

Praca oryginalna

Original paper

Wpływ 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksyny (TCDD) na czynność i strukturę jajników oraz jąder potomstwa u szczurów

IRENEUSZ CAŁKOŚIŃSKI, URSZULA WASILEWSKA, LUDMIŁA BORODULIN-NADZIEJA, MAREK CEGIELSKI*, PIOTR DZIĘGIEL*, MARCIN STAŃDA, JACEK MAJDA**

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

**Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej IV WSK SPZOZ, ul. R. Weigla 5, 50-981 Wrocław

Całkośiński I., Wasilewska U., Borodulin-Nadzieja L., Cegielski M., Dzięgiel P., Stańda M., Majda J.

Influence of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the functioning and structure of ovaries and testicles in the offspring of rats

Summary

The impaired fertility which has been observed within the recent 10 years, especially in the industrial areas, is attributed to environmental pollution. The potential toxic effect of dioxins - xenobiotics with hormone-like activity - on reproduction in humans and animals has been suggested. This negative effect on fertility is strictly associated with the ability of dioxins to bind the AhR receptor, which in turn leads to endocrine dysfunction.

The aim of the study was to investigate the mediate influence of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the impairment of fertility in rat offspring (strain), whose mothers were exposed to the aforementioned chemical compound. The experiments were performed on rat offspring whose mothers were exposed to a single dose of dioxin. The male and female rat offspring were interrogated with regard to fertility after maturation period. A histopathological examination of their testicles and ovaries was conducted as well. The histopathological assessment of male and female sexual organs demonstrated the impediment of oogenesis and spermatogenesis which caused infertility in rats. A few forms of growing Graaf vesicles and destructive changes in testicles were also found.

Keywords: dioxins, testicles and ovaries

Obserwowany wzrost zachorowalności ludzi i zwierząt oraz zaburzenia rozrodczości, występujące szczególnie w okręgach uprzemysłowionych, wynikają z wpływu skażenia środowiska pierwiastkami metali ciężkich oraz grupą związków chloroorganicznych, do których należą dioksyny (TCDD).

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksyna jest najbardziej toksyczną z liczącej ponad 200 izomerów dibenzodioksyn, do których zaliczamy także polichlorowane bifenyle (PCB) wykazujące równie szkodliwe działanie.

Główną drogą wnikania dioksyn do organizmu zwierząt i ludzi jest droga pokarmowa przez produkty pochodzenia zwierzęcego o dużej zawartości tłuszczu. Stwierdzono, że szczególnie duże ilości dioksyn są kumulowane w tkance tłuszczowej zwierząt zajmujących ostatnie ogniwo w łańcuchu pokarmowym, mimo że środowisko ich życia nie jest szczególnie narażone na skażenie. Dowodem na to jest stwierdzenie znacznej ilości tych toksycznych substancji w mleku i tkan-

ce tłuszczowej Eskimosek, żyjących w nieuprzemysłowionym środowisku, odżywiających się natomiast dużymi ilościami mięsa i tłuszczu ryb oraz ssaków morskich.

Stwierdzono, że dioksyny skumulowane w tkance tłuszczowej u ludzi i zwierząt są eliminowane w zależności od długości życia i poziomu metabolizmu obciążonego nimi gatunku, np. u ludzi proces ten trwa około 9 lat (16). Usuwanie ich z organizmu zależy również od liczby atomów chloru występujących w kongenerach dioksynowych, co jest związane ze stopniem ich toksyczności. Znaczna ilość tych substancji jest usuwana z organizmu z mlekiem – w okresie laktacji (8, 9, 15), co przyczynia się do wielokrotnego (około 50-70 razy) przekroczenia dopuszczalnej ich dawki w przeliczeniu na masę ciała u niemowląt (13). U szczurów stwierdzono również, że okres laktacji sprzyja znacznej eliminacji dioksyn z ich organizmu (10). W latach 90. na terenach uprzemysłowionych stwierdzono wzrost bezpłodności i poronień, które

należy wiązać z zanieczyszczeniem środowiska naturalnego kongenerami dioksynowymi (7).

