

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXXV, 30

SECTIO D

1980

Samodzielna Pracownia Mikroskopii Elektronowej. Instytut Biologiczno-Morfologiczny
Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof., dr hab. Maciej Latański

Maciej LATALSKI, Daniela OBUCHOWSKA

**Ultrastruktura pęcherzyków nasiennych szczura w przewlekłym zatruciu
pestycydem Cynkotox**

Ультраструктура семенных пузырьков при хроническом отравлении пестицидом
Цинкотокс

Ultrastructure of the Rat Seminal Vesicles during Chronic Poisoning with Cynkotox

Cynkotox należy do metaloorganicznych pestycydów stosowanych powszechnie w ochronie roślin. Preparat ten jako substancję czynną zawiera Zineb (etylenobisdwutiokarbaminian cynkowy (5)). Charakteryzuje się on, podobnie jak preparaty Manebu, niską toksycznością ostrą, stąd oba te preparaty zaliczane są do pestycydów o małej szkodliwości (1). Jednakże doświadczenia na zwierzętach przewlekłe zatrutowanych wykazały, że pestycydy te oraz ich metabolity wywołują szereg zmian biochemicznych.

Preparaty handlowe zawierające Maneb czy Zineb hamują, tak *in vivo* jak i *in vitro*, szybkość reakcji uwodnienia CO₂ i usuwania go z organizmu, katalizowanej przez dehydratazę węglanową (5, 6).

Z badań Izmirowej i wsp. (2) wynika, że Cynkotox, podobnie jak Maneb, wpływa na zawartość izoenzymów dehydrogenazy mleczanowej jąder szczurów. Orłowski i wsp. (4), podając szczurom Maneb i Zineb w dawkach zbliżonych do ich ilości występujących praktycznie w produktach pokarmowych stwierdzili wpływ tych pestycydów na zawartość dehydrogenazy bursztynianowej i aminotransferaz w różnych narządach. Autorzy ci obserwowali ponadto, że po 3—5 miesiącach podawania Manebu i Zinebu ma miejsce obniżenie aktywności kwaśnej fosfatazy i zmniejszenie zawartości fruktozy w dodatkowych męskich gruczołach płciowych. Ponieważ głównym producentem fruktozy w nasieniu są pęcherzyki nasienne, postanowiliśmy przebadać wpływ Cynko-

toxu na budowę submikroskopową komórek nabłonkowych tych narządów u szczura.

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Badania przeprowadzono na szczurach białych (*Rattus rattus* L. *albino*), samcach, hodowli własnej o ciężarze ciała ok. 200 g. Zwierzęta podzielono na 4 grupy: kontrolną i 3 grupy doświadczalne. Szczury doświadczalne otrzymywały odpowiednio przez okres 1, 2 i 3 miesięcy (6 razy w tygodniu) Cynkotox (prod. Zakłady Chemiczne „Azot” w Jaworznie) w dawce 30 mg/kg (4) w przeliczeniu na substancję czynną. Preparat ten podawano w zawiesinie wodnej, dożołądkowo. Użyty przez nas preparat pestycydu zawierał ok. 71% substancji czynnej (Zinebu). Zastosowana przez nas dawka, wg opinii Orłowa i wsp. (4), jest najniższą dawką Zinebu, powodującą zmiany w dodatkowych męskich gruczołach płciowych już po 3 miesiącach podawania pestycydu szczurom. Ponadto jest to ilość preparatu, którą praktycznie można wykryć w zanieczyszczonych nim produktach pokarmowych (4).

Pobrane w narkozie eterowej wycinki z części obwodowej lewego pęcherzyka nasiennego utrwalano w 6% roztworze aldehydu glutarowego zbuforowanego do pH 7,2 buforem kakodylowym przez 2 godz. w temp. 0–4°C. Po przepłukaniu w zimnym buforze materiał dotrwalano w takich samych warunkach, ale przy użyciu utrwalacza z 1% roztworem OsO₄. Po utrwaleniu i odwodnieniu w szeregu alkoholi etylowych o wzrastającym stężeniu, materiał zatapiano w Eponie 812. Skrawki krojono na ultramikrotomie Tesla BS 490 (CSSR). Oglądano i fotografowano w mikroskopie elektronowym Tesla BS 613 (CSSR).

BADANIA WŁASNE

Grupa kontrolna

Nabłonek wyścielający pęcherzyki nasienne szczura składał się z dwóch typów komórek: wysokich komórek wydzielniczych, sięgających światła gruczołu i nielicznych, leżących między nimi, komórek podstawowych (ryc. 1, 2). Wolne powierzchnie komórek wydzielniczych otaczających światło gruczołu posiadały mikrokosmki (ryc. 1). W pobliżu światła gruczołu występowały desmosomy (ryc. 1). Układy błon szorstkich szczególnie dobrze były rozwinięte u podstawy komórek i w strefie okołojądrowej (ryc. 1, 2). W okolicy szczytowej spotykano częściej przekroje błon gładkich (ryc. 1). W tej strefie komórek występowały liczniej niż w innych partiach cytoplazmy wolno leżące rybosomy (ryc. 1).

Struktury Golgiego i związane z nimi pęcherzyki wydzieliny występowały w okolicy nadjądrowej i szczytowej komórek (ryc. 1). Pęcherzyki wydzieliny, otoczone pojedynczą błoną, zawierały substancje o różnej gęstości elektronowej, jasną w zewnętrznej części pęcherzyka i ciemną — elektronowo gęstą pośrodku (ryc. 1). Mitochondria o typowej struk-

turze zlokalizowane były głównie przy podstawie komórek i w okolicy jądra komórkowego (ryc. 1, 2). Jądro komórkowe o owalnym kształcie wypełniał luźny zrab chromatyny gęstniejący na obwodzie (ryc. 2).

Komórki podstawowe były niskie i leżały na błonie podstawowej między komórkami wydzielniczymi (ryc. 2). Ich cytoplazma zawierała skąpe ilości organelli komórkowych. Obserwowano w niej nieliczne mitochondria, krótkie odcinki błon szorstkich, przekroje błon gładkich w postaci drobnych pęcherzyków, wolno leżące rybosomy i sporadycznie inne organelle komórkowe, takie jak ciała wielopęcherzykowe i lizosomy (ryc. 2). Jądro komórek podstawowych często posiadało pofałdowane obrysy z wyraźnie zagęszczoną chromatyną przybrzeżną i dobrze zaznaczonym jądrem (ryc. 2).

