

Wpływ jednorazowej dawki TCDD na poziom estrogenów i reprodukcję u szczurów

IRENEUSZ CAŁKOŚIŃSKI, LUDMIŁA BORODULIN-NADZIEJA, MARCIN STAŃDA, URSZULA WASILEWSKA, MAREK CEGIELSKI*

Katedra i Zakład Fizjologii Wydziału Lekarskiego AM, ul. Chalubińskiego 10, 50-368 Wrocław

*Katedra i Zakład Histologii Wydziału Lekarskiego AM, ul. Chalubińskiego 6, 50-368 Wrocław

Całkoński I., Borodulin-Nadzieja L., Stańda M., Wasilewska U., Cegielski M.

Influence of a single dose of TCDD on estrogen levels and reproduction in female rats

Summary

The aim of the study was to examine the influence of TCDD on the level of estrogen and reproduction in female rats. The experiments were carried out on female rats treated by a single dose of TCDD. After 3 weeks the "dioxine females" were mated with male rats (first litter – M-I). Observations of the M-I litter covered: ability to become pregnant, number of young in the litter, their vitality and mean body weight measurements. The rat's body weight and number in the litter were checked 30 days after birth. One month after isolating the mother and litter, the dioxine females were mated again with healthy rats (second litter – M-II). The M-II litter was examined in the same manner as the M-I. The estrogen level in the "dioxine females" was determined five months after TCDD administration

The results obtained during the study lead to the following conclusions: the females treated with TCDD had difficulty in getting pregnant and their litters were smaller and less vital. TCDD had an indirect negative influence on the reproductive ability of the young whose mothers had been treated with it, and the level of estrogen concentration in "dioxin females" was significantly lower than in the control group.

Keywords: rats, TCDD, fertility, reproduction of rats, estrogen level

Dynamiczny postęp przemysłu, powszechne stosowanie tworzyw sztucznych jednorazowego użytku, ich zużywanie, a następnie utylizacja lub przetwarzanie w ramach recyklingu może być przyczyną skażenia środowiska, między innymi dioksynami (3, 4).

Najbardziej toksyczną dioksyną, względem której określa się toksyczność pozostałych związków zaliczanych do tej grupy jest 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioksyna (TCDD). Toksyczność tych związków związana jest z możliwością penetrowania do wnętrza organizmu drogą pokarmową, oddechową i przez skórę w proporcjach zależnych od nośnika. Ulegają one wiązaniu z lipidami i kumulują się w tkance tłuszczowej. Metabolizm tych związków odbywa się w wątrobie (2), a wydalanie – drogą żółci. Okres połowicznego rozpadu dioksyn zależy od liczby atomów chloru. Okres ten może ulec znacznemu skróceniu poprzez wydalanie TCDD z mlekiem w trakcie laktacji (1, 9).

Różne ksenobiotyki, a wśród nich – dioksyny, mogą naśladować działanie naturalnych hormonów, stąd substancje te określano jako ekoestrogeny, estrogeny środowiskowe czy modulatory endokrynne. Zwrócono uwagę na fakt odległego w czasie narażenia na związki hormono-podobne, jak również związek istnienia pewnych ksenobiotyków w środowisku z zaburzeniami funkcjonalnymi w rozwoju zwierząt. Narażenie na te

substancje, w związku z upowszechnieniem ich występowaniem (woda deszczowa, woda pitna, gleba i żywność pochodzenia zwierzęcego), we wczesnych etapach życia płodowego daje trwałe i nieodwracalne skutki (7).

Związki te mogą działać w różny sposób na osobniki męskie i żeńskie. W badaniach na szczurach (8) stwierdzono, że samice cechują się większą podatnością na skutki działania TCDD aniżeli samce. Może to być związane z antyestrogenowym mechanizmem oddziaływania z receptorem estrogenowym i zaburzać funkcje gonad (5, 6, 10). Wysokie dawki TCDD mają działanie antyestrogenne, co prowadzi do obniżenia liczby receptorów w komórkach macicy (12). Oddziaływanie dioksyn na embriony i rozwijające się płody prowadzi do malformacji, anomalii, defektów funkcjonalnych i strukturalnych, które często widoczne są dopiero w późniejszym okresie życia (11).

Celem była ocena wpływu jednorazowej dawki dioksyn na procesy rozrodcze i reprodukcyjne u szczurów oraz analiza cech somatycznych ich potomstwa.

