

ANNALĒS
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XXXIII, 12

SECTIO D

1978

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

Marian SEMCZUK, Henryk ŻRUBEK,
Jorgos KUTULAS, Daniela CZARKOWSKA

**Wpływ Kaptanu na stan morfologiczny i czynnościowy jądra
szczura białego (I)**

Влияние Каптана на морфологическую и функциональную способность яичка
белой крысы (I)

The Influence of Kaptan on the Morphological and Functional State of White
Rat Testicle (I)

Kaptan należy do grupy związków zwanych fungicydami, które są szeroko stosowane w rolnictwie do zwalczania chorób roślin wywoływanych przez grzyby patogeniczne (2, 6, 7, 8). Jest on wprowadzany w miejsce dotychczas stosowanego DDT, co stwarza potencjalne możliwości jego przenikania do organizmów ludzkich i zwierzęcych. Brak w dostępnym piśmiennictwie danych w odniesieniu do działania Kaptanu na gonady zwierząt skłoniło nas do podjęcia badań w tym zakresie.

MATERIAŁ, POSTĘPOWANIE I METODY BADAŃ

Przedmiotem obserwacji i badań było 54 szczurów białych obojga płci, szczepu Wistar, w wieku 3 miesięcy i początkowym c.c. 180—230 g. Grupę doświadczalną stanowiło 18 samców, natomiast kontrolną 12 samców i 24 samice, które służyły jako efektor czynności rozrodczej. Na 7 dni przed rozpoczęciem doświadczenia i przez cały czas jego trwania zwierzęta przebywały pojedynczo w klatkach w warunkach naturalnego oświetlenia. Karmione były paszą granulowaną LSM, a do picia podawano im wodę w dowolnych ilościach. Szczury grup doświadczalnych przez okres 21 dni otrzymywały dożołądkowo Kaptan w ilości 3 g/kg c.c./dobę, co stanowi 1/5 LD₅₀. W ciągu pierwszych 7 dni zawiesinę Kaptanu w 0,9% chlorku sodu w ilości 2 ml podawano jeden raz dziennie, a przez następnych 14 dni co drugi dzień. Samcom grupy kontrolnej podawano placebo w ilości 2 ml 0,9% chlorku sodu.

W 22 dniu trwania doświadczenia 9 samców grupy doświadczalnej (grupa I doświadczalna) i 6 kontrolnej zgilotynowano. Pozostałe samce grupy doświadczalnej (grupa II doświadczalna) i kontrolnej dopuszczono do samic na okres 4 dni, po czym ponownie odosobniano je, pozostawiając w pojedynczych klatkach na okres 3 miesięcy. Po upływie tego okresu czasu zwierzęta ponownie parzono, a następnie samce dekapitowano. Oceniano wygląd makroskopowy jąder, ważono je, ustalając wagę bezwzględną i względną tego narządu. Wycinki utrwalano w płynie Bouina, a następnie krojono na mikrotomie. W badaniach morfologicznych posługiwano się metodą parafinową i celoidynoparafinową. W celu przeprowadzenia obserwacji morfologicznej skrawki barwiono hematoksyliną i eozyną, metodą Azan według Heidenhaina oraz metodą trójbarwną Massona (1). We wszystkich badanych grupach dokonywano pomiaru średnicy kanalików nasiennych jądra.

WYNIKI BADAŃ

Bezwzględne wagi jąder badanych zwierząt zebrano w tab. 1. Analizę statystyczną wag jąder zwierząt zaliczonych do grupy I doświadczalnej i kontrolnej przeprowadzono podając wagi narządu w miligramach na 1 g c.c. zwierzęcia (tab. 2). Waga jąder zwierząt zaliczonych do grupy I doświadczalnej mieściła się w granicach 9,5—14,1 mg/g c.c., a wartość średnia wynosiła 12,5 mg/g. Porównując powyższą wartość z odpowiadającą jej wartością grupy kontrolnej (11,1 mg/g) uzyskano różnicę nieistotną pod względem statystycznym ($t=1,47$, $t < t_0$, $P > 0,15$). Wahania międzyosobnicze wagi jąder zwierząt grupy doświadczalnej ($S=1,5$, $V=12,2\%$), jak i kontrolnej ($S=1,3$, $V=11,8\%$) okazały się niewielkie, bardzo do siebie zbliżone.

