

zostałości (15). W świetle tych obserwacji doniesienia Espira i wsp. (12) oraz Pecka (20) o impotencji pracowników rolnych stykających się z pestycydami przez dłuższy czas mają, jak się wydaje, bardzo duże znaczenie.

Celem pracy jest doświadczalne stwierdzenie, czy jednoczesne stosowanie przez długi okres bardzo małych dawek dwu powszechnie stosowanych insektycydów: Lindanu (z grupy związków chloroorganicznych) i Trichlorfonu (z grupy związków fosforoorganicznych) może powodować powstawanie zmian histopatologicznych w gonadzie męskiej szczura oraz określenie rodzaju tych zmian. Ponieważ szczególnie niejasny jest wpływ tych związków na układy enzymatyczne (oprócz znanego już wpływu na cholinesterazę), dlatego też oprócz badań histopatologicznych przeprowadzono badania histochemiczne, starając się prześledzić dynamicznie przebiegający w gonadzie proces patomorfologiczny.

Insektycydy, zarówno chloroorganiczne, jak i fosforoorganiczne, wywierają szczególnie szkodliwy wpływ na organizmy młode, dlatego też obok szczurów starszych objęto badaniem szczury młode, ale w pełni rozwinięte. Porównanie działania insektycydów na szczury w dwu grupach wiekowych może bowiem pozwolić na uchwycenie różnic w zmianach gonad w zależności od wieku.

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Do badań użyto 40 białych szczurów płci męskiej rasy Wistar, genetycznie jednorodnych, żyjących w czasie doświadczenia w stałych warunkach środowiskowych, karmionych standardową karmą LSM i wodą *ad libitum*, klinicznie zdrowych. Zwierzęta podzielono na cztery grupy: trzy grupy doświadczalne liczące po 10 szczurów oraz jedną kontrolną, liczącą również 10 szczurów. W każdej grupie znajdowało się 5 samców starszych wagi 200—220 g każdy oraz 5 samców młodych wagi 100—120 g każdy. Zwierzęta grup doświadczalnych otrzymywały insektycydy podskórnie (okolicą podbrzusza) co 3 dzień przez okres 3 miesięcy. Jednocześnie podawano dwa insektycydy: Lindan w ilości 25 mg/kg wagi ciała = $1/30$ LD₅₀ w 0,2 ml oliwy i Trichlorfon (Foschlor) w ilości 50 mg/kg wagi ciała = $1/30$ LD₅₀ w 0,5 ml soli fizjologicznej. Zwierzęta grupy kontrolnej otrzymywały w taki sam sposób i przez taki sam okres jednocześnie 0,2 ml oliwy i 0,5 ml soli fizjologicznej. Do badań użyto wzorcowych pestycydów, opracowanych przez Zakłady Doświadczalne Chemipan. Preparaty te o czystości 99,0—99,9% posiadają atesty stwierdzające ich stopień czystości metodami chromatografii cienkowarstwowej i gazowej.

Po zakończeniu podawania insektycydów szczury były zabijane przez dekapitację w różnym czasie. Pierwszą część szczurów — 10 (5 starszych i 5 młodych) zabijano w 24 godz. po ostatniej iniekcji pestycydów i oznaczono jako grupę I, drugą część, liczącą 10 szczurów (5 starszych i 5 młodych), zabijano w 2 tygodnie później i oznaczono jako grupę II, trzecią część, liczącą także 10 szczurów (5 starszych i 5 młodych) zabijano w 2 miesiące od chwili zakończenia podawania insektycydów, oznaczając ją jako grupę III. Równolegle w tym samym czasie zabijano szczury grupy kontrolnej. Pobrane od zabitych szczurów jądra oceniane były makroskopowo (wygląd, wielkość, waga, spoistość). Uzyskane dane liczbowe ciężarów jąder podano analizie statystycznej.

Część jąder przeznaczoną do badań histopatologicznych utrwalano w 10% obojętnej formalinie, część przeznaczoną do badań histochemicznych utrwalano w płynie Bakera w temp. 4°C oraz nie utrwalone wycinki jąder zamrażano w eterze naftowym ochłodzonym w mieszaninie aceton—suchy lód do temp. -78°C i bezpośrednio po zamrożeniu krojono skrawki grubości 12 μ na mikrotomie obrotowym w kriosta-

cie w temp. -20°C . Preparaty z bloczków parafinowych barwiono następującymi metodami: 1) hemalaunem Harrisa i eozyną alkoholową, 2) safraniną, 3) przez impregnację włókien srebrochłonnych wg metody Gomoriego, 4) barwienie azanem wg Heidenhaina, 5) barwienie rezorcyno-fuksyną wg Weigerta, 6) barwienie wg Brostera i Vinesa, 7) PAS-hematoksyliną wg Clermonta i Leblonda (5).

