

Zakład Histologii i Embriologii. Instytut Biologiczno-Morfologiczny. Wydział Lekarski.
Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr med. Stanisław Grzycki

Irena KRÓLIKOWSKA-PRASAŁ, Jerzy TARACH

**Badania histochemiczne nabłonka nasieniowórczego jądra szczura
pozostającego pod działaniem cytostatyku (nitrogranulogen)**

Гистохимические исследования семенного эпителия ядра крысы, находящегося
под влиянием цитостатика (нитрогранулогена)

Histochemical Studies on the Influence of Nitrogranulogen-Polfa
on the Seminiferous Epithelium of the Rat Testicle

Założeniem chemioterapii schorzeń nowotworowych jest uszkodzenie procesów mechanizmu komórkowego młodych, niedojrzałych, proliferujących komórek nowotworu. Działanie to nie jest jednak działaniem wybiórczym skierowanym wyłącznie przeciw komórce nowotworowej. Uszkodzeniu ulegają również inne komórki organizmu, młode, niedojrzałe, proliferujące, ale prawidłowe. Nie znamy bowiem procesów biochemicznych charakterystycznych tylko dla komórki nowotworowej i nie posiadamy leku o wyłącznym, swoistym działaniu na zmienioną komórkę nowotworową (22). Nie udało się wykazać w sposób bezsporny takiej różnicy pomiędzy komórką prawidłową i nowotworową, która mogłaby stanowić punkt wyjścia do syntezy związku niszczącego nowotwór bez uszkodzenia organizmu gospodarza (24). Cytostatyki, do których należą przede wszystkim związki alkilujące z nitrogranulogenem na czele, działają w pierwszym rzędzie na komórki i tkanki ulegające szybkiej odnowie, a więc na tkankę krwiotwórczą: szpik kostny, śledzionę, grudki i węzły limfatyczne, a ponadto na komórki rozrodcze i komórki nabłonków wyścielających (2). W oparciu o badania doświadczalne przeprowadzone na zarodkach gadów oraz zarodkach kurzych, mysich i szczurzych, liczni autorzy (7, 8, 11, 12, 33) wskazują również na szczególną wrażliwość tkanek płodu na działanie środków cytostatycznych w tym oczywiście nitrogranulogenu. Humke i Reinemann (9) badając wpływ różnych środków cytostatycznych, w tym związków alkilujących na proces spermiogenezy u ropuchy (*Bufo vulgaris*) stwierdzili, że efekt działania tych związków polegał głównie na zahamowaniu procesu dojrzewania komórek płciowych. Jehan i wsp. (10) w wyniku pojedynczej dootrzewnowej infekcji środka cytostatycznego (Busulphan) w dawce 10 mg/kg c. spowodowali przerwanie procesu spermatogenezy w jądrach szczura. Miętkiewski i wsp. (23) podając szczurom trenimon przez

okres 2 i 4 tygodni stwierdzili powstawanie zmian w odczynach histochemicznych oraz obrazie histologicznym jąder. Wykazano również (15), że jądra myszy po parenteralnym podaniu nitrogranulogenu ulegają histopatologicznym zmianom polegającym na degeneracji kanalików i komórek, obrzmiewaniu komórek, tworzeniu komórek olbrzymich oraz zahamowaniu procesów mitozy. De Lustig i wsp. (20) badając działanie nitrogranulogenu na komórki prawidłowe i nowotworowe hodowane *in vitro*, stwierdzili między innymi, że jądro komórkowe zarówno podczas mitozy, jak i spoczynku ulega największemu uszkodzeniu, przy czym najwrażliwszą fazą mitozy jest profaza. Kindred (13) wykazał powstawanie histopatologicznych zmian w jądrach szczura po dożylnym podawaniu nitrogranulogenu.

Biorąc pod uwagę wybitnie toksyczne właściwości nitrogranulogenu, leku stosowanego w dalszym ciągu w terapii schorzeń nowotworowych, postanowiliśmy prześledzić jego wpływ na aktywność enzymów hydrolitycznych i oddechowych oraz DNA i RNA w komórkach nabłonka nasieniowórczego kanalików krętych jądra szczura.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Badania wykonywano na szczurach białych w wieku 3—4 miesięcy, ciężaru około 180—200 g, hodowli wsobnej. W okresie doświadczenia zwierzęta przebywały w jednakowych warunkach oraz żywione były standardową dietą. Szczury podzielono na 3 grupy doświadczalne (po 5 sztuk w każdej) i grupę kontrolną (6 sztuk). W I grupie zwierzęta otrzymywały dootrzewnowo nitrogranulogen - Polfa (dichloro-diaetylo-methylaminum hydrochloricum) w dawce 0,05 mg/kg c. przez okres 7 dni, w II grupie po 0,5 mg/kg c. przez 3 dni, w III — 0,5 mg/kg c. przez 7 dni. W grupie kontrolnej podawano dootrzewnowo 1 cm roztworu soli fizjologicznej. W 24 godziny po ostatniej iniekcji zwierzęta dekapitowano i pobierano wycinki z lewego jądra. Po 24-godzinnym utrwalaniu w płynie Bakera skrawki cięto na mikrotomie mrożeniowym i wykonywano odczyny histochemiczne na aktywność fosfataz: kwaśnej i zasadowej wg Gomoriego, ATP-azy wg Wachsteina i Meisela. Natomiast wycinki nie utrwalone skrawano w kriostacie Pearse'a na 20 μ grubości skrawki i wykonywano na nich odczyny na aktywność glikozo-6-fosfatazy wg Wachsteina i Meisela, dehydrogenazę bursztynianową wg Nachlasa i wsp. oraz dehydrogenazę mleczanową i glikozo-6-fosforanową wg Pearse'a. Reakcje kontrolne badanych enzymów przeprowadzono w środowisku bezsubstratowym w tych samych warunkach. Część wycinków jądra utrwalano w płynie Carnoya i na skrawkach parafinowych wykonywano odczyny histochemiczne na DNA i RNA wg reakcji Feulgena i Bracheta. Preparaty przeglądowe barwiono hematoksyliną i eoźną.

