

Morfologia jąder i najądrzy szczurów w przebiegu doświadczalnej inwazji motylicy wątrobowej

LIDIA KOŁODZIEJCZYK, BARBARA WISZNIEWSKA*

Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Medycznej, *Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Pomorskiej Akademii Medycznej, al. Powstańców Wielkopolskich 72, 70-111 Szczecin

Kołodziejczyk L., Wiszniewska B.

Morphology of testes and epididymides of rats in the course of experimental infection with liver fluke

Summary

The aim of the study was to examine the influence of liver fluke infection (*Fasciola hepatica*) on the morphology of the testes and epididymides of rats. The study was performed on male Wistar rats, aged 5 weeks at the beginning of the experiment and exposed to a dose of 30 metacercariae of liver fluke. At 4, 7, 10, and 13 weeks post infection (wpi) the testes and epididymides of rats were fixed in Bouin's solution and paraffin sections were stained using the with PAS method. There were no morphological changes in the majority of the testes of the rats infected with liver fluke. However, multinuclear cells (giant cells) in the seminiferous epithelium of rat's testes (7 wpi) were sporadically observed. Sloughing cells were incidentally visible in the lumen of some seminiferous tubules of rats at 13 wpi. No morphological changes were detected in the epididymal epithelium over the course of fasciolosis. Nonetheless, it appeared that a decreased amount of spermatozoa were present in the lumen of caput and caudal epididymis at 13 wpi in the rats. The above-mentioned observations may be evidence for the efficacy of blood-testis and blood-epididymis barriers during the course of fasciolosis.

Keywords: fasciolosis, rat, testis

Zmiany patomorfologiczne w mięszu wątroby i przewodach żółciowych w przebiegu fasciozy opisano u różnych gatunków żywicieli, m.in.: myszy (6), królików (22), szczurów (21), bydła (13), owiec (17), kóz (14). Inwazja motylicy wątrobowej (*Fasciola hepatica*) wywołuje znaczące zaburzenia w metabolizmie wątroby żywiciela m.in. w postaci zmian aktywności enzymów oksydoredukcyjnych (7), rozkojarzenia fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach (16) czy osłabienia systemu detoksykacyjnego hepatocytów (10).

Znacznie mniej wiadomo o zmianach morfologicznych i zaburzeniach funkcjonalnych w następstwie fasciozy w innych narządach żywiciela, które również mogą mieć wpływ na kondycję zarażonych zwierząt. Zarażenie *F. hepatica* powoduje spadek ilości witaminy C nie tylko w wątrobie, ale i w korze nadnerczy (24), a także w śledzionie i nerkach (5). W wyniku zaburzeń czynnościowych wątroby w doświadczalnej fasciozie szczurów dochodzi do aktywacji mediatorów zapalnych, co modyfikuje transport jonów w nabłonku jelita grubego (8).

Nieliczne badania dotyczą potencjalnego wpływu inwazji motylicy wątrobowej na rozród żywicieli. Z jednej strony, stwierdzono u bydła i szczurów zależność między inwazją motylicy wątrobowej a funkcjonalną sprawnością układu płciowego (15), a u owiec występowanie częstszych poronień i niską wagę urodzeniową jagniąt (18). Z drugiej strony, nie wykazano

jednak istotnych różnic w stężeniu testosteronu we krwi obwodowej u baranów zarażonych motylką w porównaniu z kontrolnymi (4). Brak jest danych w piśmiennictwie na temat wpływu inwazji motylicy wątrobowej na morfologię narządów męskiego układu płciowego.

