

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

Tamara MAJSTRUK-MAJEWSKA,
Krystyna KAČKA, Wiesława ZARANKO

**Niektóre odczyny histochemiczne w wątrobie szczura
po doświadczalnym podaniu Ambuszu (*Pyrethroid insecticide*)**

Некоторые гистохимические реакции в печени крысы после опытного применения
Амбуша (*Pyrethroid insecticide*)

Some Histochemical Reactions in the Rat Liver Following Experimental
Administration of Ambusz (*Pyrethroid insecticide*)

Jednym z wielu stosowanych w rolnictwie preparatów owadobójczych jest Ambusz (synonimy: Permethrin, NRDC-143), ester 3-fenoksybenzylowy kwasu \pm cis; trans 2,2-dwuchlorowinylo-2,2 dwumetylocyklopropylokarboksylowego, służący do sporządzania emulsji wodnej o działaniu kontaktowym i żołądkowym. Przeznaczony jest do zwalczania mączlika szklarniowego, gąsienic motyli itp., także owadów uodpornionych na działanie preparatów fosforoorganicznych. Związek ten w glebie i środowisku wodnym rozkłada się stosunkowo szybko, natomiast rozpryskiwany na powierzchnię roślin w roztworze 0,05—0,075% odporny jest na działanie słońca i warunków atmosferycznych, stanowiąc tym samym zagrożenie dla ludzi i zwierząt. Wydaje się, że przebadanie wpływu Ambuszu na wątrobę ssaków rozszerzy nasze wiadomości dotyczące toksyczności tego pestycydu.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na szczurach białych szczepu Wistar o ciężarze ciała 200—250 g, które zostały podzielone na trzy grupy: dwie doświadczalne i jedną kontrolną. Zwierzęta grupy I doświadczalnej otrzymywały przez 7 kolejnych dni po 1 ml 0,1% wodnego roztworu Ambuszu, grupy II — po 1 ml 0,2%, natomiast szczury kontrolne tylko takie same ilości rozpuszczalnika (woda dest.). Zarówno roztwór Ambuszu, jak i woda destylowana podawane były dożołądkowo raz na dobę, przed porannym karmieniem zwierząt. Po 24 godz. od ostatniej dawki zwierzęta dekapitowano i pobierano wycinki wątroby do badań histologicznych i histochemicznych.

Materiał utrwalano w płynach Bakera oraz Carnoya. Skrawki 5—8 mm poddano następującym testom histochemicznym: wykrywanie aktywności fosfatazy kwaśnej wg metody Gomoriego, adenzynotrójfosfatazy wg metody Wachsteina i Meisel, oznaczanie kwasów nukleinowych metodą Bracheta oraz wykrywanie glikogenu metodą PAS z uwzględnieniem prób kontrolnych z diastazą. Do badań histologicznych stosowano barwienie hematoksyliną i eozyną. Mikrofotografie wykonano aparatem fot. Exacta Varex (Zeiss).

WYNIKI

Fosfataza kwaśna (F k)

W hepatocytach zwierząt kontrolnych aktywność enzymu ujawniała się w postaci brunatnych ziarnistości zlokalizowanych szczególnie w okolicy kanalików żółciowych (ryc. 1). W wątrobie szczurów grupy I, a szczególnie grupy II doświadczalnej odczyn zwiększał się, a intensywnie reagujące lizosomy wypełniały całą cytoplazmę komórek (ryc. 2). Obserwowano również rozszerzenie zatokowych naczyń włosowatych oraz podwyższoną reakcję w komórkach siateczkowo-śródbłonkowych gwiaździstych (Browicz-Kupffera).

Adenzynotrójfosfataza (ATP-aza)

W skrawkach kontrolnych barwna reakcja występowała w kanalikach żółciowych. U zwierząt grupy I doświadczalnej pojawiła się również w ścianach naczyń włosowatych. W grupie tej w cytoplazmie hepatocytów zauważono ziarnisty produkt reakcji gromadzący się w okolicy kanalików żółciowych (ryc. 3). W wątrobie zwierząt grupy II doświadczalnej aktywność enzymu w kanalikach żółciowych zmniejszyła się, natomiast obserwowano dyfuzyjne, ciemne zabarwienie cytoplazmy komórek oraz reakcję w błonach komórkowych (ryc. 4).

Kwasy nukleinowe (DNA i RNA)

Obraz mikroskopowy komórek wątroby zwierząt doświadczalnych nie różnił się od kontrolnego. Chromatyna jądrowa barwiła się na zielono, natomiast jąderka i ziarnistości pironinochłonne na czerwono.

