

I Klinika Ginekologii Operacyjnej, Instytut Położnictwa i Chorób Kobięcych.
Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: doc. dr hab. n. med. Henryk Żrubek

Jorgos KUTULAS, Marian SEMCZUK,
Henryk ŻRUBEK, Daniela CZARKOWSKA

**Zachowanie się niektórych odczynów histochemicznych
w tkankach jądra szczura białego w następstwie działania Kaptanu**

Поведение некоторых гистохимических реакций в тканях яичка белой крысы
в следствие действия Каптана

The Behaviour of some Histochemical Reactions in Testicle Tissue of a White Rat
as a Result of Kaptan Action

W dotychczasowym piśmiennictwie spotkano doniesienia o toksycznym działaniu wielu substancji chemicznych i czynników fizycznych na gonadę męską (4, 6, 8, 11, 13, 17). Poprzednie badania własne wykazały, że Kaptan zaliczany do fungicydów niewątpliwie powoduje uszkodzenie jąder badanych zwierząt (15). Stwierdzono zmiany w obrazie morfologicznym jądra oraz zniesienie zdolności reprodukcyjnej poddanych obserwacji zwierząt. Zmiany powyższe miały charakter ustępujący. Obecne badania własne, jako kontynuacja badań poprzednich, mają na celu ocenę zachowania się niektórych odczynów histochemicznych w tkankach jądra szczura białego w następstwie działania Kaptanu.

MATERIAŁ, POSTĘPOWANIE I METODY BADAŃ

Obecne badania przeprowadzono na 18 białych szczurach, samcach szczepu Wistar, w wieku 3 miesięcy i początkowym c.c. 180—230 g. Na 7 dni przed rozpoczęciem doświadczenia i przez cały czas jego trwania zwierzęta przebywały w oddzielnych klatkach w identycznych warunkach hodowlanych. Grupę doświadczalną stanowiło 12, a kontrolną 6 samców. Zwierzęta grupy doświadczalnej otrzymywały przez 7 dni codziennie, a przez następnych 14 dni co drugi dzień dożyłdkowo Kaptan w dawce dobowej 3 g/kg ciężaru ciała, co stanowiło 1/5 LD₅₀. Zwierzęta grupy kontrolnej otrzymywały placebo — 2 ml 0,9% chlorku sodu. W 22 dniu doświadczenia zwierzęta badanych grup dekapitowano.

Wycinki z jąder zwierząt grupy kontrolnej i doświadczalnej utrwalano w płynie Bouina, a następnie krojono na mikrotomie. W celu uwidocznienia mukopolisacharydów stosowano metodę PAS. Dla wykazania obecności i rozmieszczenia kwasu dezoksyrybonukleinowego (DNA) posłużono się metodą Feulgena-Rosenbecka, a dla wykazania kwasu rybonukleinowego (RNA) skrawki jąder barwiono metodą Bracheta (1). W celach kontrolnych przeprowadzono wytrawianie skrawków rybonukleazą. Dehydrogenazę mleczanową wykrywano wg Barki i Andersona (2), zaś adenylozotrójfosfatazę (ATP-azę) według Wachsteina i Meisela (18).

WYNIKI BADAŃ

Grupa kontrolna

W skrawkach jąder zwierząt grupy kontrolnej najintensywniejszą reakcję PAS wykazuje tkanka graniczna, przednia część główki plemników oraz akrosom. Błony komórkowe wykazują także pozytywną reakcję barwną. W cytoplazmie spermatogonii są liczne ziarnistości PAS dodatnie, których liczba maleje w spermatocytach pierwszego rzędu, a następnie drugiego rzędu. W cytoplazmie komórek Sertoliego odczyn PAS jest słabszy w porównaniu z komórkami plemnikotwórczymi i ma charakter dyfuzyjny. W komórkach Leydiga obecne są duże ziarnistości, intensywnie PAS dodatnie. Ciałka resztkowe wykazują wyraźną reakcję PAS (ryc. 1).