Histochemicznie badano w gonadzie aktywność następujących enzymów: 1) fosfatazy kwaśnej (ACP-azy) wg Gomoriego; 2) fosfatazy zasadowej (ALP-azy) wg Gomoriego; 3) adenozynotrójfosfatazy (ATP-azy) wg Wachsteina i Meisel; 4) 5-nukleotydazy (5-N-azy) wg Wachsteina i Meisel; 5) glukozy-6-fosfatazy (G-6-P-azy) wg Wachsteina i Meisel; 6) esterazy niespecyficznej (N-E) wg Barneta i Seligmana; 7) dehydrogenazy bursztynianowej (SDH) wg Nachlasy; 8) dehydrogenazy mleczanowej (LDH) wg Barki i Andersona; 9) dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (G-6-PDH) wg Barki i Andersona; 10) dehydrogenazy 3- β -ol-sterydowej (HSD) wg Wattenberga w modyfikacji Allena; 11) dehydrogenazy alkoholowej (ADH) wg Levy, Deane i Rubin, 12) reduktaz tetrazolowych wg Barki i Andersona. Badaniem histochemicznym objęto także glikogen i substancje PAS-dodatnie wg McManusa, lipidy z czerwienią oleistą wg Lillie oraz kwasy nukleinowe DNA wg Feulgena i RNA wg Bracheta.

WYNIKI BADAŃ

W grupie IV (kontrolnej) w gonadach nie stwierdzono żadnych odchyśleń w aktywności badanych enzymów ani też nie stwierdzono zmian histopatologicznych (ryc. 1, 2). Badaniem makroskopowym również w grupach doświadczalnych (I, II, III) nie stwierdzono odchyśleń od normy. Także wagi jąder szczurów grup doświadczalnych nie różniły się statystycznie znamienne od wag jąder szczurów grupy kontrolnej.

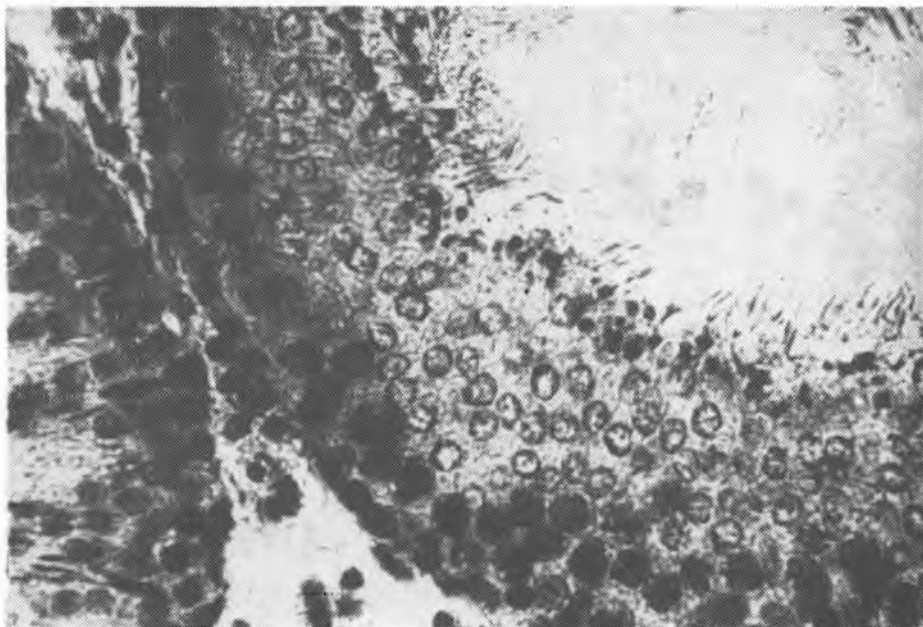
Zaznaczyły się natomiast w gonadzie zmiany w nasileniu niektórych odczynów histochemicznych, zwłaszcza w grupie I. Stwierdzono wzmoczenie odczynu histochemicznego na fosfatazę kwaśną (ACP-azę) w komórkach gruczołu śródmiąższowego Leydiga, a także w tkance granicznej kanalików nasiennych i ogniskowo w komórkach Sertoliego (ryc. 9). Wzmoczenie odczynu histochemicznego wykazywała także niespecyficzna esteraza (N-E) w komórkach gruczołu śródmiąższowego, ale tylko w grupie I. W grupie I stwierdzono także bardzo nieznaczne wzmoczenie aktywności odczynu histoenzymatycznego na dehydrogenazę mleczanową (LDH) — tylko w komórkach gruczołu śródmiąższowego. Równocześnie osłabieniu w komórkach gruczołu śródmiąższowego Leydiga ulegały odczyny histoenzymatyczne na dwie dehydrogenazy biorące udział w sterydogenezie w gonadzie męskiej — dehydrogenazę 3- β -ol-sterydową (HSD) i dehydrogenazę glukozy-6-fosforanową (G-6-PDH). Osłabienie odczynów histochemicznych na HSD i G-6-PDH zaobserwowano tylko w grupie I. Stwierdzono również, ogniskowo małego stopnia, osłabienie odczynów histochemicznych na DNA i RNA w spermatocytach, a także w komórkach gruczołu śródmiąższowego.

