

IRENEUSZ CAŁKOŚIŃSKI<sup>1</sup>, MARCIN STAŃDA<sup>1</sup>, LUDMIŁA BORODULIN-NADZIEJA<sup>1</sup>,  
URSZULA WASILEWSKA<sup>1</sup>, JACEK MAJDA<sup>3</sup>, MAREK CEGIELSKI<sup>2</sup>, PIOTR DZIĘGIEL<sup>2</sup>,  
WOJCIECH WOŹNIAK<sup>1</sup>

## Wpływ 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksyny (TCDD) na strukturę narządów mięszowych oraz na stężenie cholesterolu i estradiolu u szczurów

### The Influence of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin on Changes of Parenchymal Organs Structure and Oestradiol and Cholesterol Concentration in Female Rats

<sup>1</sup> Katedra i Zakład Fizjologii AM we Wrocławiu

<sup>2</sup> Katedra i Zakład Histologii AM we Wrocławiu

<sup>3</sup> Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej IV WSK SPZOZ we Wrocławiu

#### Streszczenie

**Wprowadzenie.** Dioksyny (TCDD) dostają się do organizmu głównie drogą alimentarną oraz w mniejszej ilości są wchłaniane przez skórę i drogi oddechowe. Biologiczne efekty oddziaływania tych związków, związane z zaburzeniami syntezy hormonów, dla których prekursorem jest cholesterol, wiążą się z upośledzeniem funkcji wątroby. TCDD, tworząc połączenie z receptorem AhR, który wykazuje podobieństwo do receptora estrogenowego, upośledzają gospodarkę steroidami.

**Cel pracy.** Ocena wpływu TCDD na zmiany struktury narządów mięszowych (wątroby, tarczycy, nerek i grasicy) z równoległą analizą zmian stężenia cholesterolu i estradiolu.

**Material i metody.** Doświadczenia wykonano na szczurach – samicach. Zwierzęta podzielono na trzy grupy: grupę kontrolną i dwie grupy badane (A i B). Samicom z grupy A i B podano jednorazowo dawkę 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksyny (5 µg/kg m.c.). Po upływie 3 tygodni od ekspozycji na TCDD pobrano krew do oznaczenia estradiolu i cholesterolu od samic z grupy A, a z ww. narządów mięszowych wykonano preparaty do oceny histopatologicznej. U samic z grupy B oceniono zdolności rozrodcze w próbie biologicznej.

**Wyniki.** Badanie histopatologiczne wątroby (grupa A) wykazało obecność licznych ognisk stłuszczenia hepatocytów. Oznaczenia biochemiczne wykazały istotny wzrost stężenia cholesterolu oraz spadek stężenia estradiolu w odniesieniu do grupy kontrolnej. W grupie B obserwowano zmniejszoną zdolność reprodukcyjną samic.

**Wnioski.** U szczurów poddanych działaniu 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksyny stwierdzono: morfologiczne zmiany w obrębie wątroby oraz brak zmian w strukturze tarczycy, grasicy i nerek; obniżenie stężenia estradiolu oraz wzrost stężenia cholesterolu; zmniejszenie liczby potomstwa oraz zaburzenie płodności prawdopodobnie spowodowane obniżeniem stężenia estradiolu (*Adv Clin Exp Med* 2005, 14, 2, 211–215).

**Słowa kluczowe:** dioksyny, histopatologia narządów mięszowych, stężenie cholesterolu i estradiolu.

#### Abstract

**Background.** Dioxins (TCDD) are getting at an organism mainly by alimentary tract but also in small amount are absorbing both by the skin and by respiratory tract. Biological action effect of these substances is related to liver dysfunction and also cause synthesis dysfunction of these hormones in which cholesterol origin is observed. TCDD producing the binding with AhR receptor, which presents estrogen-like receptor, bring on dysfunction of steroids hormones synthesis.

**Objectives.** The aim of the study was estimation of TCDD effect on changes of parenchymal organs structure such as: liver, thyroid, kidney and thymus with parallel analysis of cholesterol and oestradiol concentration changes.

