

Zakład Histologii i Embriologii. Instytut Biologiczno-Morfologiczny.
Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Józef Staszyc

Krystyna CZERNY, Józef STASZYC,
Elżbieta JĘDRZEJEWSKA, Ewa KIFER,
Anna TOMASZEWSKA

**Badania histologiczne i histochemiczne nerek znajdujących się
pod wpływem działania antybiotyku o wstępnej nazwie Bencylina-1**

Гистологические и гистохимические исследования почек, находящихся под
влиянием антибиотика о вступительном названии Бенцилина-1

Histological and Histochemical Research on Kidneys Effected
by an Antibiotic Introductorily Called Bencylina-1

Dzięki współpracy nauki i przemysłu, medycyna uzyskała leki skutecznie działające w większości bakteryjnych zakażeń. Dużo uwagi poświęcono próbom chemicznej syntezy penicyliny. Pełną syntezę penicyliny V przeprowadzili Sheehan i Henry-Logan, którzy uzyskali 5,6-cis izomer tej penicyliny. Sheehan i Hess zmodyfikowali metodę zamknięcia pierścienia laktamowego i wytworzenia przez to penicyliny optycznie czynnej i biologicznie aktywnej (4, 5, 6, 7).

Wyizolowanie kwasu 6-aminopenicylanowego zapoczątkowało erę tzw. penicylin półsyntetycznych, otrzymywanych w wyniku różnych modyfikacji chemicznych części penicyliny. Modyfikacje obejmowały zarówno łańcuch boczny, jak i rdzeń części penicyliny, a miały na celu uzyskanie związków pozbawionych wad, jakie cechują penicyliny „naturalne”, a mianowicie: szybkie wydalanie się z ustroju, inaktywowanie się w środowisku alkalicznym i kwaśnym, ograniczone spectrum antybiotyczne oraz wrażliwość na działanie penicylinazy gronkowcowej (2, 8).

W ramach umowy o poszukiwaniu nowych pochodnych, zawierających ugrupowania β -laktomowe, w Laboratorium Badawczym Chemii TZF „Polfa” przy współpracy z Instytutem Chemii i Technologii organicznej PW podjęto badania nad otrzymaniem nowej pochodnej penicylin izoksyzolinowych — soli sodowej kwasu 6-(3-benhydrylo-5'-metyloizoksazoliulo-4'-karboksyamido)-penicylanowego, zwanej umownie Bencyliną-1, oryginalnym krajowym lekiem z grupy penicylin półsyntetycznych (9). Ogólny sposób otrzymywania Bencyliny-1 uzyskał patent PRL nr 58450 z dnia 28 XII 1969 r. (autorzy: E. Żukowski, Z. Eckstein, J. Pleniewicz). Na-

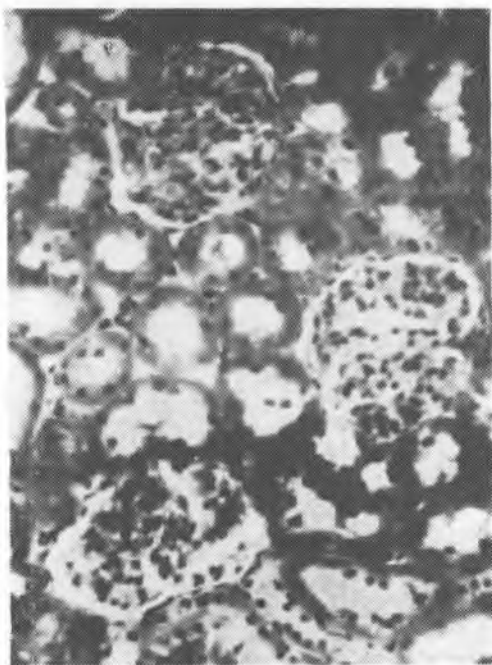
stępne wyniki poszukiwań zostały zgłoszone do Urzędu Patentowego pod nr 184892 z dnia 19 XI 1975 r. Autorami zgłoszenia są: E. Żukowski, Z. Eckstein, J. Plenkwicz, J. Kamiński, D. Rusek, P. Borowicz. Na zlecenie Tarchomińskich Zakładów „Polfa” w Zakładzie Histologii i Embriologii Instytutu Biologiczno-Morfologicznego Akademii Medycznej w Lublinie dokonano oceny histologicznej i histochemicznej narządów pobranych od zwierząt doświadczalnych badanych na toksyczność podostrą i przewlekłą Bencyliny-1. Obecna praca dotyczy części uzyskanych przez nas wyników.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