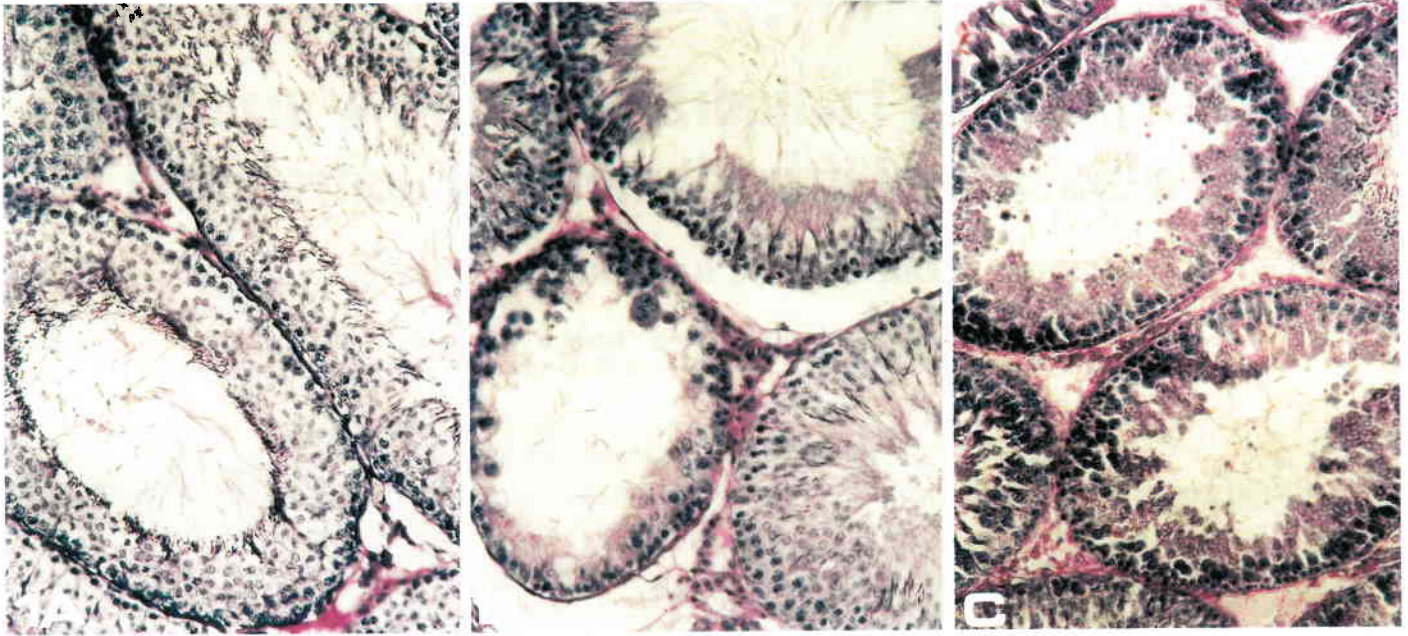
W związku z powyższym celem badań było ustalenie, czy fascioza może prowadzić do zmian morfologicznych jąder i najądrzy szczurów.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 40 samcach szczurów szczepu Wistar w wieku 5 tygodni, w chwili rozpoczęcia doświadczenia.

Postaci dojrzałe motylicy pobrano z przewodów żółciowych wątrób naturalnie zarażonego bydła z zakładów mięsnych. Miracydiów, otrzymanych w wyniku inkubacji jaj *F. hepatica*, użyto do zarażenia ślimaków *Lymnaea truncatula*. Z prowadzonej hodowli zarażonych ślimaków (20) uzyskano metacerkarie użyte w doświadczeniu. Ocenę żywotności metacerkarii przeprowadzono na podstawie stwierdzenia obecności wydzielniczych granул przy użyciu mikroskopu świetlnego (3).

Szczury zarażono *per os* dawką 30 metacerkarii *F. hepatica* przy użyciu sondy dożołądkowej. Grupę kontrolną stanowiły szczury nie zarażone pasożytami. Zwierzęta przechowywano w standardowych warunkach laboratoryjnych, w cyklu światło/mrok 12 h/12 h. Szczury otrzymywały standardową paszę granulowaną i wodę *ad libitum*. W 4., 7.,



Ryc. 1. Przekrój poprzeczny przez kanaliki kręte jądra szczura z grupy kontrolnej oraz szczurów zarażonych motylicą wątrobową. Nabłonek plemnikotwórczy ze wszystkimi generacjami komórek gametogenicznych w jądrze szczura z grupy kontrolnej (A). Regresja nabłonka plemnikotwórczego z widoczną komórką olbrzymią w jądrze szczura w 7 tpz (B) oraz kanaliki z nieznaczną ilością zluszczonych komórek plemnikotwórczych w jądrze szczura w 13 tpz (C). PAS; A, B, C $\times 320$

10. i 13. tygodniu po zarażeniu (tpz) szczury usypiano przy użyciu ketaminy. Do badań pobierano jądra i najądrza, które utrwalano w płynie Bouina, a seryjne skrawki parafinowe barwiono metodą PAS (1).

