

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

Krystyna CZERNY, Piotr CELEJ,
Elżbieta DOWGIRD

Wpływ Mefacitu na wątrobę szczura białego — obserwacje odczynów histochemicznych

Влияние Мефацила на печень белых крыс — гистохимические реакции

Effect of Mephacit on White Rat's Liver — Observations of Histochemical Reactions

Czas działania leków zależy między innymi od szybkości, z jaką są one metabolizowane w ustroju. Lek, zbliżone budową do prawidłowych składników organizmu, mogą wchodzić w reakcje katalizowane przez enzymy swoiste dla substratów naturalnych, inne — nie posiadają odpowiedników wewnątrzustrojowych i są metabolizowane przez swoiste układy enzymatyczne, których etapy związane są z określonymi strukturami komórki. Jest to spowodowane umiejscowieniem danych enzymów na błonach lub w błonach cytologicznych (1, 8). Przyjęto dla tych enzymów nazwę „markerów”, mogą być one przydatne do analizy histochemicznej (2, 9).

W obecnej pracy obserwowano tkankę wątrobową szczura białego po doświadczalnym podawaniu Mefacitu („Polfa”). Badano działanie tego specyfiku zgodnie z zaleceniami teoretyków i klinicystów (5).

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Doświadczenie przeprowadzono na 12 dojrzałych samcach szczurów białych, pochodzących z hodowli własnej Zakładu. Mefacit zawieszony w oliwie podawano sondą dożołądkowo. Zwierzęta podzielono na 3 grupy doświadczalne:

- I — lek podawano w dawce 30 mg/kg c.c.;
- II — 430 mg/kg c.c., co wynosi 1/10 LD₅₀;
- III — 860 mg/kg c.c., co wynosi 1/5 LD₅₀.

Oprócz tego badano zwierzęta kontrolne, podając tylko *oleum olivae*.

Zwierzęta grupy I i II otrzymywały Mefacit codziennie przez okres 2 tygodni. Grupa III doświadczalna otrzymywała lek tylko przez 3 dni ze względu na padanie zwierząt. Po 24 godz. od ostatniego podania Mefacitu szczury dekapitowano w narkozie eterowej, a następnie pobierano wycinki lewego płata wątroby. Na skrawkach nie utrwalonych wykonywano odczyny na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej i glukozy-6-fosfatazy, na tkance utrwalonej w Ca-formol w temp. 4°C przeprowadzono badania aktywności fosfatazy kwaśnej i ATP-azy. Lipidy barwiono Sudanem III. Część materiału utrwaloną w płynie Carnoya przeznaczono do badań mukopolisacharydów obojętnych i glikogenu (metoda PAS) oraz kwasów nukleinowych (metoda Bracheta) i barwienia przeglądowe H+E. Wszystkie metody i ich kontrole wykonywano zgodnie z metodyką zawartą w Histochemisty Pearse'a (6). Preparaty fotografowano przy pomocy aparatu Exacta Varex 1000, stosując mikroskop świetlny Ergaval-Zeiss Jena.

WYNIKI BADAŃ

Barwienie hematoksyliną i eozyną

Na preparatach kontrolnych obserwowano prawidłowo zbudowaną, równomiernie zabarwioną tkankę wątrobową. W grupie I doświadczalnej, która otrzymywała dawkę leku 30 mg/kg c.c. można było zauważyć nieznaczne przekrwienie mięszu wątrobowego. Grupa II doświadczalna (430 mg/kg c.c.) charakteryzowała się znacznym poszerzeniem przestrzeni okołoboleczkowych i występowaniem ogniskowych nacieków drobnokomórkowych (ryc. 1). W grupie III doświadczalnej (860 mg/kg c.c.) rysunek tkanki wątrobowej był zatarty, naczynia krwionośne znacznie poszerzone, występowały duże nacieki zapalne.

Reakcja na aktywność fosfatazy kwaśnej

W grupie kontrolnej obserwowano odczyn drobnoziarnisty, zlokalizowany w lizosomach hepatocytów wzdłuż włosowatych kanalików żółciowych i w komórkach Browicz-Kupffera. W grupie I doświadczalnej odczyn był bardziej intensywny, gruboziarnisty. W grupie II doświadczalnej wystąpiła ogniskowa dyfuzja produktów reakcji histochemicznej. Grupa III doświadczalna wykazywała aktywność fosfatazy kwaśnej bardzo silną, gruboziarnistą, ogniskowo dyfuzyjną (ryc. 2).

