

BADANIA MORFOMETRYCZNE I HISTOCHEMICZNE NAD WPŁYWEM ENDOKSANU NA PRZYSADKĘ MÓZGOWĄ I JĄDRO SZCZURA

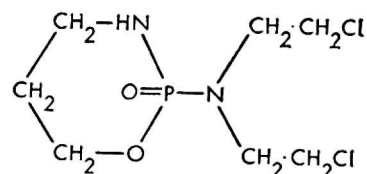
I. STAN HISTOFIZJOLOGICZNY JĄDRA U SZCZURÓW TRAKTOWANYCH ENDOKSANEM

Kazimierz Miętkiewski |, Piotr Fichna

Zakład Histologii i Embriologii Instytutu Biostruktury AM w Poznaniu
Kierownik Zakładu: doc. dr hab. Andrzej Łukaszuk

Endoksan (cyklofosfamid) należy do grupy cytostatyków alkilujących (rys. 1). Powoduje on obniżenie indeksu mitotycznego w populacjach komórek intensywnie dzielących się, np. nowotworowych [7, 10]. Wyniki histoautografii ^3H -endoksanu wskazują, że po 6-12 godzinach największe nasilenie aktywności promieniotwórczej ma miejsce, między innymi, w kanalikach plemnikotwórczych [3].

Rys. 1. Wzór chemiczny endoksanu: ester dwuamido-
wy kwasu N,N-bis/chloretylo/-N-propyleno-fosforo-
wego



Z dotychczasowych badań nad funkcją jąder gryzoni traktowanych cyklofosfamidem wynika, że spermatogenezę uszkadzają duże jego dawki (40-200 mg/kg), a zmiany przez nie wywołane są odwracalne [1, 6, 11, 12]. W wypadku stosowania mniejszych dawek (16 mg/kg przez 21 dni) stwierdzono zmiany degeneracyjne w kanalikach jądra i odchylenia aktywności enzymów oksydo-redukcyjnych w komórkach Leydiga [6]. Również wyniki badań własnych sugerują wpływ endoksanu na gruczoł śródmiąższowy jądra [9]. Podawanie cyklofosfamidu w dawce dziennej 4 mg/kg przez 10 dni nie wywołało uszkodzenia ani miąższu jądra, ani tkanki interstycjalnej [2].

Celem niniejszej pracy jest prześledzenie wpływu endoksanu na stan histofizjologiczny jądra szczura. Długie okresy wprowadzania cytostatyku zostały wybrane celem rozpoznania wrażliwych etapów spermatogenezy.

MATERIAŁ I METODY

Duża wrażliwość szczurów na endoksan [4, 13] wymagała ustalenia jego dawki zapewniającej przeżycie zwierząt przez żądany okres. Ostatecznie wykonano dwie serie doświadczeń.

W serii pierwszej szczurom (po 5 zwierząt w każdej grupie) wstrzykiwano codziennie po:

I — 4 mg/kg cyklofosfamidu * przez 12 dni,

II — 4 mg/kg przez 24 dni,

III — 4 mg/kg przez okres 44 dni.

Po 2 zwierzęta z IV grupy, otrzymujące fizjologiczny roztwór NaCl, uśmiercano równocześnie ze szczurami eksperymentalnymi.

Ciężar ciała oraz jąder i pęcherzyków nasiennych oceniano statystycznie. Skrawki jąder barwiono H+E (utrwalacze Bouin i Helly) oraz przeprowadzano w nich odczyny histochemiczne: PAS, na fosfatazę kwaśną, fosfatazę zasadową, nieswoiste esterazy i dehydrogenazę α -glicerofosforanową.