Glikogen

W grupie kontrolnej PAS-dodatnie ziarnistości lokalizowały się przede wszystkim w cytoplazmie komórek strefy spoczynkowej (przy żyłce centralnej) zrazika. W pozostałych hepatocytach obserwowano duże lub

umiarkowane nagromadzenie glikogenu bądź zupełny jego brak (ryc. 5). W zrazikach wątrobowych zwierząt grupy I doświadczałnej zwiększyła się znacznie ilość komórek z odczynem PAS-dodatnim, zlokalizowanych głównie w strefie pośredniej i obwodowej. Odczyn ten osłabł w wątrobie zwierząt grupy II doświadczałnej, pojawiło się natomiast dyfuzyjne zabarwienie cytoplazmy (ryc. 6). W obu grupach doświadczalnych zauważono rozszerzenie naczyń zatokowych.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Badania histochemiczne, wykazujące aktywność enzymów hydrolytycznych (Fk i ATP-azy), miały na celu uchwycenie zmian zachodzących w wątrobie po spożyciu Ambuszu. Fosfataza kwaśna, enzym czynnie zaangażowany w procesach wewnątrzkomórkowego trawienia, wykazywała aktywność wzrastającą wraz z wielkością dawki. Aktywność ta w grupie kontrolnej uwidaczniała się jedynie w okolicy kanalików żółciowych oraz w niewielkiej ilości w cytoplazmie, natomiast w wątrobie grup doświadczalnych I i II barwna reakcja stawała się bardziej intensywna i zlokalizowana na terenie całej cytoplazmy hepatocytów. Zwiększającą się aktywność enzymu wykazywały również komórki Browicz-Kupffera. Podobne wyniki po podaniu innych pestycydów lub cytostatyków otrzymali Staszyc (7), Królikowska-Prasał i wsp. (2, 3), odmiennie natomiast Zawistowski i wsp. (9) i inni (4, 6). Prawdopodobnie rezultaty badań zależą od czasu podawania preparatu, bowiem po wielotygodniowym stosowaniu pestycydów autorzy ci zauważyli, że aktywność fosfatazy kwaśnej początkowo zwiększała się, a następnie obniżała.

Zaobserwowane przez nas zmiany w aktywności ATP-azy oraz pojawienie się ziarnistego produktu reakcji świadczą, zgodnie z sugestiami innych autorów (1, 5, 7, 8), o zmianie przepuszczalności błon komórkowych i zaburzeniach metabolizmu komórkowego.

Stosowane dawki Ambuszu nie wpłynęły na odczyny histochemiczne kwasów nukleinowych. Z piśmiennictwa wiadomo, że tylko bardzo duże ilości podawanego pestycydu wywołują zmiany w aktywności lub strukturze DNA i RNA.

Odczyny na glikogen wskazywały na znaczne przesunięcia reakcji PAS-dodatniej w grupach doświadczalnych w porównaniu z grupą kontrolną. W grupie I doświadczałnej zmniejszył się odczyn w komórkach leżących w strefie spoczynkowej, natomiast obserwowano jego wzrost w hepatocytach obwodowej (czynnościowej) strefy zrazika. W grupie II doświadczałnej lokalizacja glikogenu przypominała grupę poprzednią, jednak intensywność zabarwienia zmalała oraz pojawiło się dyfuzyjne za-

barwienie cytoplazmy. Przesunięcie reakcji w obrębie zrazika wątrobowego świadczyć może o zaburzonej gospodarce węglowodanowej spowodowanej działaniem ambuszu. Zawistowski i wsp. (9), badając wpływ DDT i jego metabolitów na wątrobę zwierząt doświadczalnych, stwierdzili ponadto, że glikogen był szybko metabolizowany w hepatocytach, co spowodowało początkowo hyper-, a następnie hypoglikemię u zwierząt.

Otrzymane przez nas wyniki badań histochemicznych wskazują, że ambusz jest środkiem toksycznym nie tylko dla owadów, ale i dla zwierząt, takich jak szczur. Być więc może, że przypadkowe spożycie tego pestycydu przez inne zwierzęta lub człowieka spowodować by mogło wystąpienie obserwowanych zmian w wątrobie.