**Material and Methods.** The investigation was performed on female rats. The animals were divided on three groups: control group, and two exanimate groups (A and B). The single dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (5 µg/kg b.w.) was subcutaneously administered to the examined groups A and B. After the three weeks period of

TCDD exposition, from female rats (group A) the samples of blood were collected in order to oestradiol and cholesterol examination. Additional the samples of above mentioned parenchymal organs for histopathologic estimations were received. The reproductive ability in the female rats (group B) was determined in the base of biological test.

**Results.** Histopatologic examination of liver (group A) pointed to the presence of numerous hepatocytes with steatosis. The biochemical determinations prove the statistical important increase of cholesterol concentration and decrease of oestradiol concentration with reference to the control group. The diminution ability to reproduction in the group B of female rats was observed.

**Conclusions.** In the female rats exposed by influence of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin the following observation were stated: morphological changes in the liver and lack of changes in the thyroid, thymus and kidney structure; decrease of oestradiol concentration with parallel increase of cholesterol; reduction number of breed and fertility disturbance may probably depend on lowering oestradiol serum concentration (*Adv Clin Exp Med* 2005, 14, 2, 211–215).

**Key words:** dioxin, histopathology of parenchymal organs, cholesterol and oestradiol concentration.

Wzrastający poziom skażenia środowiska dioksynami jest spowodowany ograniczonymi możliwościami ich biodegradacji, co prowadzi do kumulacji tych związków w organizmie. Wnikanie dioksyn do organizmu przez skórę i drogi oddechowe stanowi kilkanaście procent całkowitego obciążenia organizmu człowieka tymi substancjami; w zależności od wykonywanego zawodu narażenie na te związki może jednak wzrosnąć kilkakrotnie.

Dioksyny dostają się do organizmu przez drogi oddechowe w postaci zaadsorbowanej, na cząstkach pyłów, fagocytowanych przez pneumocyty. Wnikanie przez skórę jest związane z bezpośrednim kontaktem jej warstwy lipidowej z sadzami i popiołami lub też zanieczyszczoną odzieżą.

W ostatnich latach zwraca się również uwagę na znaczący udział diety zawierającej ryby i ich produkty, w tłuszczu których stwierdzono wyjątkowo duże stężenia dioksyn, przekraczające wielokrotnie dopuszczalne normy [1].

Stwierdzono, że dioksyny, które dostały się do organizmu przechodząc drogą krwi do wątroby, tworzą w cytozolu tych komórek połączenia z receptorem AhR (węglowodorowy receptor arylowy) [2, 3]. Mechanizm działania tego receptora jest znacząco podobny do receptora estrogenowego (ER), co powoduje zaburzenie gospodarki hormonów steroidowych [4].

Z wcześniejszych obserwacji własnych wynika, że podczas toksycznego działania dioksyn obserwuje się znaczne zaburzenia w rozrodczości u szczurów, co ma związek z obserwowanymi zmianami stężenia estradiolu oraz ze zmianami histopatologicznymi w jajnikach [5].

Biorąc pod uwagę toksyczne działanie dioksyn i ich powinowactwo do receptora estrogenowego, celowa stała się ocena wpływu TCDD na zmiany struktury narządów mięszkowych: wątroby, tarczycy, nerek i grasicy z równoległą analizą zmian stężenia cholesterolu i estradiolu.

## Material i metody

Doświadczenia wykonano na 18 szczurach, pierwiastkach szczepu Bufflo (4-miesięcznych), o średniej masie ciała 180–200 g. Samice podzielono losowo na trzy grupy doświadczalne: A i B oraz grupę kontrolną, którą stanowiły zwierzęta nie poddane działaniu TCDD. Zwierzętom z grup A i B podano podskórnie jednorazowo dawkę 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksyny (TCDD) rozpuszczonej w DMSO w dawce 5 µg/kg m.c. Po upływie trzech tygodni od podania TCDD tylko samice z grupy A poddano narkozie tiopentalem (30 mg/kg m.c.) i pobrano krew z aorty brzusznej w celu oznaczenia stężenia estradiolu i cholesterolu całkowitego. Po dokonaniu eutanazji pobrano do oceny histopatologicznej skrawki z następujących narządów: wątroby, nerek, tarczycy oraz grasicy.