W drugiej serii doświadczeń zwierzęta podzielono na cztery grupy (po 6 szczurów w każdej), które były traktowane w następujący sposób:

A — grupa kontrolna,

B — podawano 4 mg/kg endoksanu codziennie, przez 24 dni,

C — 3 mg testosteroni propionici (Polfa) dziennie, przez 24 dni,

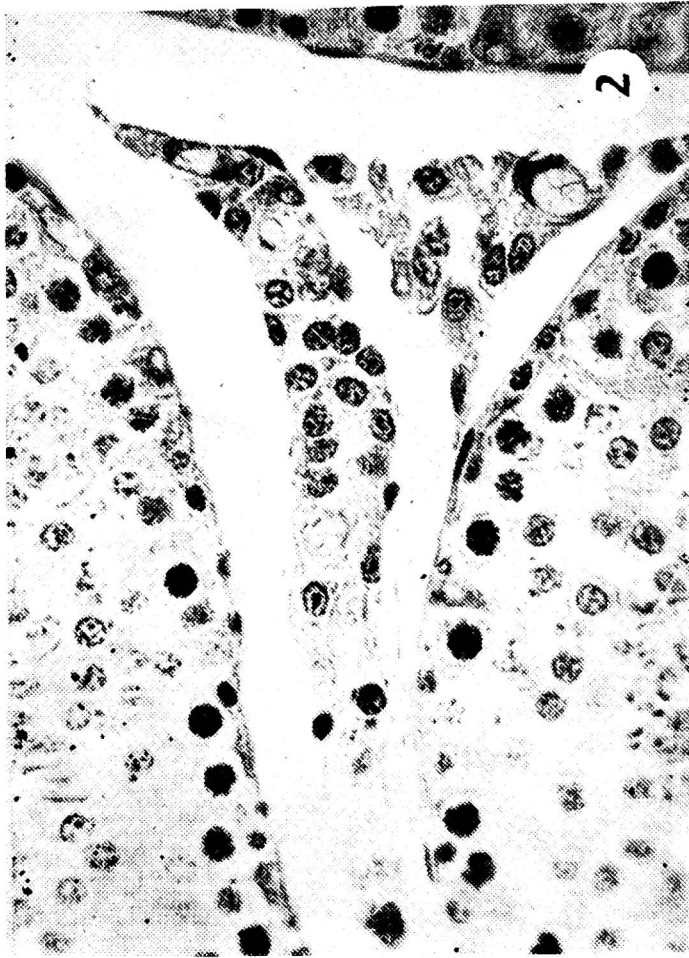
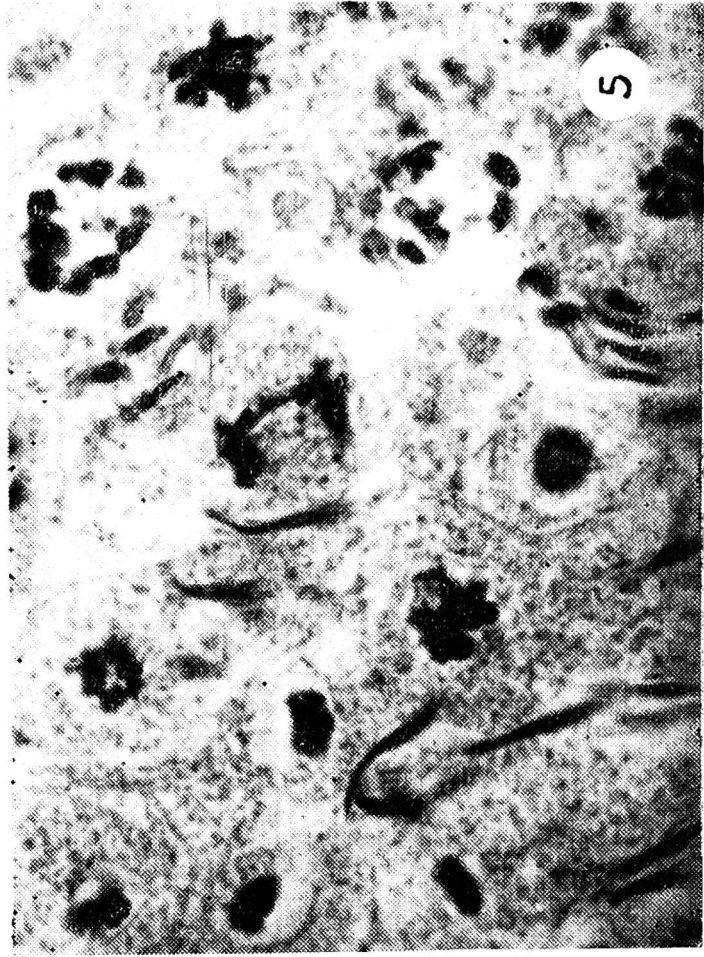
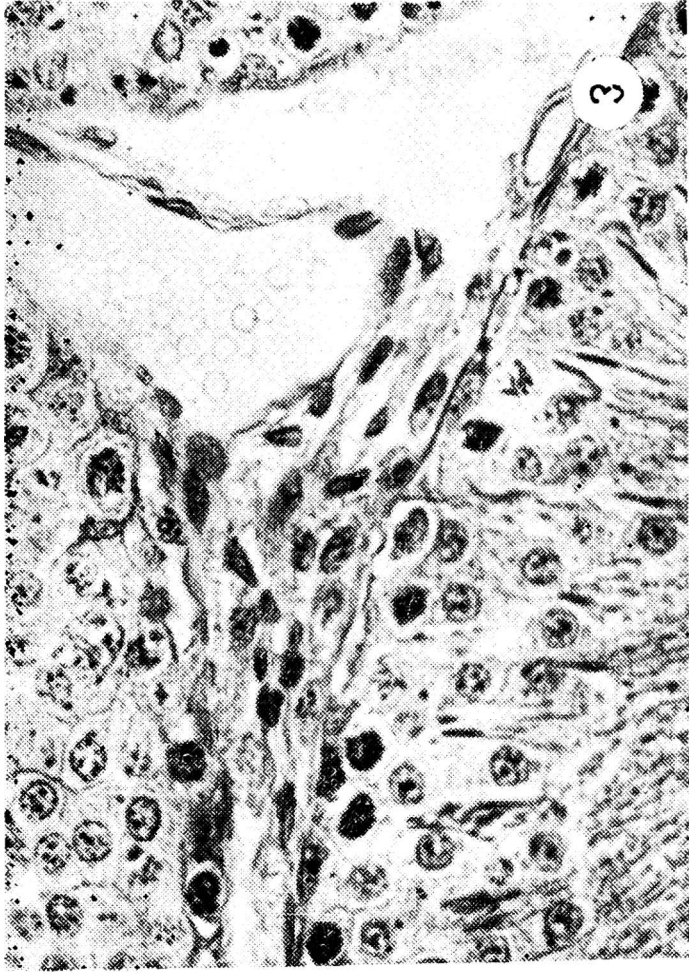
D — endoksan oraz testosteron podawane łącznie (dawkowanie, jak w grupach B i C) przez 24 dni.