WYNIKI BADAŃ

I grupa doświadczalna (0,05 mg/kg — 7 dni).

W nabłonku nasiennym kanalików krętych jądra szczurów pod działaniem stosowanej dawki nitrogranulogenu odczyny na DNA były słabsze w jądrach spermatocytów I rzędu niż w tych samych komórkach w grupach kontrolnych, nie wykazano natomiast różnic w spermatogoniach oraz spermatydach i plemnikach. Widoczne jest to na ryc. 1, która przedstawia VII stadium cyklu płciowego (wg Leblonda i Clermonta (16), gdzie obserwujemy spermatogonie A z kulistymi jądrami,

zbitą chromatyną leżące przy błonie własnej kanalika i wykazujące silne odczyny na DNA, spermatocyty I rzędu znajdujące się w profazie mejozy (st. pachytenowe), ze słabo zaznaczoną reakcją oraz dojrzewające spermatydy i plemniki.

Odczyn na RNA wg Bracheta wykazywały wszystkie komórki nabłonka nasieniowórczego, jednak porównując je z preparatami kontrolnymi zauważono osłabienie reakcji w spermatogoniach i spermatocytach w poszczególnych stadiach profazy (leptoten, zygoten) nie stwierdzono w pozostałych komórkach cyklu płciowego (ryc. 2. — stadium X).

Przystępując do omówienia reakcji enzymatycznych zwłaszcza przeprowadzonej na materiale nie utrwalonym w niektórych przypadkach powstały trudności w ustaleniu stadiów cyklu nabłonka ze względu na dokładne określenie fazy rozwojowej np. spermatocytów I rzędu, jak również spermatyd. W takich przypadkach ograniczyliśmy się do opisu lokalizacji produktu reakcji enzymatycznej w poszczególnych komórkach nabłonka i porównaniu go z preparatami kontrolnymi.

Fosfataza kwaśna wykazywała nieznaczny wzrost aktywności w komórkach rozrodczych nabłonka, zmiany te najbardziej były widoczne w spermatocytach I rzędu. Zauważano nasilenie odczynów na aktywność fosfatazy zasadowej w błonie własnej kanalika krętego (ryc. 3) w porównaniu z grupą kontrolną.

Reakcję na ATPazę wykazano przede wszystkim w tkance granicznej kanalika i w błonie komórek nasiennych, ale była ona słabsza w porównaniu z odczynami uzyskanymi u zwierząt kontrolnych. Glikozo-6-fosfataza wykazywała silną aktywność w komórkach nabłonka płciowego szczególnie w spermatogoniach.

Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej była różna w poszczególnych komórkach nabłonka nasieniowórczego już u zwierząt kontrolnych, dlatego staraliśmy się porównywać z odpowiednimi komórkami znajdującymi się w tych samych fazach rozwojowych u zwierząt doświadczalnych i kontrolnych. Wysoka aktywność dehydrogenazy bursztynianowej u zwierząt kontrolnych obserwowana w spermatocytach I rzędu we wczesnych fazach rozwojowych oraz w młodych spermatydach i komórkach Sertoliego (ryc. 4 — stadium VII) uległa stopniowemu obniżeniu pod działaniem stosowanej dawki nitrogranulogenu. Słabe odczyny zauważa się w młodszych i starszych rozwojowo spermatocytach, natomiast spermatydy i plemniki wykazują niezmienną aktywność enzymatyczną.

Dehydrogenaza mleczanowa — podobnie jak w kontroli — wykazuje silne odczyny w plemnikach oraz dojrzewających spermatydach i dość wyraźne w spermatogoniach A, słabsze odczyny występują w spermatocytach I i II rzędu, co przedstawia ryc. 5, na której widoczne jest VIII stadium cyklu płciowego z wyraźnie zaznaczonymi plemnikami w górnej

warstwie nabłonka. Spermatoocyty w stadium proleptotenu i pachytenu profazy pierwszego podziału dojrzewania dają słabą reakcję.

Odczyn na dehydrogenazę glikozo-6-fosforanową w kanaliku nasien-
nym w VII stadium cyklu płciowego przedstawia ryc. 6, gdzie intensyw-
na reakcja widoczna jest w plemnikach oraz przekształcających się sper-
matydach (w 7 stadium spermiogenezy). Pozostałe komórki nabłonka
płciowego wykazują słabą aktywność enzymatyczną z tym, że w niektó-
rych spermatogoniach typu A spotyka się również znaczne ilości produk-
tu reakcji w postaci niebieskich ziaren dwuformazanu.