Zmiany histopatologiczne w gonadzie stwierdzono w zasadzie tylko w grupie I, a także u pojedynczych szczurów grup II i III. Były to zmiany umiarkowane i występowały tylko ogniskowo. Pomiedzy nie zmienionymi kanalikami nasiennymi widoczne były kanaliki, w których zahamowany został proces spermat- i spermiogenezy (ryc. 3). W kanalikach tych brakowało plemników i spermatyd oraz widoczne było złuszczenie się wyrodnających spermatocytów do światła kanalików (ryc. 6). Nie obserwowano tworzenia się komórek olbrzymich. W pojedynczych kanalikach nasiennych, gdzie spermatogeneza uległa zahamowaniu, obserwowano braki generacji pachytenów i zygotenów w nabłonku nasiennym. W tymże nabłonku u części szczurów pojawiły się wodniczki dające ujemne odczyny na glikogen, substancje PAS-dodatnie i lipidy (ryc. 4, 5). Tkanka graniczna kanalików krętych nie wykazywała zmian histologicznych. Tylko u pojedynczych szczurów grupy III widoczne były zanikowe kanaliki nasienne o znacznie mniejszej średnicy — ok. 80 μ (ryc. 8). Kanaliki te zawierały tylko komórki Sertoliego. Komórki gruczołu śródmiąższowego Leydiga nie wykazywały zmian poza ogniskowym, nieco słabszym odczynem na obecność ziarenek androgennych przy użyciu metody Brostera i Vinesa. Przewody najądrzy wypełnione były dużą ilością plemników, wśród których tylko sporadycznie spotykano pojedyncze niedojrzałe komórki rozrodcze (ryc. 8). Opisane zmiany histoenzymatyczne i histopatologiczne były identyczne w obu grupach wiekowych — szczurów starszych i młodych.

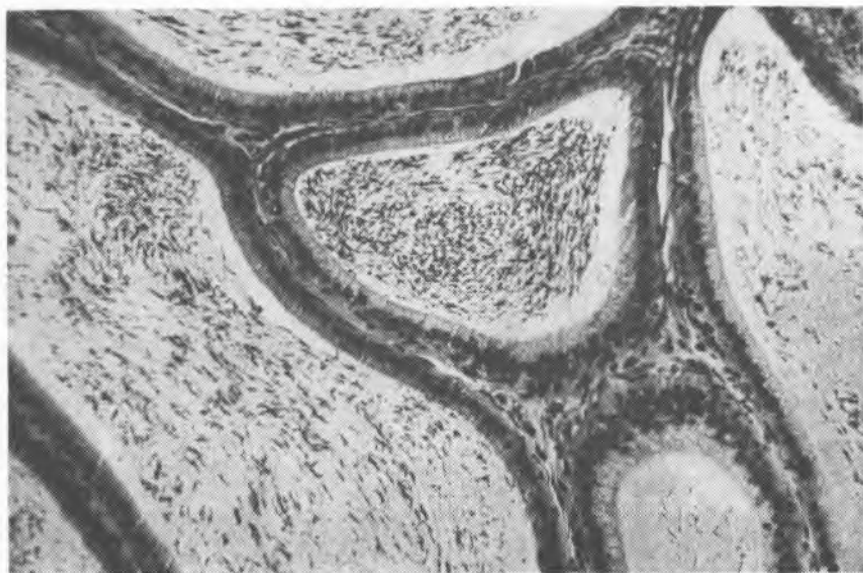
OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że pod wpływem małych dawek dwóch insektycydów: Lindanu i Trichlorfonu, stosowanych przez długi okres, w gonadzie męskiej rozwijają się zmiany histopatologiczne poprzedzone zmianami histoenzymatycznymi. Mają one niewielkie nasilenie i szybko cofają się po zaprzestaniu podawania pestycydów. Zmiany natomiast powstałe na skutek stosowania Lindanu lub Trichlorfonu oddzielnie, podawanych w dwukrotnie większej dawce, mają inny charakter, są trwałe i nie cofają się.