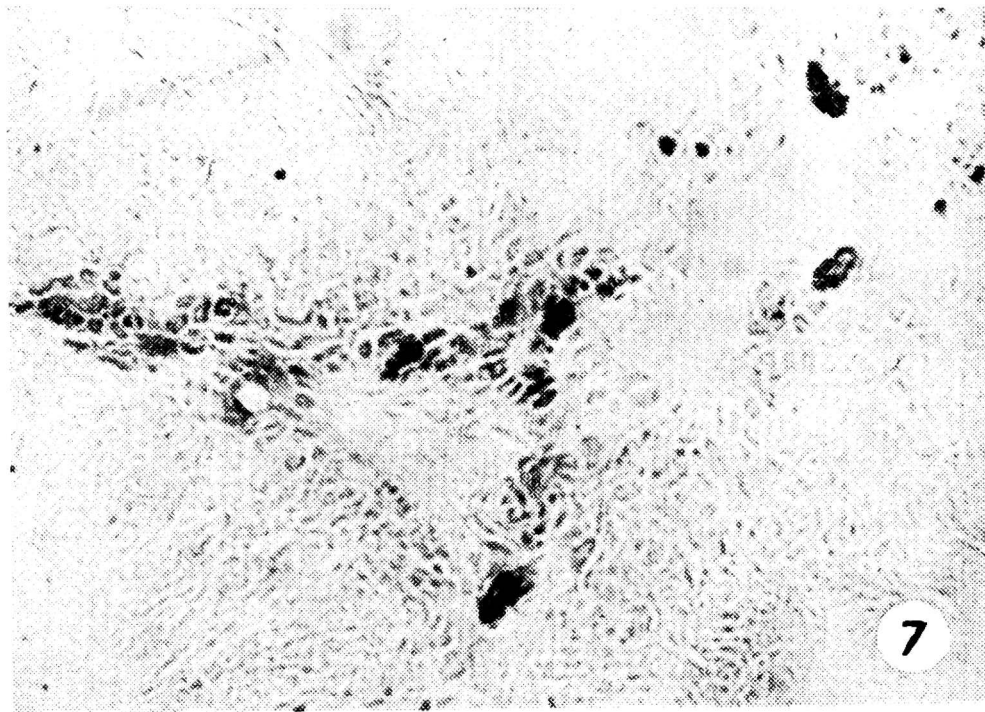
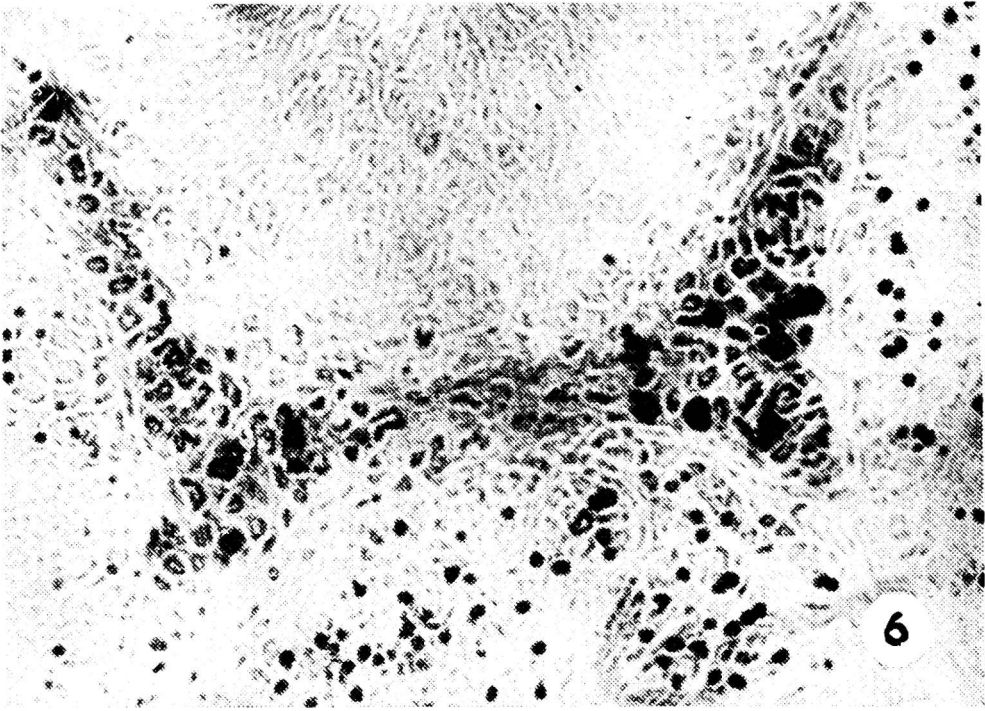
U zwierząt z drugiej serii doświadczeń oceniano statystycznie ciężary ciała, jąder i pęcherzyków nasiennych.