Tab. 1. Zestawienie wagi jąder zwierząt grupy I i II doświadczalnej oraz kontrolnej (mg)

The weight (in mg) of testicles of experimental animals in groups I and II, and in control group

Lp. szczura	Grupa I doświadczalna	Grupa II doświadczalna	Grupa kontrolna
1.	1125	1400	1525
2.	1025	1350	1525
3.	1100	1450	1250
4.	1200	1350	1525
5.	1150	1275	1525
6.	1025	1350	1250
7.	600	1300	—
8.	1250	1420	—
9.	1200	1460	—
x	1175	1361	1433,3

Tab. 2. Analiza statystyczna wagi jąder (w mg/g ciała) zwierząt grupy I doświadczalnej i kontrolnej

Statistical analysis of weight of testicles in I experimental and control group

Grupa I doświadczalna	Liczba zwierząt	9
	Wartość średnia	12,56
	Cechy statystyczne	$S=1,5$ $V=12,2\%$
Istotność różnic		$t=1,47$
		$t < t_0$
		$P > 0,15$
Grupa kontrolna	Liczba zwierząt	6
	Wartość średnia	11,10
	Cechy statystyczne	$S=1,3$ $V=11,8\%$

Makroskopowo jądra szczurów grup doświadczalnych i kontrolnej były prawidłowej wielkości, otoczone szarobiaławą włóknistą torebką. Rysunek przekroju jąder ziarnisty, o barwie szaroróżowej. Średnice kanalików nasiennych jąder szczurów grupy kontrolnej wahały się w granicach 221,02—293,36 μm , a wartość średnia wynosiła 257,27 μm . W oparciu o uzyskane wartości współczynnika zmienności ($V=93\%$) i odchylenia standardowego ($S=18,79$) można wnosić, że u zwierząt zaliczonych do grupy kontrolnej obserwuje się duże wahania średnic kanalików nasiennych jąder (tab. 3). Średnice kanalików nasiennych w grupie doświadczalnej wahały się w granicach 221,02—258,62 μm , a wartość średnia wynosiła 235,17 μm . Porównując wartości uzyskane w tej grupie z odpowiadającą wartością grupy kontrolnej uzyskano różnicę statystyczną istotną ($t=4,3269$, $t > t_0$, $P < 0,001$). Różnice międzyosobnicze średnic kanalików nasiennych w tej grupie zwierząt ($S=10,37$, $V=51,85$) okazały się znacznie mniejsze niż w grupie kontrolnej.

Tab. 3. Średnice kanalików nasiennych jąder zwierząt grupy I doświadczalnej i kontrolnej (μm)

The diameter of seminal tubules in experimental animals in group I and control

Grupa I doświadczalna	Cechy statystyczne	$S=10,3$ $V=51,8\%$
	Wartość średnia	235,2
	Zasięg wartości	221,0—258,6
Istotność różnic		$t=4,32$
		$t > t_0$
		$P < 0,001$
Grupa kontrolna	Cechy statystyczne	$S=18,8$ $V=93\%$
	Wartość średnia	257,3
	Zasięg wartości	221,0—293,4

Analizując preparaty mikroskopowe jąder szczurów grupy kontrolnej zwraca uwagę prawidłowy wygląd tkanki granicznej kanalików krętych. Liczba ciał resztkowych występująca w świetle kanalików nie odbiega od normy. Wysokość nabłonka plemnikotwórczego jest prawidłowa. Obserwuje się obecność fali spermatogenetycznej, która stanowi swoistą cechę kanalików krętych jądra szczura. W tkance łącznej wiotkiej między kanalikami krętymi układają się wieloboczne komórki Leydiga, tworzące pasma lub gniazda komórkowe, pozostające w bliskim kontakcie z naczyniami krwionośnymi. Owalne jądra komórek Leydiga wykazują wyraźny zrab chromatynowy. Wśród komórek nabłonka poza właściwymi elementami plemnikotwórczymi obserwuje się komórki Sertoliego, a w ich jądrach stwierdza się duże jąderko. Na błonie podstawowej tkanki granicznej kanalików układają się spermatogonie, wśród których dostrzega się liczne podziały. Kilka następnych warstw tworzą spermatocyty pierwszego rzędu, będące zarówno w fazie wzrostu, jak i w różnych stadiach pierwszego podziału dojrzewania. W kolejnych warstwach obserwuje się spermatocyty drugiego rzędu w okresie interkinezy oraz w okresie podziałowym. Wytworzone spermatydy układają się blisko światła kanalika (ryc. 1—3).