II grupa doświadczalna (0,5 mg/kg — 3 dni)

Podawanie zwierzętom dużych dawek nitrogranulogenu powodowało
obniżenie aktywności DNA w jądrach nabłonka płciowego kanalików
krętych z wyjątkiem dojrzałych plemników, w których odczyn nie uległ
zmianie, co ilustruje ryc. 7 — II stadium oraz ryc. 8 — IV stadium cyklu
płciowego. Wykazano natomiast osłabienie odczynów na RNA w porów-
naniu z preparatami kontrolnymi we wszystkich komórkach rozrodczych,
a zwłaszcza w spermatogoniach i spermatoocytach I rzędu (ryc. 9 — sta-
dium XII).

Podobnie jak w I grupie doświadczalnej obserwowano wzmożenie od-
czynów na fosfatazę kwaśną w komórkach nabłonka płciowego kanalików
jądra po podaniu nitrogranulogenu. Nasilenie odczynów na fosfatazę za-
sadową stwierdzono w ścianie własnej kanalika krętego (ryc. 10) oraz
zauważono wzrost odczynu w dojrzałych plemnikach znajdujących się w
świecie kanalika.

Dodatnie odczyny na ATPazę wykazano w tkance granicznej kana-
lika, przy czym jednak intensywność reakcji była słabsza w porównaniu
z preparatami kontrolnymi. W niektórych miejscach błony własnej ka-
nalików odczyny stawały się mało widoczne, zanikały prawie zupełnie
w błonach komórkowych spermatogonii i spermatoocytów, słabsze odczy-
ny wykazywały także spermatoocytidy i plemniki. Reakcja na G6Pazę była
mniej intensywna w komórkach nabłonka płciowego, a szczególnie w
spermatoocytach I rzędu w porównaniu nie tylko z grupą kontrolną, ale
również z I grupą doświadczalną.

Oslabienie aktywności na dehydrogenazę bursztynianową zauważono
w spermatogoniach i spermatoocytach I rzędu, nieco silniejsze odczyny u-
trzymywały się w spermatoocydach i plemnikach (ryc. 11 — stadium IX),
które nie były jeszcze dostrzegalne w świetle kanalika, ale w głębi na-
błonka płciowego. Odczyny na dehydrogenazę mleczanową uległy osła-
bieniu zarówno w spermatoocytach, jak i w spermatoocydach, stosunkowo in-
tensywną reakcję dawały spermatogonie leżące przy błonie własnej kana-
lika.

Zauważa się dalsze obniżenie aktywności dehydrogenazy glikozo-6-fosforanowej nie tylko w porównaniu z kontrolą, ale i I grupą doświadczalną. Słabe odczyny lub zupełny brak odczynu wykazuje nabłonek nasieniowórczy łącznie z plemnikami, oprócz spermatogonii, w których widoczne były większe ilości produktu reakcji w postaci niebieskich ziaren dwuformazanu, co ilustruje ryc. 12 — stadium X.

III grupa doświadczalna (0,5 mg/kg — 7 dni)

Podawanie dużych dawek nitrogranulogenu przez 7 dni powodowało zmiany w odczynach DNA w nabłonku płciowym kanalików krętych jądra. W większości komórek nasieniowórczych nastąpiło osłabienie reakcji na DNA, tylko plemniki wykazywały niezmienną odczyn. Uległy również osłabieniu odczynu na RNA w wielu komórkach nabłonka oraz pojawiły się zmiany degeneracyjne polegające na wakuolizacji ich cytoplazmy. Jedynie resztki cytoplazmy oderwane od przekształcających się spermatyd dawały silną reakcję na RNA (ryc. 13 — stadium IV).

W III grupie doświadczalnej — podobnie jak w dwu poprzednich — dało się zauważyć wzrost odczynu na fosfatazę kwaśną w obrębie cytoplazmy komórek płciowych. Znaczny wzrost odczynu na fosfatazę zasadową w porównaniu z preparatami kontrolnymi widoczny był w błonie własnej kanalika, co przedstawia ryc. 14, uwidaczniająca twory siateczkowe tej błony.

Obserwowano osłabienie reakcji na aktywność ATPazy w nabłonku nasieniowórczym. G6Paza wykazywała słabszą aktywność nie tylko w spermatocytach I rzędu, jak to zauważono w II grupie doświadczalnej, ale i w pozostałych komórkach. Stosunkowo wysoką aktywność wykazywały spermatogonie (ryc. 15). Wyraźne osłabienie odczynu na dehydrogenazę bursztynianową zauważono w nabłonku nasieniowórczym, gdzie produkt reakcji enzymatycznej występował przeważnie w postaci czerwonych ziaren monoformazanu, jedynie spermatydy w wyższych stadiach rozwojowych i dojrzałe plemniki wykazywały wyższą aktywność enzymu widoczną jako niebieski osad dwuformazanu.