WYNIKI

W obu seriach doświadczeń stan ogólny zwierząt był dobry. Pojedyncze szczury, wykazujące ogólne objawy nietolerancji cytostatyku, zostały wyłączone z dalszych badań. Średni ciężar zwierząt z grup eksperymentalnych, otrzymujących endoksan, nie ulegał zmianom, podczas gdy grupy kontrolne i zwierzęta otrzymujące jedynie testosteron wykazały jego przyrost. Względny ciężar jąder we wszystkich grupach nie zmieniał się. W pierwszej serii doświadczeń zaznaczyło się obniżenie względnego ciężaru pęcherzyków nasiennych u szczurów eksperymentalnych (tab. 1), natomiast w drugiej serii badań różnice te pomiędzy grupą kontrolną a traktowaną wyłącznie endoksanem były nieznamiennie statystycznie (tab. 2). W drugiej serii doświadczeń zaobserwowano charak-

* W doświadczeniach stosowano Endoxan-Asta firmy ASTA — WERKE AG.





Rys. 2. Gruczoł śródmiażdżowy jądra szczura z grupy porównawczej; H+E, pow. ok. 400×

Rys. 3. Transformacja komórek Leydiga w kierunku elementów fibroblastopodobnych w jądrze szczura otrzymującego endoksan przez 44 dni; H+E, pow. ok. 400×

Rys. 4. Gonada męska szczura otrzymującego endoksan przez 44 dni. Brak generacji pachytenów stadium VII — kanalik w górnej części zdjęcia. Braki pachytenów również w pozostałych kanalikach; H+E, pow. ok. 400×

Rys. 5. Anafaza z nierozłączonymi chromosomami w nabłonku plemnikotwórczym szczura traktowanego endoksanem przez 24 dni; H+E, pow. ok. 900×

Rys. 6. Odczyn na aktywność fosfatazy kwaśnej w licznych komórkach Leydiga, w jądrze szczura z grupy porównawczej (Gomori); pow. ok. 200×

Rys. 7. Odczyn na aktywność fosfatazy kwaśnej w jądrze szczura otrzymującego endoksan przez 44 dni (Gomori); pow. ok. 200×

Tabela 1

| Grupa Group | Względny ciężar ^a Relative seminal vesicles weight |
|----------------|--|
| I | 242 ± 27 |
| II | 149 ± 10** |
| III | 163 ± 16* |
| IV | 361 ± 53 |

^a Względny ciężar pęcherzyków nasiennych podano jako wartość średnią wyrażoną w mg/100 g ciężaru ciała ± średni błąd standardowy. Różnice statystycznie znaczne (ocena testem t Studenta), przy porównaniu z grupą IV—kontrolną, zaznaczono gwiazdkami: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Tabela 2

| Grupa Group | Względny ciężar ^a Relative seminal vesicles weight |
|----------------|--|
| A | 420 ± 36 |
| B | 325 ± 43 |
| C | 1141 ± 83** |
| D | 1127 ± 87** |

^a Względny ciężar pęcherzyków nasiennych podano jako wartość średnią wyrażoną w mg/100 g ciężaru ciała ± średni błąd standardowy. Różnice statystycznie znaczne (ocena testem t Studenta) przy porównywaniu z grupą A — kontrolną zaznaczono gwiazdkami: ** $p < 0,01$.

terystyczny wzrost ciężaru pęcherzyków nasiennych u zwierząt otrzymujących testosteron, przy czym nie stwierdzono wpływu endoksanu na reaktywność wspomnianego narządu na wprowadzany androgen.

Wpływ cytostatyku na tkankę interstycjalną przejawiał się głównie transformacją komórek Leydiga w kierunku elementów fibroblastopodobnych (rys. 2 i 3), zmniejszeniem ich liczby i pojedynczymi zmianami degeneracyjnymi. Zjawiska te obserwowano głównie w grupach II i III, natomiast prawie nie występowały w grupie I. U wszystkich szczurów tej serii doświadczałnej w tkance śródmiąższowej jądra zauważano przesieki. W porównaniu z kontrolą w świetle kanalików plemnikotwórczych zwierząt eksperymentalnych częściej spotykano złuszczone spermatocyty i spermatydy wczesnych stopni rozwojowych (niekiedy z oznakami kariolizy).