W grupie I doświadczalnej w porównaniu z grupą kontrolną zaobserwowano redukcję wysokości nabłonka plemnikotwórczego, zaś grubość tkanki granicznej kanalików nie uległa zmianie. Na poziomie spermatocytów pierwszego i drugiego rzędu obecne są komórki dwu- i wielojądrowe zawierające bogatą cytoplazmę i okrągłe jądra. Poza tym widać spermatocyty pierwszego i drugiego rzędu prawidłowo dzielące się. Sfera spermatyd, jak się wydaje, jest zredukowana. Ponad spermatydami obserwuje się okrągłe komórki, o wyraźnym jądrze, które zalegają także w świetle kanalików. Stopień nasilenia wyżej opisanych zmian w poszczególnych kanalikach jest różny. W komórkach Sertoliego oraz w komórkach Leydiga nie obserwuje się zmian w porównaniu z grupą kontrolną (ryc. 4—6).

Średnice kanalików nasiennych zwierząt grupy II doświadczalnej wahają się w granicach 223,80—281,78 μm , a wartość średnia wynosi 249,93 μm . Różnice średnic kanalików stwierdzone w tej grupie zwierząt są bardzo duże ($S=26,9$, $V=134,0\%$). Oceniając preparaty jąder zwierząt omawianej grupy (ryc. 7—9), zaobserwowano prawidłowy obraz mikroskopowy gonady, zbliżony do opisanego dla grupy kontrolnej. Nie obserwuje się tutaj redukcji wysokości nabłonka plemnikotwórczego, cech przewlekłego złuszczenia ani wyraźnego zahamowania spermatogenezy, co stwierdzono w obrazach mikroskopowych jąder zwierząt grupy I doświadczalnej.

Dla oceny stanu czynnościowego jąder zwierząt badanych grup łączono

je z samicami. Z 9 samic pokrytych samcami grupy II doświadczalnej tuż po zakończeniu podawania Kaptanu żadna nie zaszła w ciążę. Natomiast z 6 samic pokrytych samcami grupy kontrolnej wszystkie zaszły w ciążę i urodziły o czasie zdrowe potomstwo, przy czym w miocie było 6—7 szcurek. Tych samych 9 samców grupy II doświadczalnej w 90 dni po odstawieniu Kaptanu dopuszczono ponownie do samic. W następstwie parzenia 6 samic zaszło w ciążę i wydało w terminie zdrowe potomstwo.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Powyższe badania doświadczalne wykazały, że Kaptan jest środkiem chemicznym powodującym zmiany w obrazie morfologicznym gonady szczura białego oraz upośledzającym jego funkcję rozrodczą. Po trzytygodniowym podawaniu Kaptanu u obserwowanych zwierząt stwierdzono: zahamowanie spermat- i spermiogenezy, zmniejszenie średnicy kanalików nasiennych, redukcję wysokości nabłonka plemnikotwórczego oraz złuszczenie się jego komórek do światła kanalików. Zbliżony obraz morfologiczny opisali Van Thiel i wsp. (12) u szcurek poddanych intoksykacji alkoholowej. Inni autorzy (3, 4, 5, 9, 10) podobne zmiany w jądrach zwierząt doświadczalnych opisali pod wpływem toksycznego działania substancji chemicznych i czynników fizycznych. Stąd wniosek, że stwierdzone zmiany w obrazie mikroskopowym jąder szczura nie są charakterystyczne tylko dla toksycznego działania Kaptanu. Oddziaływanie czynników toksycznych na gonadę męską jest niespecyficzne, bowiem wiele z nich może powodować powstanie podobnych zmian w obrazie morfologicznym (9).