Materiał i metody

Badania wykonano na samicach szczurów pierwiastkach, w wieku 4 miesięcy, o masie 180-200 g szczepu Buffalo. Zwierzęta losowo podzielono na dwie grupy po 6 zwierząt w każdej: K – kontrolna i D – obejmująca samice, którym

podano podskórną jednorazową dawkę 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioksyny (TCDD) rozpuszczonej w DMSO, w dawce 5 µg/kg m.c.

Po upływie trzech tygodni od momentu podania TCDD eksperyment przeprowadzono według następującego schematu. Ustalono 2 nowe grupy:

- grupę 1, w której samice grupy kontrolnej (K) oraz grupy dioksynowej (D) skojarzono z samcami dobranymi losowo pochodzącymi z tej samej hodowli; uzyskano pierwszy miot dioksynowy (MD-I) oraz miot kontrolny (MK-I),
- grupa 2, w której po okresie 30 dni od odsadzenia pierwszych miotów (MD-I i MK-I) ponownie dokonano skojarzenia samic grupy K i D według powyższego schematu uzyskując miot drugi (MD-II i MK-II).

We wszystkich grupach przeprowadzono obserwacje dotyczące zdolności zajścia samic w ciążę oraz czasu porodu od momentu skojarzenia z samcem. Masę, liczebność oraz żywotność (pobieranie pokarmu, ruchliwość) miotu oceniano bezpośrednio po porodzie oraz po upływie 30 dni od narodzin. Po osiągnięciu dojrzałości płciowej (2,5 miesiąca) osobniki obu miotów (MD-I oraz MD-II) zostały skojarzone ze sobą, a następnie po upływie 6 tygodni z osobnikami grupy kontrolnej.

Po upływie 6 tygodni od skojarzenia i braku objawów ciąży samice zostały poddane narkozie barbituranowej (pentobarbital 30 mg/kg masy ciała), a krew do oznaczeń estradiolu pobrano z aorty brzusznej. Estradiol oznaczono w oparciu o metodę IMMULITE Estradiol.

Przeprowadzono ocenę histopatologiczną jajników i jąder badanych zwierząt w oparciu o metodę barwienia hematoksyliną i eozyną.

Uzyskane wyniki badań opracowano statystycznie za pomocą programu STATISTICA 5,1 analizując je testem t-Studenta.

Wyniki i omówienie

W otrzymanych wynikach grupa dioksynowa cechowała się trzytygodniową rozpiętością w porodach w stosunku do samic grupy kontrolnej, które urodziły w bardzo wąskim przedziale czasowym, zamykającym się w zakresie 2 dni. Osobniki grupy D zakończyły porody trzy tygodnie później. Jest to znaczna różnica, jeśli uwzględni się długość trwania ciąży u szczurów, która trwa 21-23 dni oraz długość cyklu płciowego trwającego średnio 4-5 dni. Liczebność miotów matek ekspozycyjnych na działanie TCDD była wprawdzie mniejsza, ale nie różniła się w sposób statystycznie istotny od liczebności miotów matek należących do grupy kontrolnej (ryc. 1, tab. 2). W porównaniu z grupą kontrolną statystycznie istotnie mniejsza była natomiast masa urodzeniowa miotów „dioksynowych” (tab. 1). W badaniach wykonanych po upływie 1 miesiąca stwierdzono nie tylko statystycznie istotnie mniejszą w porównaniu z grupą kontrolną liczebność miotu „dioksynowego” przypadającego na jedną samice, ale i statystycznie istotnie mniejszą masę poszczególnych osobników.

Po upływie miesiąca od momentu odsadzenia samic grupy dioksynowej ponownie skojarzono ze zdrowymi samcami dobranymi losowo.

W drugiej części doświadczenia stwierdzono również, że zachodzenie w ciążę było utrudnione, a porody były opóźnione o około 3 tygodnie w porównaniu z grupą kontrolną. Liczebność drugiego miotu „dioksynowego” przypadająca na jedną samice była mniejsza (statystycznie istotna różnica) aniżeli w grupie kontrolnej (tab. 2). Masa miotu natomiast była wyższa niż w grupie kontrolnej (tab. 1). Fakt ten można tłumaczyć zarówno zmniejszoną dawką otrzymanego TCDD (drugie pokolenie) jak również faktem mniejszej liczebności miotu, i tym samym mniejszej konkurencji w zdobywaniu pokarmu. Liczebność osobników po upływie 30 dni w grupie drugiego miotu „dioksynowego” była również mniejsza aniżeli w grupie kontrolnej (tab. 2). Masa ciała tych osobników nie różniła się od masy ciała grupy kontrolnej w sposób statystycznie istotny (tab. 1).