Reakcja na aktywność ATP-azy

Na preparatach kontrolnych wystąpił odczyn miernie nasilony, zlokalizowany w śródbłonkach naczyń i w kanalikach żółciowych. W grupie

I doświadczalnej intensywność odczynu nasiliła się na całej przestrzeni zrazików wątrobowych. W grupie II doświadczalnej obserwowano dalszy wzrost aktywności enzymu, zwłaszcza w okolicy naczyń krwionośnych. W grupie III doświadczalnej odczyn na aktywność ATP-azy miał charakter bardzo nierównomierny (ryc. 3).

Reakcja na aktywność glukozo-6-fosfatazy

W materiale kontrolnym obserwowano prawidłowy, drobnoziarnisty odczyn w cytoplazmie hepatocytów. W grupie I doświadczalnej intensywność odczynu znacznie się nasiliła. W grupie II doświadczalnej odczyn był nierównomierny, ogniskowo bardzo silny, ogniskowo ujemny (ryc. 4). Grupa III doświadczalna charakteryzowała się, podobnie jak grupa II doświadczalna dużą nierównomiernością nasilenia i lokalizacji produktów reakcji histochemicznej, na ogół osłabionej.

Reakcja na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej

Preparaty wykonane z materiału kontrolnego wykazywały odczyn mierny, prawidłowo nasilony, zlokalizowany w mitochondriach komórek wątrobowych. W grupie I doświadczalnej wystąpił wzrost intensywności odczynu, zwłaszcza w strefie obwodowej morfologicznych zrazików, w okolicy przestrzeni bramnych (ryc. 5). W grupie II doświadczalnej wystąpiło zatarcie rysunku odczynu, był on nierównomierny, zwykle jednak silniejszy w okolicy przestrzeni bramnych. W grupie III doświadczalnej szczególnie silny odczyn obserwowano ogniskowo, prawdopodobnie w okolicy nacieków drobnokomórkowych.

Barwienie Sudanem III

Preparaty kontrolne były prawidłowo zabarwione, występował na nich odczyn drobnoziarnisty w cytoplazmie hepatocytów. W grupie I doświadczalnej obserwowano nieznaczny wzrost nasilenia odczynu. W grupie II doświadczalnej uwidoczniono się znaczne zróżnicowanie nasilenia reakcji histochemicznej. Najsilniejszy odczyn występował stale na obwodzie morfologicznych zrazików, w okolicach przestrzeni bramnych (ryc. 6). W grupie III doświadczalnej hepatocyty, zwłaszcza wokół triad wątrobowych, były „przeładowane” substancjami sudanochłonnymi.

Reakcja PAS — odczyn na mukopolisacharydy obojętne i glikogen

Preparaty kontrolne wykazywały prawidłową lokalizację i nasilenie odczynu. W grupie I doświadczalnej wystąpił nieznaczny wzrost intensywności zabarwienia hepatocytów, zwłaszcza na obwodzie zrazików. W grupie II doświadczalnej odczyn PAS był nierównomierny i na ogół osłabiony (ryc. 7). Grupa III doświadczalna charakteryzowała się znacznym osłabieniem reakcji histochemicznej, miejscami odczyn był negatywny.

Odczyn Bracheta na kwasy nukleinowe

Na materiale kontrolnym uwidoczniło się równomierną pyroninochłonność cytoplazmy hepatocytów. Zrąb jąder komórkowych również nie wykazywał odchylenia od normy. W grupie I doświadczalnej obserwowano wzrost intensywności odczynu, natomiast w grupie II doświadczalnej uległ on osłabieniu, był nierównomiernie zlokalizowany (ryc. 8). W grupie III doświadczalnej preparaty przypominały obraz grupy II doświadczalnej.