Dodatnią reakcję Feulgena-Rosenbecka obserwowano w obrębie całego jądra komórkowego, głównie spermatogonii i spermatocytów pierwszego i drugiego rzędu w postaci ziarnistego odczynu, ze szczególnym nasileniem jego intensywności w błonie jądrowej. W komórkach Leydiga DNA jest rozmieszczony w całej chromatynie jądrowej w postaci drobnych ziarenek. Główki plemników i dojrzewające spermatydy dawały silny, równomierny odczyn na obecność kwasu dezoksyrybonukleinowego (ryc. 2).

W preparatach jąder barwionych na obecność kwasu rybonukleinowego cytoplazma spermatogonii zawiera odczyn ziarnisty o jednolitym zabarwieniu. W cytoplazmie spermatocytów pierwszego rzędu występują liczne, gęsto obok siebie ułożone ziarenka kwasu rybonukleinowego, dające intensywną reakcję barwną. W jądrach tych komórek obecne są duże, silnie barwiące się jąderka. W spermatocytach drugiego rzędu obserwuje się osłabienie reakcji barwnej w porównaniu ze spermatocytami pierwszego rzędu, mniejsze jąderka, które często są zupełnie niewidoczne. W młodych spermatydach odczyn jest bardzo słaby o charakterze dyfuzyjnym. W spermatydach starszych reakcja barwna jest silniejsza, w ich cytoplazmie pojawiają się także maleńkie ziarnistości, świadczące o obecności tego kwasu. Cytoplazma komórek Sertoliego ma bladoróżowe zabarwienie, natomiast w jądrze stwierdza się obecność dużego jąderka, bogatego w kwas

rybonukleinowy. W cytoplazmie niektórych komórek Leydiga obserwuje się ziarenka dające pozytywną reakcję barwną o takim samym nasileniu jak w spermatocytach pierwszego rzędu, a w innych odczyn ujemny (ryc. 3).

U wszystkich zwierząt grupy kontrolnej najbardziej intensywny odczyn enzymatyczny na obecność dehydrogenazy mleczanowej (LDH) zaobserwowano w komórkach Leydiga. Miał on charakter ziarnisty i dyfuzyjny, głównie na obwodzie komórki. Również dodatni, ale umiarkowany odczyn ziarnisty obserwowano we wszystkich komórkach rozrodczych, głównie młodych spermatogoniach i spermatocytach spoczynkowych, w postaci ziarnistości zgrupowanych w mitochondriach komórkowych (ryc. 4).

Odczyn na aktywność adenzynotrójfosfatazy widoczny jest w błonach podstawowych kanalików nasiennych i nabłonku plemnikotwórczym. Szczególnie duży odczyn stwierdzono w tkance granicznej błon podstawowych oraz ścianach międzykanalikowych naczyń krwionośnych, gdzie ziarnistości zlewają się ze sobą tworząc rodzaj otoczki. W nabłonku plemnikotwórczym odczyn na obecność ATP-azy ma charakter drobnych ziarenek zlokalizowanych głównie w mitochondriach (ryc. 5).

Grupa doświadczalna

W skrawkach jąder grupy doświadczalnej intensywna reakcja PAS cechuje tkankę graniczną oraz przednie odcinki główek plemników. W cytoplazmie spermatogonii oraz spermatocytów pierwszego i drugiego rzędu ziarenek PAS dodatnich spostrzega się niewiele, odczyn ma charakter dyfuzyjny, jednakowo nasilony we wszystkich wyżej wymienionych komórkach. W spermatydach akrosom jest widoczny, ale reakcja PAS w wielu komórkach wyraźnie słabsza w porównaniu z grupą kontrolną. Pozytywną reakcję barwną obserwuje się w komórkach dwu- i wielojądrazystych, komórkach złuszczonej do światła kanalików i ciałkach resztkowych. W komórkach Sertoliego i Leydiga odczyn PAS jest podobny do opisanego w grupie kontrolnej (ryc. 6).