Aktywność dehydrogenazy mleczanowej uległa osłabieniu w porównaniu z I i II grupą kontrolną w całym nabłonku płciowym za wyjątkiem spermatogonii leżących przy błonie własnej kanalika, co ilustruje ryc. 16 — III stadium cyklu płciowego, w którym spermatogonie A wykazują silną reakcję, natomiast spermatocyty w stadium pachytynowym profazy mejozy i spermatydy dają słabszą reakcję enzymatyczną, oraz plemniki znajdujące się jeszcze w okresie dojrzewania. Odczyn na dehydrogenazę glikozo-6-fosforanową nadal jest słaby, podobnie jak w II grupie doświadczalnej.

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Spermatogeneza jest procesem bardzo złożonym, podczas którego w komórkach nabłonka nasieniowórczego zachodzą nie tylko zmiany morfologiczne, ale także czynnościowe związane z syntezą kwasów nukleinowych, białek i aktywnością układów enzymatycznych. Ostatnio szereg autorów oprócz zmian morfologicznych (Leblond i Clermont, 1952; Roosen-Runge, 1962; Clermont, 1967) podejmuje badania dotyczące stanu czynnościowego komórek związanego z aktywnością enzymów hydrolitycznych i oksydacyjnych stosując metodykę histochemiczną i biochemiczną (Lison, 1955; Buno i Germino, 1958; Posalaky i wsp., 1968; Lehman i Brandau, 1970; Reissenweber, 1970), zwracając uwagę na zmiany aktywności enzymatycznej w zależności od fazy rozwojowej poszczególnych komórek, od cyklu nabłonka nasieniowórczego (Posalaky i wsp., 1961; Ambadkar i George, 1964) oraz na zmiany cykliczne w komórkach Sertoliego w zależności od fali spermatogenetycznej (Posalaky i wsp., 1968).

W naszych badaniach zastosowaliśmy substancję cytostatyczną — nitrogranulogen, która wykazuje zdolności alkilujące do wielu substancji komórkowych jak białka, aminokwasy, kwasy tłuszczowe, kwasy nukleinowe i inne (Mordarski, 1970). Związki alkilujące działają przede wszystkim na komórki i tkanki ulegające szybkiej odnowie (Bersagel i wsp., 1962), a więc również na nabłonek nasieniowórczy kanalików jądra, w którym obserwujemy szybki wzrost i liczne podziały komórkowe. Zwróciliśmy uwagę, że nitrogranulogen powoduje zmniejszenie odczynów na RNA w komórkach płciowych. Okazało się, że im na wyższym etapie rozwoju znajduje się dana komórka tym zmiany w odczynach na RNA są mniejsze. Stąd najsilniejsze odczyny na RNA utrzymywały się w plemnikach i spermatydach nie ulegając zmianie w porównaniu z tymi komórkami w preparatach kontrolnych, a odpowiednio słabsze występowały w spermatocytach i spermatogoniach, mimo że jak wiadomo z badań Daleda (5) — ilość cytoplazmatycznego i jąderkowego RNA podczas normalnego procesu spermatogenezy wzrasta w okresie rozwoju pierwotnych spermatocytów aż do pierwszego okresu dojrzewania, a następnie maleje. Należy sądzić, że zmniejszenie ilości RNA związane jest z zakłóceniem syntezy białka w komórkach i mniejszej zdolności podziałowej komórek rozrodczych, co w konsekwencji może doprowadzić do osłabienia lub zahamowania procesu spermatogenezy.

Obserwowane przez nas zmiany w odczynach na DNA w jądrach komórek płciowych mogą wskazywać na zaburzenia w procesie mejozy, o czym świadczy największe osłabienie odczynów w spermatocytach znajdujących się w jej profazie (leptoten, pachyten). Zmiany wykazane

podczas stosowania nitrogranulogenu w odczynach RNA i DNA dotyczyły przede wszystkim zwierząt tych grup doświadczalnych, które otrzymały duże dawki preparatu (II i III grupa dośw.). W związku z tym należy sądzić, że stężenia cytotatyków decydują o ostatecznych wynikach i mogą prowadzić do poważnych uszkodzeń komórk.

Z badań innych autorów wynika, że związki alkilujące powodują powiększenie jąder komórkowych, fragmentację chromosomów i zahamowanie mitoz w komórkach nabłonka nasieniowórczego (9,26) przy czym — jak podaje *Landing* (16) — następuje pęcznienie i tworzenie się komórek olbrzymich. Według *Mordarskiego* (24) efekt cytotatyczny i mechanizm hamowania podziałów komórkowych uwarunkowany jest alkilacją podwójną spirali DNA. Znane jest również mutagenne działanie cytotatyków. *Kindred* (13) i inni wykazali, że cytotatyki powodują największe zmiany w komórkach narządów limfopoetycznych: śledziony, szpiku, węzłów limfatycznych, ponieważ substancje alkilujące mają łatwiejszy dostęp do ich komórek wraz z płynami tkankowymi oraz z krwią przez śródbłonek kapilarów. Natomiast przeniknięcie substancji cytotatycznej do kanalików jądra jest utrudnione ze względu na obecność „bariery” w postaci błony własnej kanalika. Niemniej jednak zmiany w komórkach nabłonka nasieniowórczego były przez nas obserwowane chociaż w łagodniejszej formie niż w narządach limfopoetycznych. Również *Miętkiewski* i wsp. (23) zauważyli, że pod wpływem trenimonu wyraźne zmiany w aktywności enzymatycznej występują w tkance interstycjalnej, w komórkach Leydiga, jednak wpływa on również na komórki nasieniowórcze kanalików chociaż w nieco mniejszym stopniu. Również *Hunke* i *Reinemann* (9) badając samce ropuch wykazali, że cytotatyki powodują zahamowanie dojrzewania spermatyd i plemników zwłaszcza we wczesnych okresach.

