikantno smanjeno (sl. 11). Preživljavanje draženih ženki očito je produženo, dok preživljavanje draženih

mužjaka nije, se je zbog toga razlika u preživljavanju kod oba spola signifikantna samo u 11. mesecu nakon zračenja (sl. 12).



Slika 11 — Kumulativna smrtnost iradiiranih (I) i nediradiiranih (N) miševa u drugom pokusu (oznake kao na slici 9).



Slika 12 — Kumulativna smrtnost životinja, koje su bile pod uticajem stresa (S) i nedraženih kontrolnih životinja (N) u drugom pokusu (oznake kao na slici 9).

Diskusija — Mehanizam delovanja stresa i iradijacije samih za sebe na endokrine žlezde dosta je dobro objasnjen (8, 9). Literatura o interakciji oba faktora prilično je škrta. U našem primeru podražaj, koji je delovao stresogeno bio je blag i pojavljivao se u pravilnim intervalima. Zato mislimo, da je bila postignuta faza adaptacije, odnosno stanje eustresa prema Selyeju (10), što bi prema našim očekivanjima povećalo nespecifičnu otpornost prema raznim noksama, uključivo jonizacionim.

Mehanizam inhibitorynog dejstva stresa i zračenja na štitnjaču bio bi isti, tj. smanjenje sekrecije TSH zbog povećanja sekrecije ACTH; budući da oba činioca zajedno nisu signifikantno povećali taj učinak, možemo zaključiti, da je bio učinak svakog za sebe već maksimalan. Inhibitoryno delovanje kombinacije stresa i iradijacije na Leydigove intersticijske ćelije u testisima, kao producente androgena, moglo bi biti posledica poremećene centralne neuroendokrine regulacije, koja bi dovela do smanjene sekrecije LH, dok gotovo intaktni semeni epitel govori da

sekrecija FSH nije bila poremećena. U suprotnosti s testisima, u kojima vidimo postiradijacionu restituciju skoro ad integrum, kasne promene u zračenim ovarijima vrlo su teške. Mišji oociti zapravo vrlo su radiosenzitivni te su u našim pokusnim uslovima bili skoro posve uništeni, zajedno s pripadajućim foliklima, čija funkcija u normalnim prilikama je takođe sekrecija estrogena. To je verovatno bio dovoljan razlog za kompenzacionu hiperplaziju intersticijskih ćelija, kojima takođe pripisuju sekreciju estrogena. Draženje je očito ubrzalo tu kompenzacionu pojavu, koja je verovatno posledica jonizacione povrede. Posledica interakcije draženja i zračenja na nadbubrežnu žlezdu su kontraverzne. Delovanje stresa je očito stimulatorno, što se izražava u povećanoj vakuolizaciji ćelija i jačoj krvnoj irigaciji, na drugoj strani kočena je involucija, koju označava porast mnogojezgrenih gigantskih ćelija, znakovima piknoze u jezgrima. Postiradijaciono smanjenje vakuolizacije moglo bi da bude znak nedovoljne rediferencijacije ili moguće »iscrpljene« hiperaktivnosti zbog iradijacionog stresa. Kočenje pojava involucijskih gigantskih ćelija radi postiradijacione regeneracije je razumljivo delovalo sinergistički stresu radi draženja.

Iz kretanja telesne težine miševa u drugom pokusu možemo zaključiti, da su posledice zračenja katabolične; smrtnost životinja nakon zračenja bila je takođe ubrzana. Nasuprot tome draženje je delovalo anabolički i sprečavalo smrtnost. Prema tome je blago draženje u pravilnim intervalima delovalo na metabolizam antagonistički zračenju; s draženjem bio je dostignut eustres, koji je blažio štetne posledice jonizacionog zračenja. Zanimljivo je, da je bila reaktivnost ženki veća nego mužjaka; to je u skladu s većim promenama u strukturi ovarija u usporedbi s testisima.

Potrebno je dodati, da se pokusne okolnosti prvog i drugog pokusa razlikuju u tri točke: u prvom pokusu bili su miševi soja CBA na početku zračenja stari 2,5 meseca, a za vreme zračenja bili su konfinirani (to bi mogao biti dodatni stresor), u drugom, bili su miševi soja Balb/C na početku zračenja stari 4 meseca i za vreme zračenja nisu bili konfinirani; time smo želeli smanjiti preveliku opću smrtnost, koja nam je pokvarila neki raniji tovrnski pokus. Zapravo, zanima nas takođe radijaciona karcinogeneza kod draženih životinja, što će biti sadržaj drugog izveštaja.