Odczyn na obecność kwasu dezoksyrybonukleinowego w obserwowanych komórkach nie wykazuje uchwytanych różnic w porównaniu z grupą kontrolną. W komórkach złuszczonej do światła kanalików, które obserwuje się w preparatach jąder zwierząt omawianej grupy, występuje dodatnia reakcja Feulgena (ryc. 7).

Barwienie na obecność kwasu rybonukleinowego w prawidłowych komórkach plemnikotwórczych, komórkach Sertoliego, komórkach dwu- i wielojądrazystych oraz w strefie spermatocytów pierwszego i drugiego

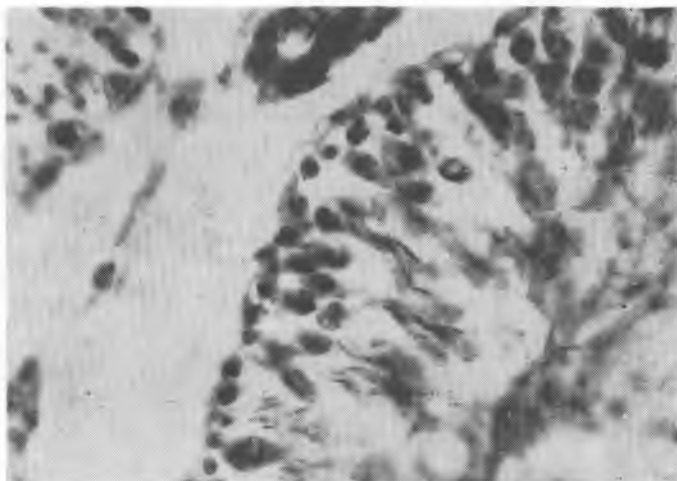
rzędu nie wykazuje różnic w porównaniu z grupą kontrolną. Natomiast osłabiony i dyfuzyjny odczyn barwny występuje w komórkach Leydiga. W komórkach złuszczonych do światła kanalików stwierdza się pozytywną reakcję barwną (ryc. 8).

W grupie zwierząt doświadczalnych aktywność dehydrogenazy mleczanowej okazała się znacznie mniejsza, zarówno w obrębie komórek Leydiga, jak i w komórkach plemnikotwórczych. Lokalizacja zaś aktywności omawianego enzymu jest identyczna jak w grupie kontrolnej (ryc. 9). Odczyn na obecność adenozynotrójfosfatazy (ATP-azy) w grupie zwierząt doświadczalnych jest widoczny, zarówno w błonach podstawowych, jak i w nabłonku plemnikotwórczym. Zwraca jednak uwagę fakt, że aktywność omawianego enzymu jest osłabiona, szczególnie w obrębie tkanki granicznej błon podstawowych kanalików nasiennych.