Celem badań była ocena przyczyn bezpłodności występującej u potomstwa obojga płci pochodzących od samic poddanych działaniu jednorazowej dawki 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksyny. Istotnym zagadnieniem było udowodnienie pośredniego, toksycznego działania TCDD na procesy oogenezy i spermatogenezy. Wcześniejsze opublikowane wyniki badań wykazują znaczący bezpośredni wpływ TCDD na rozrodność matek badanego potomstwa (2).

Materiał i metody

Badania wykonano na czteromiesięcznych samicach szczurów, o masie 180-200 g szczepu Buffalo. Zwierzęta losowo podzielono na dwie grupy po 6 zwierząt w każdej: K – kontrolną i D – obejmującą samice, którym podano podskórnie jednorazową dawkę TCDD rozpuszczoną w DMSO, w dawce 5 µg/kg m.c.

Po upływie trzech tygodni od momentu podania TCDD eksperyment przeprowadzono wg następującego schematu (ryc. 1). Grupę kontrolną samic i grupę samic po dawce dioksyny skojarzono losowo z samcami pochodzącymi z tej samej hodowli, które nie były obciążone działaniem TCDD. Otrzymane w ten sposób mioty – pokolenie F_1 – nazwano odpowiednio miotem kontrolnym (MK-1) i miotem dioksynowym (MD-1). Po okresie 30 dni od odsadzenia pierwszych miotów kontrolnych i doświadczalnych samice z grupy K i D skojarzono ponownie losowo z samcami, którym również nie podano TCDD. W ten sposób uzyskano drugi miot kontrolny MK-2 i dioksynowy MD-2. We wszystkich grupach przeprowadzano obserwacje dotyczące zdolności samic zajścia w ciążę oraz czasu porodu od momentu skojarzenia z samcem. Po osiągnięciu dojrzałości płciowej (4,5 miesiąca) szczury samce i samice pokolenia F_1 dwu miotów, pochodzących od samic dioksynowych (MD-1, MD-2), zostały skojarzone ze sobą, a następnie, wobec braku objawów ciąży, po upływie 6 tygodni, ze szczurami samcami i samicami z grupy kontrolnej. Po upływie 6 tygodni od skojarzenia i braku objawów ciąży samice i samce zostały poddane narkozie barbituranowej (pentobarbital 30 mg/kg m.c.), pobrano krew do oznaczeń estradiolu. Prze-

prowadzono również ocenę histopatologiczną jajników i jąder badanych zwierząt, w oparciu o metodę barwienia hematoksyliną i eozyną. Pobrane skrawki gonad utrwalano w 4% roztworze formaliny. Następnie płukano 24 godziny w wodzie i odwadniano w szeregu alkoholi o rosnącym stężeniu z 70% do stężenia absolutnego. Skrawki były prześwietlane w benzenie dwukrotnie po 15 minut, a następnie umieszczone w roztworze benzenu z parafiną na 0,5 godziny, po czym zatopiono je w parafinie. Bloczki parafinowe cięto na ultramikrotomie firmy Leica 2145 na grubość 8 µm, a następnie wykonywano standardowe barwienie hematoksyliną i eozyną.

Wyniki i omówienie

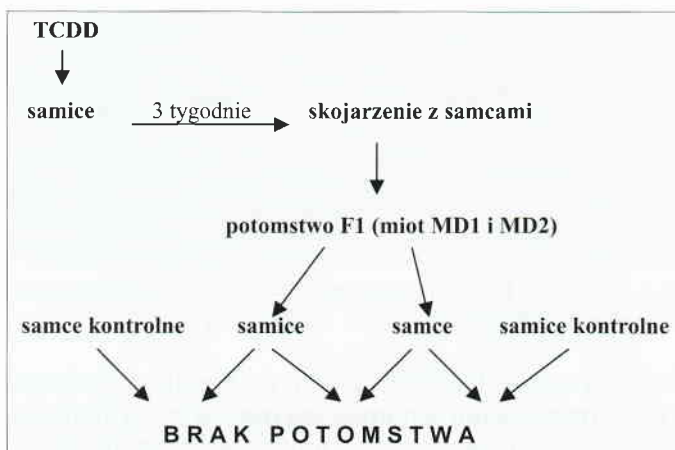
Samice i samce, od których pobrano badany materiał (jajniki i jądra), pochodziły od matek poddanych jednorazowej ekspozycji TCDD (pokolenie F_1).