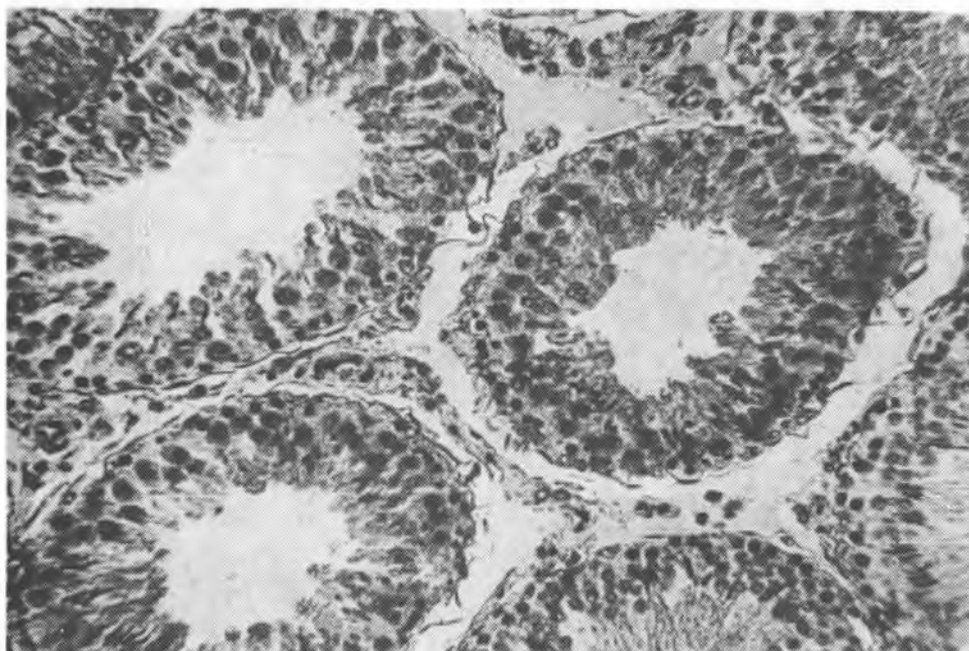
Do najważniejszych zmian histoenzymatycznych, jakie obserwowano w gonadzie, należy osłabienie odczynów histoenzymatycznych na aktywność dehydrogenazy 3- β -ol-sterydowej (HSD) i dehydrogenazy glukozoz-6-fosforanowej (G-6-PDH). Obie te dehydrogenazy, jak wiadomo, są niezbędne do prawidłowej sterydogenezy w jądrze (1, 2, 3, 13, 17). O uszkodzeniu komórek gonady świadczyć może wzmożenie odczynów histochemicznych na fosfatazę kwaśną (ACP-azę) i dehydrogenazę mleczanową