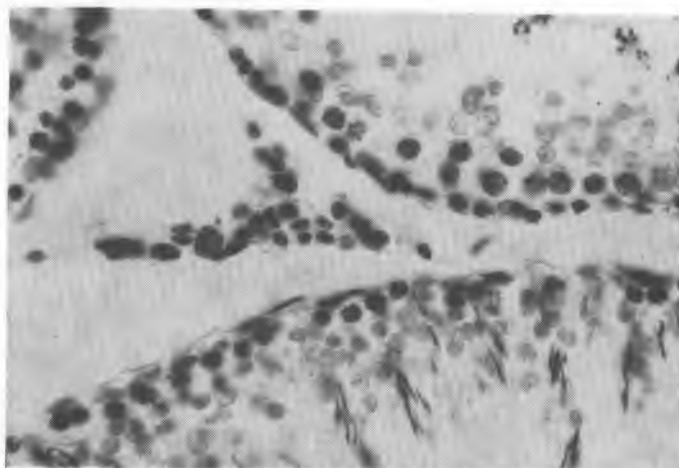
OMÓWIENIE WYNIKÓW

W jądrach zwierząt otrzymujących Kaptan przez okres 3 tygodni wykazano osłabienie intensywności reakcji PAS w komórkach nabłonka plemnikotwórczego oraz zmniejszenie aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH) i adenozynotrójfosfatazy (ATP-azy). Nie zaobserwowano wyraźnej różnicy w zawartości i rozmieszczeniu kwasu dezoksyrybonukleinowego (DNA) i rybonukleinowego (RNA) w komórkach jąder zwierząt grupy doświadczalnej w porównaniu z kontrolną. Porównując wcześniejsze badania własne (15) z wynikami obecnych obserwacji można sądzić, że Kaptan prowadzi do powstania zmian w obrazie morfologicznym gonady oraz zahamowania funkcji reprodukcyjnej badanych zwierząt, ale także przyczynia się do zaburzenia metabolizmu w obrębie komórek gonady męskiej. Wydaje się, że toksyczny wpływ fungicydów na gonadę męską szczura ma charakter bezpośredni, poprzez jego toksyczny wpływ na komórki nasienne oraz komórki Leydiga. Zastanawiające jest, czy Kaptan również, może w mniejszym stopniu obok ogólnoustrojowego wpływu, nie uszkadza pośrednio gonady poprzez zaburzenie czynności wydzielniczej podwzgórza i przysadki mózgowej.

Badania Miętkiewskiego i wsp. (10) nad zawartością fosfolipidów, wolnych kwasów tłuszczowych, estrów cholesterolu, cholesterolu, nukleoproteidów i substancji PAS pozytywnych u zdrowych oraz niepłodnych mężczyzn wskazują, że zawartość tych substancji zależy od stanu anatomicznego komórek Leydiga. Potwierdza to, że substancje powyższe niewątpliwie biorą udział w syntezie podstawowego hormonu jądrowego — testosteronu. Substancje PAS pozytywne są głównym materiałem energetycznym prawidłowej komórki, między innymi rozrodczej, stąd wy-



