

---

Zakład Badań Podstawowych. Instytut Medycyny Pracy i Higieny Wsi w Lublinie  
Kierownik: doc. dr hab. Włodzimierz Tyburczyk

Jadwiga LATUSZYŃSKA

**Badania doświadczalne nad embriotoksycznym wpływem fosfomidonu na nabłonek kanalików krętych nerki. III. Badania submikroskopowe \***

Экспериментальные исследования эмбриотоксического влияния фосфамидона на эпителий извилистых канальцев почки. III. Субмикроскопические исследования

Experimental Research on the Embryotoxic Influence of Phosphamidon on the Epithelium of Renal Convoluted Tubules. III. Submicroscopic Studies

W części I i II stwierdzono embriotoksyczne i teratogenne oddziaływanie fosfamidonu na płody szczurze oraz występowanie w nerkach tych zwierząt zmian histologicznych i histochemicznych. Pierwsze z nich, objawiające się przyćmieniem miąższowym, zwiększoną homogennością cytoplazmy oraz obecnością wysięku w świetle kanalików nerkowych, sygnalizują pewnego stopnia zahamowanie rozwoju tej części nefronu. Drugie — wyrażone odchyleniami w nasileniu odczynów enzymatycznych, takich jak: fosfataza zasadowa i adenylozotrójfosfataza — świadczą o nieznacznym upośledzeniu transportu przez błony komórkowe.

Uzyskane wyniki uzasadniły podjęcie badań submikroskopowych. Przeprowadzono je, aby uzupełnić wyniki obserwacji histologicznych i histochemicznych.

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Do badań submikroskopowych użyto nerek noworodków szczurzych pochodzących od 24 samic szczepu Wistar w wieku 3 mies., o c.c. ok. 200—250 g. Zwierzęta te pochodziły z własnej zwierzętarni Instytutu Medycyny Pracy i Higieny Wsi w Lublinie.

---

\* Wyrażam podziękowanie Panu Prof. Drowi hab. Maciejowi Latałskiemu, pod którego kierunkiem prowadzone były badania.

Ciężarne samice zatruwano 93,3% fosfamidonem technicznym. Preparat zawieszano w oleju z oliwek i podawano szczurom sondą dożołądkowo w ilości 1/2 LD<sub>50</sub> w dawkach pojedynczych i 1/10 LD<sub>50</sub> w dawkach wielokrotnych. Za ostrą dawkę toksyczną doustną LD<sub>50</sub> dla szczura przyjęto 30 mg/kg c.c. Podział na grupy doświadczalne omówiono szerzej w części I.

Do badań, prowadzonych w mikroskopie elektronowym, pobierano nerki tuż po narkozie od 96 noworodków, po 4 noworodki od 3 samic (12 noworodków z każdej grupy).

Badania mikroskopowo-elektronowe przeprowadzono w samodzielnej Pracowni Mikroskopii Elektronowej Instytutu Biologiczno-Morfologicznego Akademii Medycznej w Lublinie.

Badania ultrastrukturalne komórek kanalików krętych wykonywano na wycinkach kory o wielkości ok. 1 mm<sup>3</sup>. Materiał utrwalano przez 2 godz. w temp. 0°C ±4°C w 6,25% aldehydzie glutarowym zbuforowanym buforem kakodylowym do pH=7,2. Następnie wycinki płukano zimnym buforem i dotrwalano przez 2 godz., również w temp. 0°C w 1% roztworze OsO<sub>4</sub>, zbuforowanym także buforem kakodylowym, i zatapiano w Eponie 812. Błoczki polimeryzowano w temp. 60°C przez 3 doby, następnie krojono na ultramikrotomie Tesla B 400 (CSSR).

Fosfatazę kwaśną wykrywano metodą Gomoriego, używając jako substratu CMP (*cystidine-5-monophosphoric acid*). Inkubację skrawków prowadzono przez 12 min. w temp. 37°C, przy pH=5,1.