PIŚMIENNICTWO

1. Hoń S. H., Chang J. P.: *J. Histochem. Cytochem.* **11**, 71—77, 1963.
2. Królikowska-Prasał I.: *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin, Sectio D* **28**, 81—91, 1973.
3. Królikowska-Prasał I., Tarach J.: *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin, Sectio D* **30**, 21—25, 1975.
4. Malendowicz L.: *Folia Histochem. Cytochem.* **3**, 297—314, 1966.
5. Schatski P. F.: *Arch. Path.* **75**, 1, 85—91, 1963.
6. Stachura J., Papla B., Dubiel-Bigaj M.: *Acta Med. Pol.* **9**, 319—328, 1968.
7. Staszyc J.: *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin, Sectio D* **31**, 237—241, 1976.
8. Staszyc J., Kifer E.: *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin, Sectio D* **28**, 75—80, 1973.
9. Warchoń J. B.: *Folia Histochem. Cytochem.* **10**, 57—84, 1971.
10. Zawistowski S., Krechniak J.: *Bromat. Chem. Toksykol.* **6**, 343—352, 1973.

Otrzymano 12 VI 1979.

OBJAŚNIENIA RYCIŃ

Ryc. 1. Aktywność fosfatazy kwaśnej w wątrobie szczura kontrolnego. Met. Gomoriego. Pow. ca 200×.

Ryc. 2. Znacznie podwyższona aktywność fosfatazy kwaśnej w wątrobie szczura grupy II doświadczalnej. Met. Gomoriego. Pow. ca 200×.

Ryc. 3. Aktywność ATP-azy w wątrobie szczura grupy I doświadczalnej. Reakcja w kanalikach żółciowych. Pojawienie się ziarnistego produktu reakcji. Met. Wachsteina i Meisel. Pow. ca 200×.

Ryc. 4. Aktywność ATP-azy w wątrobie szczura grupy II doświadczalnej. Pojawienie się dyfuzyjnej reakcji w komórkach. Metoda Wachsteina i Meisel. Pow. ca 200×.

Ryc. 5. Glikogen w wątrobie szczura kontrolnego. Met. PAS. Pow. ca 150×.

Ryc. 6. Glikogen w wątrobie szczura grupy II doświadczalnej. Dyfuzyjne zabarwienie cytoplazmy. Zmiany w lokalizacji substancji PAS-dodatniej. Pow. ca 150×.

РЕЗЮМЕ

Исследуя гистохимические реакции в печени опытной крысы обнаружено, что увеличивающиеся дозы Амбуша вызывают рост активности кислой фосфатазы, которую можно обнаружить при помощи метода Гомори, а также рост активности аденозинотрифосфатазы обнаруженной методом Вахштайна и Майзел. Нуклеиновые кислоты (DNA и RNA) обнаруженные методом Брашета не проявляли изменений по сравнению с контрольными препаратами. Исследуя гликоген (методом PAS) замечено значительное смещение PAS-положительной реакции (от неподвижной зоны дольки к зоне действия), а также понижение интенсивности окраски.

SUMMARY

The examinations of histochemical reactions in the rat liver following experimental administration of pyrethroid insecticide gave the following results. The application of increasing doses of pyrethroid insecticide caused an increased activity of acid phosphatase, detected by Gomori's method, and an increased adenosine triphosphatase, detected by the method of Wachstein and Meisel. Nucleic acids (DNA and RNA) detected by Brachet's method showed no changes when compared with control preparations. The examination of glycogen (by the PAS method) showed considerable displacement of the positive PAS reaction from the rest zone in the lobe to its active zone, and a decreased colour intensity.

EXPLANATION TO FIGURES

Fig. 1. Acid phosphatase activity in the liver of control rat. Gomori's method. Magn. 200×.

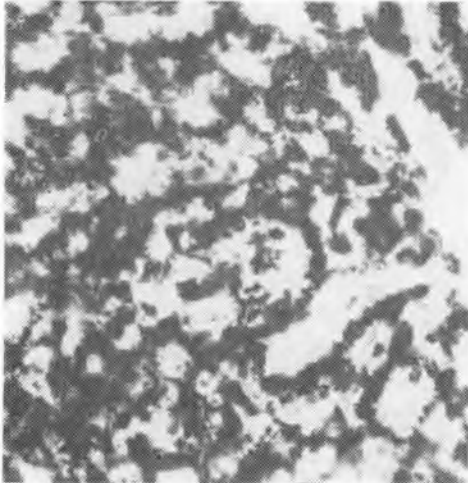
Fig. 2. Much increased acid phosphatase activity in the rat liver, experimental group II. Gomori's method. Magn. 200×.

Fig. 3. Adenosine triphosphatase activity in the rat liver, experimental group I. Reaction in the bile canaliculi. The appearance of a granular reaction product. Wachstein and Meisel method. Magn. 200×.