W badaniach opublikowanych wcześniej (1), wykonanych na tej samej grupie zwierząt, analizowano wpływ bezpośredniego oddziaływania dioksyn (przez dawki obciążające organizmy matek) na liczebność, przeżywalność i żywotność potomstwa w pokoleniu F_1 (MD-1, MD-2). Po osiągnięciu dojrzałości płciowej pokolenia F_1 (samców i samic) badanej grupy, podjęto próbę kojarzenia ich.

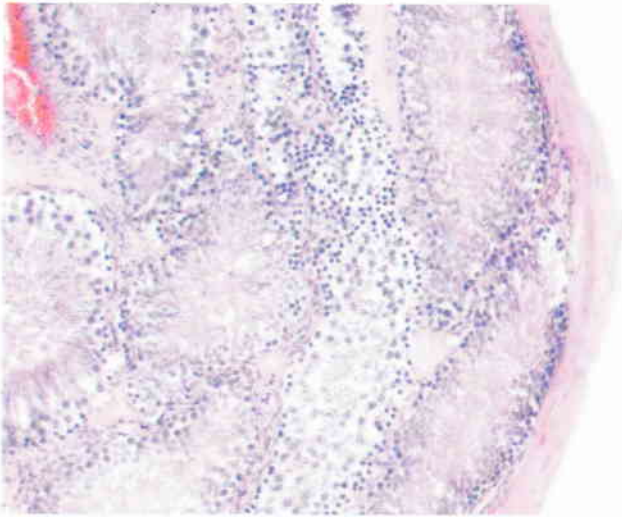
Po upływie 30 dni nie stwierdzono u żadnej z badanych samic ciąży. W następnym etapie kojarzono samice z pokolenia F_1 z samcami, które nie były pod wpływem działania TCDD, a pochodzącymi z tej samej hodowli, oraz samce z pokolenia F_1 ze zdrowymi samicami kontrolnymi. Po upływie 30 dni w obu obserwowanych grupach nie stwierdzono ciąży.

Dalszym etapem, po ocenie biologicznej rozrodności, była ocena histopatologiczna gonad osobników pokolenia F_1 . Przeprowadzone badanie histopatologiczne jajników wykazuje znaczące różnice w odniesieniu do obrazu jajników grupy kontrolnej. W otrzymanych preparatach stwierdzono nieliczne oogonia lub ich kompletny brak pod błoną białawą jajnika, bardzo nieliczne formy rozwojowe pęcherzyków pierwotnych wzrastających i dojrzewających, jak również, co jest bardzo istotne, obecność (w czterech przypadkach) dużego, przerosłego ciała żółtego (ryc. 2, 3, 4). Ocena histopatologiczna jąder szczurów pokolenia F_1 wykazywała uszkodzenie błony własnej kanalików nasiennych, brak prawidłowego ułożenia komórek plemnikotwórczych w odpowiednich pokładach, zmienione kształty kanalików krętych (ryc. 5, 6). Ponadto zaobserwowano zaburzenie cykli rozwojowych nabłonka plemnikotwórczego, brak poszczególnych form rozwojowych – spermatocytów I i II rzędu, oraz obecność pustych, bezjądrzastych komórek charakterystycznych dla procesów apoptozy (ryc. 6, 7).

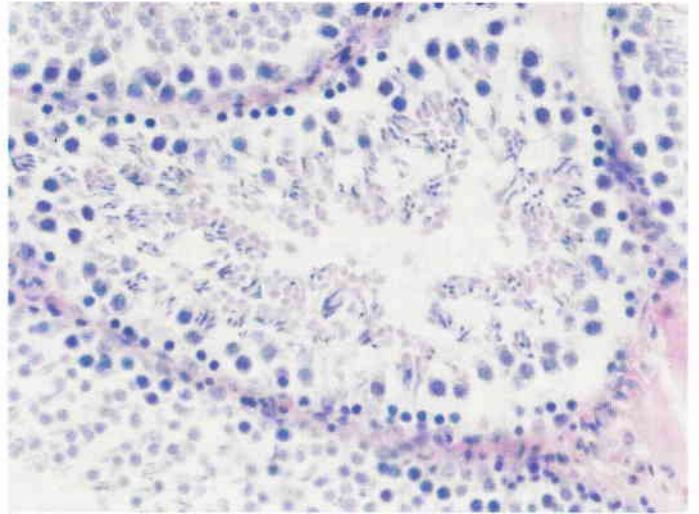
Przedstawione zmiany histopatologiczne jajników samic pokolenia F_1 potwierdzają brak zdolności rozrodczych tych osobników. Występujące zmiany morfologiczne struktury jajnika należy wiązać z oddziaływaniem dioksyn (podanych 3 tygodnie wcześniej przed