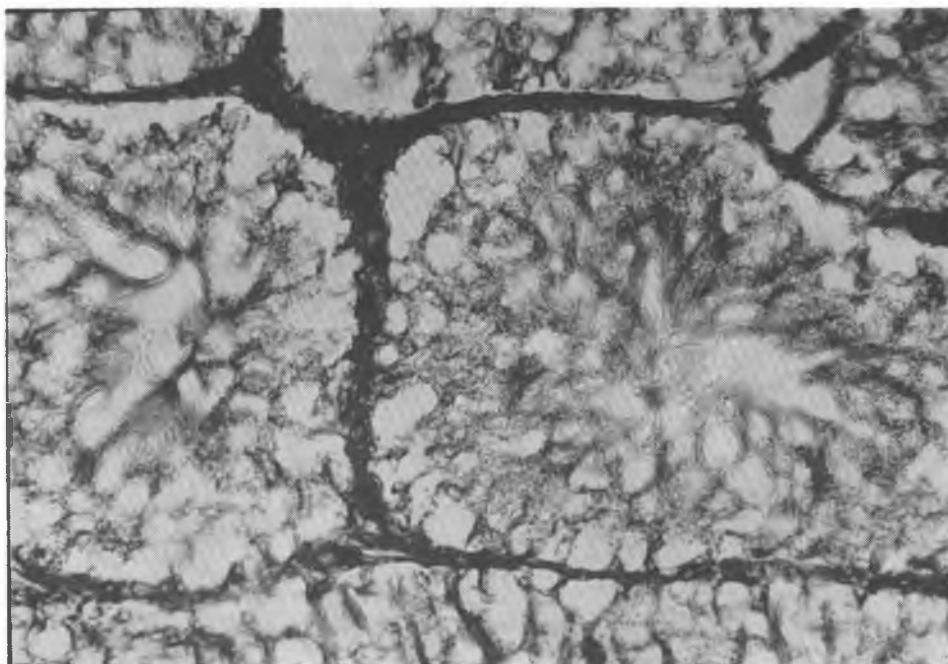
Ryc. 1



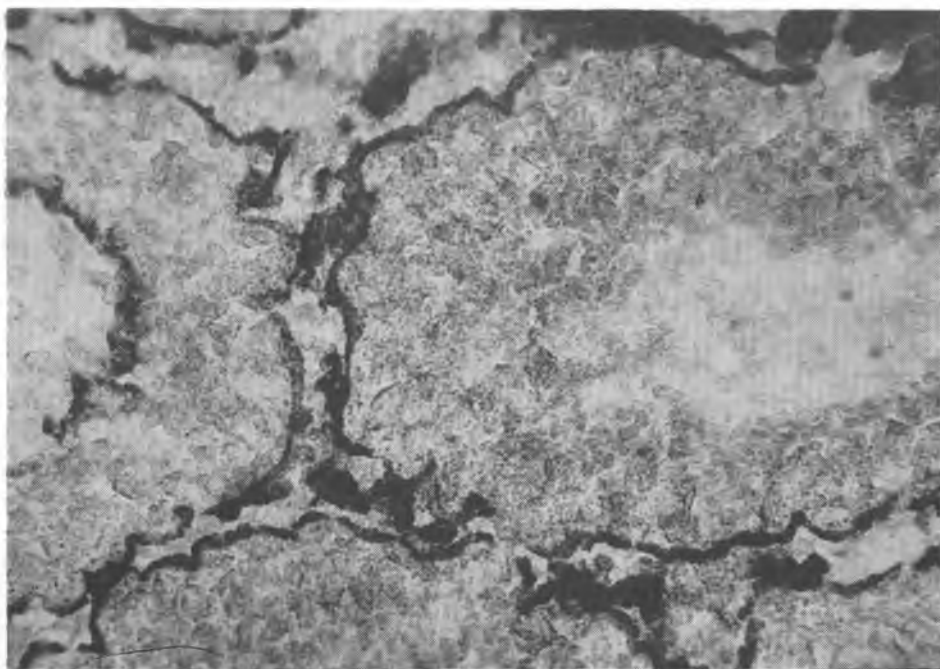
Ryc. 2



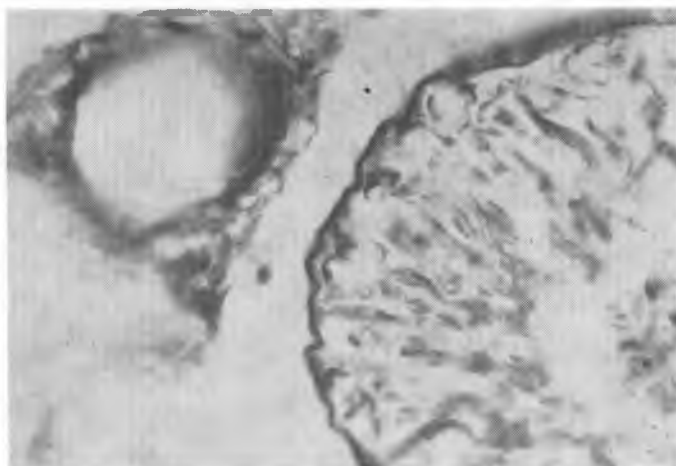
Ryc. 3



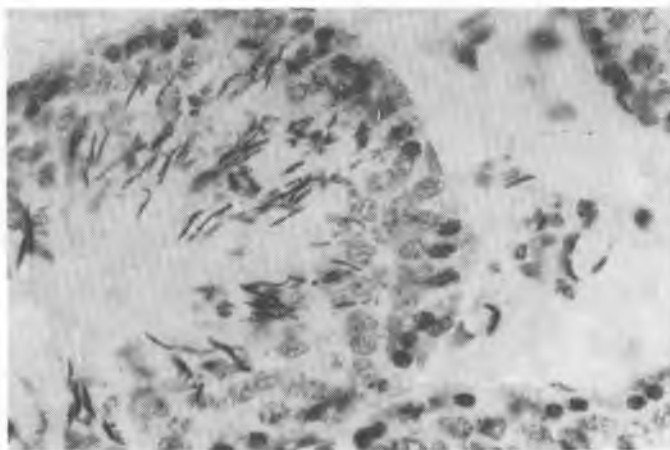
Ryc. 4



Ryc. 5



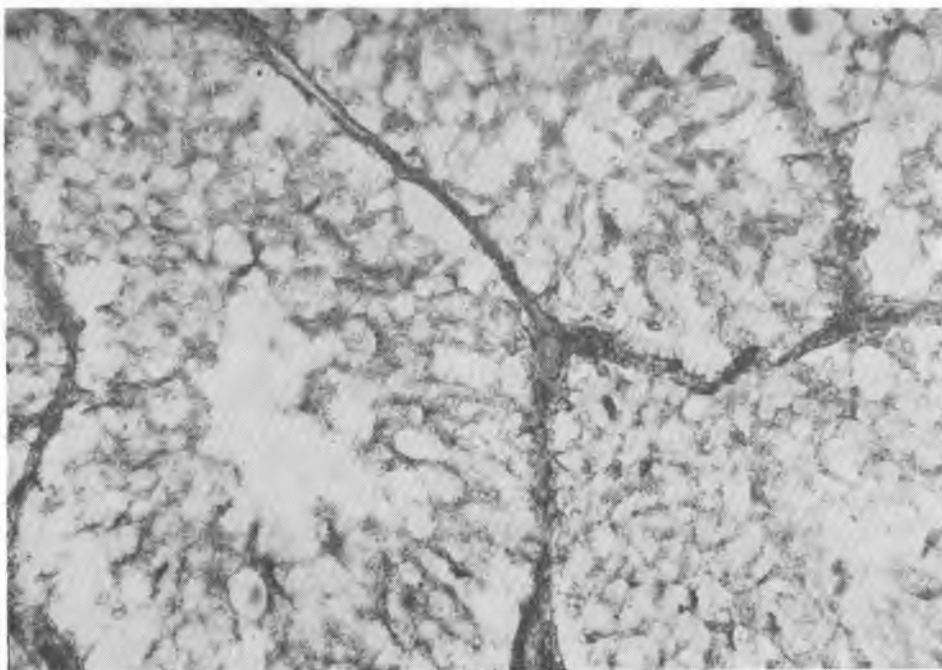
Ryc. 6



Ryc. 7



Ryc. 8



Ryc. 9



Ryc. 10

daje się uzasadnione stwierdzone obecnie obniżenie zawartości wielocukrów w kontekście ze stwierdzonymi uprzednio zmianami w obrazie morfologicznym gonady, szczególnie upośledzenie spermatogenezy i spermioogenezy. Substancja PAS pozytywna spermatyd i plemników powstaje prawdopodobnie z materiału sfery Goldiego i bierze udział w wytwarzaniu akrosomu (10). Aminoglutethimid (9) zależnie od dawki i czasu podawania prowadzi do zmniejszenia PAS pozytywnej reakcji w komórkach Leydiga, ze zmianami morfologicznymi w obrębie tych komórek. Również w komórkach Leydiga szczura stwierdzono osłabienie PAS pozytywnych reakcji po podaniu endoksanu (12).

Dehydrogenaza mleczanowa to jeden z enzymów oddechowych. Zlokalizowana jest głównie w mitochondriach komórkowych. Zawiera jony cynku i katalizuje odwracalnie w obecności koenzymu I utlenianie kwasu mlekowego do pirogronowego. Aktywność dehydrogenazy mleczanowej wzrasta we wszystkich komórkach dojrzewających, szybko regenerujących (16). Stąd w obecnych badaniach własnych równoległe do zmian wstecznych w nabłonku plemnikotwórczym gonady zaobserwowano zmniejszenie aktywności dehydrogenazy mleczanowej u zwierząt otrzymujących Kaptan.