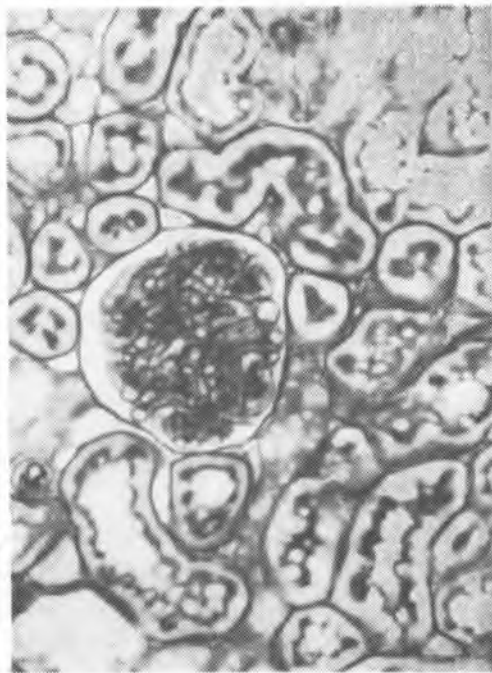
Do badań użyto 100 szczurów białych (samców o ciężarze ciała 150—160 g) oraz 50 myszek białych (samców o ciężarze 20—25 g). Zwierzęta podzielono na grupy, z których każda zawierała 5 osobników. Doświadczenie przeprowadzono w dwóch częściach: badano zwierzęta poddane toksyczności podostrej, po 6 tygodniach codziennego podawania leku, oraz po działaniu przewlekłym, po 3 miesiącach codziennego podawania Bencyliny-1. Lek stosowano szczurom dootrzewnowo (i.p.) i dożołądkowo (p.o.), zaś myszkom tylko dootrzewnowo. Szczurom wstrzykiwano maksymalnie 0,5 ml/100 g c.c., myszkom 0,01 ml roztworu na 1 g c.c. Sporządzony roztwór leku przy dawce i.p. 10 mg/kg dla szczurów był 0,2%, przy dawce 30 mg/kg 0,6%, przy podaniu p.o. 100 mg/kg — roztwór 2%, 400 mg/kg — 8%. U myszek stosowano roztwory: przy dawce 20 mg/kg — 0,2%, przy dawce 60 mg/kg — 0,6%. Grupy kon-

Tabela 1

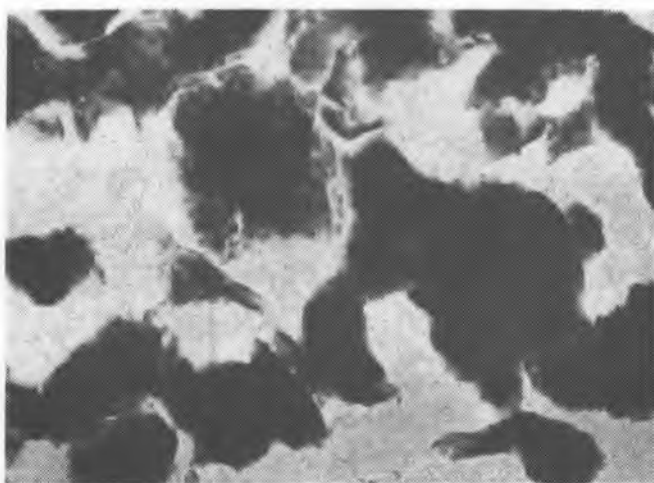
Toksyczność podostra (6 tygodni)			Toksyczność przewlekła (3 miesiące)		
A — SZCZURY (każda grupa — 5 zwierząt)			B — SZCZURY (każda grupa — 5 zwierząt)		
nr grupy	dawka w mg/kg	droga podawania	nr grupy	dawka w mg/kg	droga podawania
I	10	i.p.	2	10	i.p.
II	10	i.p.	III	10	i.p.
III	30	i.p.	IV	30	i.p.
IV	30	i.p.	V	30	i.p.
V	kontrola	i.p.	VI	kontrola	i.p.
VI	100	p.o.	VII	100	p.o.
VII	100	p.o.	VIII	100	p.o.
VIII	400	p.o.	IX	400	p.o.
IX	400	p.o.	X	400	p.o.
X	kontrola	p.o.		kontrola	p.o.
C — MYSZY (każda grupa — 5 zwierząt)			D — MYSZY (każda grupa — 5 zwierząt)		
I	20	i.p.	I	20	i.p.
II	20	i.p.	II	20	i.p.
III	60	i.p.	III	60	i.p.
IV	60	i.p.	IV	60	i.p.
V	kontrola	i.p.		kontrola	i.p.