Obserwacje własne sugerują, że toksyczne działanie Kaptanu ma charakter przejściowy, bowiem w 3 miesiące po jego odstawieniu stwierdzono prawidłowy obraz mikroskopowy gonady oraz powrót zdolności reprodukcyjnej samców. Z drugiej zaś strony dwudziestojednodniowy okres podawania Kaptanu powoduje podostre, krótkotrwałe zatrucie organizmu zwierzęcia fungicydami, stąd, być może, obserwowane zmiany w obrębie gonady męskiej nie są najbardziej zaawansowane bądź utrwalone. Dalsze badania doświadczalne w warunkach przewlekłego zatrucia Kaptanem pozwoliłyby ustalić stopień zaawansowania zmian w obrazie morfologicznym gonady męskiej oraz dać odpowiedź na pytanie, czy powyższe zmiany mają charakter odwracalny przy dłuższym narażeniu na działanie substancji toksycznej.

Wnioski

1. Podawanie Kaptanu przez okres 3 tygodni prowadzi do powstania zmian morfologicznych w obrębie jądra szczura białego oraz znosi czynność rozrodczą obserwowanych zwierząt.

2. Po okresie 3 miesięcy od odstawienia Kaptanu stwierdzono cofnięcie się zmian w obrazie mikroskopowym jądra oraz powrót zdolności reprodukcyjnej samców.

3. Obserwowane zmiany mają charakter niespecyficzny.

PIŚMIENNICTWO

1. Bagiński S.: Technika mikroskopowa. PWN, Warszawa 1969.
2. Borecki Z.: Chemiczne środki grzybobójcze (fungicydy). Warszawa 1965.
3. Cieciora L., Minecki L.: *Medycyna Pracy* **6**, 507—514, 1966.
4. Dąbrowski Z., Meyer J., Seńczuk W.: *Gin. Pol.* **10**, 1037—1044, 1966.
5. Gondzik M.: *Pat. Pol.* **2**, 129—136, 1970.
6. Jeske J.: *Farmakologiczne metody badania leków*. Warszawa 1955.
7. Mielnikow H. H.: *Metody analiza pestycydów — Kaptan*. Moskwa 1967.
8. Rusiecki W.: *Toksykologia środków ochrony roślin*. PZWL, Warszawa 1973.
9. Steinberger E.: *Effect of Altered Blood Flow on the Testis*. [w:] Johnson A. D., Gomes W. R., Valdemarck N. L. [eds.]: *The Testis, Influencing Factors* vol. III, Academic Press, New York 1970, 313—332.
10. Soszka S., Krawczuk A.: *Gin. Pol.* **4**, 487—494, 1960.
11. Stieve H.: *Folia Morphologica* **3**, 1—29, 1950.
12. Van Thiel D. H., Gavalier J., Lester R.: *Science* **6**, 186, 4167, 941—942, 1974.

Otrzymano 5 IV 1977.

OBJAŚNIENIA RYCIN

Ryc. 1. Jądro szczura grupy kontrolnej. Barwienie hematoksyliną i eozyną. Pow. ok. 600×.

Ryc. 2. Jądro szczura grupy kontrolnej. Barwienie metodą Azan wg Heidenheina. Pow. ok. 600×.

Ryc. 3. Jądro szczura grupy kontrolnej. Barwienie metodą trójbarwną Massona. Pow. ok. 400×.

Ryc. 4. Jądro szczura grupy I doświadczalnej. Barwienie hematoksyliną i eozyną. Widoczne komórki dwu- i wielojądrzaste oraz redukcja wysokości nabłonka plemnikotwórczego w porównaniu z grupą kontrolną. Pow. ok. 600×.

Ryc. 5. Jądro szczura grupy I doświadczalnej. Barwienie metodą Azan wg Heidenheina. Pow. ok. 600×.

Ryc. 6. Jądro szczura grupy I doświadczalnej. Barwienie metodą trójbarwną Massona. Obraz podobny do uzyskanego na ryc. 4. Pow. ok. 600×.

Ryc. 7. Jądro szczura grupy II doświadczalnej. Barwienie hematoksyliną i eozyną. Obraz zbliżony do uzyskanego na ryc. 1. Pow. ok. 600×.

Рис. 8. Ядро szczura grupy II doświadczalnej. Barwienie metodą Azan wg Heidenheina. Pow. ok. 600X.

Рис. 9. Ядро szczura grupy II doświadczalnej. Barwienie metodą trójbarwną Massona. Pow. ok. 600X.