W grupie III wykazano braki generacji spermatocytów pierwszego rzędu stadium leptotenowego, zygotenowego lub pachytenowego, występujące tylko w niektórych polach na przekroju kanalików. Stadium 7 cyklu nabłonka plemnikotwórczego było tym, w którym obserwowano brak najstarszej generacji spermatocytów, tj. pachytenów (rys. 4). Zja-

wiska te występowały również w grupie II, jednak braki generacji komórek sięgały tam tylko do stadium 5 pachytenów.

U wszystkich zwierząt z grup I-III w nabłonku plemnikotwórczym widywano nieprawidłowości w przebiegu meta- i anafazy pierwszego podziału mejotycznego. Manifestowały się one niesymetrycznym ustawieniem chromosomów lub nierozłączaniem się chromosomów homologicznych (rys. 5). W doświadczeniu często spotykano podziały patologiczne, charakteryzujące się ciemnym wejrzeniem cytoplazmy i umiejscowieniem w nietypowych stadiach cyklu.

Odczyny histochemiczne na aktywność fosfatazy zasadowej oraz dehydrogenazy α -glicerofosforanowej nie uwidoczniły istotnych różnic między zwierzętami doświadczalnymi a porównawczymi. W komórkach Leydiga grup II i III nastąpiło osłabienie aktywności fosfatazy kwaśnej (rys. 6 i 7). Nieswoiste esterazy wykazywały silniejszy odczyn w tkance śródmiąższowej grup II i III niż I lub IV.

OMÓWIENIE I DYSKUSJA

Zmiany zaobserwowane w nabłonku plemnikotwórczym są zgodne z wynikami uzyskanymi przez Hilschera [5], dotyczącymi szczególnej wrażliwości spermatogonii i spermatocytów na cyklofosfamid. Stwierdzone braki niektórych generacji komórek pozwalają w oparciu o analizę czasu trwania poszczególnych stadiów spermatogenezy [8] wyznaczyć moment efektywnego zadziałania na nie cytostatyku. Na podstawie tych rozważań przyjąć należy, że dzienna dawka endoksanu 4 mg/kg hamuje różnicowanie spermatogonii w kierunku spermatocytów dopiero po 12 dniach jego podawania.

Wyraźny spadek ciężaru pęcherzyków nasiennych u szczurów I serii doświadczeń sugeruje, że zostało zmniejszone wydzielanie testosteronu przez komórki Leydiga, z czym nie spotykaliśmy się w dostępnym nam piśmiennictwie. Powyższa hipoteza zgodna jest z obrazem histologicznym gruczołu śródmiąższowego jądra i nabłonka pęcherzyków nasiennych. Również osłabienie aktywności kwaśnej fosfatazy w tkance interstycjalnej zdaje się potwierdzać ten pogląd. Wzmożenie odczynu nieswoistych esteraz można by w tych warunkach tłumaczyć wpływem gonadotropin na komórki Leydiga [14], przy czym brak spodziewanego przerostu gruczołu śródmiąższowego mógł być spowodowany cytostatycznym działaniem endoksanu. Jednakże wyniki pomiarów ciężaru pęcherzyków nasiennych w drugiej serii doświadczeń zmuszają do rezerwy w ocenie powyższej hipotezy i potwierdzają znaczną indywidualność reakcji szczurów na wprowadzany cytostatyk. Natomiast brak hamującego wpływu cyklofosfamidu na przerost pęcherzyków u szczurów traktowanych tes-

tosteronem zdaje się wykluczać interpretację wyniku pierwszej serii badań jako bezpośrednie oddziaływanie cytostatyku na pęcherzyki nasienne.

Należy więc sądzić, że endoksan, w zależności od dawki i czasu wprowadzania, zaburza czynność części gametogenicznej, jak i zapewne dokrewnej jądra.