Na przeprowadzenie badań otrzymano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach (nr 18/02. z 12.03.2002).

Wyniki i omówienie

W 7 tpz u sekcjonowanych szczurów stwierdzono zarówno obecność młodocianych motylic w mięszu wątroby, jak i dojrzałe płciowo osobniki w wyprowadzającym przewodzie żółciowym. W 10 tpz w przewodzie żółciowym szczurów wykrywano przeciętnie 10 dojrzałych płciowo przywr.

W jądrach szczurów w okresie prepatentnym (4 tpz) oraz patentnym fascjolozy (7, 10 i 13 tpz) nie stwierdzono ewidentnych zmian morfologicznych w porównaniu z morfologią jąder zwierząt z grupy kontrolnej. W przekrojach poprzecznych kanalików, w nabłonku plemnikotwórczym obecne były wszystkie generacje komórek gametogenicznych w poszczególnych stadiach cyklu nabłonka plemnikotwórczego. Nie obserwowano też zmian w morfologii gruczołu śródmiąższowego tkanki interstycjalnej (ryc. 1A). W 7 tpz w nabłonku plemnikotwórczym kanalików jąder niektórych szczurów sporadycznie występowały wielojądrzaste komórki (komórki olbrzymie) (ryc. 1B). Formowanie komórek olbrzymich obserwuje się w nabłonku plemnikotwórczym zwierząt doświadczalnych eksponowanych na związki toksyczne, podawane w wysokich dawkach (12; 19). Zjawisko takie można zaobserwować często w warunkach fizjologicznych, jak i w starzejącej się gonadzie. Chociaż przyczyna powstawa-

nia tych komórek nie jest w pełni wyjaśniona, to można przypuszczać, że jest to jedna z dróg usuwania komórek germinalnych, uszkodzonych podczas spermatogenezy. Nie można więc autorytatywnie stwierdzić, że regresja nabłonka plemnikotwórczego obserwowana na przekroju poprzecznym jednego kanalika krętego wywołana została inwazją motylicy wątrobowej.

W świetle pojedynczych kanalików krętych jąder szczurów w okresie patentnym fascjolozy (13 tpz) obserwowano nieliczne zluszczone komórki plemnikotwórcze (ryc. 1C). Trudno wyjaśnić obecność niedojrzałych komórek gametogenicznych w świetle kanalików. Podczas przebiegu spermatogenezy wszystkie generacje komórek plemnikotwórczych połączone są z komórką Sertoliego specyficznymi połączeniami, tzw. specjalizacjami powierzchniowymi. Obecność zluszczonych komórek germinalnych w świetle kanalika świadczyć może o uszkodzeniu połączeń pomiędzy komórką Sertoliego a komórkami germinalnymi. Jedną z przyczyn rozluźnienia połączeń może być zachwianie równowagi hormonalnej. Można przypuszczać, że te zmiany morfologiczne dotyczące pojedynczych kanalików mogły być spowodowane właśnie zachwianiem lokalnej równowagi hormonalnej w następstwie zaburzeń czynnościowych wątroby obserwowanymi w fascjolozie szczurów (2).

U szczurów zarażonych motylicą nie obserwowano również zmian w morfologii nabłonka wyścielającego przewód najądrza. Wydaje się jednak, że w świetle głowy i ogona najądrzy szczurów w 13 tpz występowało mniej plemników (ryc. 2A i 2B). Dla potwierdzenia obniżenia zawartości plemników w najądrzu należałoby jednak policzyć ich koncentrację w nasieniu lub po ich wypłukaniu z ogona najądrza. Takie ba-

dania nie były przedmiotem niniejszej pracy. Niemniej, w przebiegu fasciozy była i szczurów stwierdzono upośledzenie funkcjonalnej sprawności układu płciowego (15). U buhajów zarażonych motylicą wątrobową obserwowano zmniejszenie liczby plemników w 1 ml, zwolnienie ruchu postępowego i osłabienie ruchliwości, natomiast u szczurów zarażonych w wieku 3 miesięcy, obniżenie płodności i plenności (15).