Różnice w składzie chemicznym jądra i cytoplazmy komórek rozrodczych jądra — takie jak zmiany w kwasach nukleinowych RNA i DNA oraz innych substancji i układów enzymatycznych — mogą wywierać duży wpływ na żywotność plemników, ich ruchliwość i zdolność do zapłodnienia (42). Jak podaje *Leuchtenberger* i wsp. (18) u mężczyzn płodnych występują zawsze te same stałe wartości DNA w jądrach plemników, natomiast niższe u nieplodnych. Obniżenie tych wartości związane jest z anomaliami cytomorfologicznymi zachodzącymi podczas procesu spermat- i spermiogenezy. *Królikowska-Prasał* (14) wskazuje, że zawartość DNA w jądrze i fosfatazy kwaśnej w otoczce cytoplazmatycznej plemnika jest ważnym czynnikiem wpływającym na żywotność plemnika oraz może być związana z ich zdolnością do zapłodnienia.

W naszych doświadczeniach wykazano wzrost aktywności fosfatazy zasadowej w błonach własnych kanalika oraz w nabłonku płciowym. Naj-

silniejsze zmiany wystąpiły przy dużych dawkach cytostatyku, podobnie jak w badaniach Singha i Mathura (32) po podaniu busulphanu, gdzie obserwowano wzrost nie tylko fosfatazy zasadowej, ale i 5-nukleotydyazy. Aktywność ATPazy obniżała się w błonie własnej kanalika oraz w błonkach komórek nasieniowórczych wszystkich grup doświadczalnych. Obniżenie aktywności ATPazy może świadczyć o zmniejszeniu transportu jonów oraz glikozy i aminokwasów między nabłonkiem nasieniowórczym a tkanką śródmiąższową. Zmniejszeniu ulegała również aktywność G6Pazy zwłaszcza w II i III grupie doświadczalnej.

Enzymy oddechowe, a wśród nich dehydrogenaza bursztynianowa, odgrywają ważną rolę w procesie utleniania komórkowego, w procesach energetycznych, zwłaszcza w komórkach nabłonka nasieniowórczego, w którym zużycie energii ze względu na wzmożone podziały komórkowe jest bardzo duże. Już w grupach kontrolnych Posalak i wsp. (26) zauważyli różnice w aktywności dehydrogenazy bursztynianowej w poszczególnych typach komórek nabłonka płciowego; najwyższą aktywność obserwowano w młodych spermatocytach oraz starszych spermatydach. W naszych badaniach wykazaliśmy, że nitrogranulogen powodował obniżenie aktywności enzymu przede wszystkim w spermatogoniach i spermatocytach, mniejsze w młodych spermatydach, zaś nie stwierdziliśmy ich wcale w dojrzałych plemnikach i to bez względu na okres i wielkość podawanej dawki. Stąd można sądzić, że działanie cytostatyku jest mniejsze na dojrzałe, znajdujące się na wyższym etapie rozwoju komórki płciowe nabłonka nasiennego, co znalazło również wyraz w badaniach Singha i Mathura (32) nad wpływem busulphanu na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w jądrach gryzoni z rodzaju *gerbillus* (suwaki).

Z pracy Mordarskiego (24) wiemy, że cytostatyki mogą powodować alkilację albo części białkowej enzymu leżącej w pewnej odległości od jego centrum albo bezpośrednio w centrum aktywności enzymu. W przypadku pierwszym komórka może nadal rozwijać się prawidłowo, w drugim dochodzi do uszkodzenia funkcji danego enzymu i stąd efekt cytostatyczny staje się bardziej wyraźny.

Badane przez nas inne enzymy oddechowe wykazują również zmniejszenie aktywności pod wpływem nitrogranulogenu. W przypadku dehydrogenazy mleczanowej dotyczy to przede wszystkim spermatocytów I rzędu (we wczesnych stadiach rozwojowych), w których już w I grupie doświadczalnej obserwuje się obniżenie aktywności w spermatocytach, niewielkie osłabienie reakcji w spermatogoniach i spermatydach, a nie zauważono zmian w plemnikach; w tych ostatnich dopiero przy dużych dawkach cytostatyku (III grupa dośw.). Natomiast nie wykazano różnic w aktywności dehydrogenazy glikozo-6-fosforanowej w spermatogoniach

zadnej z grup doświadczalnych. Obniżenie jej aktywności następuje w spermatocytach I rzędu w I, II i III grupie oraz starszych spermatydach i plemnikach w III grupie doświadczalnej.