PIŚMIENNICTWO

1. Brittinger D.: Humangenetik, 3, 156, 1966.
2. Doepfmer R., Schuler W.: Arzneimittelforsch., 16, 1533, 1966.
3. Gerhards H., Graul E.: Arzneimittelforsch., 20, 601, 1970.
4. Hayakawa T., Yamada R., Kanai N.: Br. J. Cancer., 24, 489, 1970.
5. Hilscher W.: Morph. Aspects Androl. 1, 17, 1970.
6. Jungck E.: Acta Histochem., 28, 134, 1967.
7. Klein H., Lennartz K., Habicht W., Eder M., Gross R.: Klin. Wschr., 48, 1001, 1970.
8. Leblond C. P., Steinberger E., Roosen-Runge E. C.: Spermatogenesis (In:) C. G. Hartmann: Mechanisms Concerned With Conception, Pergamon Press, 1963.
9. Miętkiewski K., Fichna P.: Folia Morph. (Warsz.), 4, 445, 1973.
10. Palme G., Liss E., Oeff K.: Internationaler Kongress Für Chemotherapie, Wien, Verh. II. 183, 1967.
11. Röhrborn G., Vogel F.: Dt. med. Wschr., 92, 2315, 1967.
12. Schleiermacher E., Schroeder T., Adler I., Vrba M., Vogel F.: Dt. med. Wschr., 92, 2343, 1967.
13. Tipton J.: Surg. Forum, 15, 344, 1964.
14. Verne J., Herbert S.: Folia histoch., 2, 103, 1964.

[*Казимеж Менткевски*], *Петр Фихна*

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ И ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ВЛИЯНИЮ ЭНДОКСАНА НА ГИПОФИЗ И СЕМЕННИК КРЫСЫ

I. ГИСТОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ СЕМЕННИКА КРЫС ОБРАБОТАННЫХ ЭНДОКСАНОМ

Резюме

Исследовали морфометрические и гистохимические изменения в семеннике крысы вызванные ежедневной подачей 4 мг/кг эндоксана (циклофосфамида) в разные периоды. Исследования показали, что длительное применение указанного цитостатического препарата вызывает трансформацию клеток Лейдига в направлении фибробластоподобных элементов и отклонения в активности гистохимических реакций в интерстициальной железе.

Установлено, что эндоксан воздействует на сперматогенез путем звдержания митотических делений сперматогонии и нарушения правильного механизма мейоза.

В связи с предположением, что возможное снижение уровня андрогенов может подготавливать гаметогенную часть семенника к действию указанного цистостатического вещества, исследовали реагирование интерстициальной железы семенника на подачу плацентового гонадотропина крысам предварительно обработанным циклофосфамидом. Оценивали также морфологические показатели функционального состояния гипофиза орхидектомизованных животных, как и с сохраненными гонадами после инъекции эндоксана.

Kazimierz Miętkiewski], *Piotr Fichna*

MORPHOMETRICAL AND HISTOCHEMICAL INVESTIGATIONS ON THE ENDOXAN EFFECT ON HYPOPHYSIS AND TESTICLE OF RAT

I. HISTOPHYSIOLOGICAL STATE OF TESTICLE IN ENDOXAN TREATED RATS

Summary

Adult male rats were treated with endoxan (cyclophosphamide), with endoxan and testosterone together and only with testosterone. The prolonged injections of endoxan lead to transformations of Leydig's cells into fibroblastlike cells. This transformation is paralleled by changes in reactions for activities of acide phosphatase and the nonspecific esterases. Under these conditions the relative seminal vesicles weight is lower in comparison with intact animals. However, endoxan does not inhibit testosterone-induced enlargement of the seminal vesicles. Endoxan effects on spermatogenesis comprise the inhibition of mitotic divisions of spermatogonia as well as the appearance of pathological meiosis. Due to these effects of endoxan, the absence of certain cell generations in seminiferous epithelium may be explained.

lek. med. Piotr Fichna

Instytut Biostruktury AM w Poznaniu

Zakład Histologii i Embriologii

60-781 Poznań, ul. Rektora Świącickiego 6