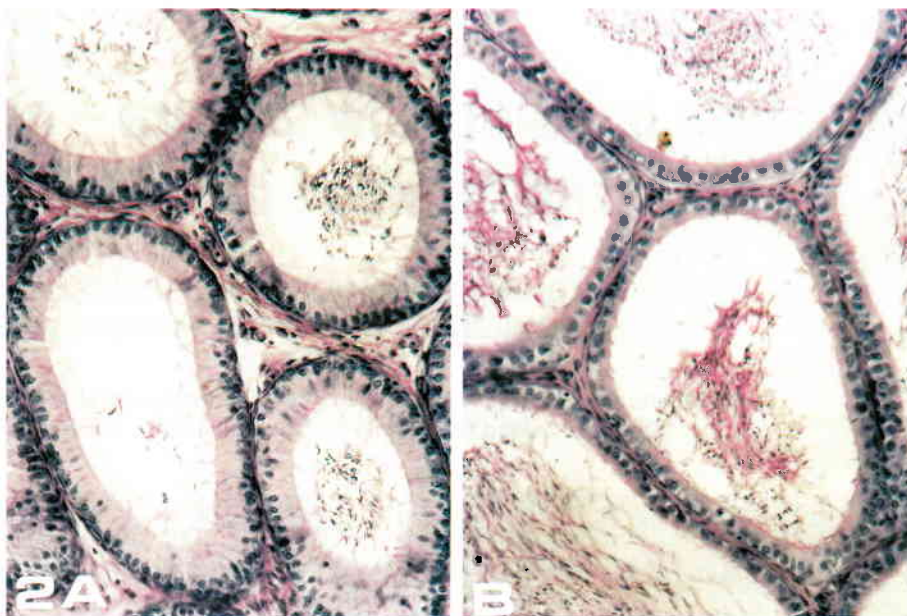
Brak ewidentnych zmian w morfologii jąder i najądrzy szczurów, które osiągnęły dojrzałość płciową w trakcie trwania doświadczenia można tłumaczyć efektywnością bariery krew–jądro i krew–najądrze. Ostateczne uformowanie bariery krew–jądro następuje bowiem jeszcze przed osiągnięciem dojrzałości płciowej. U szczura występuje między 16. a 19.

dniem życia postnatalnego. Wyspecjalizowane kompleksowe połączenia pomiędzy komórkami Sertoliego nabłonka plemnikotwórczego skutecznie zabezpieczają komórki germinalne w przedziale adluminalnym przed dostępem szkodliwych substancji krążących w krwi (9). Wykazano, że podany szczurom dootrzewnowo barwnik przyżyciowy Hoechst 33342 nie penetrował wnętrza przedziału adluminalnego, a jedynie był wykrywany w jądrach komórek tkanki interstycjalnej (11).

W barierze krew–najądrze największe znaczenie odgrywają strefy zamykające zlokalizowane na powierzchniach bocznych szczytowych części komórek nabłonkowych, wyścielających przewód. Uważa się, że strefa zamykająca w nabłonku najądrza należy do najlepiej funkcjonujących złączy, istniejących w tkankach ssaków. U szczura sieć ścisłych połączeń zaczyna wytwarzać się już w życiu prenatalnym (23). Pomimo że bariera krew–najądrze jest mniej efektywna niż bariera krew–jądro, to obecność stref zamykających w nabłonku najądrza decyduje, które substancje mogą być transportowane z krwi do światła przewodu.

Piśmiennictwo

1. Bancroft J. D., Gamble M.: Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone, London 2002, 75, 217.
2. Biro-Sauveur B., Eeckhoutte C., Sutra J. F., Calleja C., Alvinerie M., Gallier P.: Consequence of challenge infections with *Fasciola hepatica* on rat liver P450-dependent metabolism of sex hormones. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1994, 51, 209-217.
3. Boray J. C.: Experimental fascioliasis in Australia. *Adv. Parasitol.* 1969, 7, 95-210.
4. Fleming M. W., Fetterer R. H.: Peripheral androgen levels in peripuberal rams infected with *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 1986, 19, 295-299.
5. Gameel A. A.: Tissue ascorbic acid concentrations in rats experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Z. Parasitenkd.* 1982, 68, 181-184.
6. Kolodziejczyk L.: Study on glycogen content in the liver of mouse vs. pathomorphological changes in experimental fasciolosis. *Acta Parasitol.* 1994, 39, 211-216.