Równocześnie wykonywano kontrolę odczynów enzymatycznych, inkubując skrawki w płynach pozbawionych substratu. We wszystkich przypadkach nie stwierdzono odczynu, co pozwala przypuszczać, że obserwowany produkt reakcji, zachodzących w określonych strukturach na preparatach inkubowanych substratem, nie był artefaktem.

#### WYNIKI BADAŃ

W grupie kontrolnej komórki nabłonkowe kanalików krętych I rzędu opierały się na jednorodnej błonie podstawowej. Błona, otaczająca komórki, tworzyła w części bazalnej fałdy wpuklające się do ich wnętrza, natomiast na bocznych powierzchniach posiadała przebieg prosty lub lekko pofałdowany. Od strony światła kanalika komórki nabłonkowe pokryte były licznymi, gęsto ułożonymi, mikrokosmkami, tworzącymi rąbek szczoteczkowy.

Wewnątrz cytoplazmy widoczne było jądro komórkowe, mitochondria, ciała elektronowo gęste, ciała wielopęcherzykowe, aparat Golgiego, retikulum endoplazmatyczne, rybosomy, ciała tłuszczowe.

Jądra komórkowe, układające się najczęściej w środku komórki, posiadały przeważnie kształt okrągły. Otoczone były błoną zbudowaną z dwóch blaszek, oddzielonych od siebie substancją o niskiej gęstości elektronowej. Chromatyna w postaci skupień przylegała do błony jądrowej lub układała się w karioplazmie (ryc. 1). W jądrze występowało najczęściej jedno jąderko.

W jądrach komórkowych zwierząt doświadczalnych brak było skupień chromatynowych przylegających do wewnętrznej blaszki błony jądrowej (ryc. 2). Widoczne to było szczególnie w komórkach nabłonkowych grup doświadczalnych I, II, III i IV, czyli tych, w których samicom podawano pojedyncze dawki fosfamidonu 8., 9., 10. i 11. dnia ciąży oraz w komórkach nabłonkowych kanalików proksymalnych nerek noworodków, których matki zatrutowane były wielokrotnie.

W grupie kontrolnej obserwowano mitochondria o bardzo różnorodnych kształtach i wielkości w całej cytoplazmie. Grzebienie mitochondrialne układały się przeważnie prostopadle do długiej osi organellum i zamurzone były w substancji macierzystej o umiarkowanej gęstości elektronowej.

W komórkach zwierząt doświadczalnych mitochondria ulegały obzmianieniu, a ich wewnętrzna struktura — rozrzedzeniu. W niektórych z nich obserwowano miejsca o niewielkiej gęstości elektronowej macierzy oraz o różnym stopniu uszkodzenia integralności błon mitochondrialnych, łącznie z przerwaniem ciągłości otoczki (ryc. 3). W obrzmiałych mitochondriach grzebienie były porozrywane lub zupełnie zanikły, ich rozmiary były czasami kilkakrotnie większe od obserwowanych w grupie kontrolnej. Zmiany te miały nieco mniejsze nasilenie w grupach doświadczalnych V i VI.

Ciała elektronowo gęste reprezentowały lizosomy i mikrociała (peroxysomy). Te drugie w grupie kontrolnej otoczone były pojedynczą błoną, lekko pofałdowaną. Wnętrze mikrociał wypełniała substancja o znacznej gęstości elektronowej. Ciała te, o kształcie przeważnie okrągłym, zwykle można było spotkać na terenie całej cytoplazmy. Z zasady były mniejsze od lizosomów. We wszystkich grupach doświadczalnych obserwowano wzrost ilości mikrociał w częściach podstawowych komórek nabłonkowych. Największa ilość tych organelli występowała w grupach doświadczalnych IV i VII.

