

Zakład Histologii i Embriologii, Instytut Biologiczno-Morfologiczny, Wydział Lekarski
Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr med. dr h.c. Stanisław Grzycki

Irena KRÓLIKOWSKA-PRASAŁ, Jerzy TARACH

Wpływ nitrogranulogenu na odczyn histochemiczne komórek wątrobowych szczura białego

**Влияние нитрогранулогена на гистохимические реакции печеночных клеток
белых крыс**

**The Effect of Nitrogranulogen on the Histochemical Reactions of White Rat Liver
Cells**

Morfologiczne i histochemiczne zmiany w tkankach pod wpływem antymitycyków pozostają w dalszym ciągu tematem badań (8, 14). Stwierdzono, że związki alkilujące hamują procesy oddechowe tkanki nowotworowej, a także erytrocytów, wątroby, śledziony, nerek (3). Wykazano, że nitrogranulogen wywołuje histopatologiczne zmiany w wątrobie świnek morskich (6). Humieczyńska i Stanośz (5) badając wpływ nitrogranulogenu na aktywność enzymatyczną łożyska stwierdzili, że preparat ten nie wpływa na aktywność fosfatazy zasadowej, natomiast wybitnie hamuje aktywność dehydrogenazy bursztynianowej i fosfatazy kwaśnej. Stachura i wsp. (14) obserwowali histochemiczne zmiany w odczynach enzymów hydrolitycznych i oddechowych nerki i wątroby, powstające pod wpływem cyklofosfamidu (cytostatyku z grupy związków alkilujących).

Ze względu na ważną rolę wątroby i jej funkcję odtruwającą postanowiono przeanalizować, jakie zmiany histochemiczne w hepatocytach powoduje nitrogranulogen, jeden z cytostatyków stosowany w terapii nowotworów.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Badania przeprowadzono na szczurach białych, samcach, hodowli własnej, ciężaru około 200 g, które przez okres doświadczenia przebywały w jednakowych warunkach i żywione były standardową dietą. Zwierzęta doświadczalne otrzymywały dootrzewnowo Nitrogranulogen-Polfa (dichlorodiaethylaminum hydrochloricum) w dawce 0,05 mg/kg dziennie przez 7 dni (I grupa) i po 0,5 mg/kg przez 3 dni. W grupie kontrolnej podawano dootrzewnowo 1 cm soli fizjologicznej. Po 24 godz. od ostatniej iniekcji pobierano wycinki z prawego płata wątrobowego. Część z nich utrwalano w płynie Carnoya i na skrawkach parafinowych wykonywano reakcje Feulgena i Bracheta na kwasy nukleinowe. Inne wycinki utrwalano w płynie Bakera i na skrawkach ciętych w mikrotomie mroźniowym oznaczano aktywność fosfataz: kwaśnej i zasadowej według metody Gomoriego, ATPazę wg metody Wachsteina i Meisel.

Inkubację powyższych enzymów przeprowadzano w temp. 37°C przez 1 godz. Natomiast na skrawkach nieutralnych krajanych w kriostacie Pearse'a wykonywano oznaczenia histochemiczne dehydrogenaz: bursztynianowej, mleczanowej i glikozo-6-fosforanowej. Jako akceptora elektronowego użyto w płynach inkubacyjnych nitro BT. Czas inkubacji dla dehydrogenazy bursztynianowej wynosił 1 godz. w temp. 37°, dla dwu pozostałych 30 min. w temp. 37°. Próby kontrolne dla badanych enzymów wykonywano w środowisku bezsubstratowym.

BADANIA WŁASNE

Po upływie pierwszych kilku dni od chwili rozpoczęcia podawania leku można było zaobserwować u szczurów oznaki zatrucia. Zwierzęta doświadczalne były wyraźnie apatyczne, słabo reagowały na bodźce otoczenia, nie chciały przyjmować pokarmu. U niektórych wystąpiła biegunka, natomiast wszystkie, zwłaszcza pod koniec okresu doświadczalnego, zaczęły tracić sierść, głównie na grzbiecie. Przeprowadzone odczyny histochemiczne zwróciły uwagę na zaburzenia enzymatyczne w komórkach wątrobowych zwierząt doświadczalnych.

Kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA). U zwierząt otrzymujących nitrogranulogen następowało rozproszenie chromatyny jądrowej. Nie spotykało się większych jej skupisk w pobliżu błony jądrowej, jak to obserwowano na preparatach zwierząt kontrolnych. Odczyny na DNA były słabsze. Największe zmiany wystąpiły przy podawaniu dużych dawek cytostatyku, tj. 0,5 mg/kg dziennie przez 3 dni.

Kwas rybonukleinowy (RNA). Osłabienie pironinochłonności w cytoplazmie wszystkich komórek wątrobowych po podaniu zwierzętom nitrogranulogenu świadczyło o zmniejszeniu ilości RNA. Zauważono również zmniejszoną ilość jąderek, najczęściej było jedno rzadziej dwa. Niektóre komórki wykazywały zwyrodnienie cytoplazmy, jej wakuolizację.

Fosfataza kwaśna (Fk). Zarówno w grupie I doświadczalnej, tj. u zwierząt otrzymujących nitrogranulogen w dawce 0,05 mg/kg przez 7 dni, jak i w grupie II, gdzie podawano lek w dawce 0,5 mg/kg przez 3 dni, wystąpiły charakterystyczne zmiany w odczynach na fosfatazę kwaśną. Widoczna ona była w cytoplazmie nie tylko w postaci ziaren lizosomów, lecz spotykano także odczyny dyfuzyjne. Lizosomy przybierały często duże rozmiary i jako cytolisomy skupione były w pobliżu kanalików żółciowych (ryc. 1). Intensywne odczyny wykazano nie tylko w komórkach wątrobowych, lecz również w komórkach układu siateczkowo-śródbłonkowego, w komórkach Browicza-Kupffera.

Fosfataza zasadowa (Fz). Fosfataza zasadowa u zwierząt doświadczalnych widoczna była zarówno w błonie komórkowej, jak i w ścianach naczyń krwionośnych. Dość silne odczyny dyfuzyjne pojawiły się w cytoplazmie hepatocytów.

Adenozynotrójfosfataza (ATPaza). Odczyny na ATPazę intensywne były w komórkach wątrobowych zwierząt kontrolnych, natomiast ulegały znacznemu obniżeniu u zwierząt, które otrzymywały nitrogranulogen.

Dehydrogenaza bursztynianowa (DB). W komórkach zrazika wątrobowego, zwłaszcza leżących w strefie obwodowej, nastąpiło obniżenie aktywności DB w porównaniu z grupą kontrolną. Natomiast w pobliżu żyły

środkowej zmiany w komórkach wątrobowych były mniejsze (ryc. 2). Obserwowany w nich produkt reakcji enzymatycznej występował głównie w postaci czerwonych ziaren monoformazanu.

Dehydrogenaza mleczanowa (DM). Porównując odczyny na aktywność dehydrogenazy mleczanowej na preparatach zwierząt kontrolnych i doświadczalnych, zauważono jej wzrost w hepatocytach szczurów otrzymujących cytostatyki. Intensywna reakcja widoczna w postaci niebieskich ziaren dwuformazanu występowała we wszystkich hepatocytach zrazika wątrobowego. Nie zauważono różnic w odczynach poszczególnych grup doświadczalnych (ryc. 3).

Dehydrogenaza glikozo-6-fosforanowa (DG6P). Znaczne osłabienie odczynów na aktywność dehydrogenazy glikozo-6-fosforanowej po podaniu nitrogranulogenu wystąpiło w komórkach wątrobowych zwierząt obu grup doświadczalnych. W licznych komórkach odczyn ograniczał się do niewielkiej liczby ziaren w obrębie cytoplazmy, tylko pojedyncze hepatocyty wykazywały silniejsze odczyny podobnie jak w grupie kontrolnej (ryc. 4).

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Stosując leki cytostatyczne, zwłaszcza z grupy związków mitotycznych, należy liczyć się z możliwością uszkodzenia tkanek zdrowych o niezbyt wysokiej aktywności mitotycznej (14). Związki te mogą wywoływać zaburzenia w procesach wewnątrzkomórkowych w okresie podziału komórkowego, jak również w łańcuchach przemian metabolicznych, powodując uszkodzenie niektórych układów enzymatycznych, zwykle w wyniku wiązania się leku z czynnymi grupami enzymu (10).