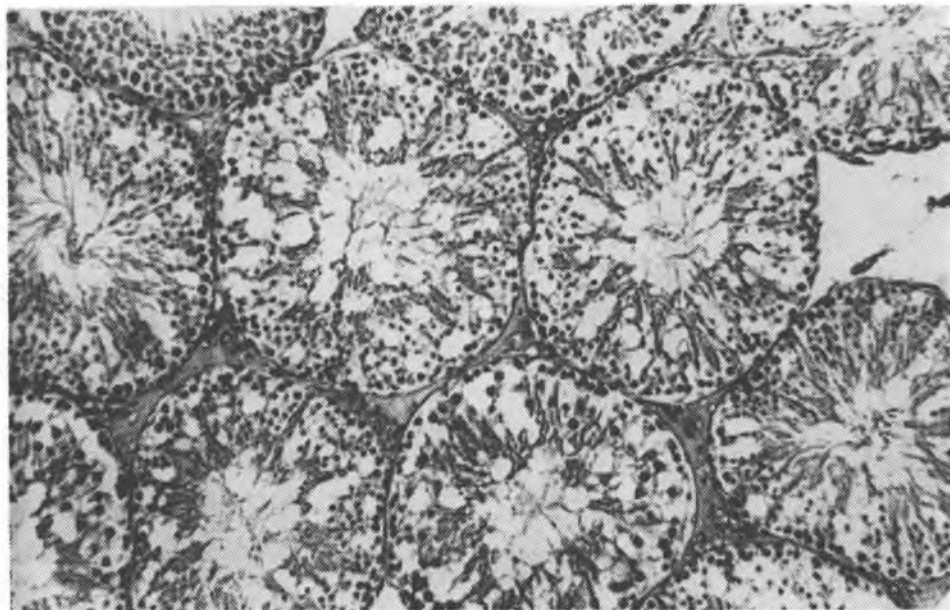
Ryc. 1



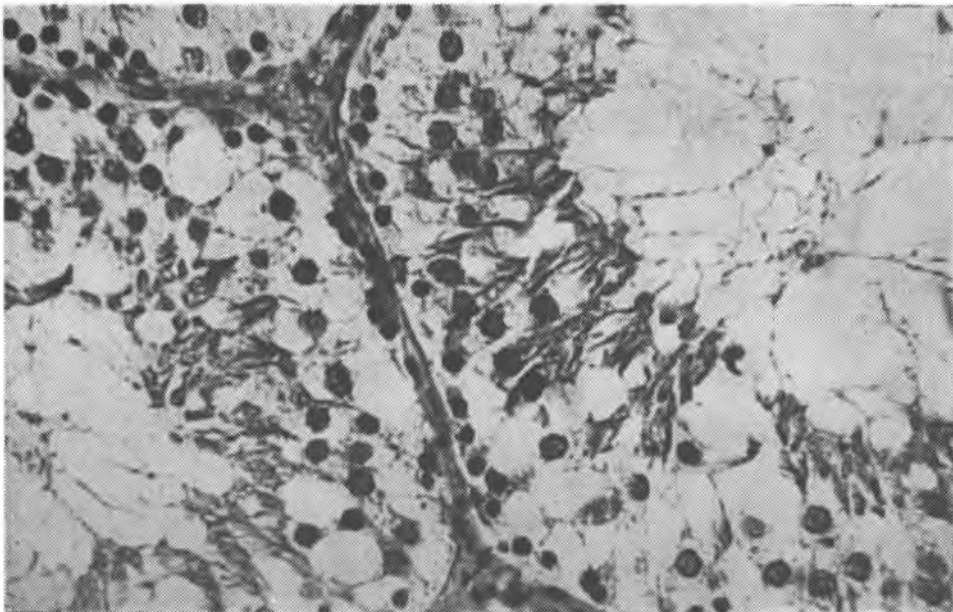
Ryc. 2



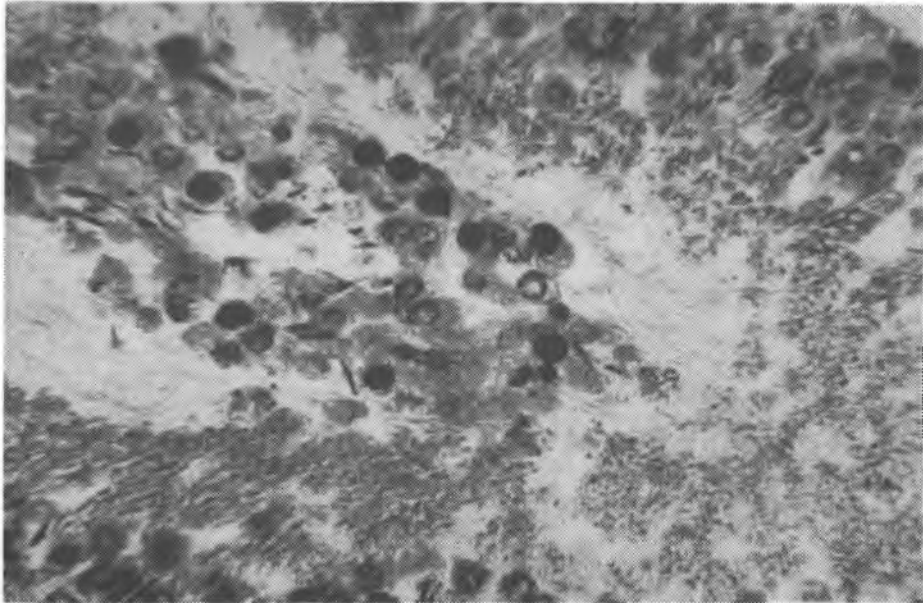
Ryc. 3



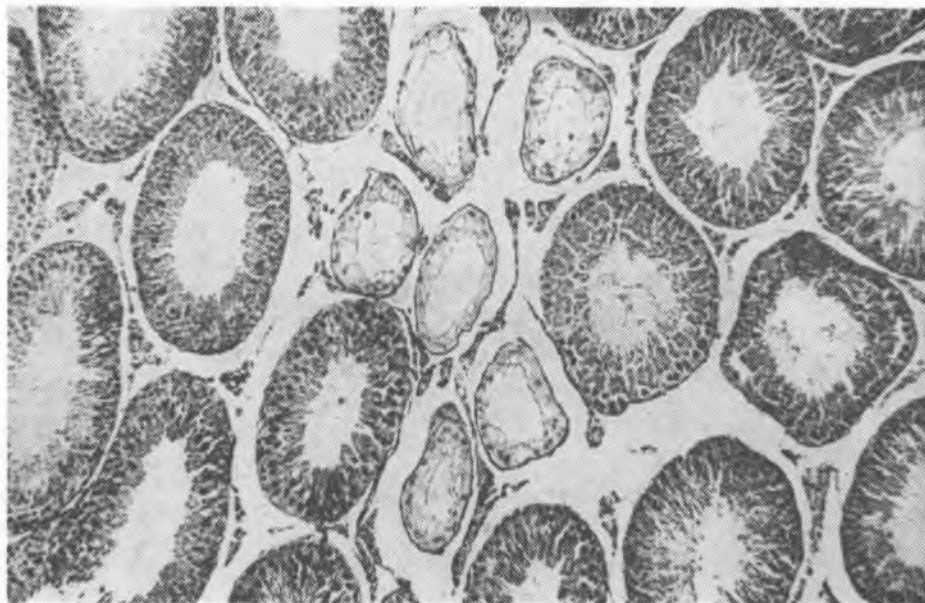
Ryc. 4



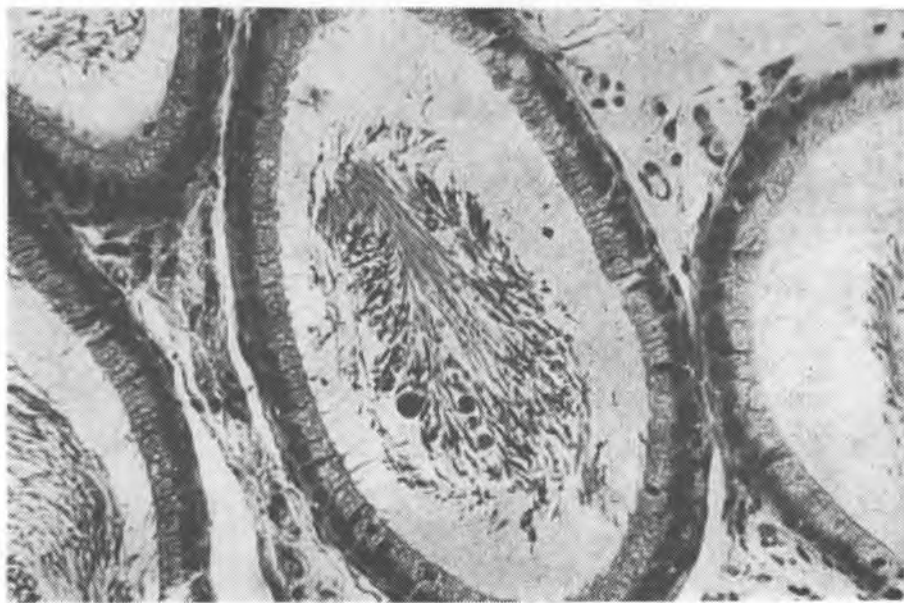
Ryc. 5



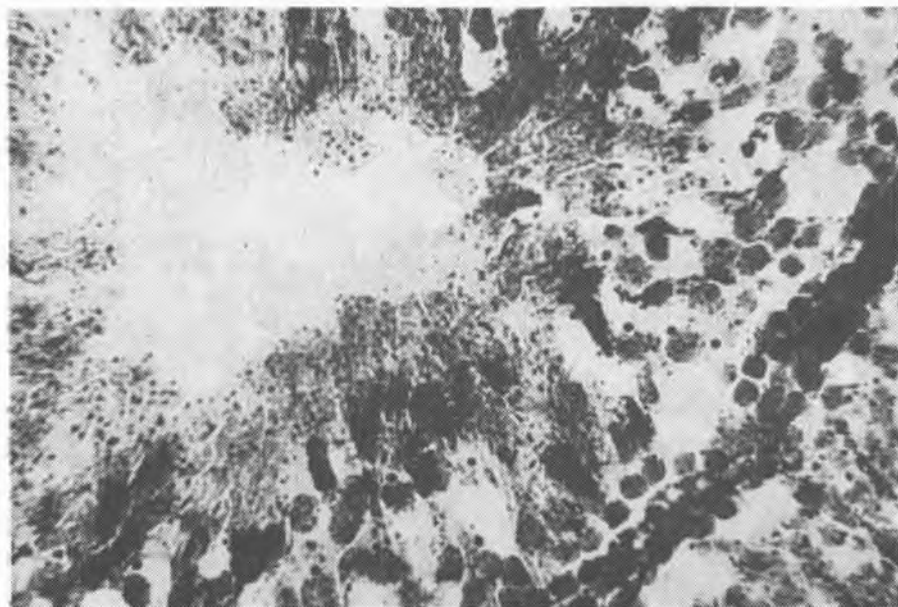
Ryc 6



Ryc. 7



Ryc. 8



Ryc. 9

(LDH), głównie w komórkach gruczołu śródmiąższowego Leydiga. Podobne wzmoczenie odczynu na ACP-azę w komórkach gruczołu śródmiąższowego Leydiga u szczurów stwierdzili Reddy i Svoboda (21), a u mężczyzn w pewnych postaciach zaburzeń w czynności gonady Jirasek i Raboch (16).

Zmiany histopatologiczne obserwowane w gonadzie były takie same jak po stosowaniu doświadczalnym innych insektycydów podawanych osobno (Lindan, Trichlorfon, Endrin), ale o znacznie mniejszym nasileniu. Jest to związane zapewne nie tylko ze stosowaniem bardzo małych dawek insektycydów podawanych łącznie (Lindanu i Trichlorfonu), ale również brakiem synergizmu toksycznego podawanych związków chemicznych. Bardzo zbliżone zmiany histopatologiczne w gonadzie męskiej szczura zostały opisane po dojadrowym i dootrzewnowym podawaniu insektycydów chloroorganicznych (Endrinu i Lindanu) szczurom przez