Ryc. 2. Przekrój poprzeczny przez głowę (A) i ogon (B) najądrza szczura w okresie patentnym fasciozy (13 tpz). W świetle przewodu widoczna zmniejszona liczba plemników. PAS; A, B $\times 320$

7. Kolodziejczyk L.: Histochemical studies on *Fasciola hepatica* in mice. II. Oxidoreductase activity in experimentally induced fasciolosis. *Acta Parasitol.* 1996, 41, 221-226.
8. Kosik Bogacka D. I., Kolodziejczyk L.: Ion transport in colon of rats experimentally infected with liver fluke (*Fasciola hepatica*). *Folia Biol. (Kraków)* 2004, 52, 243-246.
9. Laszczyńska M.: Budowa i funkcja bariery krew–jądro. *Postępy Androl.* 2002, 4, 95-106.
10. Maffei Facino R., Carini M., Genchi C., Tofanetti O., Casciarri I.: Participation of lipid peroxidation in the loss of hepatic drug-metabolizing activities in experimental fascioliasis in the rat. *Pharmacol. Res.* 1989, 21, 549-560.
11. Marchlewicz M., Wenda-Różewicka L., Wiszniewska B., Piasecka M., Świder-Al-Amawi M.: Permeability of blood-testis and blood-epididymis barriers to Hoechst 33342 dye. *Folia Histochem. Cytobiol.* 1999, 47, 85-86.
12. Narayana K., D'Souza U. J., Sanyal A. K., Rao K. P.: 5-Fluorouracil (5-FU) induces the formation of giant cells and sloughing of seminiferous epithelium in the rat testis. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 2000, 22, 317-322.
13. Rahko T.: The pathology of natural *Fasciola hepatica* infection in cattle. *Pathol. Vet.* 1969, 6, 244-256.
14. Rahko T.: Studies on the pathology of microcoeliasis and fascioliasis in the goat. I. The histopathology of the liver and bile ducts. *Acta Vet. Scand.* 1972, 13, 554-562.
15. Romaniuk K.: Poszukiwania zależności między przewlekłą fasciozą bydła i doświadczalną inwazją motylicy wątrobowej u szczurów a przebiegiem rozrodu tych zwierząt. *Zesz. nauk. ART Olszt., Weterynaria* 1977, 8, 3-48.
16. Rule C. J., Behm C. A., Bygrave F. L.: Aberrant energy-linked reactions in mitochondria isolated from the livers of rats infected with the liver fluke *Fasciola hepatica*. *Biochem. J.* 1989, 260, 517-523.
17. Rushton B., Murray M.: Hepatic pathology of a primary experimental infection of *Fasciola hepatica* in sheep. *J. Comp. Pathol.* 1977, 87, 459-470.
18. Sinclair K. B.: The pathogenicity of *Fasciola hepatica* in pregnant sheep. *Br. vet. J.* 1972, 128, 249-259.
19. Singh S. K., Chakravarty S.: Antispermatic and antifertility effects of 20, 25-diazacholesterol dihydrochloride in mice. *Reprod. Toxicol.* 2003, 17, 37-44.
20. Taylor E. L., Mozley A.: A culture method for *Lymnaea truncatula*. *Nature* 1948, 161, 894.
21. Thorpe E.: The pathology of experimental fascioliasis in the albino rat. *J. Comp. Pathol.* 1965, 75, 39-44.
22. Urquhart G. M.: The pathology of experimental fascioliasis in the rabbit. *J. Pathol. Bact.* 1956, 71, 301-310.
23. Wenda-Różewicka L.: Morfologia i funkcja bariery krew–najądrze. *Postępy Androl.* 2002, 4, 107-114.
24. Ziolo T.: Obserwacje histochemiczne nad rozmieszczeniem cholesterolu i witaminy C w korze nadnerczy owiec z marskością wątroby wywołaną motylicą wątrobową. *Medycyna Wet.* 1960, 16, 646-652.

Adres autora: dr Lidia Kolodziejczyk, al. Powstańców Wielkopolskich 72, 70-111 Szczecin; e-mail: lkol@sci.pam.szczecin.pl