Posalaky (25) obserwuje intensywną reakcję na dehydrogenazę bursztynianową, dehydrogenazę izocytrynianową i reduktazę tetrazolową NADPH w spermatocytach I rzędu w IV stadium już u zwierząt kontrolnych opierając się przy ocenie stadiów na metodzie Rosen-Rungego (30), co zostało potwierdzone w badaniach Reissenwebera i wsp. (29), że aktywność dehydrogenazy bursztynianowej i mleczanowej jest wyższa w spermatocytach I rzędu niż w spermatydach w stadium od 1 do 8. Autorzy zwracają uwagę (Reissenweber i wsp., 1970), że komórki Sertoliego wykazują wysoką aktywność enzymów oddechowych, silniejszą niż komórki plemnikotwórcze, co zostało również zaobserwowane w naszych badaniach. Nie zauważyliśmy zmian w aktywności dehydrogenazy bursztynianowej w plemnikach za wyjątkiem III grupy doświadczalnej, w której podawano duże dawki cytostatyku przez okres 7 dni. Silne odczyny na dehydrogenazę mleczanową enzymem związanym z procesem beztlenowej glikozy występowały nadal w spermatydach i plemnikach. Jak zauważa Kindred (13) podczas podawania nitrogranulogenu szczyt zmian histopatologicznych przy dawkach subtelnym następuje 3 dnia po iniekcji, a oznaki degeneracyjne mogą utrzymywać się jeszcze przez 5 dni od ostatniego podania leku. Zwykle zmiany morfologiczne przebiegają równolegle w czasie i charakterze do zmian cytoenzymatycznych, a często te ostatnie je wyprzedzają. Największe uszkodzenia występują w spermatydach, tworzących olbrzymie komórki, najbardziej odporne na działanie nitrogranulogenu są plemniki, spermatogonie oraz komórki Sertoliego, co częściowo pokrywa się z naszymi badaniami, w których najmniejsze zmiany odczynów histochemicznych obserwowaliśmy w plemnikach i komórkach Sertoliego, natomiast najbardziej wrażliwe na działanie nitrogranulogenu okazały się spermatocyty I rzędu i spermatydy we wczesnych stadiach rozwojowych.

Na podstawie przeprowadzonych badań oraz danych z piśmiennictwa należy sądzić, że:

1. Substancje cytostatyczne (nitrogranulogen) wywierają wpływ na nabłonek nasieniowórczy kanalików jądra, o czym świadczą zmiany w odczynach histochemicznych.

2. Obniżenie odczynu na DNA występuje w spermatocytach I rzędu w okresie profazy, nie ulega zmianom w plemnikach.

3. Reakcja na RNA wykazuje osłabienie w spermatocytach I rzędu i niektórych spermatogoniach, nie obserwuje się zmian w innych komórkach.

4. Wzrost aktywności fosfatazy zasadowej występuje w błonach własnych kanalików jądra oraz obniżenie aktywności ATPazy i G6Pazy w nabłonku nasieniowtórczym.

5. Dehydrogenazy: bursztynianowa, mleczanowa i glikozo-6-fosforanowa wykazują zmniejszoną aktywność enzymatyczną w spermatogoniach i wczesnych spermatacytach.

6. Zmiany w aktywności enzymów oddechowych wskazują na zaburzenia w procesach utleniania komórkowego oraz w przypadku dehydrogenazy mleczanowej również w procesach glikozy beztlenowej.

7. Zmiany w odczynach histochemicznych DNA i RNA oraz badanych enzymów zależą od stężenia nitrogranulogenu. Największe zmiany obserwowano przy dużych dawkach preparatu podawanego przez dłuższy (7 dniowy) okres.

8. Obserwowane zmiany w komórkach nasieniowtórzych nabłonka kanalików jądra pod wpływem nitrogranulogenu mogą być wynikiem zarówno obniżenia produkcji androgenów przez komórki Leydiga, jak również mogą być związane ze zmniejszonym wydzielaniem gonadotropin przez przysadkę,

PIŚMIENNICTWO

1. Ambadkar P. M., George J. C.: *J. Histochem. Cytochem.* **12**, 587—590, 1964.
2. Bersagel D. E., Sprague C. C., Austin C., Griffith K. M.: *Cancer Chem. Reports* **21**, 87, 1962.
3. Buno W., Germino N. J.: *Acta Anat.* **33**, 161—174, 1958.
4. Clermont Y.: *Arch. Anat. micr., Suppl.* **56**, 7—60, 1967.
5. Daled H. J.: *Arch. Anat. micr.* **40**, 183—194, 1951.
6. Goldeck H.: *Klin. Wschr.* **28**, 620—621, 1950.
7. Haskin D.: *Anat. Rec. (Phil.)* **102**, 493—511, 1948.
8. Hettig R. A., Robertson G. G., Cline D. T.: *J. Lab. clin. Med.* **36**, 833—834, 1950.
9. Humke W., Reinemann I.: *Chemotherapie (Basel)* **12**, 306—319, 1967.
10. Jehan Q., Chowdhury A. R., Kamboj V. P., Karr A. B.: *Indian J. Exp. Biol.* **7**, 173—174, 1969.
11. Jurand A.: *Embryol. Exp. Morph.* **8**, 60—67, 1960.
12. Jurand A.: *J. Embryol. Exp. Morph.* **9**, 492—506, 1961.
13. Kindred J. E.: *J. Exp. Zool.* **121**, 225—293, 1952.
14. Królikowska - Prasał I.: *Pol. Tyg. Lek.* **19**, 1078—1080, 1964.
15. Landing B. H., Goldin A., Noe H. A.: *Cancer* **2**, 1075—1081, 1949.
16. Leblond C. P., Clermont Y.: *Am. J. Anat.* **90**, 167—216, 1952.
17. Lehman V., Brandau H.: *Acta Histochem.* **35**, 18—27, 1970.
18. Leuchtenberger C., Weir D. R., Schrader F., Leuchtenberger R.: *Acta genet.* **6**, 272—278, 1956.
19. Lison L.: *Acta Histochem (Jena)* **2**, 47—67, 1955.
20. de Lustig E. S., Teyssie A., Milner A., Sacerdote F.: *Anat. Rec.* **118**, 448, 1954.