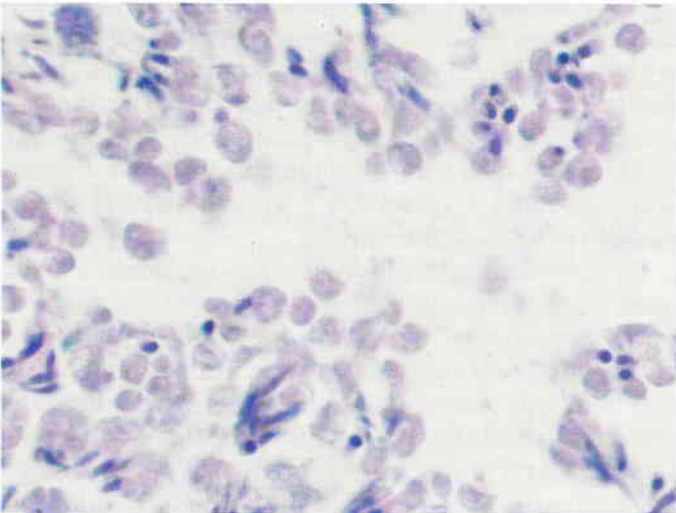
Ryc. 1. Schemat doświadczenia



Ryc. 2. Jajnik – przerosłe ciało żółte. Pow. $\times 40$



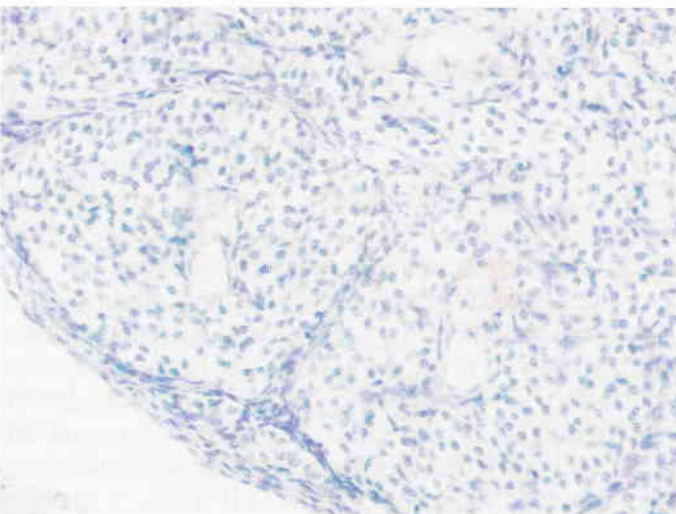
Ryc. 3. Jajnik – brak oogonii. Pow. $\times 100$



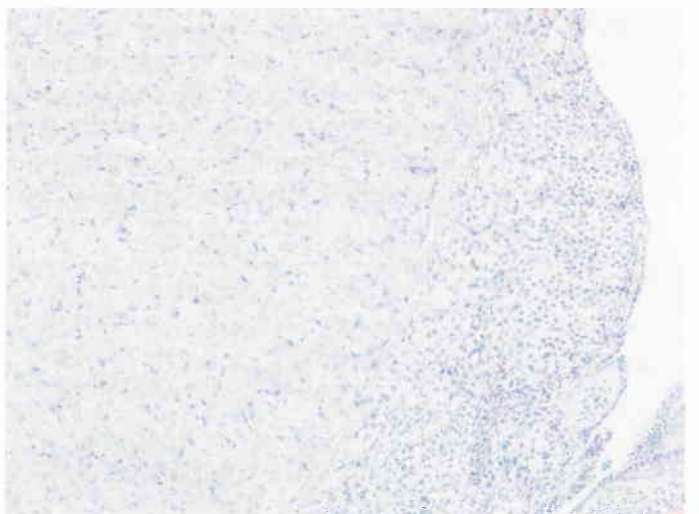
Ryc. 4. Jajnik – brak form rozwojowych pęcherzyków pierwotnych i wtórnych. Pow. $\times 200$