Grupa I doświadczalna (1 miesiąc podawania Cynkotoxu)

Po miesiącu podawania szczurom pestycydu zaobserwowano zmiany w partiach szczytowych komórek wydzielniczych. Część komórek wykazywała rozdęte kanały ergastoplazmy, które wypełniał materiał o umiarkowanej gęstości elektronowej (ryc. 3). W takich komórkach pęcherzyki wydzieliny były nieliczne i często posiadały zniekształcone obrysy (ryc. 3). Struktury Golgiego były wyraźnie poszerzone (ryc. 3). Pozostałe organelle komórkowe nie wykazywały uchwytynych zmian. W części podstawnej komórek wydzielniczych obserwowano nieznaczne poszerzenie elementów ergastoplazmy (ryc. 4). Niektóre mitochondria w tej partii komórek wykazywały nieznaczne obrzmienie (ryc. 4). W nielicznych komórkach w strefie przypodstawnej stwierdzano nieco większą ilość wakuoli autofagowych niż w kontroli. Jądra komórkowe posiadały rozrzedzoną chromatynę, skupienia chromatyny brzeżnej były skąpe (ryc. 4).

W komórkach podstawowych wyraźnych różnic w porównaniu z kontrolą nie stwierdzono (ryc. 4).

Grupa II doświadczalna (2 miesiące podawania Cynkotoxu)

Po 2 miesiącach podawania preparatu w części komórek nabłonkowych pęcherzyków nasiennych obserwowano zmiany tego typu co w komórkach grupy I. Niektóre komórki wydzielnicze wykazywały zmiany degeneracyjne (ryc. 5). Część szczytowa takich komórek była w mniejszym lub większym stopniu zwakuolizowana. Często w takich komórkach ściany pęcherzyków wydzieliny były porozrywane, a pęcherzyki opróżnione z wydzieliny (ryc. 5). Spotykano nieliczne pęcherzyki wydzieliny

o typowym wyglądzie. Kanały ergastoplazmy i elementy struktur Golgiego były mocno poszerzone (ryc. 5). W partiach bazalnych komórek, podobnie jak w grupie poprzedniej, notowano niewielkie poszerzenie cystern ergastoplazmy i lekkie obrzmienie mitochondriów (ryc. 6). Jądra komórkowe w komórkach mocno zwakuolizowanych posiadały silnie pofałdowane obrysy (ryc. 5). W komórkach podstawowych, poza sporadycznym pojawieniem się dużych wakuoli autofagowych (ryc. 6), istotnych różnic w porównaniu z kontrolą nie obserwowano.

Grupa III doświadczalna (3 miesiące podawania Cynkotoxu)

Zasięg i rodzaj zmian w tej grupie doświadczalnej układały się podobnie jak w grupie poprzedniej. Partie szczytowe, dużej ilości komórek wydzielniczych były w różnym stopniu zwakuolizowane, niektóre nawet bardzo znacznie (ryc. 7). W tych ostatnich obserwowano zniszczenie błony komórkowej ograniczającej wolną powierzchnię komórek i „wysypywanie się” elementów cytoplazmatycznych do światła gruczołu (ryc. 7). Okolice okołojądrowe i przypodstawne nie wykazywały dużych zmian. Podobnie jak w poprzednich grupach, miało miejsce nieznaczne poszerzenie elementów ergastoplazmy (ryc. 8).

Cytoplazma komórek podstawowych zawierała w porównaniu z poprzednimi grupami mniej organelli komórkowych (ryc. 8).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W pracach, dotyczących wpływu Cynkotoxu lub samej jego substancji czynnej — Zinebu — na różne narządy, zwraca się uwagę na niską toksyczność tego związku, zwłaszcza przy stosowaniu niskich dawek (30 mg/kg ciężaru ciała). Jednakże przedłużone działanie tego pestycydu wywołuje szereg zmian biochemicznych, które rzutują na funkcję i morfologię narządów. Z badań Orłowa i wsp. (4) wynika, że niska dawka Zinebu (30 mg/kg), wprowadzana szczurom przez okres 3—5 miesięcy, wpływa na aktywność jąder i dodatkowych męskich gruczołów płciowych. Autorzy ci podają, że po takim okresie podawania pestycydu ma miejsce obniżenie aktywności fosfatazy kwaśnej w prostaty, zmniejszenie ilości fruktozy w gruczole koagulującym, a w jądrach — zmniejszenie ilości wolnych grup — SH. Tego rodzaju zmiany, aczkolwiek niezbyt nasilone, zdaniem cytowanych autorów mogą rzutować na aktywność męskich hormonów płciowych. Izmirova i wsp. (2), badając wpływ Zinebu i Manebu na zawartość izoenzymów LDH w jądrach szczu-

rów, stwierdzili niewielkie obniżenie aktywności dehydrogenazy mleczanowej pod wpływem niskich dawek Zinebu w jądrach szczurów. Działanie to potęgowało się przy większych dawkach.

Cynkotox wyraźnie obniżał aktywność dehydratazy węglanowej, tak *in vitro*, jak i *in vivo*, we krwi szczurów (5, 6). Znany jest również znaczny jego wpływ inhibujący na wiele innych enzymów: aminotransferazy, peroksydazy, ureazy, cytochromu P-450 (1).

W naszych badaniach kilkumiesięczne zatrucie szczurów Cynkotoxem w dawce 30 mg/kg ciężaru ciała powodowało wyraźne zmiany w partiach szczytowych komórek wydzielniczych pęcherzyków nasiennych. Zmiany te obejmowały błony szorstkie, struktury Golgiego i pęcherzyki wydzieliny, w znacznie mniejszym stopniu mitochondria, a więc głównie elementy komórkowe zaangażowane w produkcję wydzieliny. Wakuolizacja szczytowych fragmentów cytoplazmy wiązała się ze zmniejszeniem ilości pęcherzyków wydzieliny. Zmiany tego typu nasilały się w miarę przedłużania okresu wprowadzania zwierzętom pestycydu.