Dikshitha i Dattę (8, 9), a także innych związków chemicznych, o czym pisze Ribelin (22). Jak już wyżej wspomniano, uszkodzenie komórek gonady, zarówno nabłonka, jak i komórek gruczołu śródmiąższowego jest stosunkowo nieznaczne, o czym może świadczyć bardzo szybka regeneracja tych elementów jądra — prawie natychmiast po zakończeniu podawania pestycydów. Tylko pojedyncze kanaliki nasienne mogą wykazywać trwałe uszkodzenie morfologiczne.

Wnioski

1. Przewlekłe łączne podawanie bardzo małych dawek Lindanu (I/30 LD₅₀) i Trichlorfonu (I/30 LD₅₀) powoduje powstawanie w gonadzie męskiej szczura zmian histoenzymatycznych i histopatologicznych.

2. Pod wpływem podawanych insektycydów ogniskowo następuje osłabienie odczynów histochemicznych na kwasy nukleinowe DNA i RNA w nabłonku nasiennym i częściowo w komórkach gruczołu śródmiąższowego Leydiga. Następuje jednocześnie przejściowe osłabienie odczynów histoenzymatycznych na dehydrogenazę 3- β -ol sterydową (HSD) i dehydrogenazę glukozo-6-fosforanową (G-6-PDH). Przejściowemu wzmoczeniu ulegają odczyny histoenzymatyczne na aktywność fosfatazy kwaśnej (ACP-azy) i dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w komórkach gruczołu śródmiąższowego.