Przeprowadzone badania wykazały ponadto różnice w zachowaniu i wyglądzie zewnętrznym potomstwa samic z grupy D. Potomstwo to było mniej samodzielne w pobieraniu pokarmu, mniej ruchliwe, ospałe, szybko męczące się. Pokrywa włosowa tych osobników była rzadka, szorstka, bez połysku z przeświecającą czerwoną skórą (ryc. 2).

Po uzyskaniu dojrzałości płciowej sprawdzono zdolność rozrodczą samic z miotu pierwszego oraz drugiego (MD-I i MD-II). Próbę przeprowadzono zgodnie ze schematem przedstawionym w metodyce. Po upływie 60 dni od momentu skojarzenia w żadnej z tych grup nie stwierdzono ciąży ani nie doszło do porodu.

W wyniku badania histopatologicznego jajników i jąder potomstwa pierwszego miotu dioksynowego stwierdzono zaburzoną spermatogenezę (oligospermię)

Tab. 1. Porównanie masy ciała szczurów w miocie po urodzeniu i po upływie jednego miesiąca życia, (g) ($\bar{x} \pm s$)

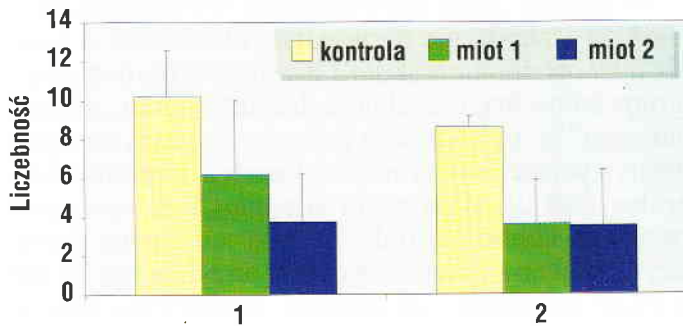
Masa ciała	Grupa kontrolna	I miot	II miot
Po urodzeniu	n = 51	n = 31	n = 15
	5,9 ± 0,5	5,0 ± 0,5*	6,5 ± 0,2*
Po 1 mies. życia	n = 43	n = 18	n = 14
	72,7 ± 8,4	62,3 ± 16,5*	75,9 ± 6,4

Objaśnienie: * różnica istotna w porównaniu do grupy kontrolnej przy $p \leq 0,001$

Tab. 2. Porównanie liczebności szczurów w miocie po urodzeniu i po upływie jednego miesiąca życia ($\bar{x} \pm s$)

Liczba szczurów przypadających na samice	Grupa kontrolna	I miot	II miot
Urodzonych	10,2 ± 2,3	6,2 ± 3,8	3,7 ± 2,5**
Odchowanych	8,6 ± 0,5	3,6 ± 2,3*	3,5 ± 2,9**

Objaśnienia: * różnica istotna w porównaniu do grupy kontrolnej przy $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$



Ryc. 1. Porównanie liczebności szcurek bezpośrednio po urodzeniu i upływie 1 miesiąca życia

Tab. 3. Stężenie estradiolu w surowicy krwi samic grupy kontrolnej i dioksynowej ($\bar{x} \pm s$)

Grupy		Stężenie estradiolu (pg/ml)
Kontrolna	n = 7	67,1 ± 7,4
Dioksynowa	n = 5	54,5 ± 5,4*

Objaśnienie: *p ≤ 0,01



Ryc. 2. Porównanie zewnętrznych cech osobników I miotu dioksynowego i kontrolnego po 30 dniach od urodzenia

i nieliczne, bądź brak dojrzewających pęcherzyków Graffa w jajnikach.

Oznaczenie poziomu estradiolu w surowicy samic dioksynowych wykazywał statystycznie istotny spadek (tab. 3) osiągając 81% wartości stężenia kontrolnego. Spadek ten może być związany z działaniem dioksyn określanych jako ekoestrogeny lub estrogeny środowiskowe (7). Spadek poziomu estradiolu może wynikać również z obniżenia liczby receptorów w komórkach macicy w związku z oddziaływaniem wysokich dawek TCDD (12), a z kolei zmniejszona liczba czynnych receptorów prawdopodobnie wpływa na obniżenie poziomu estradiolu, co w konsekwencji prowadzi do zakłócenia funkcji gonad (5, 6, 10) i ma bezpośredni wpływ na zdolności reprodukcyjne osobników oraz na cechy budowy somatycznej ich potomstwa.