Opisane przez nas zmiany w ultrastrukturze komórek wydzielniczych pęcherzyków nasiennych szczura, zwłaszcza w partiach szczytowych, mogą przemawiać za osłabieniem procesów wydzielniczych i zaburzeniem przepuszczalności błon. Obraz ultrastrukturalny pewnej części komórek silnie zwakuolizowanych z „wysypującymi się” organellami świadczy o zmianach degeneracyjnych na terenie pęcherzyków nasiennych. Takie odchylenia od normy mogą mieć związek ze zmienioną pod wpływem Zinebu aktywnością męskich hormonów płciowych produkowanych przez jądra, na co zwrócili uwagę Orłowski i wsp. (4). Zmniejszona zawartość fruktozy, obserwowana przez wyżej wymienionych autorów pod wpływem Zinebu, może być konsekwencją zaburzonej struktury pewnej części komórek wydzielniczych pęcherzyków nasiennych, bowiem wiele komórek pozostawało nie zmienionymi.

Można zatem przyjąć, że oddziaływanie użytego w naszym doświadczeniu pestycydu na pęcherzyki nasienne odbywa się na drodze pośredniej, poprzez hamujące działanie na czynność jąder. Na podstawie naszych obserwacji trudno przyjąć, aby Zineb działał bezpośrednio w sposób destrukcyjny na ultrastrukturę badanych komórek.

PIŚMIENNICTWO

1. Fonberg-Broczek M.: Roczn. PZH 29, 173—179, 1978.
2. Izmirova N., Izmirov L., Ivanova L.: Compt. rend. Acad. bulg. Sci. 22, 225—227, 1969.
3. Izmirova N., Kaloyanova F., Ivanova-Chemishanska L.: Compt. rend. Acad. Bulg. Sci. 25, 861—863, 1972.

4. Orłow N. W., Chowajew L. A., Akinczew M. J.: Woprosy pitanija 30, 32—38, 1971.
5. Zawadzka T.: Roczn. PZH 28, 141—147, 1977.
6. Zawadzka T.: Roczn. PZH 28, 435—439, 1977.

Otrzymano 27 IX 1979.

OBJAŚNIENIA RYCIN

Ryc. 1. Grupa kontrolna. Części szczytowe komórek wydzielniczych pęcherzyka nasiennego szczura. Pow. ok. 14 000×.

Ryc. 2. Grupa kontrolna. Część podstawna komórki wydzielniczej i komórka podstawowa pęcherzyka nasiennego szczura. Pow. ok. 14 000×.

Ryc. 3. Grupa I doświadczalna. Części szczytowe komórek wydzielniczych pęcherzyka nasiennego szczura. Pow. ok. 14 000×.

Ryc. 4. Grupa I doświadczalna. Część podstawna komórki wydzielniczej i komórka podstawowa pęcherzyka nasiennego szczura. Pow. ok. 14 000×.

Ryc. 5. Grupa II doświadczalna. Części szczytowe komórek wydzielniczych pęcherzyka nasiennego szczura. Pow. ok. 14 000×.

Ryc. 6. Grupa II doświadczalna. Część podstawna komórek wydzielniczych i fragment komórki podstawowej pęcherzyka nasiennego szczura. Pow. ok. 14 000×.

Ryc. 7. Grupa III doświadczalna. Części szczytowe komórek wydzielniczych pęcherzyka nasiennego szczura. Pow. ok. 14 000×.

Ryc. 8. Grupa III doświadczalna. Część podstawna komórki wydzielniczej i komórka podstawowa pęcherzyka nasiennego szczura. Pow. ok. 14 000×.

OBJAŚNIENIA SKRÓTÓW

BM — błona podstawowa	R — rybosomy
BC — komórka podstawowa	G — struktury Golgiego
Mv — mikrokosmki	V — pęcherzyki wydzieliny
D — desmosomy	M — mitochondria
RER — ergastoplazma	N — jądro komórkowe
SC — komórka wydzielnicza	Ly — lizosomy
SER — gładkie retikulum endoplazmatyczne	Nu — jąderko
	L — światło gruczołu
	Mvb — ciało wielopęcherzykowe

РЕЗЮМЕ

Замеченные изменения в ультраструктуре семенных пузырьков крыс под влиянием пестицида Цинкотокс указывают на ослабление секретарного процесса и частичную дегенерацию этих органов. Действие, используемого нами пестицида, на семенные пузырьки вероятно происходит косвенным путём через тормозящее действие на функцию ядер.

SUMMARY

Examinations were carried out on the administration of Cynkotox (a pesticide) to rats in a dose of 30 mg/kg of body weight. The results showed that the pesticide caused the changes in the secretory cells of the rat seminal vesicles. The changes involved the rough endoplasmic reticulum, Golgi complex, secretory vesicles and, to some degree, mitochondria. The above changes point to a decreased secretory process in the seminal vesicles, subject to a partial degeneration. The pesticide has been found to have possibly an indirect effect on the seminal vesicles due to its inhibitory activity on the testes.

EXPLANATION TO FIGURES

Fig. 1. Control group. The apical parts of the secretory cells of the rat seminal vesicles. Magn. ca. 14,000X.

Fig. 2. Control group. The basal part of the secretory cell and the basal cell of the rat seminal vesicles. Magn. ca. 14,000X.

Fig. 3. Experimental group I. The apical parts of the secretory cells of the rat seminal vesicles. Magn. ca. 14,000X.

Fig. 4. Experimental group I. The basal part of the secretory cell and the basal cell of the rat seminal vesicles. Magn. ca. 14,000X.

Fig. 5. Experimental group II. The apical parts of the secretory cells of the rat seminal vesicles. Magn. ca. 14,000X.

Fig. 6. Experimental group II. The basal parts of the secretory cells and a fragment of the basal cell of the rat seminal vesicles. Magn. ca. 14,000X.

Fig. 7. Experimental group III. The apical parts of the secretory cells of the rat seminal vesicles. Magn. ca. 14,000X.

Fig. 8. Experimental group III. The basal part of the secretory cell and the basal cell of the rat seminal vesicles. Magn. ca. 14,000X.