Podając zwierzętom duże dawki cytostatyku (nitrogranulogenu) zauważono obniżenie intensywności odczynów na RNA w hepatocytach. Widoczne były również zmiany w odczynach na DNA w jądrach komórek wątrobowych, polegające na rozproszeniu chromatyny jądrowej. Jak wykazuje Dold (wg 16), cytostatyki mogą wywierać wpływ na syntezę DNA. Według Supniewskiego (15) wiele leków, a wśród nich cytostatyki jak np. iperyt azotowy, wywiera wpływ na biosyntezę białek i ich rozpad. Niektóre z tych związków łączą się z grupami aminowymi i hydroksylowymi zasad purynowych i pirymidynowych, a nawet z grupami hydroksylowymi pentoz kwasów nukleinowych, alkilują je i denaturują. Dzięki zdolności reagowania z grupami funkcyjnymi białek i alkilacji azotu gwaniny i adeniny DNA, związki te posiadają nieograniczoną możliwość działania w obrębie komórki, co w końcowym efekcie prowadzi do destrukcji chromosomów i zahamowania podziałów komórkowych (12).

Najważniejszą rolą iperytu azotowego i jego pochodnych (3) jest zdolność do inaktywacji układów enzymatycznych biorących udział w syntezie nukleoproteidów, a zwłaszcza DNA, co powoduje jego depolaryzację; ich działanie odbywa się głównie przez inaktywację grup SH aminokwasów i białek.

Przeprowadzone w naszym doświadczeniu reakcje histochemiczne zwracają uwagę na wpływ nitrogranulogenu na odczyny wielu enzymów zarówno hydrolitycznych, jak i cyklu Krebsa. Wykazano przede wszystkim wybitny wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej w postaci zwiększonej liczby lizosomów jak również występowanie odczynów dyfuzyjnych w cytoplazmie, świadczące o procesach degeneracyjnych komórek wątrobowych. Destrukcyjne działanie

lizosomów w stosunku do hepatocytów obserwowano podczas działania na wątrobę substancjami hepatotoksycznymi i niektórymi hormonami (7, 13).

Odczyny na fosfatazę zasadową, która bierze udział w aktywnym transporcie przez błony komórkowe, występowały nie tylko w ścianach naczyń krwionośnych i przewodów żółciowych, ale również w cytoplazmie komórek wątrobowych. Nastąpiło również osłabienie odczynów na ATPazę w zrazikach wątrobowych zwierząt obu grup doświadczalnych. Wśród badanych dehydrogenaz, dehydrogenaza mleczanowa wykazuje wzrost aktywności w komórkach wątrobowych zwierząt otrzymujących nitrogranulogen, natomiast pozostałe, jak: glikozo-6-fosforanowa a zwłaszcza bursztynianowa zlokalizowana w mitochondriach i katalizująca reakcje oksydo-redukcyjne, zmniejszają swą aktywność w komórkach obwodowej strefy zrazika, które najbardziej są zaangażowane w procesach metabolicznych.

O wrażliwości wątroby i innych tkanek na działanie iperytu azotowego i trójetylenomelaminy (TEM) piszą Cardinali i wsp. (2), zwracając jednocześnie uwagę na obniżenie zawartości glikogenu w wątrobie, które przypisują zahamowaniu działania enzymatycznego (mechanizmów enzymatycznych) związanego z glikogenezą.

Zauważono, że działanie nitrogranulogenu jest zależne od wielkości dawki. Zmiany w odczynach enzymatycznych zawsze były większe w II grupie doświadczalnej, gdzie lek podawano w dawce 0,5 mg/kg. Znacznie obniżoną aktywność enzymatyczną dehydrogenaz bursztynianowej oraz glikozo-6-fosforanowej i ATPazy posiadały również komórki dwujądrowe, które w normalnych warunkach odznaczają się wysoką aktywnością enzymatyczną (1).