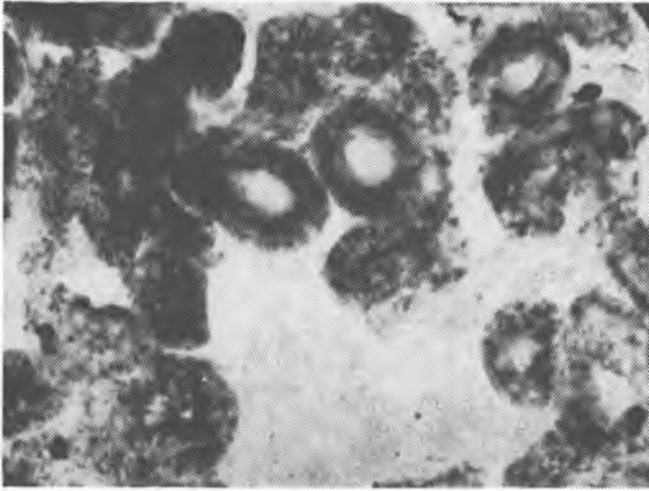
Ryc. 1



Ryc. 2



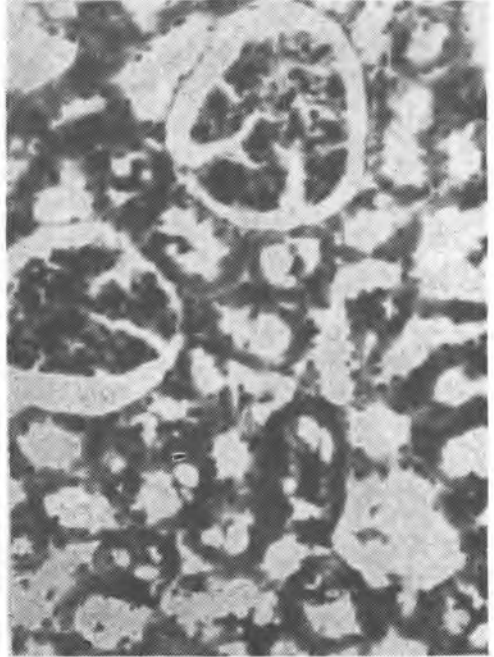
Ryc. 3



Ryc. 4



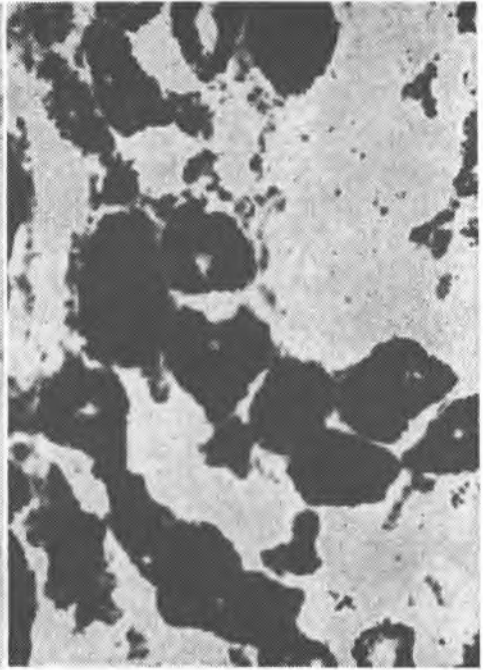
Ryc. 5



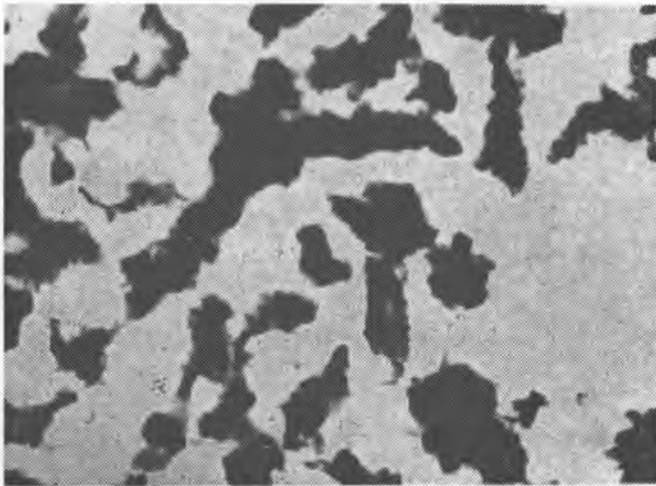
Ryc. 6



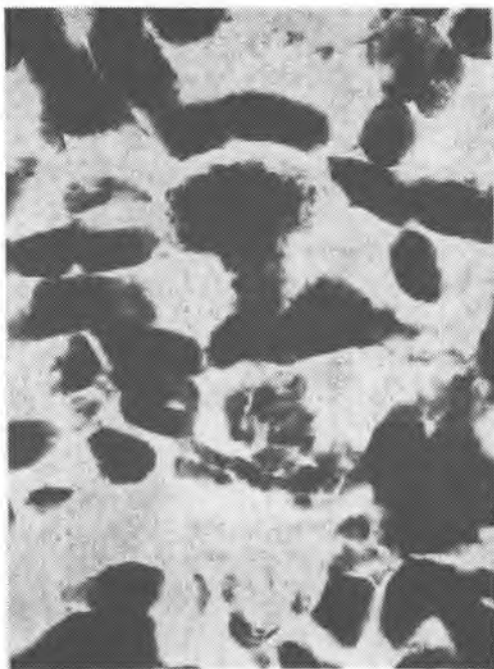
Ryc. 7



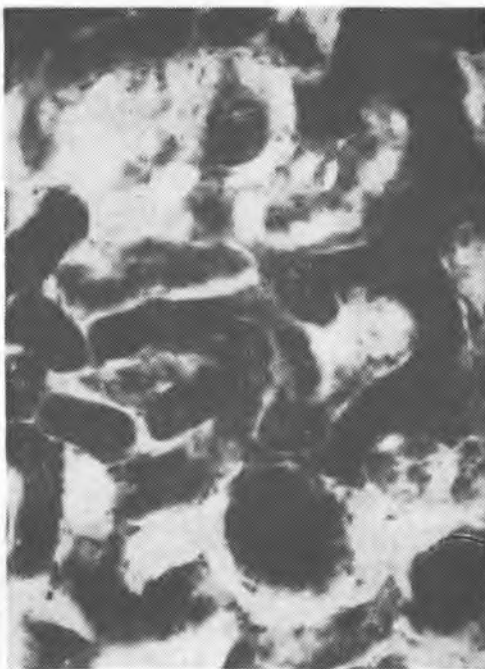
Ryc. 8



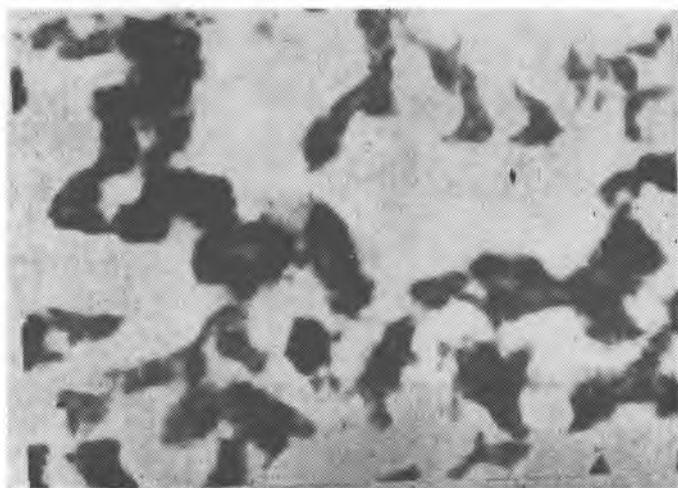
Ryc. 9



Ryc. 10



Ryc. 11



Ryc. 12

trolne otrzymywały sam rozpuszczalnik w tych samych warunkach co zwierzęta doświadczalne. Dawki ustalono w porozumieniu z Zakładem Farmakologii Instytutu Patologii Klinicznej Akademii Medycznej w Lublinie. Wysokość dawek w poszczególnych grupach i sposób podawania zestawiono w tab. 1. Po okresie doświadczalnego podawania leku, zwierzęta dekapitowano i przeprowadzono badania histologiczne i histochemiczne na wycinkach narządów.