3. Ogniskowo w kanalikach nasiennych rozwijają się zmiany histopatologiczne polegające na częściowym uszkodzeniu nabłonka nasiennego ze zwyrodnieniem i obumieraniem niedojrzałych komórek rozrodczych i zahamowaniem spermato- i spermiogenezy. Zaznaczają się także delikatne zmiany wsteczne w komórkach gruczołu śródmiąższowego Leydiga.

4. Wymienione zmiany histochemiczne i histopatologiczne mają w gonadzie męskiej charakter odwracalny, a regeneracja nabłonka nasiennego i komórek gruczołu śródmiażdżowego zaczyna się bezpośrednio po zakończeniu podawania pestycydów.

5. Zarówno zmiany histochemiczne, jak i histopatologiczne dotyczyły w równym stopniu szczurów starszych co i młodych, z czego wnosić można, iż badane układy enzymatyczne i mikrostruktura gonady w obu grupach wiekowych były takie same, a także taka sama była odczynowość różnych wiekiem szczurów na podawane im insektycydy.

6. Nie stwierdzono synergicznego efektu toksycznego wpływu obu insektycydów na rozwój zmian histochemicznych i histopatologicznych w gonadzie.

7. W przebiegu doświadczenia nie nastąpił statystycznie znamieny zanik gonady, w związku z czym waga jąder nie może być brana pod uwagę w powyższym doświadczeniu jako wskaźnik uszkodzenia gonady.

PIŚMIENNICTWO

1. Allen J.: *Anat. Rec.* **137**, 57—63, 1960.
2. Beat V.: *J. Am. Vet. Assoc.* **157**, 1835—1840, 1970.
3. Bell J., Vinson G., Hopkin D., Lacy D.: *Biochim. biophys. Acta* **64**, 412—420, 1968.
4. Boyd V., Chen C.: *Arch. Environ. Health* **17**, 156—163, 1968.
5. Clermont Y., Leblond C.: *Am. J. Anat.* **96**, 229—250, 1965.
6. Conney A., Welch C., Kuntzman R., Burns J.: *Clin. Pharmacol. Ther.* **8**, 2—10, 1967.
7. Deichman N., Keplinger M.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **8**, 337—338, 1966.
8. Dikshith T., Datta K.: *Exp. Path.* **7**, 309—316, 1972.
9. Dikshith T., Datta K.: *Acta Pharmacol. et Toxicol.* **31**, 1—10, 1972.
10. Edson A.: *Pharmacol. J.* **185**, 361—367, 1960.
11. Edson A.: *Brit. med. J.* **1**, 841—844, 1955.
12. Espir M., Hall J., Shirrefs J., Stevens D.: *Brit. med. J.* **1**, 423—425, 1970.
13. Hardonk M.: *Histochemie* **5**, 234—243, 1965.
14. Hayes W.: *Ann. N. Y. Science* **160**, 40—52, 1969.
15. Jończyk H.: *Rocznik PZH* **21**, 589—593, 1970.
16. Jirasek J., Raboch J.: *Fertil. Steril.* **14**, 237—244, 1963.
17. Lacy D., Pettitt J.: *Brit. med. Bull.* **26**, 87—91, 1970.
18. Lichtenstein E., Liang T., Anderegg B.: *Science* **181**, 847—849, 1973.
19. *Medical News-Tribune. Art. red.* **1**, 21, 1969.
20. Peck A.: *Brit. med. J.* **1**, 690, 1970.
21. Reddy K., Svoboda D.: *Arch. Path.* **84**, 376—392, 1967.
22. Ribelin A.: *Arch. Path.* **75**, 229—235, 1963.
23. Rusiecki W.: *Toksykologia środków ochrony roślin. PZWŁ, Warszawa* 1973, 28—30.
24. Wattenberg L.: *J. Histochem. Cytochem.* **6**, 225—232, 1958.

Otrzymano 21 VII 1978.

ОБЪЯСНЕНИЯ РЫЦИН

Ryc. 1. Grupa IV (kontrolna). Duże powiększenie fragmentu przekroju kanalika nasiennego z prawidłowym układem komórek rozrodczych w VIII stadium spermatogenezy, z widoczną generacją spermatocytów spoczynkowych, pachytenów, spermatyd i plemników. Barw. H+E. Pow. 400X.

Ryc. 2. Grupa IV (kontrolna). Przewody najądrza szczura kontrolnego wypełnione dużą ilością dojrzałych plemników. Barw. H+E. Pow. 200X.

Ryc. 3. Grupa I. Zahamowanie spermiogenezy w kanalikach nasiennych, złuszczenie się spermatocytów. Barw. H+E. Pow. 200X.

Ryc. 4. Grupa I. Zwyrrodnienie wodniczkowe komórek nabłonka nasiennego. Barw. H+E. Pow. 200X.

Ryc. 5. Grupa I. Widoczne liczne duże wodniczki we wszystkich warstwach nabłonka nasiennego z obumieraniem pojedynczych komórek rozrodczych. Barw. H+E. Pow. 400X.