РЕЗЮМЕ

Опыт проводили на 54 трехмесячного возраста белых крысах расы Вистар с начальным весом 180—230 г. Самцам опытной группы давали внутрижелудочно Каптан по 3 г/кг массы тела в сутки на протяжении трех недель. Оценивая функциональную способность яичек крыс опытной и контрольной групп, самцы в отдельные сроки опыта случались с самками.

Исследование срезов яичек животных сразу же после окончания дозировок Каптана показало: статистически существенное сужение света семяносных канальцев, ослабление спермато и спермиогенеза, понижение высоты сперматозоидообразовательного эпителия, а также симптомы хронического слущивания. Вышепредставлены изменения оказались временными, ибо спустя три месяца с момента получения Каптана у животных обнаружено правильную морфологическую картину яичек и возвращение воспроизводительной способности самцов.

Наблюдаемая картина поврежденных яичек свидетельствует о токсическом действии Каптана, ибо такие изменения были обнаружены после применения других вредных химических и физических элементов.

SUMMARY

54 white Wistar rats of both sexes aging 3 months and weighing initially 180—220 g were studied. The male experimental group were given Kaptan in a dose of 3 g/kg for 3 weeks. In order to estimate the functional state of testicles, experimental rats were coupled with females in some periods of the experiments.

The studies of testicles slices carried out directly after the treatment with Kaptan had ended showed a significant stricture of seminal tubules, handicapped spermat- and spermiogenesis, lowering of the spermatogenic epithelium and signs of chronic desquamation. These changes proved to be transitory as the normal morphological structure of the reproductive ability of the males was stated after 3 months

The picture of testicle damage is characteristic not only for the toxic action of Kaptan — similar changes were observed under the influence of other noxiously acting chemical and physical factors.

EXPLANATION OF FIGURES

Fig. 1. The testicle of control rat. Staining with hematoxylin and eosin. Magn. ca 600X.

Fig. 2. The testicle of control rat. Stained after the method of Heidenhein. Magn. ca 600X.

Fig. 3. The testicle of control rat. Staining three colour after the method of Masson. Magn. ca 400X.

Fig. 4. The testicle of rat from I experimental group. Staining with hematoxylin and eosin. Twonuclear and multinuclear cells are visible as well as lower-

ing of spermatogenic epithelium in comparison with control group. Magn. ca 600×.

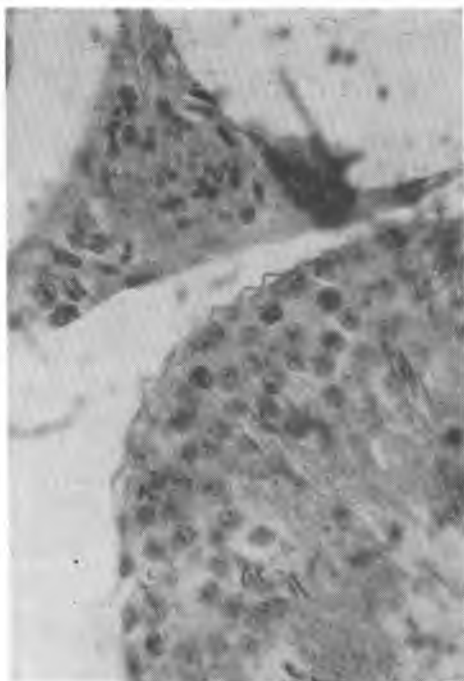
Fig. 5. The testicle of rat from I experimental group. Stained after the method of Heidenhein. Magn. ca 600×.

Fig. 6. The testicle of rat from I experimental group. Staining three colour after the method of Masson. The picture resembles that shown in fig. 4. Magn. ca 600×.