EXPLANATION TO SYMBOLS

BM — basement membrane

SC — secretory cell

BC — basal cell

Mv — microvilli

D — desmosomes

RER — rough endoplasmic reticulum

SER — smooth endoplasmic reticulum

R — ribosomes

G — Golgi complex

V — secretory vesicles

M — mitochondria

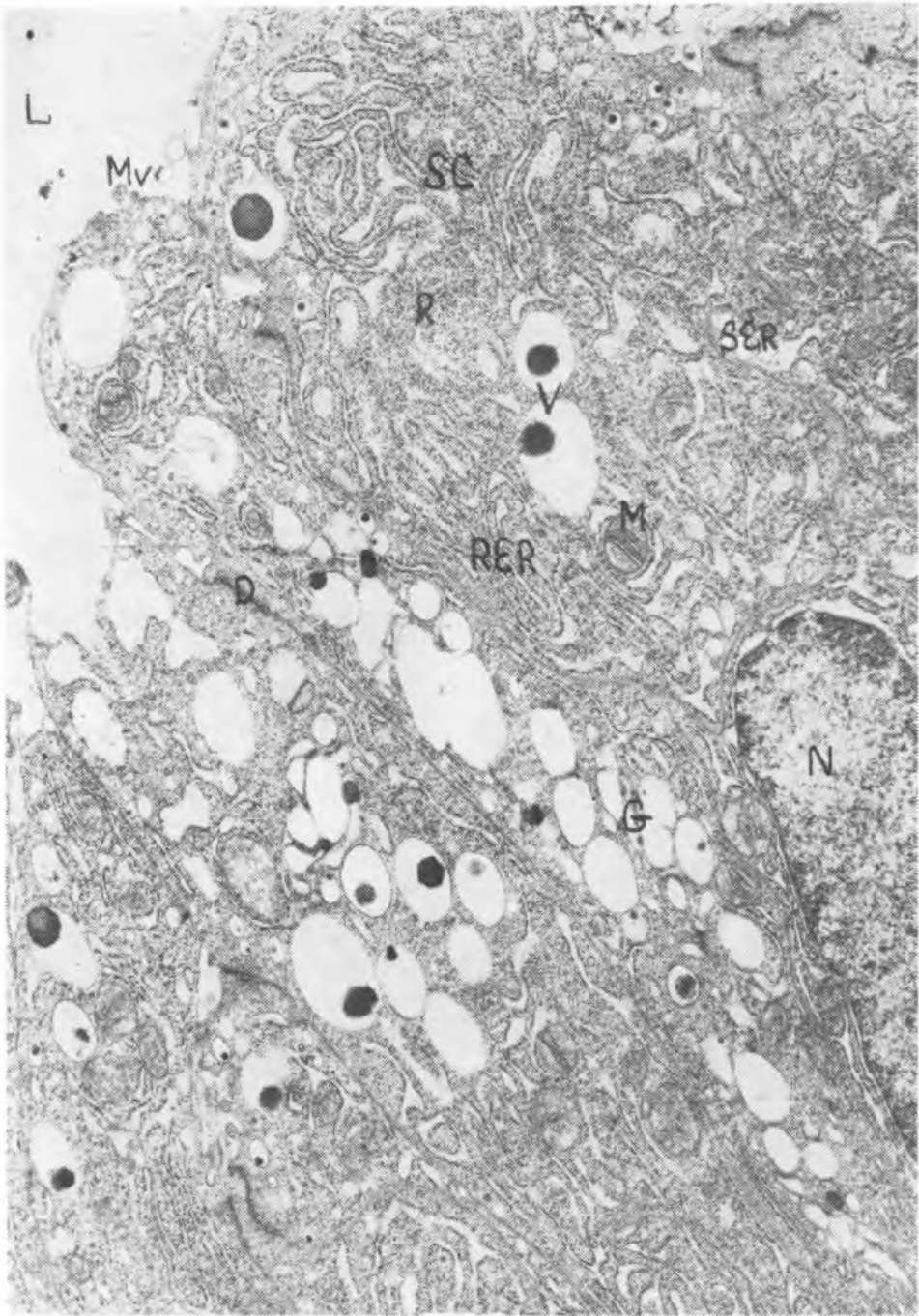