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ I WNIOSKI

Podstawową funkcją wątroby jest metabolizm, zdeterminowany przez cytoarchitekturę narządu. Zachodzą w niej procesy biochemiczne o największej różnorodności, między innymi przemiany przyswojonych przez ustrój leków. Budowa chemiczna wielu stosowanych specyfików na tyle różni się od budowy normalnych metabolitów tkankowych, że nie ulegają one działaniu układów enzymatycznych wysoko wyspecjalizowanych. Nie podlegają ani spalaniu, ani wbudowaniu w układy wielocząsteczkowe, najwyżej ulegają częściowej degradacji, są więc dla ustroju elementem obcym, niekiedy szkodliwym, muszą więc być wydalone. Mefacit (kwas N/2,3-ksyloamtranylowy) ingeruje celowo w określone mechanizmy fizjologiczno-metaboliczne i w przypadku przedawkowania działa w sposób szkodliwy na funkcje życiowe organizmu, a będąc związkami o charakterze słabego elektrolitu, dobrze rozpuszczającym się w lipidach, znajduje łatwy dostęp do delikatnych struktur hepatocytów (4, 3). Przemiany, jakim podlega Mefacit w ustroju, polegają między innymi na reakcjach utleniania. Układy enzymatyczne katalizujące te procesy zlokalizowane są w mikrosomach wątroby (7). Istotną ich cechą jest bardzo mała spe-

cyficzność oraz niepolarny charakter substratów. Enzymy mikrosomalne katalizujące hydroksylację Mefacitu nie wykazują żadnej aktywności w stosunku do związków polarnych. O wielkim nasileniu przemian oksydacyjnych substancji niepolarnych w wątrobie świadczy fakt, że cytochrom P-450 stanowi prawie 1/5 całości białek siateczki endoplazmatycznej hepatocytów. W stanie spoczynku wątroba zużywa ok. 30% tlenu przyswojonego przez organizm. Analiza aktywności dehydrogenazy bursztynianowej, enzymu związanego z utlenianiem komórkowym, wykazała w warunkach doświadczalnych naszej pracy, że podawanie małych dawek Mefacitu zwiększa aktywność badanej dehydrogenazy. Dotyczy to zwłaszcza okolicy przestrzeni bramnych — „strefy stałej czynności” zrazika wątrobowego. Wraz ze wzrostem dawki leku rozmieszczenie produktów reakcji histochemicznej zmienia się — rysunek odczynu zaciera się i aktywność dehydrogenazy bursztynianowej jest największa w okolicy występujących ognisk zapalnych, co zgadza się z ogólną zasadą wzrostu metabolizmu w tych okolicach. Przemiany mikrosomalne określane są jako tzw. detoksykacja ustrojowa. W większości wypadków towarzyszy im unieczynnienie lub zmniejszenie aktywności biologicznej związku. Podstawowy sens przemian polega na zwiększeniu hydrofilności substancji (2). Efekty tego typu występują w przypadku stosowania Mefacitu. Mikrosomalna frakcja komórkowa zawiera między innymi glukozo-6-fosfatazę. Aktywność tego enzymu wykazuje stan struktur odpowiedzialnych za czynności odtruwające wątroby. Wykazane przez nas zmiany w aktywności glukozo-6-fosfatazy mogą świadczyć o początkowym wzroście intensywności procesów zmierzających do „odtrucia” ustroju, następnie mechanizm obronny ulega załamaniu.

W wyniku badań odczynów histochemicznych stwierdzono zmiany polegające na zatarciu rysunku zrazików, poszerzeniu przestrzeni okołobeczkowych, występowaniu nacieków zapalnych. Większe dawki Mefacitu powodowały stłuszczenie mięszu wątrobowego. Zmianom morfologicznym towarzyszyło obniżenie intensywności reakcji PAS, co łączyć należy ze zmniejszeniem ilości glikogenu, bowiem produkty reakcji PAS ulegały hydrolizie pod wpływem diastazy. Wystąpiły również zmiany w tkance świadczące o zaburzeniu gospodarki kwasów nukleinowych. Stwierdzono to obserwując reakcję Bracheta, ujawniającą zmiany pyroninochłonności cytoplazmy. Również o uszkodzeniu struktur komórki można sądzić na podstawie wyników badań aktywności fosfatazy kwasnej. Lizosomy ulegały początkowo zwiększeniu, a następnie obserwowano nawet dyfuzyjne zabarwienie cytoplazmy produktami reakcji histochemicznej.