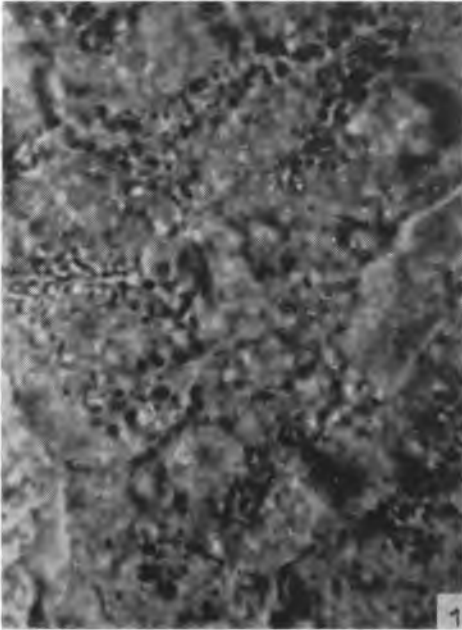
Jak wykazali Novikoff i Essner (11), duże zmiany w metabolizmie hepatocytów odnoszą się głównie do mitochondriów i błon komórkowych. Wyjaśnia to zarówno powiększanie się mitochondriów, jak i zmiany w odczynach histochemicznych enzymów oddechowych. Ławkowicz i wsp. (9) podając cyklofosfamid do hodowli komórkowej wykazali początkowo (po 24 godz.) wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej, a następnie stopniowy jej spadek (96 godz). Cuccurullo i wsp. (4) badając ultrastrukturę hepatocytów pod wpływem subletalnych dawek cyklofosfamidu stwierdzili zaburzenia białkowe w mikrosomach.

Pomimo dużej zdolności detoksykacyjnej wątroby wykazano, że nitrogranulogen wpływa na obniżenie aktywności dehydrogenaz bursztynianowej, glikozo-6-fosforanowej i ATPazy oraz wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej i dehydrogenazy mleczanowej. Na podstawie przeprowadzonych badań histochemicznych dochodzi się do przekonania że:

1. Nitrogranulogen powoduje obniżenie ilości DNA i RNA w hepatocytach szczurów, zwłaszcza po podaniu dużych dawek tego leku.

2. W komórkach wątrobowych zwierząt obu grup doświadczalnych obserwuje się wybitny wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej, pojawianie się dość silnych odczynów dyfuzyjnych na fosfatazę zasadową w cytoplazmie, wyraźny spadek aktywności ATPazy.

3. Dehydrogenaza mleczanowa wykazuje wzrost aktywności w hepatocytach po podaniu szczurom nitrogranulogenu, natomiast dehydrogenaza glikozo-6-fosforanowa, a zwłaszcza bursztynianowa, znaczny spadek aktywności, szczególnie w komórkach obwodowej strefy zrazika. Spadek aktywności dehydrogenaz bursztynianowej, dehydrogenazy glikozo-6-fosforanowej oraz ATPazy wykazują również komórki dwujądrowe wątroby.



Irena Królikowska-Prasał, Jerzy Tarach

4. Nitrogranulogen wywiera ujemny wpływ na metabolizm komórek wątrobowych szczurów, co między innymi wyraża się zaobserwowanymi zmianami w odczynach histochemicznych.

PIŚMIENNICTWO

1. Beneke G., Simon H.: ZBL Allg. Path. Anat. 102, 429—434, 1961.
2. Cardinali G., Caprino G., Piscitelli N.: Gazz. Int. Med. Chir. 59, 1331—1333, 1954.
3. Chorąży M.: Post. Wiedzy Med., 1, 3—45, 1957.
4. Cuccurullo L., Coveli V.: Riv. Anat. Pat. 1, 39—45, 1964.
5. Humiczewska M., Stanosz S.: Folia Morph. (Warszawa) 32, 103—114, 1973.
6. Humiczewska M., Stanosz S.: Folia Histochem. Cytochem. 9, 77—94, 1971.
7. Królikowska-Prasał I.: Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio D, 23, 237—258, Lublin 1968.
8. Królikowska-Prasał I., Tarach J.: Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio D, 29, 227—239, 1974.
9. Ławkowicz W., Krzemińska-Ławkowicz I., Szmigielski S.: Bull. Pol. Med. Sci Hist., 3, 106—112, 1966.
10. Mordarski M.: Post. Hig. Med. Dośw., 24, 609—638, 1970.
11. Novikoff A. B., Essner E.: Fed. Proc., 21, 1130—1142, 1962.
12. Patkowski J.: Post. Hig. Med. Dośw., 22, 911—956, 1968.
13. Rodani T. H.: Am. J. Physiol., 193, 73—74, 1958.
14. Stachura J., Papla B., Dubiel-Bigaj M.: Acta Medica Pol., 9, 319—328, 1968.
15. Supniewski J.: Post. Hig. Med. Dośw., 20, 145—152, 1966.
16. Wilmanns H. (Ed): Chemotherapie maligner Tumoren. Dosierungsprobleme Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Cyclophosphamid. F. K. Schattauer Verl., Stuttgart 1964.