Ryc. 5. Jądro – uszkodzenie błony własnej kanalików nasennych. Pow. $\times 100$



Ryc. 6. Jądro – nieprawidłowo ułożone komórki nabłonka plemnikotwórczego. Pow. $\times 200$



Ryc. 7. Jądro – liczne bezjądrzaste komórki w świetle kanalików plemnikotwórczych. Pow. $\times 600$

ciążą), zawartych w organizmach matek. Substancje te wpłynęły znacząco na rozwój ciąży i kształtowanie się jajników potomstwa – potwierdza to znikoma ilość lub brak oogonii w jajnikach samic pokolenia F_1 . Obec-

ność przerosłych ciałek żółtych powoduje zaburzenie cyklu rozrodczego. Przerost ten można by było tłumaczyć obserwowanym przez innych autorów (4-6) obniżeniem wydzielania progesteronu pod wpływem

TCDD. Niedobór progesteronu prowadzi do czynnościowego przerostu ciała żółtego. Niski poziom progesteronu powoduje również niemożność implantacji zarodka i jego utrzymania, co prowadzi do poronień we wczesnej fazie ciąży. Powstałe zaburzenia związane są również z funkcjonalnym (przez aryl hydrocarbon receptor-AhR) działaniem dioksyn (14), które dostały się do badanych szczurów od matek przez łożysko, jak również z ich mlekiem (1).

Dioksyny tworzą kompleks z receptorem AhR, który działa supresyjnie na geny odpowiedzialne za syntezę receptorów estrogenowych, przez co zmniejsza się ich liczba. Badania *in vitro*, dotyczące wpływu TCDD na syntezę progesteronu i estradiolu przez komórki luteinowe warstwy ziarnistej, wykazały zmienność obserwacji przez różnych badaczy (3, 11, 12). Wiadomo również, że TCDD posiada właściwość obniżania produkcji estradiolu przez komórki warstwy ziarnistej jajnika (4, 7, 8). Inni autorzy (1, 11) po jednorazowym podaniu TCDD w dawce zbliżonej do zastosowanej w badaniach własnych zaobserwowali zakłócenie gospodarki estrogenowej, cechujące się wydłużeniem stadium *diestrus* i hamowaniem owulacji. Również wcześniejsze badania własne (2), wykonane na matkach analizowanego pokolenia F₁, wskazywały na deficyt estrogenowy. Ocena histopatologiczna jajników u części samic pokolenia F₁ wykazywała obecność przerosniętego ciała żółtego, które może być przyczyną bloku progesteronowego, stanowiącego istotną przyczynę bezpłodności.

Istotnym również czynnikiem, warunkującym bezpłodność drugiego pokolenia, jest brak lub znikoma ilość oocytów. Zróżnicowane, szkodliwe oddziaływanie dioksyn na komórki jajników spowodowały całkowitą bezpłodność samic pokolenia F₁. Wyniki uzyskane u samic pokolenia F₁ – poddanych pośredniemu działaniu dioksyn, wykazują bardziej nasilone oddziaływanie negatywne tych związków w porównaniu z ich matkami zachowującymi jednak ograniczone zdolności rozrodcze (2).

Obserwowane zmiany histopatologiczne jąder pod wpływem dioksyn związane są ze znacznym zakłóceniem spermatogenezy oraz występowaniem morfologicznych uszkodzeń w jądrach (zmiany destrukcyjne w kanalikach nasiennych). Ważnym elementem zaobserwowanym w badaniach przeprowadzonych u szczurów pokolenia F₁ jest obecność bezjądrzastych komórek, których nie zaobserwowali inni badacze (8). Powyższe wyniki oceny wpływu TCDD na gonady samców wykazują, że dioksyny, które dostały się do ich organizmu w okresie płodowym i wczesnonorodkowym (przez mleko matki), oprócz działania uszkadzającego struktury jądra, wykazują dłuższe działanie biologiczne, oddziałujące na procesy spermatogenezy u osobników dojrzałych. Tym należałoby tłumaczyć brak pozytywnych efektów kojarzenia samców pokolenia F₁ ze zdrowymi samicami kontrolnymi.