21. Loveless A.: Genetic and Allied Effect of Alkylating Agents, Butterworth, London 1966.
22. Madejczyk A.: Onkologia, PZWL, Warszawa 1965.
23. Miętkiewski K., Warchoł J. B., Trojanowicz R.: Acta Histochem. 31, 188—201, 1968.
24. Mordarski M.: Post. Hig. Med. Dośw. 24, 609—638, 1970.
25. Posalaky Z.: Acta Histochem. 20, 86—90, 1965.
26. Posalaky Z., Gyevai A., Bukulya B.: Acta Morph. Hung. 10, 137—152, 1961.
27. Posalaky Z., Szabó D., Bácsi E., Ökrös I.: J. Histochem. Cytochem. 16, 249—262, 1968.
28. Reissenweber N. J.: Histochemie 21, 73—83, 1970.
29. Reissenweber N. J., Arbes-Navarrete I., Sala M. A.: Histochemie 21, 84—96, 1970.
30. Roosen-Runge E. C.: Anat. Rec. 123, 385—398, 1955.
31. Roosen-Runge E. C.: Biol. Rev. 37, 343—377, 1962.
32. Singh K., Mathur R. S.: Acta Anat. (Basel) 71, 472—480, 1968.
33. Waddington C. H.: J. Embryol. Exp. Morph. 6, 363—364, 1958.
34. Williams W. W.: Intern. J. Fertil. 3, 404—407, 1958.

Otrzymano 18 I 1974.

OBJAŚNIENIA RYCIN

Ryc. 1. Odczyn na DNA w komórkach nabłonka nasieniowórczego jądra szczura otrzymującego nitrogranulogen w dawce 0,05 mg/kg przez 7 dni. Reakcja Feulgena. Pow. 600 X.

Ryc. 2. Odczyn na RNA w komórkach nabłonka nasieniowórczego jądra szczura po podaniu nitrogranulogenu w dawce 0,05 mg/kg przez 7 dni. Reakcja Bracheta. Pow. 300 X.

Ryc. 3. Odczyn na fosfatazę zasadową w kanaliku krętym jądra szczura po podaniu nitrogranulogenu w dawce 0,05 mg/kg przez 7 dni. Reakcja Gomoriego. Pow. 200 X.

Ryc. 4. Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w komórkach nabłonka płciowego jądra szczura kontrolnego. Metoda Nachlasy i wsp. Pow. 200 X.

Ryc. 5. Aktywność dehydrogenazy mleczanowej w nabłonku nasieniowórczym kanalika jądra szczura po podaniu nitrogranulogenu w dawce 0,05 mg/kg przez 7 dni, wg Pearse'a. Pow. 200 X.

Ryc. 6. Aktywność dehydrogenazy glikozo-6-fosforanowej w nabłonku nasieniowórczym kanalika jądra szczura otrzymującego nitrogranulogen w dawce 0,05 mg/kg przez 3 dni. Metoda Nachlasy i wsp. Pow. 200 X.

Ryc. 7. Odczyn na DNA w komórkach nabłonka nasieniowórczego (stadium II) jądra szczura po podaniu nitrogranulogenu w dawce 0,5 mg/kg przez 3 dni. Reakcja Feulgena. Pow. 300 X.

Ryc. 8. Odczyn na DNA w komórkach nabłonka nasieniowórczego (stadium IV) jądra szczura otrzymującego nitrogranulogen w dawce 0,5 mg/kg przez 3 dni. Reakcja Feulgena. Pow. 300 X.

Ryc. 9. Odczyn na RNA w komórkach nabłonka nasieniowórczego jądra szczura otrzymującego nitrogranulogen w dawce 0,5 mg/kg przez 3 dni. Reakcja Bracheta. Pow. 300 X.

Ryc. 10. Odczyn na fosfatazę zasadową w kanalikach krętych jądra szczura otrzymującego nitrogranulogen w dawce 0,5 mg/kg przez 3 dni. Metoda Gomoriego. Pow. 200 X.

Ryc. 11. Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w komórkach nasieniowców kanalików jądra szczura po podaniu nitrogranulogenu w dawce 0,5 mg/kg przez 3 dni. Metoda Nachlas i wsp. Pow. 200 X.

Ryc. 12. Aktywność dehydrogenazy glikozo-6-fosforanowej w kanaliku nasieniowców jądra szczura po podaniu nitrogranulogenu w dawce 0,5 mg/kg przez 3 dni wg Pearse'a. Pow. 200 X.