Pobrane skrawki narządów utrwalano w 4% zbuforowanym roztworze formaliny, a następnie przygotowywano bloczki parafinowe do wykonania preparatów. Ocenę histopatologiczną przeprowadzono na preparatach barwionych hematoksyliną i eozyną.

Stężenie estradiolu w surowicy określano za pomocą testu Immulite Estradiol, a cholesterolu całkowitego oznaczono na analizatorze biochemicznym Olympus 560-U testami bioMérieux metodą enzymatyczną.

Samice z grupy B poddano biologicznej próbie rozmnażania, kojarząc je przez 30 dni ze zdrowymi samcami w celu sprawdzenia ich zdolności rozrodczych.

Otrzymane wyniki badań biochemicznych opracowano statystycznie testem *t*-Studenta (program Statistica 5.0).

## Wyniki

U zwierząt z grupy A stwierdzono sekcyjnie znaczne wyniszczenie przejawiające się zmniejszeniem objętości tkanki tłuszczowej podścieli-

skowej lub jej całkowitym brakiem oraz zanikiem tkanki tłuszczowej okołonarządowej. U części zwierząt obserwowano zwiększoną objętość płynu w jamie otrzewnej. W obrazie makroskopowym stwierdzono powiększenie wymiarów wątroby z zaokrągleniem jej brzegów oraz zwiększonym napięciem torebki.

Badanie histopatologiczne skrawków wątroby wykazało obecność licznych ognisk stłuszczenia hepatocytów (*degeneratio adiposa peripherica*), jak również dość często występujące ogniska martwicy tych komórek będące następstwem stłuszczenia. U części zwierząt stwierdzono nieznaczne przekrwienie wątroby.

Przeprowadzona ocena histopatologiczna nerek, tarczycy oraz grasicy nie wykazała zmian patologicznych.

Stężenie estradiolu w osoczu ( $54,5 \pm 5,3$  pg/ml) było statystycznie niższe ( $p \leq 0,005$ ) w porównaniu ze stężeniem w grupie kontrolnej ( $67,1 \pm 7,4$  pg/ml). Stężenie cholesterolu całkowitego w osoczu było istotnie wyższe ( $p \leq 0,005$ ) niż w grupie kontrolnej (z  $65,4 \pm 7,7$  do  $94,8 \pm 6,7$  mg/dl).

Biologiczna próba rozrodczości w grupie kontrolnej charakteryzowała się zapłodnieniem i porodami w wąskim przedziale czasowym ograniczonym do dwóch dni. Zwierzęta należące do grupy B miały zachowaną zdolność reprodukcji, jednak w grupie tej obserwowano znaczące wydłużenie okresu zdolności zapłodnienia, czego dowodem były porody w okresie trzech tygodni. W grupie tej stwierdzono również mniejszą liczebność potomstwa w stosunku do grupy kontrolnej [5].