Ryc. 6. Grupa I. Złuszczenie się zwyrodniałych i marwiczejących spermatocytów w różnych stadiach rozwoju do światła kanalików. Barw. H+E. Pow. 600X.

Ryc. 7. Grupa III. Pomiędzy nie zmienionymi kanalikami nasiennymi z zachowaną spermato- i spermiogenezą widoczne są kanaliki zanikowe pozbawione całkowicie nabłonka rozrodczego. Barw. H+E. Pow. 90X.

Ryc. 8. Grupa II. W przewodach najądrza oprócz plemników widoczne pojedyncze niedojrzałe komórki rozrodcze. Barw. H+E. Pow. 200X.

Ryc. 9. Grupa I. Fosfataza kwaśna (ACP-aza). Wzmocnienie odczynu histochemicznego na ACP-azę w komórkach Sertoliego i częściowo w spermatogoniach. Odczyn Gomoriego. Pow. 200X.

РЕЗЮМЕ

Автор представил результаты исследований влияния длительных, одновременно применяемых, небольших доз $1/30 LD_{50}$ двух повсеместно использованных в сельскохозяйственной практике инсектицидов из группы хлороорганических (Линдан) и фосфоорганических (Трихлорфон) соединений на возникновение морфологических и гистоэнзиматических изменений в мужской гонаде белой крысы. Исследования показали, что в гонаде развиваются гистопатологические дегенеративно-некротические, небольшой интенсивности, изменения вызывающие очаговое заторможение спермато- и спермиогенезу в семенном эпителии. Развиваются также небольшие инволюционные изменения в клетках интерстициальной железы Лейдига. В мужской гонаде гистопатологические изменения выступают после гистоэнзиматических. Это: понижение гистохимических реакций на дегидрогеназу, принимающие участие в стеридогенезе в гонаде — дегидрогеназу 3- β -оль-стеридовой (HSD) и дегидрогеназу глюкозо-6-фосфорановой (G-6-PDH). Одновременно усилению подвергаются гистохимические реакции в гонаде на активность кислой фосфатазы (ACP-азы) и лактатной (LDH), а также неспецифической экстеразы (N-E) в клетках интерстициальной железы. Как гистоэнзиматические так и гистопатологические изменения бывают обратимые и быстро уступают, когда прекращается применение инсектицидов. Не обнаружено токсического синергизма обоих применяемых инсектицидов.

SUMMARY

The author presented the results of his examinations on the effect of a long-term experimental administration of low doses (1/30 LD₅₀) of two simultaneously applied, widely used, chlororganic (Lindan) and phosphorus insecticides (Trichlorfon) on the appearance of morphological and histoenzymatic changes in the testis of the white rat. The examinations showed histopathologic degenerative and necrotic changes, low in intensity, resulting in the inhibition of spermatogenesis in the seminiferous epithelium. Weak degenerative changes in Leydig interstitial cells were also found. The histopathologic changes were preceded by histoenzymatic disturbances in the testes. They were: a decreased intensity of histochemical reactions to dehydrogenase involved in steroidgenesis in the testis, i.e., steroid 3- β -ol dehydrogenase (HSD) and G-6-P-dehydrogenase (G-6-PDH). Increased histochemical reactions in the testis to acid phosphatase (ACP), lactic dehydrogenase (LDH) and non-specific esterase (N-E) in the Leydig interstitial cells were also observed. Both histoenzymatic and histopathologic changes are reversible and re-treated quickly after discontinued application of the insecticides. No toxic synergism of both administered insecticides was observed.

EXPLANATION TO FIGURES

Fig. 1. Group IV (control). A cross-section of a seminiferous tubule with a normal distribution of germ cells at VIII stage of spermatogenesis, with visible spermatocytes, pachytenes, spermatids and spermatozoa. Haematoxylin and eosin (HE). Magn. 400 \times .

Fig. 2. Group IV (control). Ductus epididymis of a control rat, filled up by numerous spermatozoa. HE. Magn. 200 \times .

Fig. 3. Group I. Inhibition of spermiogenesis in seminiferous tubules, exfoliation of spermatocytes. HE. Magn. 200 \times .

Fig. 4. Group I. Degenerated vacuolation of the cells of the seminiferous epithelium. HE. Magn. 200 \times .

Fig. 5. Group I. Numerous, large vacuoles in all layers of the seminiferous epithelium and necrobiosis of single germ cells. HE. Magn. 400 \times .

Fig. 6. Group I. Exfoliation of degenerated and necrotic spermatocytes at different stages of the development inside tubules. HE. Magn. 600 \times .

Fig. 7. Group III. Among unchanged seminiferous tubules with active spermatogenesis atrophic tubules deprived completely of the germinal epithelium are visible. HE. Magn. 90 \times .

Fig. 8. Group II. In ductus epididymis besides spermatozoa, single germ cells are visible. HE. Magn. 200 \times .

Fig. 9. Group I. Acid phosphatase (ACP). Increased histopathological reaction to acid phosphatase in Sertoli cells, and, partly, in primordial germ cells. Gomori. Magn. 200 \times .