Ryc. 13. Odczyn na RNA w nabłonku nasieniowców jądra szczura po podaniu nitrogranulogenu w dawce 0,5 mg/kg przez 7 dni. Metoda Bracheta. Pow. 300 X.

Ryc. 14. Odczyn na fosfatazę zasadową w kanaliku krętym jądra szczura po podaniu nitrogranulogenu w dawce 0,5 mg/kg przez 7 dni. Metoda Gomoriego. Pow. 600 X.

Ryc. 15. Aktywność glikozo-6-fosfatazy w nabłonku nasieniowców jądra szczura otrzymującego nitrogranulogen w dawce 0,5 mg/kg przez 7 dni. Metoda Wachsteina i Meisela. Pow. 200 X.

Ryc. 16. Aktywność dehydrogenazy mleczanowej w kanaliku nasieniowców jądra szczura po podaniu nitrogranulogenu w dawce 0,5 mg/kg przez 7 dni wg Pearse'a. Pow. 200 X.

РЕЗЮМЕ

Авторы провели гистохимические исследования семенного эпителия ядра крысы после подавания разных доз цитостатического препарата в разные периоды времени. Результаты исследований свидетельствуют о понижении реакций ДНК и РНК, особенно в спермацитах I ряда. Наблюдались также изменения в активности гидролитических и дыхательных энзимов.

SUMMARY

The authors have carried out histochemical studies of the seminiferous epithelium of the rat testicles after nitrogen mustard (Nitrogranulogen-Polfa) injections taking into account both different doses of the preparation and various periods of administration. The results of the studies have pointed out a decrease in the DNA and RNA reactions especially in the primary spermatocytes. Changes in the activities of the hydrolytic and respiratory enzymes have been also observed.

EXPLANATIONS OF FIGURES

Fig. 1. DNA reaction in the seminiferous epithelium cells of the rat testicle after nitrogen mustard injections in a dose of 0,05 mg/kg for 7 days. Feulgen reaction. Magn. 600 X.

Fig. 2. RNA reaction in the seminiferous epithelium cells of the rat testicle after nitrogen mustard injections in a dose of 0,05 mg/kg for 7 days. Brachet reaction. Magn. 300 X.

Fig. 3. Alkaline phosphatase reaction in the convoluted tubule of the rat testicle after nitrogen mustard administration in a dose of 0,05 mg/kg for 7 days. Gomori reaction. Magn. 200 X.

Fig. 4. Succinic dehydrogenase activity in the sexual epithelium cells of the control rat testicle. Nachlas et al. method. Magn. 200 X.

Fig. 5. Lactic dehydrogenase activity in the seminiferous epithelium of the rat testicle tubule, after nitrogen mustard injections in a dose of 0,05 mg/kg for 7 days, by Pearse. Magn. 200 X.

Fig. 6. Glicose-6-phosphatase dehydrogenase activity in the seminiferous epithelium of the rat testicle tubule after nitrogen mustard injections in a dose of 0,05 mg/kg for 7 days by Pearse. Magn. 200 X.

Fig. 7. DNA reaction in the seminiferous epithelium cells of the rat testicle after nitrogen mustard administration in a dose of 0,5 mg/kg for 3 days. Feulgen reaction. Magn. 300 X (Stage II).

Fig. 8. DNA reaction in the seminiferous epithelium cells (stage IV) of the rat testicle after nitrogen mustard injections in a dose of 0,5 mg/kg for 3 days. Feulgen reaction. Magn. 300 X.

Fig. 9. RNA reaction in the seminiferous epithelium cells of the rat testicle after nitrogen mustard injections in a dose of 0,5 mg/kg for 3 days. Brachet reaction. Magn. 300 X.

Ryc. 10. Alkaline phosphatase reaction in the convoluted tubules of the rat testicle after nitrogen mustard injections in a dose of 0,5 mg/kg for 3 days. Gomori method. Magn. 200 X.

Fig. 11. Succinic dehydrogenase activity in the seminiferous epithelium of the rat testicle tubule after nitrogen mustard administration in a dose of 0,5 mg/kg for 3 days. Nachlas et al. method. Magn. 200 X.

Fig. 12. Glicose-6-phosphate dehydrogenase activity in the seminiferous tubule of the rat testicle after nitrogen mustard administration in a dose of 0,5 mg/kg for 3 days, by Pearse. Magn. 200 X.

Fig. 13. RNA reaction in the seminiferous epithelium of the rat testicle after nitrogen mustard administration in a dose of 0,5 mg/kg for 7 days. Brachet method. Magn. 300 X.

Fig. 14. Alkaline phosphatase reaction in the convoluted tubule of the rat testicle after nitrogen mustard injections in a dose of 0,5 mg/kg for 7 days. Gomori method. Magn. 600 X.

Fig. 15. Glicose-6-phosphatase activity in the seminiferous epithelium of the rat testicle after nitrogen mustard injections in a dose of 0,5 mg/kg for 7 days. Wachstain and Meisel method. Magn. 200 X.

Fig. 16. Lactic dehydrogenase activity in the seminiferous tubule of the rat testicle after nitrogen mustard administration in a dose of 0,5 mg/kg for 7 days, by Pearse. Magn. 200 X.