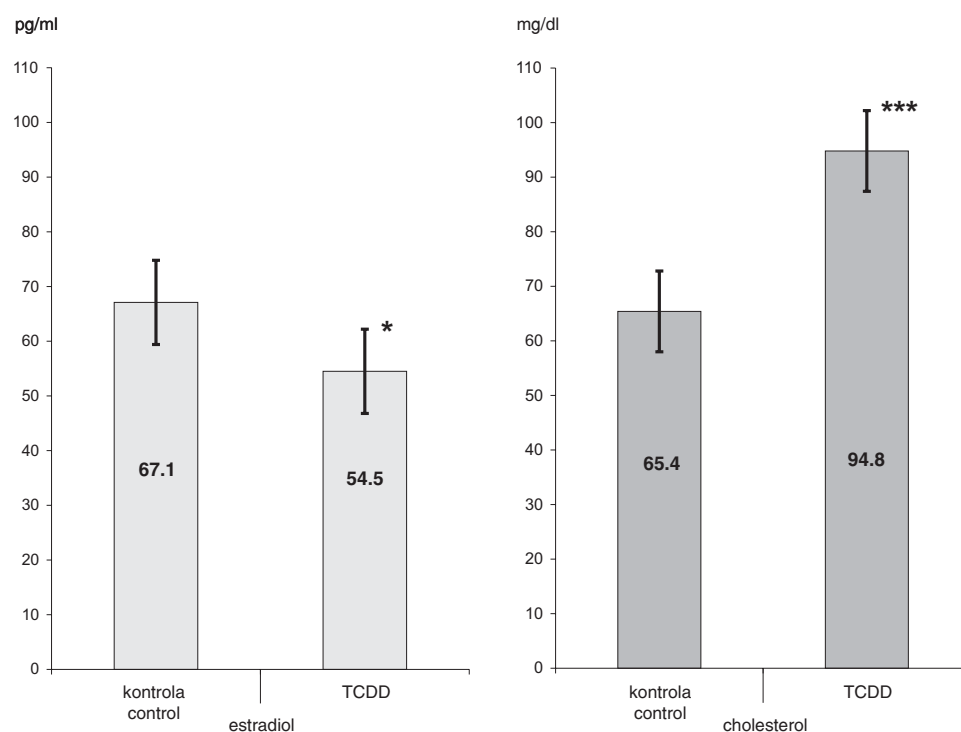
## Omówienie

W literaturze można znaleźć liczne doniesienia dotyczące zarówno zaburzeń struktury, jak i funkcji wątroby u osobników poddanych toksycznemu działaniu TCDD [6–8]. Stwierdzone w badaniach własnych makroskopowe (ryc. 2) i mikroskopowe zmiany morfologiczne w obrębie wątroby, ogniska stłuszczenia (ryc. 3a, b) i martwicy (ryc. 4), obserwowali też Jenes i McConel [6, 7]. Wykazali między innymi liczne zmiany w ultrastrukturze wątroby, głównie w siateczce endoplazmatycznej okolicy kanalików żółciowych.

Istnieją także dane dotyczące wzajemnej zależności między zmianami w ultrastrukturze wątroby a upośledzeniem eliminacji z żółcią takich substancji, jak: estradiol, progesteron i kortyzol [9].

Estradiol działa przez receptor estrogenowy ER, który wiąże się z komórkowym DNA. Wykazano, że receptor wykazuje duże podobieństwo budowy i właściwości do receptora AhR (węglowodorowy receptor arylowy), z którym wiąże się dioksyny [2, 10]. Udowodniono, że TCDD wiąże się z białkami w cytozolu wątroby przez wymieniony receptor [8]. Zaburzenie syntezy białek w wątrobie jest związane z połączeniem wymienionego kompleksu z DNA komórki wątrobowej.

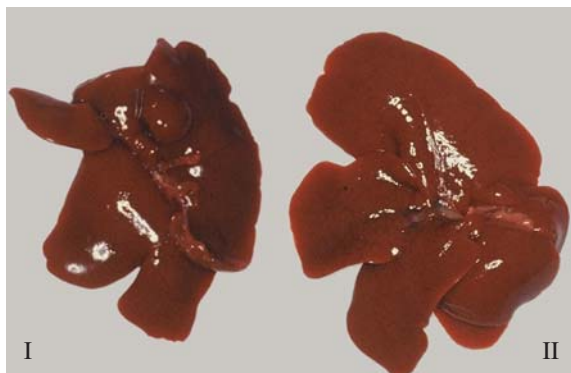
Z przedstawionych faktów wynika, że w hepatocytach dochodzi do zaburzeń czynnościowych, związanych z zaburzeniami aktywności układu monooksygenaz mikrosomowych [10]. Przyjęcie takiej koncepcji może tłumaczyć obserwowane w badaniach własnych zmniejszenie stężenia



**Ryc. 1.** Stężenie estradiolu i cholesterolu

**Fig. 1.** Oestradiol and cholesterol concentration





**Ryc. 2.** Makroskopowy obraz wątroby szczura: (I) – kontrola, (II) – 3 tyg. po podaniu TCDD, Pow. 400×

**Fig. 2.** Macroscopic picture of rat's liver: (I) – control, (II) – 3 weeks after TCDD injection. Magnification ×400

estradiolu przy jednoczesnym wzroście stężenia cholesterolu całkowitego, który jest prekursorem hormonów steroidowych. Podwyższenie stężenia cholesterolu całkowitego w surowicy można tłumaczyć obserwowanym przez innych badaczy wydłużeniem okresu półtrwania lipidów wątrobowych u szczurów po ekspozycji na TCDD [11]. Zakłócenia cyklu estrogenowego u szczurów oraz wydzielania estrogenów i progesteronu obserwowali również inni autorzy [12, 13]. Odnotowane zmiany w wydzielaniu estradiolu mogą tłumaczyć fakt utrudnionego zachodzenia w ciążę oraz zmniejszenie liczebności potomstwa.