Summary

MODIFYING ACTION OF STRESS
ON EFFECTS OF SUBLETHAL IONIZING
RADIATION OBSERVED IN SOME
ENDOCRINE GLANDS OF MICE

Two experiments were carried out on mice of both sexes in view of studying the interaction of stress and irradiation. In the first experiment 24 mice of CBA strain were distributed into 3 groups; half of the animals of each group were irritated by an optic signal followed by a mild electric shock repeated at equal intervals, whereas the other half were not subjected to stress. The animals of group 1 were sacrificed one month after the beginning of the experiment, when group 2 was subjected to gamma irradiation with 20 successive daily doses of 50 rad (140 rads/min), the total dosage amounting to 1000 rad. Group 3 comprised the nonirradiated animals. Groups 2 and 3 were sacrificed 6 month after the initiation of irradiation. From the animals, thyroid gland, testis, ovary and adrenal were taken for the systematic stereological analysis using light microscope. — In the second experiment, 120 mice of Balb/C strain were distributed into 4 groups: 2 irritated and 2 nonirritated groups, of which one irritated and one nonirritated group were exposed to irradiation using the same schedule as in the first experiment. The animals were weighed weekly and the food intake was measured throughout. They lived until their spontaneous death.

Both, stress and irradiation diminished the activity of the thyroid gland, the interaction of the two, however, entailed no significant additional effect. — In the testes, stress and irradiation caused a synergistic decrease in the volume density of the Leydig's interstitial cells. — In ovaries, stress brought about an increase in the absolute volume of the atretic follicles whereas irradiation destroyed all the follicles including the atretic ones and induced hyperplasia of the interstitial cells. Animals exposed to both, stress and irradiation showed a greater volume density of the interstitial cells, which spoke for a synergistic interaction of stress and irradiation. — The effects entailed on the adrenal were dissociated. Stress promoted the vacuolization, while irradiation decreased it, the effect of interaction being additionally significant. Stress, per se, increased the volume density of the blood vessels and irradiation showed results of opposite direction in irritated and nonirritated animals. Both, stress and irradiation diminished the volume density of multinucleate giant cells in the adrenal cortex, the results of interaction were additionally significant and had the same direction. — The irradiated mice had lower body weight as compared to the nonirradiated animals, whereas the irritated mice were heavier than the nonirritated ones. The survival of the irradiated mice was shortened as compared to the nonirradiated ones, while the irritated mice had prolonged survival times as compared to the nonirritated animals.

Mild stress applied at equal intervals induced the state of eustress, which had an anabolic and antagonistic action against the catabolic effect of irradiation. Eustress was found to reduce the ill late effects of ionizing radiation.

Literatura

1. Kališnik M. et al.: Vpliv psihosomatskega stresa na nekatere endokrine žleze seva CBA. *Zdrav. vestn.* **45** (1976), 567—570.
2. Logonder-Mlinšek M., M. Kališnik, D. Štiblar: Uticaj psihosomatskog stresa i presađenog Ehrlichovog ascitesnog tumora na štitnjaču miševa. *Folia anat. iugosl.* **6** (1977), 51—56.
3. Vraspir-Porenta O., M. Kališnik, R. Pleskovič-Zorc: Uticaj psihosomatskog stresa i Ehrlichovog ascitesnog tumora (EAT) na jajnike kod miševa. *Folia anat. iugosl.* **6** (1977), 57—62.
4. Zorc M., M. Kališnik, D. Štiblar: Utjecaj psihosomatskog stresa i presađenog Ehrlichovog ascitesnog tumora na suprarenalnu žlezdu miša soja CBA. *Folia anat. iugosl.* **7** (1978), 57—64.
5. Zorc M., M. Logonder-Mlinšek, M. Kališnik: Uticaj stresa na suprarenalnu i štitastu žlezdu miša. *International Symposium on Neuroendocrine Regulatory Mechanisms. Proc. serb. Acad. Sci.* (u štampi).
6. Kališnik M., A. Rus, T. Lejko: Uticaj stresa na testis miša. *International Symposium on Neuroendocrine Regulatory Mechanisms. Proc. serb. Acad. Sci.* (u štampi).
7. Kališnik M. et al.: Histological and stereological analysis of some endocrine and lymphatic organs of mice after total body irradiation. *International Symposium on the late biological effects of ionizing radiation, Vienna, 13—17, March 1978* (in press).
8. Mason J. W.: Organization of the multiple endocrine responses to avoidance in the monkey. *Psychosom. Med.* **30** (1968), 774—788.
9. Sommers S. C.: Effects of ionizing radiation upon endocrine glands. U: Berdjis C. C. (ed.), *Pathology of irradiation*. Williams and Wilkinson, Baltimore 1971, 408—446.
10. Selye H.: Stress without distress. *World Health*, December 1974, 3—11.

Zahvale

Autori zahvaljuju Raziskovalnoj skupnosti Slovenije za subvencioniranje tog rada u okviru projekta Endokrinij i malignomi, nadalje tehničnim saradnicima Instituta za histologiju i embriologiju, pre svega laborantima Ivanu Mavriču i Nadi Plevnik, slikarici Veri Fettich, abs. med. Tomu Brezovaru iz Instituta za patološku morfologiju MF u Ljubljani za fotografije.

Adresa autora: Prof. dr. Miroslav Kališnik, Inštitut za histologiju in embriologijo MF, 61105 Ljubljana, p. p. 10.