Adenozynotrójfosfataza jest enzymem metabolizującym kwas adenozynotrójfosforowy. Rola jej łączy się poza tym z aktywnym transportem przez błony komórkowe, jest ona integralną częścią pompy sodowej, uczestniczy w wymianie jonów Na^+ i K^+ (5, 7, 14). Część ATP-azy wykrywana w tkance granicznej może brać udział w przenikaniu jonów przez barierę utworzoną przez ścianę kanalików nasiennych (4) W badaniach Cieciorury (3) rozmieszczenie ATP-azy w obrębie prawidłowych jąder szczura białego okazało się bardzo zbliżone do obserwowanego we własnej grupie kontrolnej. Brak istotnych zmian w zawartości i rozmieszczeniu kwasu dezoksyrybonukleinowego i rybonukleinowego w obrębie obserwowanych komórek-gonad przemawia za prawidłową czynnością aparatu jądrowo-chromosomalnego, odpowiedzialnego za przenoszenie cech.

Interesujące może okazać się zachowanie niektórych reakcji histochemicznych w jądrach zwierząt po dłuższym okresie podawania fungicydów. Badania nad toksycznym wpływem Kaptanu na gonadę męską szczura są prowadzone nadal.

PIŚMIENNICTWO

1. Bagiński S., Technika mikroskopowa. PWN, Warszawa 1969.
2. Barka T., Anderson P.: Histochemistry. Ed. Hoeber Medical Division. N.Y., Evanston and London 1965.
3. Cieciorura L.: Folia morph. (Warszawa) 21 255—233, 1962.

4. Cieciora L., Minecki L.: *Med. Pracy*, 6, 507—514, 1966.
5. Conway E. J., Mulaney M.: *Symposia CSAV. Membrane Transport and Metabolism*. Praha 1961.
6. Gondzik M.: *Pat. Pol.* 2, 129—136, 1970.
7. Hokin L. E., Hokin M. R.: *Symposia CSAV. Membrane Transport and Metabolism*. Praha 1961.
8. Kuna M., Woliczko K.: *Folia morph. (Warszawa)* 1 (9) 1—30, 1950.
9. Limanowski A., Miśkowiak B.: *Endokryn. pol.* 23, 231—245, 1972.
10. Miętkiewski K., Borszewski J., Sroka L.: *Por. Arch. Med. Wewn.* 1, 49—55, 1958.
11. Miętkiewski K., Łukaszyk A.: *Endokryn. pol.* 20, 415—433, 1969.
12. Miętkiewski K., Fichna P.: *Folia morph. (Warszawa)* 32, 445—455, 1973.
13. Ottowicz J.: *Endokryn. pol.* 9, 327—335, 1958.
14. Post R. L., Albright C. O.: *Symposia CSAV. Membrane Transport and Metabolism*. Praha 1961.
15. Semczuk M., Żrubek H., Kutulas J., Czarkowska D.: *Wpływ Kaptanu na stan morfologiczny i czynnościowy jądra szczura białego*. *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, sectio D*, 33, 69—96, 1978.
16. Sobczyński A., Miśkowiak B., Zabel M.: *Otolaryng. pol.* 28, 166—169, 1974.
17. van Thiel D. H., Gavalier J., Lester R.: *Science* 6, 186, 4167, 941—942, 1974.
18. Wachstein M., Meisel E.: *Am. J. Clin. Path.*, 27, 13—23, 1957.

Otrzymano 5 IV 1977.

OBJAŚNIENIA RYCIN

Ryc. 1. Jądro szczura kontrolnego. Barwienie wielocukrów metodą PAS. Pow. ok. 600×.

Ryc. 2. Jądro szczura kontrolnego. Barwienie kwasu dezoksyrybonukleinowego metodą Feulgena-Rosenbecka. Pow. ok. 600×.

Ryc. 3. Jądro szczura kontrolnego. Barwienie metodą Bracheta. Pow. ok. 240×.

Ryc. 4. Jądro szczura kontrolnego. Wykazana aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH). Pow. ok. 360×.

Ryc. 5. Jądro szczura kontrolnego. Barwienie na obecność adenozyntrotrójfosfatazy (ATP-azy). Pow. ok. 360×.

Ryc. 6. Jądro szczura grupy doświadczalnej. Barwienie metodą PAS. Obserwuje się osłabienie reakcji barwnej na wielocukry w porównaniu z grupą kontrolną. Pow. ok. 600×.