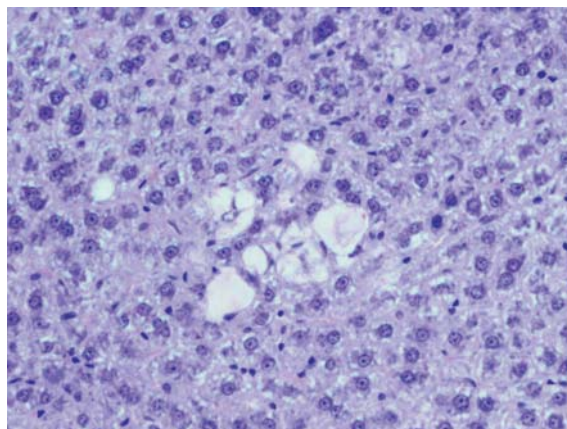
Obserwowane w niniejszych badaniach wodobrzusze u szczurów inni autorzy stwierdzili także u kurcząt [14].

Mimo doniesień [15], dotyczących zmian w stężeniu hormonów tarczycy (wzrost  $T_4$ ), w niniejszych badaniach nie zauważono zmian w strukturze tarczycy. Prawdopodobnie obserwowane zmiany w stężeniu hormonów mają podłoże funkcjonalne, a nie strukturalne.

Wpływ TCDD na układ odpornościowy [16], związany z obniżeniem liczby limfocytów T, nie charakteryzował się w badaniach własnych zmianami w strukturze grasicy.

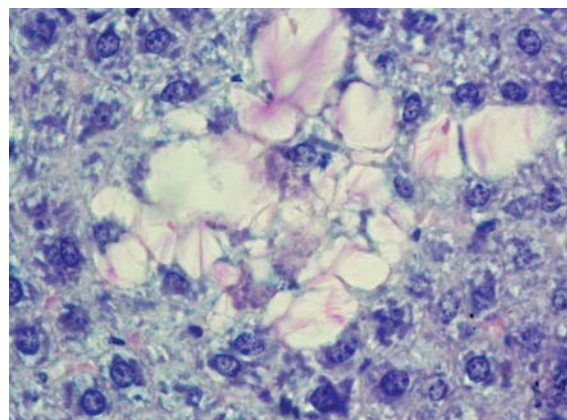
W dostępnej literaturze oraz w niniejszych badaniach nie stwierdzono w ocenie morfologicznej nefrotoksycznego działania TCDD na strukturę nerki, mimo istotnej metabolicznej funkcji tego narządu w organizmie.

Badania własne dowodzą, że u szczurów poddanych działaniu 2,3,7,8-tetrachlorodibezo-p-dioksyny można stwierdzić: morfologiczne zmiany w obrębie wątroby oraz brak zmian w strukturze tarczycy, grasicy i nerek; obniżenie stężenia estradiolu oraz wzrost stężenia cholesterolu; zmniejszenie liczby potomstwa oraz zaburzenie płodności, prawdopodobnie spowodowane obniżeniem stężenia estradiolu.



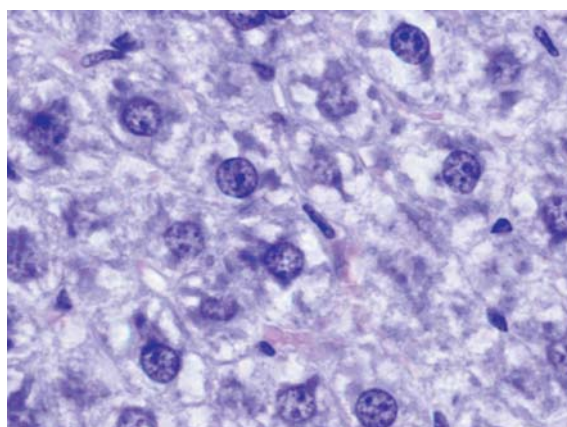
**Ryc. 3a.** Ogniskowe stłuszczenie hepatocytów. Barwienie H+E. Pow. 200×