Wycinki nerki utrwalano w 10% formalinie obojętnej do badań ogólnomorfologicznych (barwienie hematoksyliną i eozyną), w płynie Bakera do wykazywania aktywności fosfatazy zasadowej i fosfatazy kwaśnej, w płynie Carnoya dla reakcji PAS. Materiał nie utrwalony, zamrożony i krojony w kriostacie służył do wykazywania aktywności dehydrogenazy bursztynianowej. Reakcję PAS przeprowadzono wg metody McManusa. Preparaty kontrolne trawiono diastazą. Aktywność fosfatazy wykazywano wg metody Gomoriego, dehydrogenazy bursztynianowej wg metody Nachlasa (3).

Mikrofotografie wykonano przy pomocy aparatu fotograficznego Exacta Varex 1000, stosując mikroskop świetlny Ergaval — Zeiss — Jena, pow. ok. 80×.

WYNIKI BADAŃ

SERIA A (SZCZURY, TOKSYCZNOŚĆ PODOSTRA)

Barwienie hematoksyliną i eozyną. Zauważono zmiany w grupach VI i VII: przyćmienie miąższowe nabłonka kanalików krętych (ryc. 1). Zjawisko miało charakter ogniskowy. W grupach VIII i IX wystąpiło przyćmienie miąższowe bardziej nasilone. Nie obserwowano zmian strukturalnych w jądrach komórkowych ani łuszczenia się komórek nabłonka do światła kanalików.

Reakcja PAS. W grupach VIII i IX odczyn w rąbku szczoteczkowym jest nierównomierny, ogniskowo osłabiony lub nasilony (ryc. 2). Pozostałe grupy jak w kontroli.

Aktywność fosfatazy zasadowej. Występuje silny odczyn i zatarcia budowy rąbka szczoteczkowego w grupach VIII i IX (ryc. 3).

Aktywność fosfatazy kwaśnej. W grupach VI i VII zauważyć można występowanie dyfuzyjne reakcji w cytoplazmie nabłonka kanalików. Intensywna reakcja o charakterze dyfuzyjnym występuje w grupach VIII i IX (ryc. 4).

Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej. W grupach III, IV, VIII i IX obserwuje się osłabienie odczynu (ryc. 5). Dotyczy to szczególnie nabłonka kanalików krętych I rzędu. Nie wszystkie kanaliki reagują w tym samym stopniu, zjawisko ma charakter ogniskowy.

SERIA B (SZCZURY, TOKSYCZNOŚĆ PRZEWLEKŁA)

Barwienie hematoksyliną i eozyną. W grupach VI i VII na ok. 80% preparatów obserwowano ogniskowe przyćmienie miąższowe, zwłaszcza kanalików krętych I rzędu (ryc. 6). W grupach VIII i IX zmiany dotyczą 100% preparatów. Występuje przyćmienie miąższowe cytoplazmy nabłonka kanalików krętych i rozszerzenie naczyń krwionośnych kory.

Reakcja PAS. W grupach VI i VII występuje zmniejszenie nasilenia odczynu w rąbku szczoteczkowym kanalików krętych (ryc. 7). Podobne zmiany obserwuje się w grupach VIII i IX. Nie wszystkie kanaliiki są w tym samym stopniu zmienione.

Aktywność fosfatazy zasadowej. W grupach VI i VII występuje ogniskowe osłabienie odczynu w strukturach kanalików krętych I rzędu. Zjawisko to dotyczy 100% preparatów grup VIII i IX.

Aktywność fosfatazy kwaśnej. Zauważyć można zmiany w grupach VI i VII: nasilenie intensywności odczynu, dyfuzję produktów reakcji. Zmiany ulegają dalszemu zwiększeniu w grupach VIII i IX.

Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej. Dawki podawane dootrzewnowo nie wywołują uchwytnych zmian. W grupach VI i VII występuje ogniskowe osłabienie intensywności odczynów (ryc. 9), podobnie w grupach VIII i IX, gdzie nasilenie reakcji zmniejsza się znacznie. Nie ulega zmianom położenie struktur specyficznych.