Wnioski

1. Podanie jednorazowej dawki TCDD samicy szcurek powoduje:
 - zmniejszenie wydzielania estrogenów,

- zmniejszenie zdolności reprodukcyjnych samic.
- 2. Wykazano pośredni wpływ TCDD na potomstwo uzyskane od samic grupy dioksynowej przejawiające się:
 - mniejszą liczebnością i odchawalnością miotu,
 - utratą zdolności rozrodczych potomstwa.

Piśmiennictwo

1. Berg M. van den, van den Wijnen J., Wever H., Seinen W.: Selective retention of toxic polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in the liver of the rat intravenous administration of a mixture. *Toxicology* 1989, 55, 173-182.
2. Berg M. van den, De Jongh J., Poiger H., Olson JR.: The toxicokinetics and metabolism of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) and their relevance for toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 1994, 24, 1-74.
3. Calkosiński I., Borodulin, Nadzieja L., Stańda M., Wasilewska U., Majda J., Purzyc L., Cegielski M.: Wpływ podania TCDD na przebieg doświadczalnego zapalenia opłucnej u szcurek. *Wyd. Nauk. Politech. Kraków* 2001, s. 87.
4. Calkosiński I., Stańda M., Purzyc L., Pietraszkiewicz T., Borodulin-Nadzieja L.: Emisja doksyn do środowiska i ich wpływ na parametry fizjologiczne organizmu. *Mat. Konf. Nauk. – Legnica* 2000, s. 49-50.
5. Chafin C. L., Hutz R. II.: Regulation of the aromatic hydrocarbon receptor (AHR) by in utero and lactational exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *J. Reprod. Dev.* 1997, 43, 47-52.
6. Chafin C. L., Heimler L., Rawlins R. G., Wimpee B. A., Sommer C., Hutz R. J.: Estrogen receptor and aromatic hydrocarbon receptor in the primate ovary. *Endocrinol.* 1996, 5, 315-321.
7. Colborn T., van Saal F. C., Soto A. M.: Developmental effects on endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environm. Health Perspect.* 1993, 101, 378-384.
8. Ivens I. A., Loser E., Rinke M., Schmidt U., Neupert M.: Toxicity of 2, 3, 7, 8-tetrabromodibenzo-p-dioxin in rats after single oral administration. *Toxicology* 1992, 73, 53-69.
9. Korte M., Stahlam R., Neupert D.: Induction of hepatic monooxygenases in female rats and offspring in correlation with TCDD tissue concentration after single treatment during pregnancy. *Chemosphere* 1990, 20, 1193-1195.
10. Liem A. K. D., Van Zorge J. A.: Dioxins and related compounds: status and regulatory aspects in selected countries. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 1995, 2, 46-56.
11. Piskorska-Pliszczynska J.: Dioksyny i związane z nimi zagrożenia zdrowia. *Medycyna Wet.* 1999, 55, 491-496.
12. Romkes M., Piskorska-Pliszczynska J., Safe S. H.: Effects of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on hepatic and uterine estrogen receptor in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1987, 87, 306-314.

Adres autora: dr Ireneusz Calkosiński, ul. Brzozowa 40, 52-129 Wrocław; e-mail: icalkosinski@2com.pl

ARMSTRONG S. C., JONSSON N. N., BARRETT D. C.: Wrodzona erytrocytarna protoporfiria u cielęcia rasy limousin w Wielkiej Brytanii. (Bovine congenital protoporphyria in a Limousin calf bred in the UK). *Vet. Rec.* 150, 608-610, 2002 (19)

Wrodzona erytrocytarna protoporfiria bydła (BCEPP) jest ostrą formą fotouczulenia spowodowaną zwiększonym poziomem protoporfiryny w tkankach i we krwi. U zwierząt zdrowych protoporfiryna ulega konwersji w hem w procesie katalizowanym przez ferrochelatazę. Choroba wystąpiła u byczka w wieku 3 mies. rasy limousin i cechowała się ataksją i zapaścią, umiarkowanego stopnia neutrofilią ($16,9 \times 10^9$ neutrofilów/L), nieznacznie powiększonym poziomem dehydrogenazy glutaminianowej (35 j/L) i obniżeniem poziomu witaminy A. Zawartość ołowiu we krwi, który może być jedną z przyczyn protoporfirii była niższa od dopuszczalnego minimum i wynosiła $0,5$ $\mu\text{m/L}$. Z kału izolowano *Campylobacter sp.*, ale ponieważ nie było biegunki fakt ten uznano za incydentalny. W płynie mózgowo-rdzeniowym podwyższony był poziom białka ($0,07$ g/L) i liczba leukocytów ($0,22 \times 10^9$ komórek/L). Leczenie przy użyciu witaminy A i fluorofenikolu nie przyniosło poprawy.