Z przeprowadzonych badań można wyprowadzić wnioski dotyczące wpływu Mefacitu na wątrobę. Dawka terapeutyczna stosowana

u człowieka w klinikach wpływa na metabolizm wątroby szczura, powodując wzrost intensywności procesów odtruwających. Nie stwierdzono jednak zmian destrukcyjnych nieodwracalnych. Dawka 1/10 LD₅₀ podawana przez okres 2 tygodni wywołuje w wątrobie szczura zmiany morfologiczne, które określić można jako patologiczne. Dawka Mefacitu 1/5 LD₅₀ powoduje po 3 dniach codziennego podawania zgon zwierzęcia. Zmiany w wątrobie są bardzo duże, nieodwracalne. Przeprowadzone obserwacje mogą być punktem wyjścia do dalszych, pogłębionych badań w tym zakresie, dotyczących również innych narządów, co wydaje się szczególnie celowe ze względu na częstość stosowania Mefacitu w terapii.

PIŚMIENNICTWO

1. Enzyme Cytology. Ch. VI. Acad. Press, London and New York 1968.
2. Enzyme Cytology. Ch. VII. Acad. Press, London and New York 1968.
3. Gunn J. A.: An Introduction to Pharmacology and Therapeutics. Oxford Medical Publication 1978.
4. Kolmer J. A.: Clinical Diagnosis by Laboratory Examinations. Appleton-Century-Crofts, Inc. New York 1980.
5. „Mefacit” — prospekt „Polfa”. RSW, Warszawa 1978.
6. Pearse A. G. E.: Histochemistry Churchill. LTD, London 1979.
7. Subcellular Particles. Roland Press, New York 1978.
8. Szczeklik E.: Enzymologia kliniczna. PZWL, Warszawa 1964.

Otrzymano 2 XII 1982.

OBJAŚNIENIA RYCIŃ

Ryc. 1. Wątroba szczura białego. Grupa II doświadczalna. Barwienie hematoksyliną i eozyną. Widoczne ogniskowe nacieki zapalne. Pow. ok. 80×.

Ryc. 2. Wątroba szczura białego. Grupa III doświadczalna. Reakcja na aktywność fosfatazy kwaśnej. Odczyn bardzo silny, gruboziarnisty. Pow. ok. 80×.

Ryc. 3. Wątroba szczura białego. Grupa III doświadczalna. Reakcja na aktywność ATP-azy. Widoczna nierównomierność odczynu. Pow. ok. 80×.

Ryc. 4. Wątroba szczura białego. Grupa II doświadczalna. Reakcja na aktywność G-6-P-azy. Odczyn nierównomierny. Pow. ok. 80×.

Ryc. 5. Wątroba szczura białego. Grupa I doświadczalna. Reakcja na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej. Odczyn ogniskowo wzmożony. Pow. ok. 80×.

Ryc. 6. Wątroba szczura białego. Grupa II doświadczalna. Barwienie Sudanem III. Silny odczyn na obwodzie zrazików. Pow. ok. 80×.

Ryc. 7. Wątroba szczura białego. Grupa II doświadczalna. Reakcja PAS. Odczyn osłabiony. Pow. ok. 80×.

Ryc. 8. Wątroba szczura białego. Grupa II doświadczalna. Odczyn Bracheta. Obserwuje się znaczne osłabienie reakcji. Pow. ok. 80×.

РЕЗЮМЕ

Проведено гистохимическое исследование печени белых крыс после экспериментального введения Мефацита. Произведено реакции на кислую фосфатазу, АТФ, глюкозу-6-фосфатазу и янтарную дегидрогеназу, реакцию PAS, Судан III, реакцию Брачета и окраску гематоксилина и эозина. Полученные данные показали, что терапевтическая доза (30 мг/кг веса в течение 2-х недель) активизирует клеточный обмен печени, не вызывая деструктивных изменений. Доза 1/10 LD₅₀ после 2-х недель вызывает изменения, которые можно расценивать как обратные. Доза 1/5 LD₅₀ — уже после 3-дневного приема вызывает необратимые изменения, часто вызывающие смерть животных.