SERIA C (MYSZY, TOKSYCZNOŚĆ PODOSTRA)

Barwienie hematoksyliną i eozyną. Po stosowanych dawkach Bencyliny-1 nie obserwowano zmian morfologicznych w strukturach nerki.

Barwienie PAS. Nie stwierdzono zmian w rąbku szczoteczkowym kanalików krętych ani w błonie podstawowej. Kłębki naczyniowe również nie uległy zmianie.

Aktywność fosfatazy zasadowej. Nie obserwowano zmian w aktywności enzymu w żadnej z badanych grup w stosunku do zwierząt kontrolnych.

Aktywność fosfatazy kwaśnej. Materiał doświadczalny nie różnił się od materiału kontrolnego.

Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej. Zastosowane dawki nie miały wpływu na intensywność ani na lokalizację odczynu.

SERIA D (MYSZY, TOKSYCZNOŚĆ PRZEWLEKŁA)

r.

Barwienie hematoksyliną i eozyną. W grupach III i IV (80% badanego materiału) obserwuje się ogniskowe przyćmienie mięszo-
we cytoplazmy w nabłonku kanalików krętych I rzędu. Jądra komórko-
we nie są zmienione.

Reakcja PAS. W grupach III i IV występuje pogrubienie błon
podstawowych zawierających mukopolisacharydy obojętne. Zjawisko ma
charakter ogniskowy.

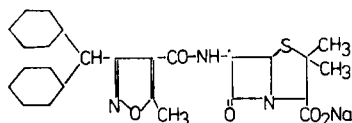
Aktywność fosfatazy zasadowej. W grupach III i IV
obserwuje się nierównomierne nasilenie reakcji. Ogniskowo występuje
wzmoczenie i osłabienie odczynu w rąbku szczoteczkowym kanalików krę-
tych.

Aktywność fosfatazy kwaśnej. W grupach III i IV wy-
stępuje ogniskowa dyfuzja produktów reakcji. Odczyn jest wzmoczony,
zwłaszcza w kanalików krętych I rzędu (ryc. 11).

Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej.
W grupach III i IV występuje obniżenie intensywności odczynu. Zjawis-
ko to jest nierównomiernie zlokalizowane, dotyczy kanalików krętych
I rzędu (ryc. 12).

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ I WNIOSKI

Bencylina-1 należy do izoksalilowych penicylin półsyntetycznych,
pochodnych kwasu 6-amino-penicylanowego. Wzór sumaryczny:
 $C_{26}H_{24}N_3O_5SNa$. Masa cząsteczkowa: M.c.z. = 513,6. Wzór strukturalny:



Bencylina-1 powstaje w reakcji acylowania kwasu 6-aminopenicy-
lanowego za pomocą kwasu 3-benzhydrylo-5-metyloizoksazolilo-4-karbo-
ksylowego i przez przekształcenie otrzymanego kwasu penicylanowego
w sól sodową. Surowy produkt spełnia ogólne warunki, przyjęte dla peni-
cylin izoksazolilowych (1). Związki tej grupy wywierają działanie bak-
teriostatyczne, a w wyższych stężeniach bakteriobójcze dzięki zdolności
hamowania biosyntezy błony komórkowej bakterii w okresie podziału.

Bencylina-1 na ogół wykazuje aktywność przeciwbakteryjną *in vitro*
zbliżoną do pozostałych penicylin — przedstawicieli grupy izoksazolilo-
wych, a więc wysoką w stosunku do grup: *Staphylococcus* i *Yersinia*,
Pseudotuberculosis i *B. subtilis*, średnią aktywność w stosunku do: *B.*

cereus, bakterii z grupy *Listeria monocytogenes* i niektórych przedstawicieli grupy *Streptococcus*. Nie wykazuje działania na bakterie: *Pseudomonas*, *E. coli*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Shigella*, *Bordatella*, *Corynolacterium* i niektóre *Streptococcus*. Badania zostały przeprowadzone w Laboratorium Biologicznym Kontroli Jakości TZF „Polfa” (cyt. wg 1).