Ryc. 7. Jądro szczura grupy doświadczalnej. Barwienie metodą Feulgena-Rosenbecka. Pow. ok. 600×.

Ryc. 8. Jądro szczura grupy doświadczalnej. Barwienie metodą Bracheta. Pow. ok. 240×.

Ryc. 9. Jądro szczura grupy doświadczalnej. Barwienie dla wykazania aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH). Obserwuje się zmniejszenie aktywności enzymu w porównaniu z grupą kontrolną. Pow. ok. 360×.

Ryc. 10. Jądro szczura grupy doświadczalnej. Widoczne zmniejszenie aktywności adenozyntrotrójfosfatazy w porównaniu z grupą kontrolną. Pow. ok. 360×.

РЕЗЮМЕ

Исследовали 18 тримесячных белых крыс самок расы Вистар с начальным весом 180—230 г. Самцы опытной группы в течение 7 дней получали ежедневно внутрижелудочно Каптан в дозе 3 г/кг массы тела, а в течение следующих 14 дней ту же дозу через день.

Обнаруживая полисахариды, применено метод окрашивания PAS, а метод Фольгена-Розенбека использовали при определении дезоксирибонуклеиновой кислоты (DNA). Определяя размещение рибонуклеиновой кислоты (RNA) срезы яичек окрасили методом Брашета. Лактатный дегидрогенез (LDH) обнаружено при помощи метода Барки и Андерсона, а аденозинтрифосфатазу (ATP) методом Вахштайна и Майзеля.

В яичках крыс, получающих Каптан на протяжении 21 дня, заметили гиподинамию реакции PAS в клетках гаметогенической полосы, понижение активности лактатной дегидрогеназы и аденозинтрифосфатазы. Не обнаружено отчетливых изменений в содержании и размещении дезоксирибонуклеиновой и рибонуклеиновой кислот в клетках животных опытной группы по сравнению с контрольной группой.

SUMMARY

The investigations were carried out on 18 male white Wistar rats aging 3 months and weighing initially 180—230 g. The experimental animals were given Kaptan intragastrically in a dose of 3 g/kg every day during a week and afterwards every second day for 2 weeks.

In order to make polisaccharides evident the PAS staining method was employed, for DNA — Feulgen-Rosenbeck's method was used — and for the evaluation of RNA distribution Brachet's method. Lactate dehydrogenase (LDH) was detected by means of Barka—Anderson's method, and ATP-ase after the method of Wachstein and Meisel.

In testicles of rats treated with Kaptan one could observe a weak PAS-reaction and low activity of both investigated enzymes. There were no significant changes of DNA and RNA distributions in cells of experimental animals in comparison with the control ones.

EXPLANATION OF FIGURES

Fig. 1. The testicle of the control rat. Stained polisaccharides with PAS. Magn. ca 600X.

Fig. 2. The testicle of the control rat. Stained DNA after the method of Feulgen-Rosenbeck. Magn. ca 600X.

Fig. 3. The testicle of the control rat. Stained after the method of Brachet. Magn. ca 240X.

Fig. 4. The testicle of the control rat. The activation of LDH is shown. Magn. ca 360X.

Fig. 5. The testicle of the control rat. Staining for the presence of ATP-ase. Magn. ca 360X.

Fig. 6. The testicle of experimental rat. Staining with PAS. The colour reaction for polisaccharides is weaker compared with control group. Magn. ca 600X.

Fig. 7. The testicle of experimental rat. Stained after the method of Feulgen-Rosenbeck. Magn. ca 600X.

Fig. 8. The testicle of experimental rat after 3-week treatment with Kaptan. Staining for the presence of RNA after Brachet. Magn. ca 240X.

Fig. 9. The testicle of experimental rat. Staining for the presence activation of lactate dehydrogenase (LDH). The decreased activity of LDH is shown compared with control group. Magn. ca 360X.

Fig. 10. The testicle of experimental rat. The decreased activity of ATP-ase is shown compared with control group. Magn. ca 360X.