SUMMARY

White rat's liver was examined with histochemical methods after experimental administration of Mephacit. Histochemical reactions were performed for acid phosphatase, ATP-ase, G-6-P-ase and succinic dehydrogenase. PAS-reaction, staining with Sudan III, staining with the Brachet method and staining with hematoxylin and eosin were also performed. It was found that a therapeutic dose used for people (30 mg/l kg body weight), administered for the period of two weeks, intensifies cytomorphosis in the liver without producing any destructive changes. A 430 mg/l kg body weight dose of Mephacit produces changes after 2 weeks, which can be called irreversible disturbances. An 860 mg/l kg body weight dose of the drug causes the death of animals as early as after 3 days and the parenchyma of their livers is found to be considerably destroyed.

EXPLANATIONS TO FIGURES

Fig. 1. A white rat's liver. Experimental group II. Staining with hematoxylin and eosin. Focal inflammatory infiltrations can be seen. Ca. $\times 80$.

Fig. 2. A white rat's liver. Experimental group III. Reaction for acid phosphatase. Reaction is very strong, coarse-granular. Ca. $\times 80$.

Fig. 3. A white rat's liver. Experimental group III. Reaction for ATP-ase. The reaction's irregularity can be seen. Ca. $\times 80$.

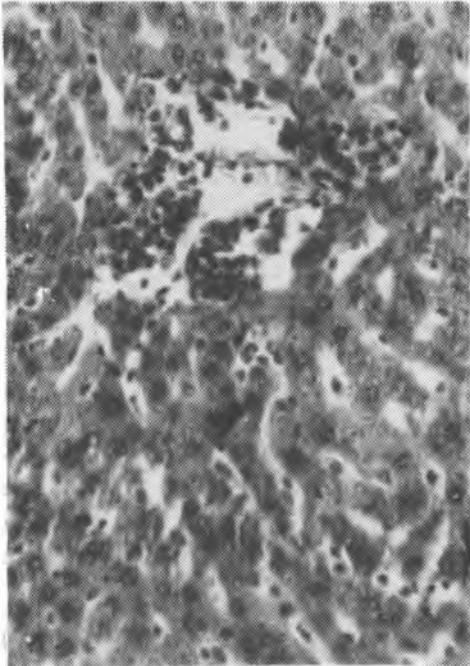
Fig. 4. A white rat's liver. Experimental group II. Reaction for G-6-P-ase. The reaction is irregular. Ca. $\times 80$.

Fig. 5. A white rat's liver. Experimental group I. Reaction for succinic dehydrogenase. The reaction increased in the focus. Ca. $\times 80$.

Fig. 6. A white rat's liver. Experimental group II. Staining with Sudan III. A strong reaction on the lobules circumference. Ca. $\times 80$.

Fig. 7. A white rat's liver. Experimental group II. PAS-reaction. Reaction is weakened. Ca. $\times 80$.

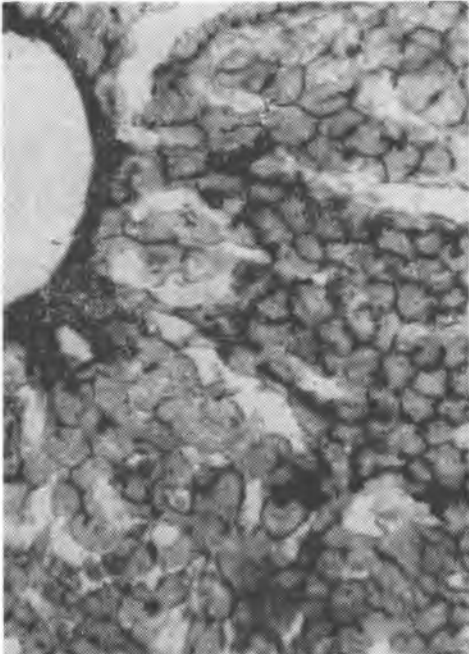
Fig. 8. A white rat's liver. Experimental group III. Staining with the Brachet's method. A considerable weakening of reaction is observed. Ca. $\times 80$.