Otrzymano 7 X 1974.

OBJAŚNIENIA FOTOGRAFII

Fot. 1. Odczyn na aktywność fosfatazy kwaśnej w komórkach wątrobowych szczurów, otrzymujących nitrogranulogen w dawce 0,5 mg/kg przez 3 dni. Metoda Gomoriego. Pow. ok 400X.

Fot. 2. Odczyn na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w komórkach wątrobowych zwierząt kontrolnych. Metoda Nachlasi i wsp. Pow. ok. 300X.

Fot. 3. Odczyn na aktywność dehydrogenazy mleczanowej w komórkach wątrobowych zwierząt otrzymujących nitrogranulogen w dawce 0,05 mg/kg przez 7 dni. Metoda wg Pearse'a. Pow. ok. 400X.

Fot. 4. Odczyn na aktywność dehydrogenazy glikozo-6-fosforanowej w hepatocytach zwierząt otrzymujących nitrogranulogen w dawce 0,05 mg/kg przez 7 dni. Metoda wg Pearse'a. Pow. 400X.

РЕЗЮМЕ

Исследования проводили на белых крысах самцах, которым введено до брюшины Нитрогранулеген-Польфа. Группа I получила Нитрогранулеген-Польфа в дозе 0,05 мг на 1000 г веса тела через 7 дней, а II группа в дозе 0,5 мг на 1000 г веса тела через 3 дня. На печеночных отрезках проведено гистохимические реакции на активность некоторых ферментов гидролитических и дыхательных, а также на кислоту рибонуклеиновую (РНК) и дезоксирибонуклеиновую (ДНК). Результаты исследований указывают, что Нитрогранулеген-Польфа привел к уменьшению интенсивности реакции на РНК и ДНК, повлиял на рост активности кислой фосфатазы и молочной дегидрогеназы, а также снижал активность янтарной и гlikozo-6-фосфорановой дегидрогеназы и А-Т-П-азы в печеночных клетках.

SUMMARY

The investigations have been carried out on male white rats in which Nitrogranulogen was injected intraperitoneally in the Ist group in a dose of 0,05 mg/kg for 7 days, in the IInd group in a dose of 0,5 mg/kg for 3 days.

Histochemical reactions for the activities of some hydrolytic and respiratory enzymes as well as reactions for DNA and RNA have been performed on the liver sections. The obtained results point out that Nitrogranulogen brings about a diminution in the intensity of reactions to DNA and RNA as well as having an effect on the increase of acid phosphatase and lactic dehydrogenase activities and on the decrease of succinic and glucose-6-phosphate dehydrogenases and also ATPase activities in liver cells.

EXPLANATIONS TO THE PHOTOGRAPHS

Phot. 1. Reaction to acid phosphatase activity in liver cells of the rats receiving Nitrogranulogen in a dose of 0,5 mg/kg for 3 days. Method acc. to Gomori. Magn. approx. 400X.

Phot. 2. Reaction to succinic dehydrogenase activity in liver cells of a control rat. Method acc. to Nachlas *et al.* Magn. approx. 300X.

Phot. 3. Reaction to lactic dehydrogenase activity in liver cells of the rats receiving Nitrogranulogen in the dose of 0,05 mg/kg for 7 days. Method acc. to Pearse. Magn. approx. 400X.

Phot. 4. Reaction to glucose-6-phosphate dehydrogenase in liver cells of the rats receiving Nitrogranulogen in a dose of 0,05 mg/kg for 7 days. Method acc. to Pearse. Magn. approx. 400X.