Kliniczna przydatność Bencyliny-1 zależy będzie od skutków jej działania na struktury narządów wewnętrznych. W tym celu wykonano również obecne badania. Stwierdzono na ich podstawie, że po 6 tygodniach podawania Bencylina-1 nie powoduje istotnych zaburzeń w strukturze histo-morfologicznej nerki szczura i myszki białej, uchwytanych wykonywanymi odczynami histochemicznymi. U szczurów zauważono po dużych dawkach leku podawanego dootrzewnowo ogniskowe przyćmienie mięszkowe nabłonka kanalików krętych. Równocześnie nie obserwowano zmian struktur jąder komórkowych ani łuszczenia się komórek nabłonka do światła kanalików. Zmiany zauważono w rąbku szczoteczkowym kanalików krętych I rzędu (aktywność fosfatazy zasadowej, reakcja PAS), są wyrazem stanu czynnościowego nerek w granicach fizjologicznych.

Po 3 miesiącach podawania dootrzewnowego leku w dawkach 10 i 30 mg/kg c.c. nie stwierdzono zmian w strukturach nerki szczura. Dożołądkowe dawki 100 ml/kg c.c., a zwłaszcza 400 mg/kg c.c. powodują pewne zaburzenia obserwowanych odczynów, które mogą wynikać z uszkodzenia struktur, zwłaszcza lizosomalnych. Również dawka 60 mg/kg c.c. podawana dootrzewnowo myszkom białym przez okres 3 miesięcy codziennie, wywołuje w nerce zmiany polegające na występowaniu przyćmienia mięszkowego cytoplazmy nabłonka kanalików krętych, ogniskowego pogrubienia błon podstawowych i zmiany w aktywności enzymatycznej badanych fosfataz i dehydrogenazy bursztynianowej. Korzystne byłoby wykonanie następnego doświadczenia, polegającego na obserwacji odwracalności występujących zmian, zwłaszcza przy stosowaniu wysokich dawek leku.

PIŚMIENNICTWO

1. Borowicz P.: „Bencylina” — wstępna charakterystyka związku (Sprawozdanie z prac przeprowadzonych nad Bencyliną-1 i pochodnymi w okresie sierpień 1974 — lipiec 1975 r.). Tarchomińskie Zakłady Farmaceutyczne „Polfa”, Laboratorium Badawcze Chemii. Warszawa 1 VII 1975.
2. Korzybski T., Kowszyk-Gindifer Z., Kuryłowicz W.: „Antybiotyki” pochodzenie, rodzaje i właściwości. PZWL, Warszawa 1977.
3. Pearse A. G. E.: Histochemistry. Ed. Churchill, London 1972.
4. Sheehan J. C., Ben-Ishai Dov, Piper J. U.: J. Am. Chem. Soc. 95, 3064—3074, 1973.

5. Sheehan J. C., Henry-Logan R. K.: V. J. Am. Chem. Soc. **78**, 1262—1264, 1957.
6. Sheehan J. C., Henry-Logan R. K.: V. J. Am. Chem. **81**, 3089—3090, 1959.
7. Sheehan J. C., Henry-Logan R. K.: V. J. Am. Chem. Soc. **84**, 2983—2990, 1962.
8. Sheehan J. C., Hoff D. R.: V. J. Am. Chem. Soc. **79**, 237—240, 1957.
9. Żukowski E., Eckstein Z., Plenkiewicz J.: Patent PRL 58450, 30 X 1969.

Otrzymano 30 X 1978.

OBJAŚNIENIA RYCIŃ

Ryc. 1. Seria A. Grupa VI doświadczalna. Barwienie hematoksyliną i eozyną. Przyćmienie mięszowe nabłonka kanalików krętych. Pow. ca 80X.

Ryc. 2. Seria A. Grupa VIII doświadczalna. Reakcja PAS. Nierównomierny odczyn w rąbku szczoteczkowym. Pow. ca 80X.

Ryc. 3. Seria A. Grupa IX doświadczalna. Reakcja na aktywność fosfatazy zasadowej. Silny odczyn i zatarcie budowy rąbka szczoteczkowego. Pow. ca 80X.

Ryc. 4. Seria A. Grupa VIII doświadczalna. Reakcja na aktywność fosfatazy kwaśnej. Intensywny odczyn ogniskowo-dyfuzyjny. Pow. ca 80X.

Ryc. 5. Seria A. Grupa III doświadczalna. Reakcja na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej. Odczyn mało intensywny. Pow. ca 80X.

Ryc. 6. Seria B. Grupa VI doświadczalna. Barwienie hematoksyliną i eozyną. Ogniskowe przyćmienie mięszowe nabłonka kanalików. Pow. ca 80X.