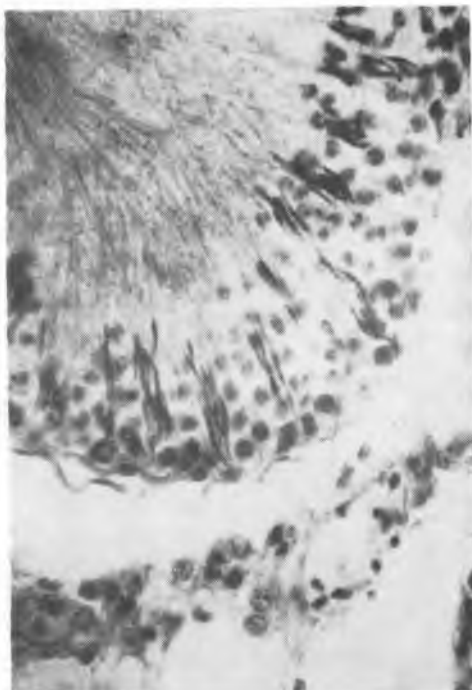
Fig. 7. The testicle of rat from II experimental group. Staining with hematoxylin and eosin. The picture resembles that shown in fig. 1. Magn. ca 600×.

Fig. 8. The testicle of rat from II experimental group. Stained after the method of Heidenhein. Magn. ca 600×.

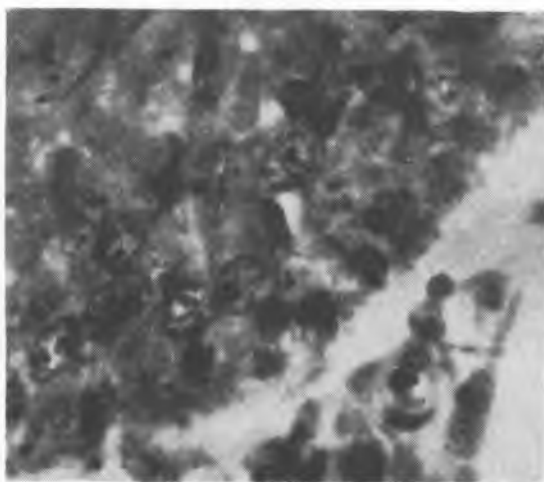
Fig. 9. The testicle of rat from II experimental group. Staining three colour after the method of Masson. Magn. ca 600×.