N — nucleus

Ly — lysosomes

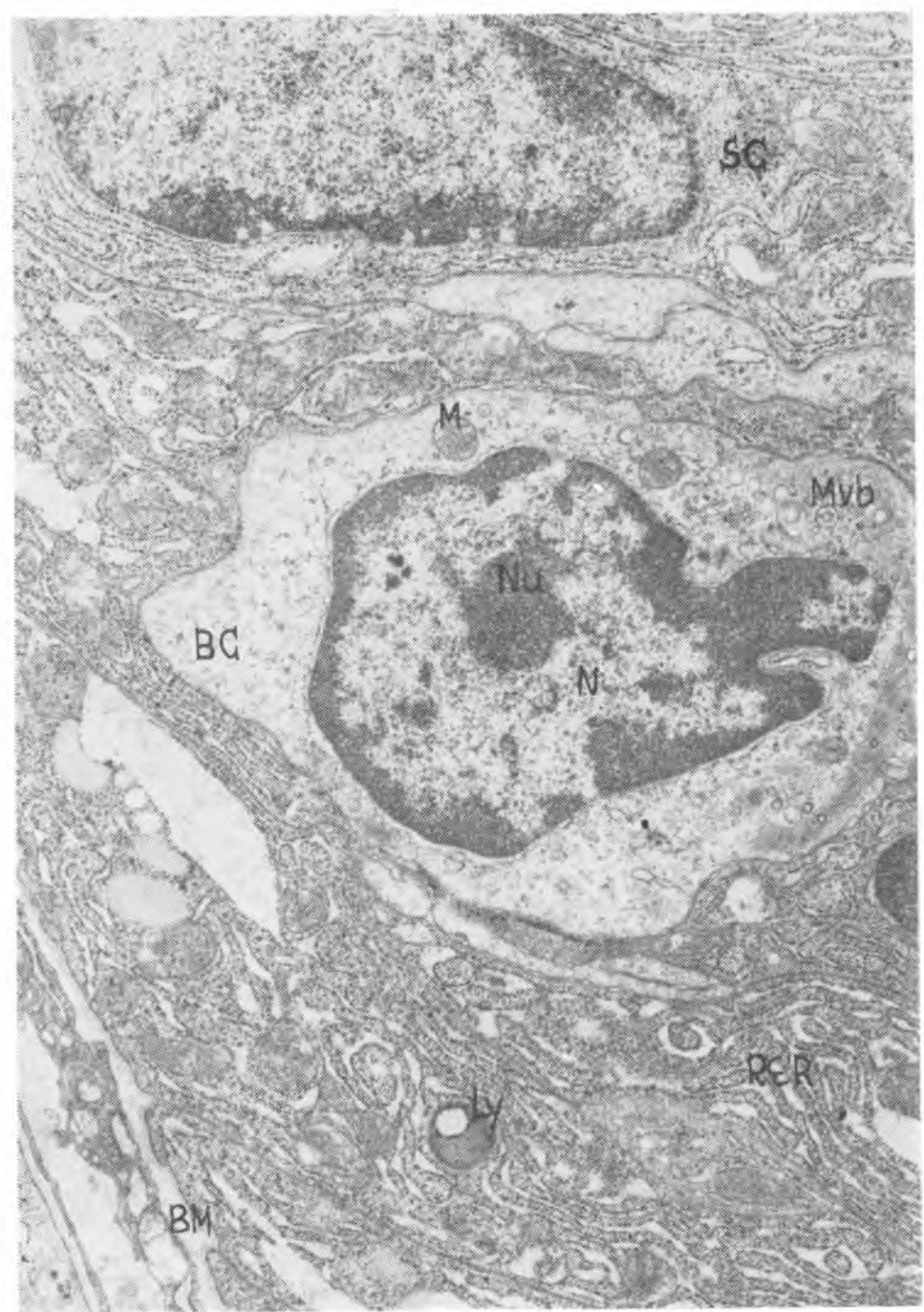
Nu — nucleolus

L — lumen of the gland

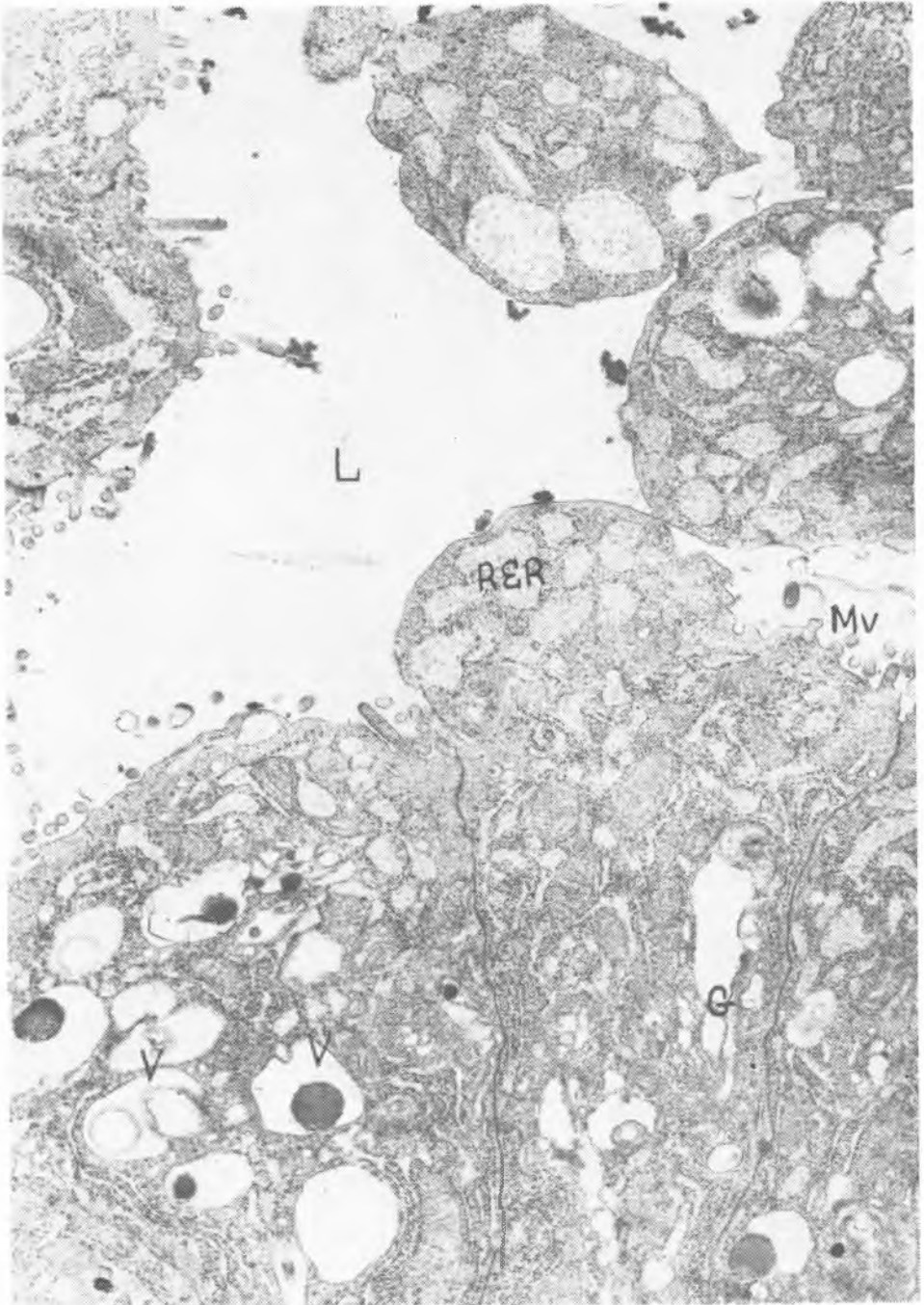