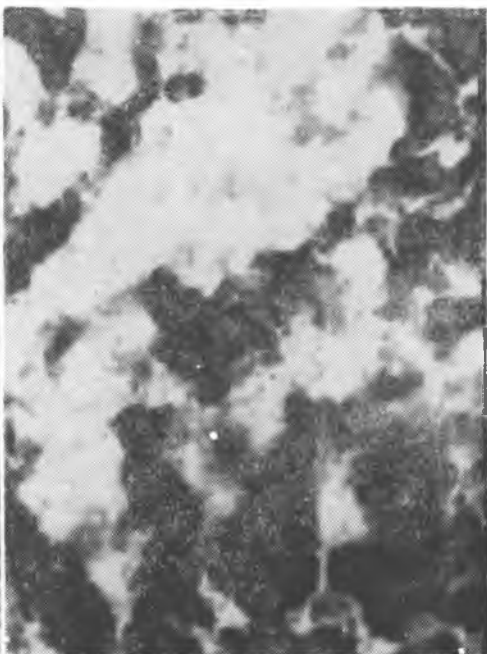
Ryc. 1



Ryc. 2



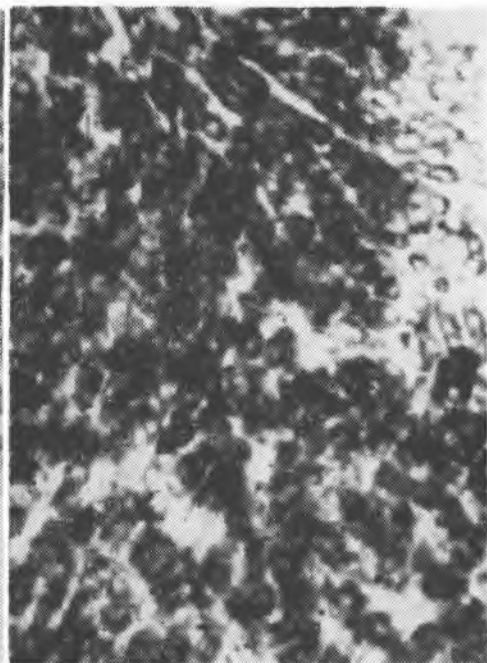
Ryc. 3



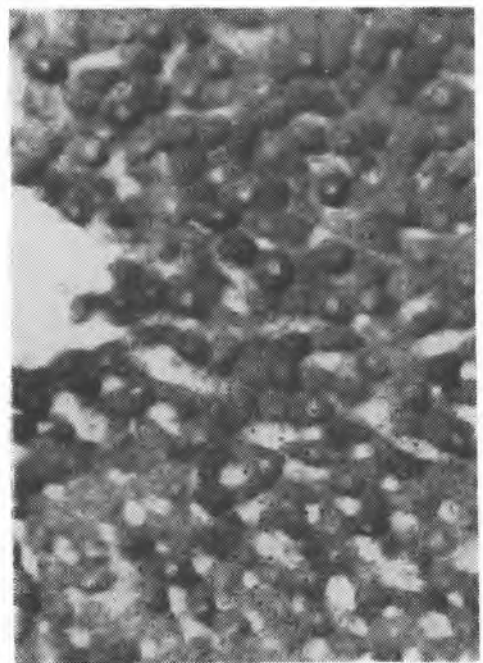
Ryc. 4



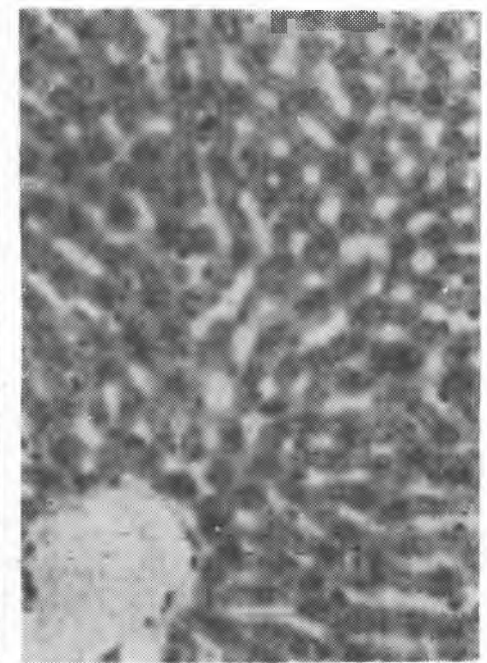
Ryc. 5



Ryc. 6



Ryc. 7



Ryc. 8