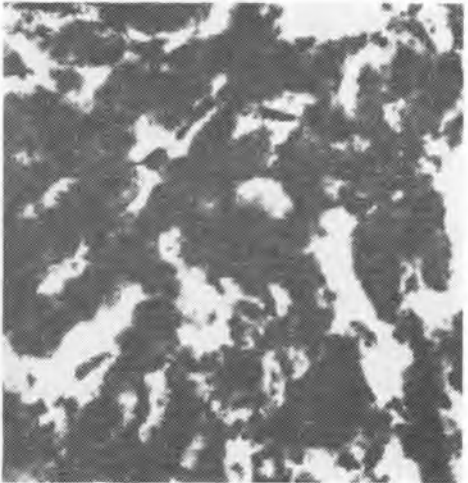
Fig. 4. Adenosine triphosphatase activity in the rat liver, experimental group II. Diffusive reaction in the cells. Wachstein and Meisel method. Magn. 200×.

Fig. 5. Glycogen in the liver of a control rat. PAS method. Magn. 150×.

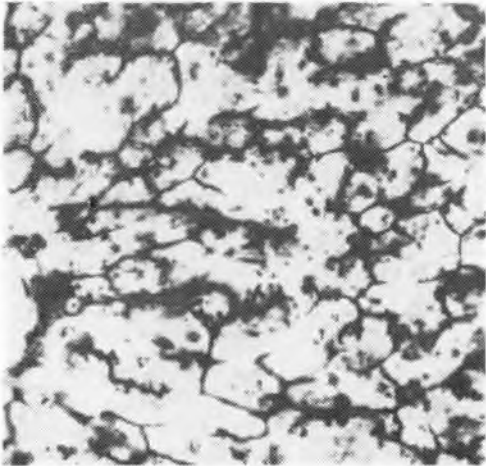
Fig. 6. Glycogen in the rat liver, experimental group II. Diffusive colouring in the cytoplasm. Changes in the localization of PAS positive substance. Magn. 150×.



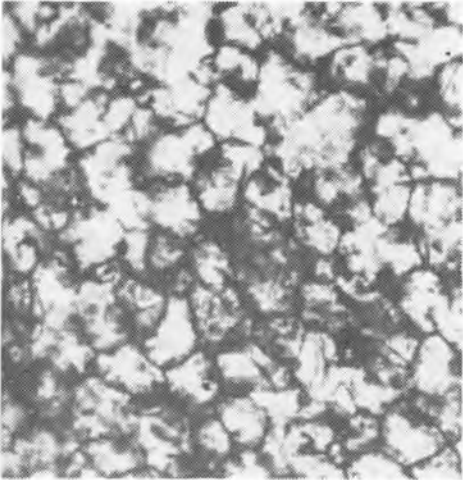
Ryc. 1



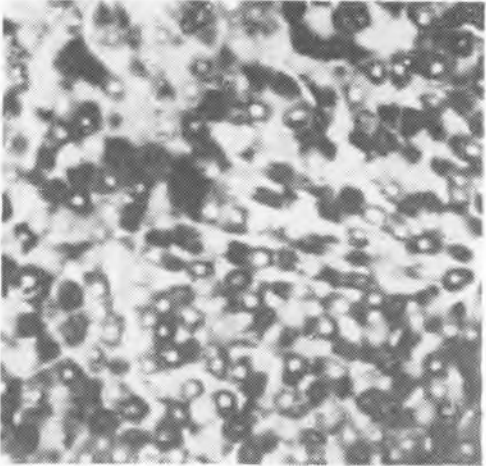
Ryc. 2



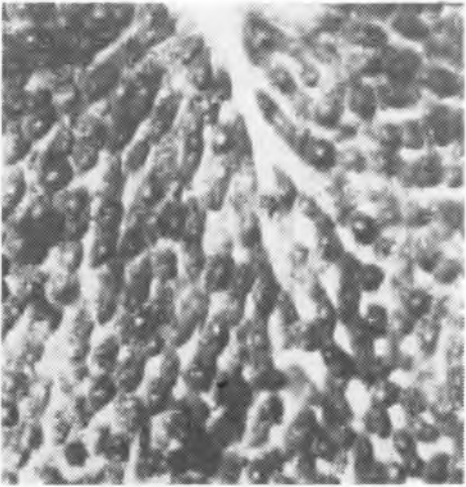
Ryc. 3



Ryc. 4



Ryc. 5



Ryc. 6