Ryc. 7. Seria B. Grupa VII doświadczalna. Reakcja PAS. Mało intensywny odczyn w rąbku szczoteczkowym kanalików. Pow. ca 80X.

Ryc. 8. Seria B. Grupa VII doświadczalna. Reakcja na aktywność fosfatazy zasadowej. Odczyn nierównomiernie nasilony. Pow. ca 80X.

Ryc. 9. Seria B. Grupa VI doświadczalna. Reakcja na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej. Ogniskowe osłabienie intensywności odczynu. Pow. ca 80X.

Ryc. 10. Seria D. Grupa III doświadczalna. Reakcja na aktywność fosfatazy zasadowej. Nierównomierne nasilenie odczynu w rąbku szczoteczkowym kanalików krętych. Pow. ca 80X.

Ryc. 11. Seria D. Grupa IV doświadczalna. Reakcja na aktywność fosfatazy kwaśnej. Widoczne wzmożenie odczynu w nabłonku kanalików krętych. Pow. ca 80X.

Ryc. 12. Seria D. Grupa IV doświadczalna. Reakcja na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej. Intensywność odczynu osłabiona i nierównomierna. Pow. ca 80X.

РЕЗЮМЕ

При помощи гистохимических методов проведено гистологическую и гистохимическую оценку почек, взятых от опытных животных и исследованных на подострую и затяжную токсичность нового антибиотика о вступительном названии Бенцилина-1.

Определено, что после шестинедельного применения Бенцилина-1 применяемые дозы не вызывали существенных расстройств в гистоморфологическом строении почки крысы, белой мыши, а которые были обнаружены благодаря проведенным гистохимическим реакциям.

После 3-месячного применения больших доз препарата (100, 400 мг/кг веса тела для крыс и 60 мг/кг в.т. для мыши) выступили расстройства в наблюдаемых реакциях, которые возникали из повреждения структур.

SUMMARY

A histological and histochemical evaluation of kidneys taken from experimental animals was made by means of histochemical methods. The animals were examined for the subacute and chronic toxicity of a new antibiotic introductorily called Bencylina-1.

It was observed that after 6 weeks of administration, Bencylina-1 in the applied doses causes no essential disturbances in histomorphological structure of rat and white mouse kidneys which can be revealed with the histochemical reactions used in the experiment.

A 3 month administration of the drug in large doses (100, 400 mg/kg cc in the rats and 60 mg/kg cc in the mice) caused disturbances in the observed reactions which may reflect injuries of the structures.

EXPLANATION OF THE FIGURES

Fig. 1. Set. A. Experimental group VI. Colouring with hematoxyline and eozyne. Parenchymal dimness of twisted tubules epithelium. Magn. approx. 80X.

Fig. 2. Set. A. Experimental group VIII. PAS reaction. Irregular reaction in the brush border. Magn. approx. 80X.

Fig. 3. Set. A. Experimental group IX. Reaction to alkaline-phosphatase activity. Strong reaction and blurring of the brush border strukture. Magn. approx. 80X.

Fig. 4. Set. A. Experimental group VIII. Reaction to acid Phosphatase activity. Intensive diffusible and focal reaction. Magn. approx. 80X.

Fig. 5. Set. A. Experimental group III. Reaction to succinate dehydrogenase activity. Not intensive reaction. Magn. approx. 80X.

Fig. 6. Set. B. Experimental group VI. Colouring with hematoxyline and eozyne. Focal parenchymal dimnes of tubular epithelium. Magn. approx. 80X.

Fig. 7. Set. B. Experimental group VII. PAS reaction. Not intensive reaction in the brush border of the tubules. Magn. approx. 80X.

Fig. 8. Set. B. Experimental group VII. Reaction to alkaline-phosphatase activity. Irregular reaction. Magn. approx. 80X.

Fig. 9. Set. B. Experimental group VI. Reaction to succinate dehydrogenase activity. Magn. approx. 80X.

Fig. 10. Set. D. Experimental group III. Reaction to alkaline-phosphatase activity. Irregular reaction in the brush border of twisted tubules. Magn. approx. 80X.

Fig. 11. Set. D. Experimental group IV. Reaction to acid-phosphatase activity. Visible increase of the reaction in the epithelium of twisted tubules. Magn. approx. 80X.

Fig. 12. Set. D. Experimental group IV. Reactions to succinate dehydrogenase activity. Decreased and less regular reaction. Magn. approx. 80X.