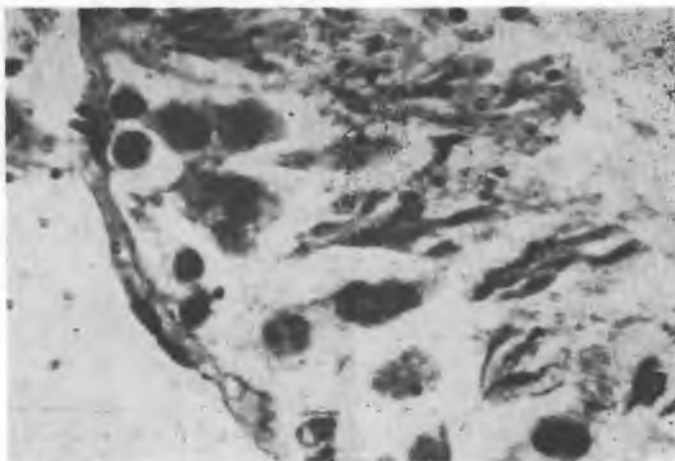
Ryc. 1



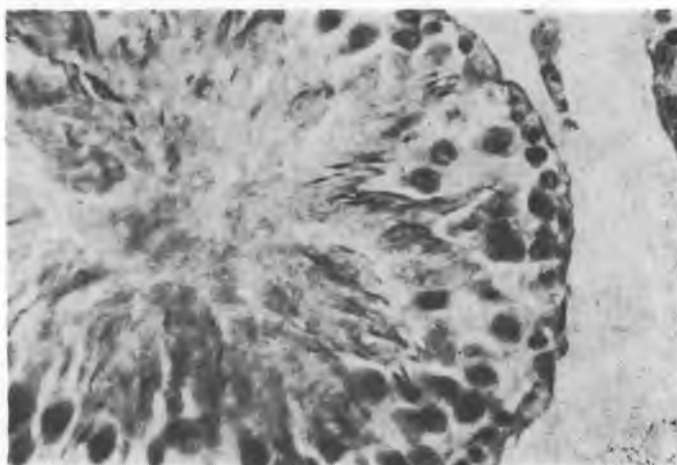
Ryc. 2



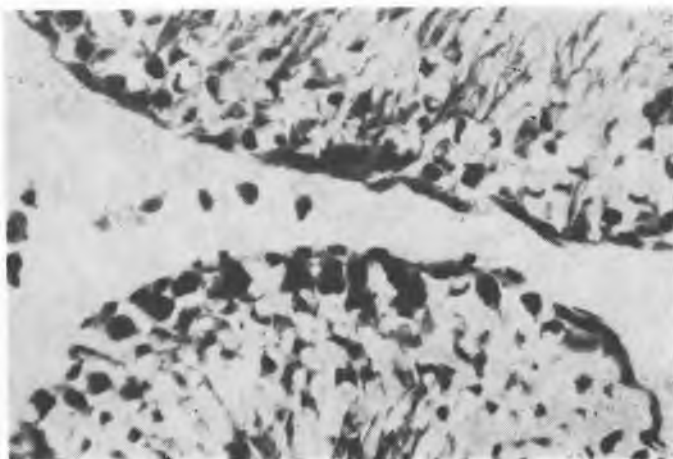
Ryc. 3



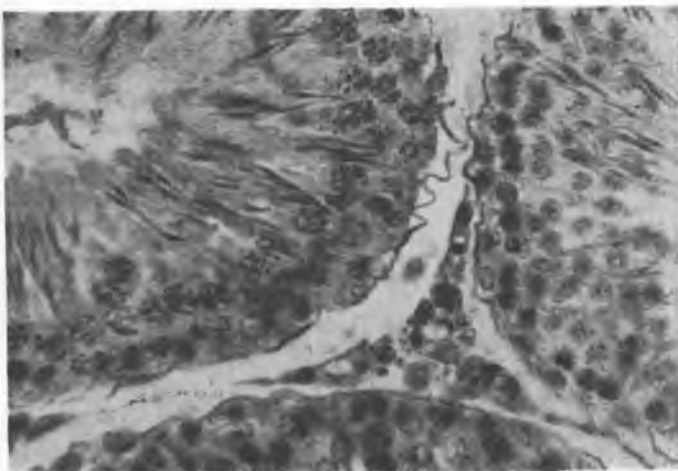
Ryc. 4



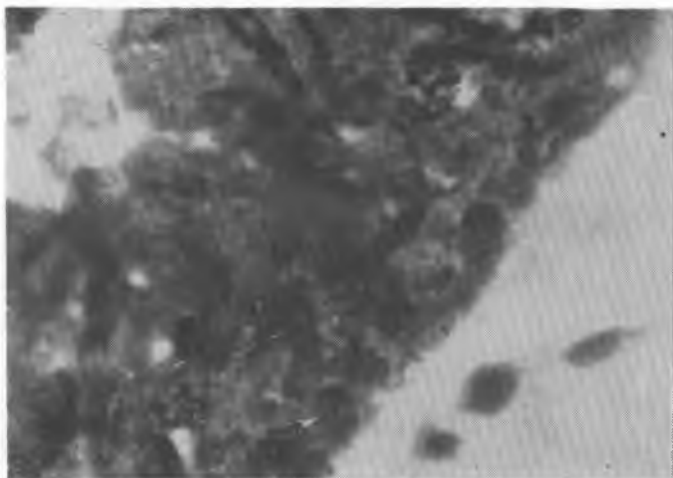
Ryc. 5



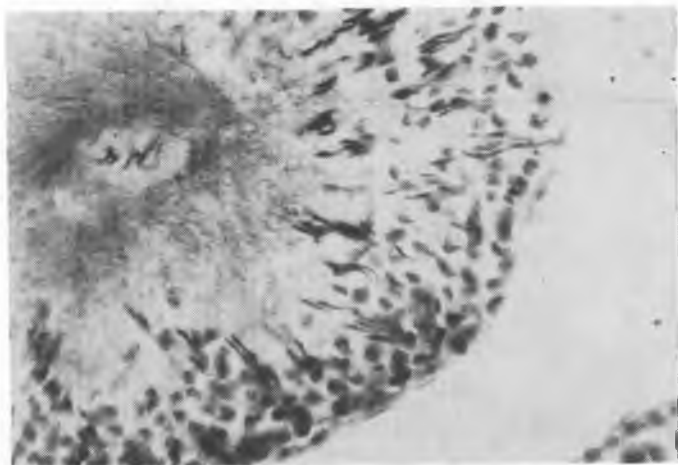
Ryc. 6



Ryc. 7



Ryc. 8



Ryc. 9