Mvb — multivesicular body



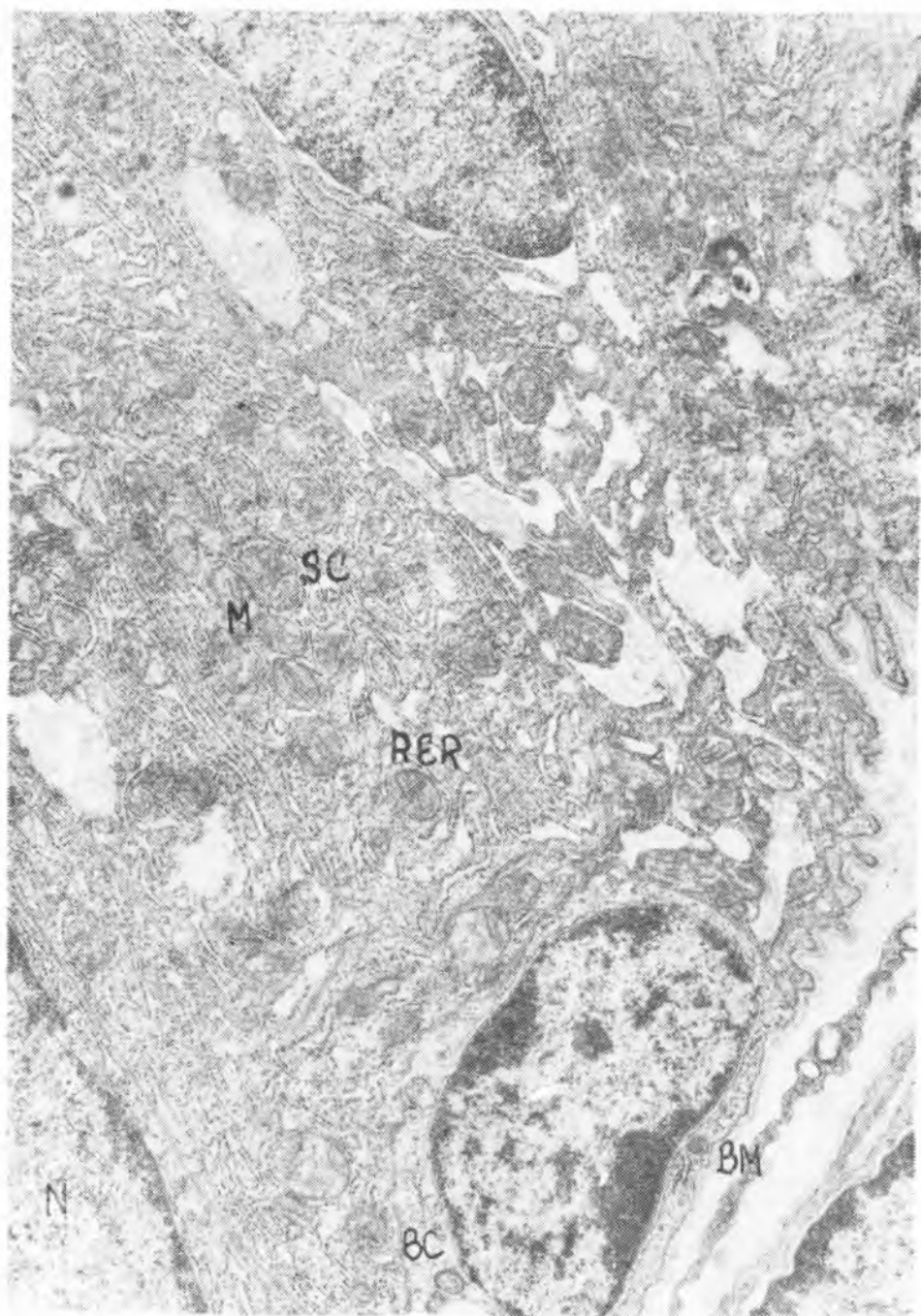
Ryc. 1



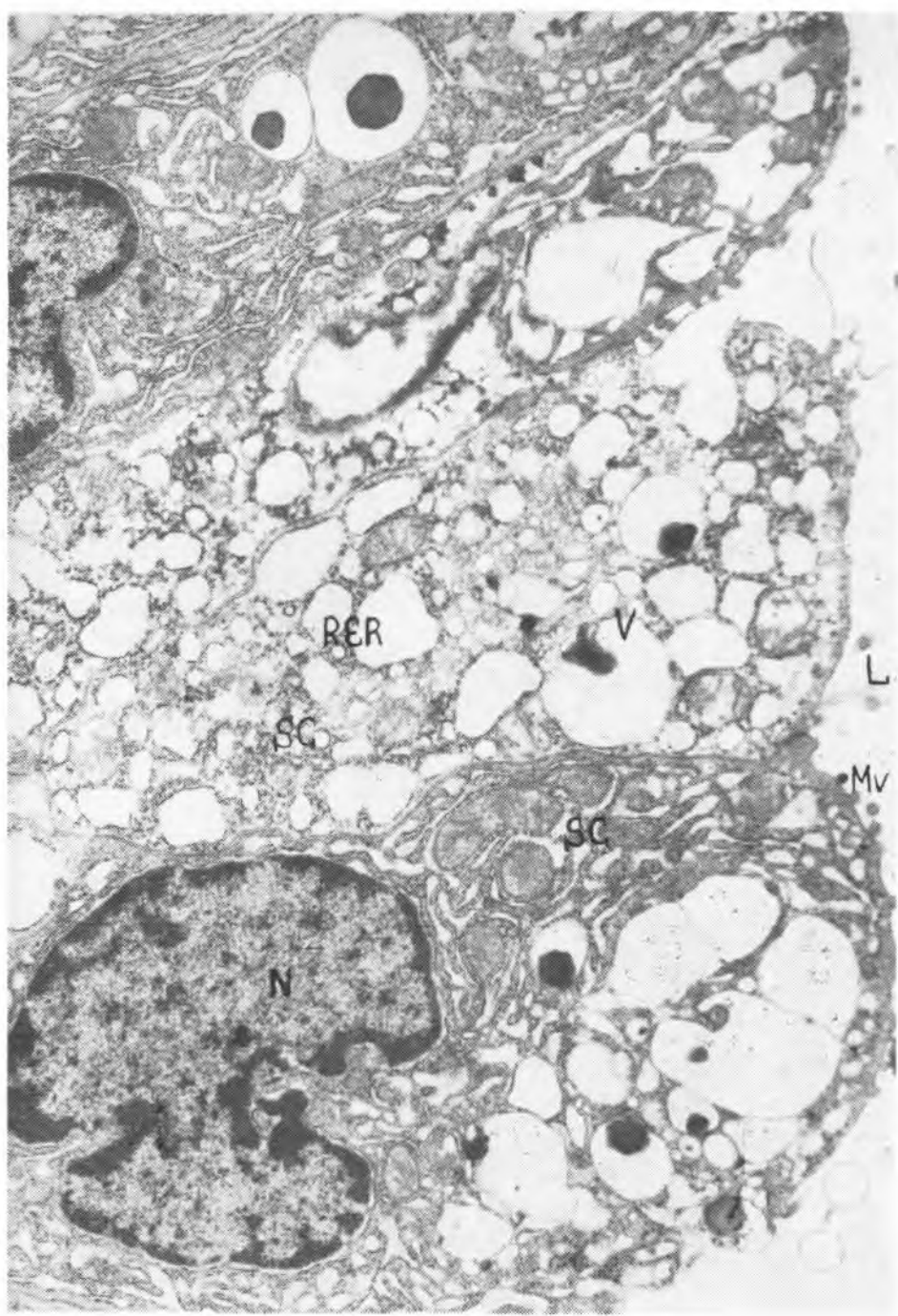
Ryc. 2



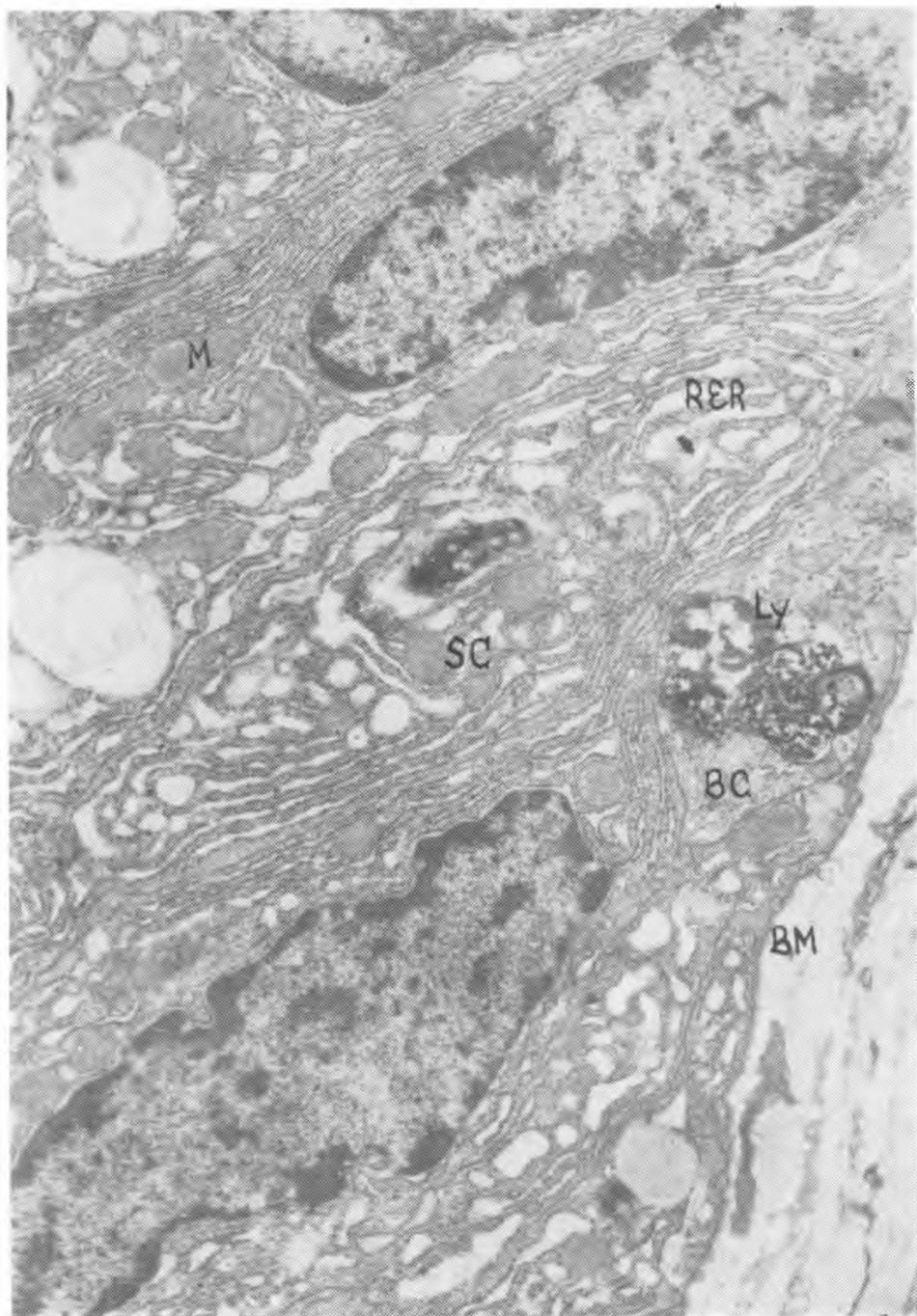