**Fig. 3a.** Focal steatosis of hepatocytes. Staining H+E. Magnification ×200



**Ryc. 3b.** Ogniskowe stłuszczenie hepatocytów. Barwienie H+E. Pow. 400×

**Fig. 3b.** Focal steatosis of hepatocytes. Staining H+E. Magnification ×400



**Ryc. 4.** Początkowa faza martwicy hepatocytów. Barwienie H+E. Pow. 600×

**Fig. 4.** Beginning stage of hepatocytes necrosis. Staining H+E. Magnification ×600

## Piśmiennictwo

- [1] **Piskorska-Pilszczyńska J:** Toksykologiczne aspekty skażenia żywności dioksynami. Materiały VII Konferencji Naukowej – Dioksyny w Przemysle i Środowisku. 2004, 1–9.
- [2] **Piskorska-Pilszczyńska J:** Toksyczność i mechanizm działania dioksyn. *Med Wet* 1996, 22, 94–98.
- [3] **Poland A, Teitelbaum P, Glover E:** [<sup>125</sup>I] 2-Iodo-3-7-8-trichlorodibenzo-p-dioxin binding species in mouse liver induced by agonists for the Ah receptor: characterization and identification. *Mol Pharmacol* 1989b, 36, 113–120.
- [4] **Madej JA:** Estrogeny w nowotworach narządów płciowych. *Med Wet* 2004, 1, 60, 6–10.
- [5] **Całkosiński I, Borodulin-Nadzieja L, Stańda M, Wasilewska U, Cegielski M:** Wpływ jednorazowej dawki TCDD na poziom estrogenów i reprodukcję u szczurów. *Med Wet* 2003, 59, 536–538.
- [6] **Jones G, Greig JB:** Pathological changes in the liver of mice given 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Experientia* 1975, 31, 1315–1317.
- [7] **McConel EE, Moore JA, Dalgard DW:** Toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Rhesus monkeys following a single oral dose. *Toxicol Appl Pharmacol* 1978a, 43, 175–187.
- [8] **Poland A, Glover E, Kende AS:** Stereospecific high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. *J Biol Chem* 1976, 251, 4936–4946.
- [9] **Yung KH, Croft WA, Peterson RE:** Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on plasma disappearance and biliary excretion of foreign compounds in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1977, 40, 485–496.
- [10] **Cuthill S, Poellinger L, Gustafsson JA:** The receptor for 2,3,7,8-TCDD in the mouse hepatoma cell line Hepa 1c1cd7. *J Biol Chem* 1987, 262, 3477–3481.
- [11] **Cunningham HM, Williams DT:** Effect of tetrachlorodibenzo-p-dioxins on growth rate and the synthesis of lipids and proteins in rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 1972, 7, 45–51.
- [12] **Brinbaum LS:** Developmental effects of dioxins and related endocrine disrupting chemicals. *Toxicol Lett* 1995, 82, 743–750.
- [13] **Gregoraszczuk EL, Zabelny 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.
- [14] **Norback DM, Allen JR:** Biological responses of the nonhuman primate, chicken and rat to chlorinated dibenzo-p-dioxin ingestion. *Environ Health Perspect* 1973, 5, 223–240.
- [15] **Pluim HJ, Koppe JG, Olie K, Slikke JW, Kok JH, Vulsma T, Van Tijn D, De Vijlder JJ:** Effects of dioxins on thyroid function in newborn babies. *Lancet* 1992, 339, 1303–1304.
- [16] **Ivens IA, 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.

## Adres do korespondencji:

Ireneusz Całkosiński  
Katedra i Zakład Fizjologii AM  
ul. T. Chałubińskiego 10  
50-368 Wrocław  
m.calkosinska@xl.wp.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 20.07.2004 r.

Po recenzji: 21.09.2004 r.

Zaakceptowano do druku: 27.09.2004 r.

Received: 20.07.2004

Revised: 21.09.2004

Accepted: 27.09.2004