Podsumowanie

Dioksyny działają pośrednio na potomstwo matek, które poddano działaniu tego związku. Przejawia się to zmniejszeniem liczby oocytów w jajnikach lub ich brakiem, nielicznymi formami dojrzewających pęcherzyków Graffa, zahamowaniem spermatogenezy i występowaniem destrukcyjnych zmian w jądrach.

Piśmiennictwo

1. Brinbaum L. S.: Developmental effects of dioxins and related endocrine disrupting chemicals. *Toxicol. Lett.* 1995, 82, 743-750.
2. Calkosiński I., Borodulin-Nadzieja L., Stańda M., Wasilewska U., Cegielski M.: Wpływ jednorazowej dawki TCDD na poziom estrogenów i reprodukcję u szczurów. *Medycyna Wet.* 2003, 59, 536-538.
3. Enan E., Moran F., Vandervoort C. A., Steward D. R., Overstreet J. W., Lasley B. L.: Mechanism of toxic action of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-dioxin (TCDD) in cultured human luteinized granulosa cells. *Toxicol.* 1996, 10, 483-497.
4. Gregoraszcuk E. L., Zabiłny E., Piekło R., Grochowalski A., Wójtowicz A., Mika R.: Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on luteal cell function. Tissue culture approach. *Organohalogen Compounds* 1999, 42, 67-71.
5. Gregoraszcuk E. L., Zabiłny E., Ochwat D.: Aryl hydrocarbon receptor (AhR) – linked inhibition of luteal cell progesterone secretion in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin treated cells. *J. Physiol. Pharm.* 2001, 52, 2, 303-311.
6. Gregoraszcuk E. L., Wójtowicz A. K., Zabiłny E., Grochowalski A.: Dose- and time dependent effect of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on progesterone secretion by porcine luteal cells cultured in vitro. *J. Physiol. Pharm.* 2000, 51, 127-135.
7. Grochowalski A.: Dioksyny. *Mat. Międzynarod. Konf. Dioksyny w Przemysle i Środowisku – Kraków 2001*, s. 1-38.
8. Heimler I., Trewin A. L., Chaffin C. L., Rawlins R. G., Hutz R. J.: Modulation of ovarian follicle maturation and effects on apoptotic cell death in Holtzman rats exposed to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in utero and lactationally. *Reprod. Toxicol.* 1998, 12, 69-73.
9. Koopman-Esseboom C., Huisman M., Weisglas-Kuperus N., Boersma E. R., de Ridder M. A., Van der Paauw C. G., Tuinstra L. G.: Dioxin and PCB levels in blood and human milk in relation to living areas in The Netherlands. *Chemosphere* 1994, 29, 2327-2337.
10. Korte M., Stahlman R., Neubert D.: Induction of hepatic monooxygenases in female rats and offspring in correlation with TCDD tissue concentration offer single treatment during pregnancy. *Chemosphere* 1990, 20, 1193-1195.
11. Li X., Johanson D. C., Rozman K. K.: Effects of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on estrous cyclicity and ovulation in female Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Lett.* 1995, 78, 219-222.
12. Moran F., Enan E., Vandervoort C. A., Steward D. R., Conley A. J., Overstreet J. W., Lasley B. L.: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) modulates function of human luteinizing granulosa cells in vitro. *Society for The Study of Reproduction*, Portland, OR 1997, (Suppl 1) 56 (Abstract).
13. Patandin S.: Dietary exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins from infancy until adulthood: Comparison between breast-feeding and longterm exposure. *Env. Health Prospect.* 1999, 107, 45-51.
14. Piskorska-Pliszczynska J.: Dioksyny i związane z nimi zagrożenia zdrowia. *Medycyna Wet.* 1999, 55, 491-496.
15. Plum H. J., Koppe J. G., Olie K., V.d. Slikke J. W., Kok J. H., Vulsma T., Van Tijn D., De Vijlder J. J.: Effects of dioxins on thyroid function in newborn babies. *Lancet* 1992, 339, 1303-1304.
16. Schlatter C.: Data on kinetics of PCDDs and PCDFs as a prerequisite from human assessment, [w:] *Biological basis for risk assessment of dioxins and related compounds (Banbury Report 15)* Red.: Gallo M. A., Scheuplein R. J., Van der Heijden K. A., CSH Press, Banbury 1991.

Adres autora: dr Ireneusz Calkosiński, ul. Brzozowa 40, 52-129 Wrocław; e-mail: mcalkosinska@xl.wp.pl