Ryc. 3



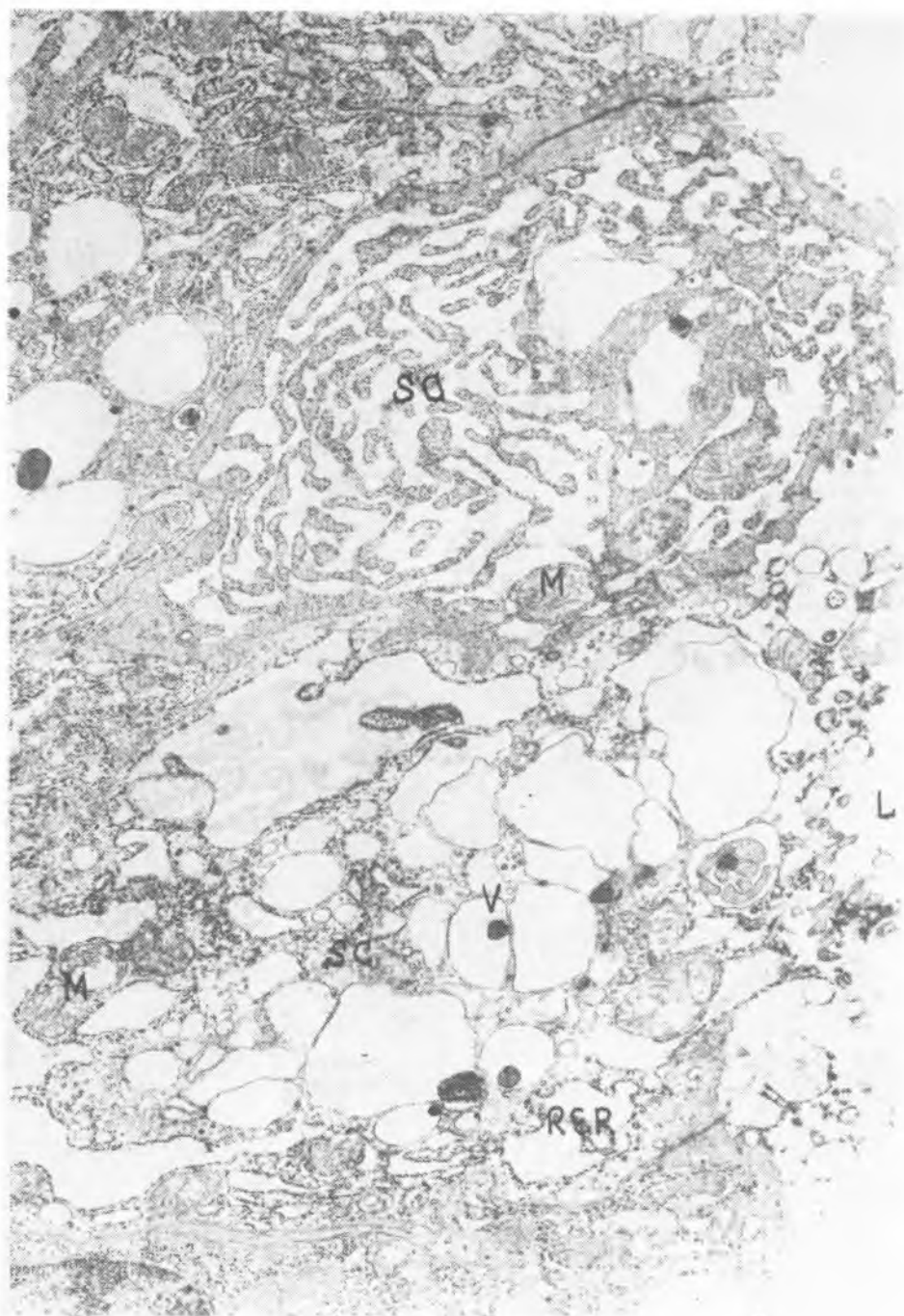
Ryc. 4



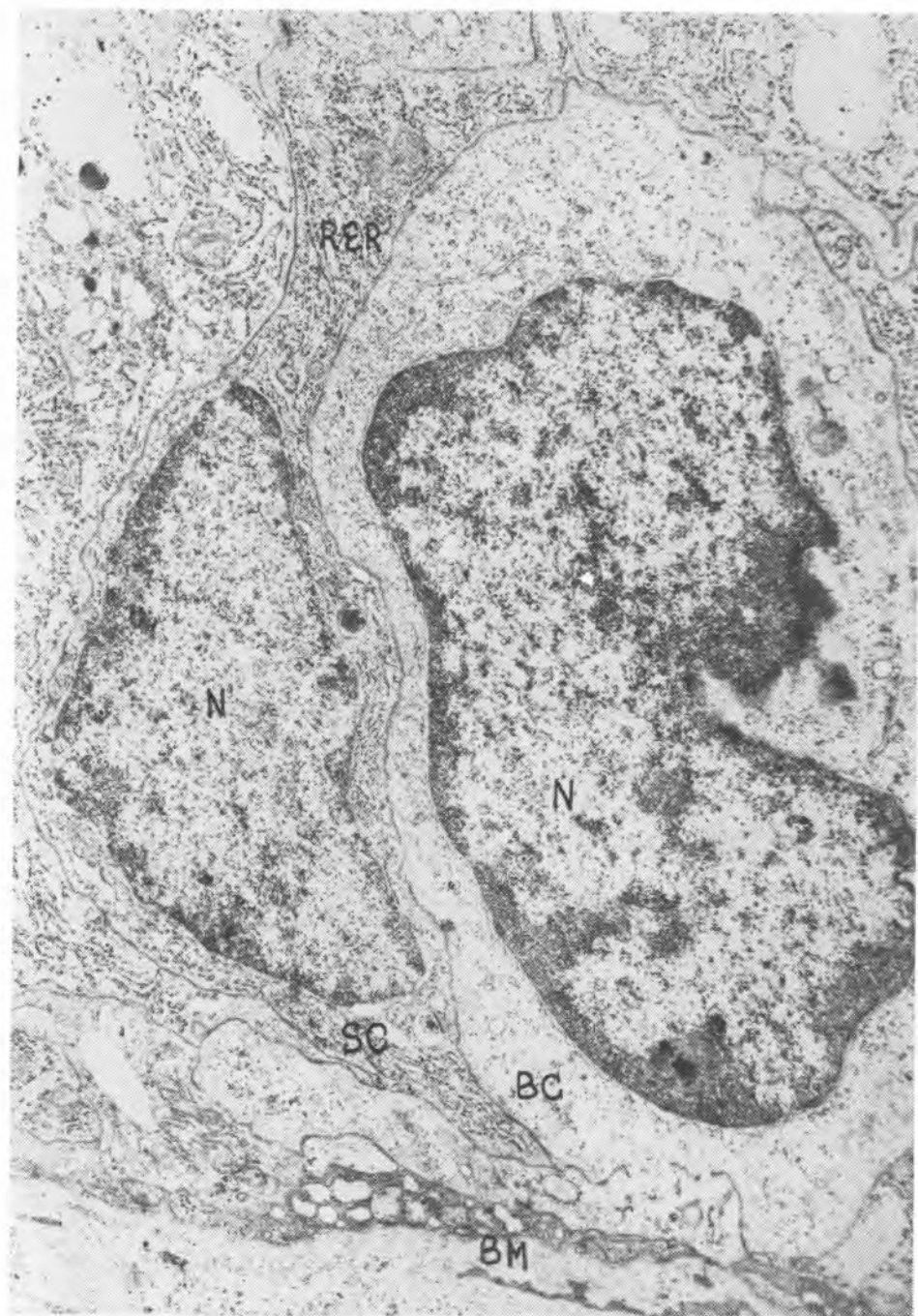
Ryc. 5



Ryc. 6



Ryc. 7



Ryc. 8