W grupie kontrolnej lizosomy występowały na terenie całej cytoplazmy w postaci ciał o różnej gęstości elektronowej. Ciała te, o kształcie owalnym lub okrągłym, otoczone były pojedynczą błoną. Badania cytochemiczne wykazały w lizosomach obecność produktu reakcji na kwaśną fosfatazę w postaci ciemnych gruboziarnistych złogów (ryc. 4). We wszystkich grupach doświadczalnych obserwowano wzrost ilości lizosomów. Ich gęstość elektronowa i rozmiary były bardziej zróżnicowane niż w grupie kontrolnej. W niektórych lizosomach obserwowano obecność materiału błoniastego i ziarnistego. Zmiany ilości, wielkości oraz zmiany w wewnętrznym zróżnicowaniu lizosomów były największe w grupach doświadczalnych III i IV. W niektórych lizosomach wystąpiło duże nagromadzenie osmofilnego materiału o nierównomiernym stopniu zagęszcze-

nia. Widoczne były połączenia lizosomów między sobą, lizosomów z wakuolami i wakuoli (ryc. 5). Przeprowadzone badania cytochemiczne odczynu na fosfatazę kwaśną potwierdziły zarówno zwiększenie ilości, jak i zróżnicowanie lizosomów (ryc. 6).

Ciała tłuszczowe o pokaźnych rozmiarach spotykano rzadko. W grupach doświadczalnych III, IV, V, VI i VII obserwowano zwiększenie ilości ciał tłuszczowych w porównaniu z ilością ciał tłuszczowych występujących w grupie kontrolnej.

W budowie aparatu Golgiego, retikulum endoplazmatycznego i ciał wielopęcherzykowych zmian nie obserwowano.

### OMÓWIENIE WYNIKÓW

Badania ultrastrukturalne komórek nabłonkowych kanalików krętych I rzędu nerki noworodków szczurzych, wykonywane przez innych autorów, wykazują wysoki stopień organizacji cytoplazmy, niewiele odbiegający od obserwowanego u szczurów dorosłych.

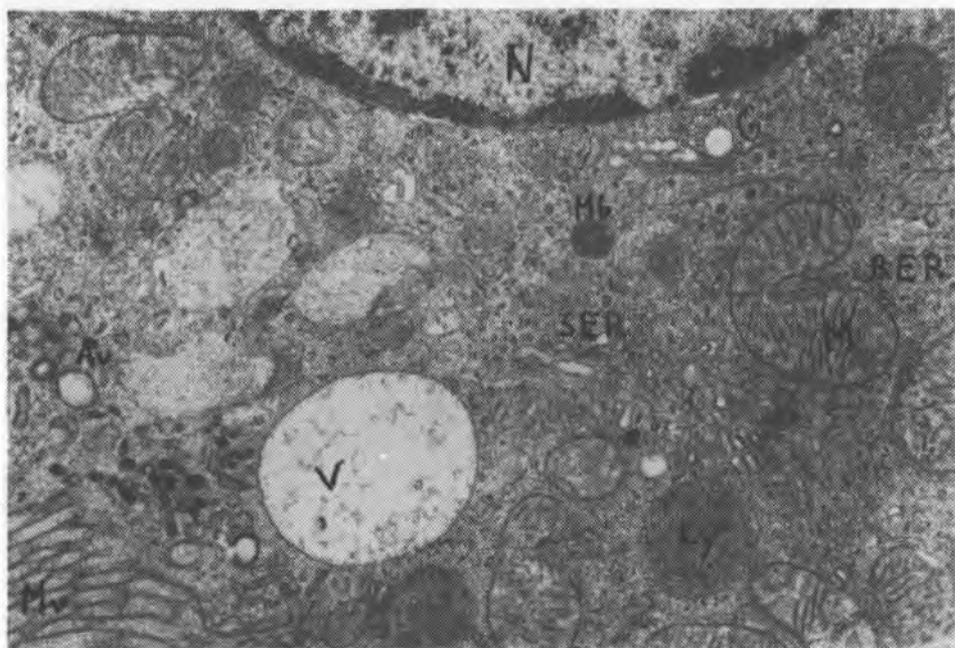
Mikrokosmki, wyścielone od strony światła kanalika powłózką glikoproteidową, umożliwiają absorpcję zwrotną białek i niskocząsteczkowych związków na drodze pinocytozy. Zresorbowane ze światła kanalika substancje pojawiają się najpierw w wakuolach apikalnych, a następnie w lizosomach leżących w strefie szczytowej komórek (3).

Bardzo ważnym procesem w mechanizmie działania lizosomów jest wybiórcza zdolność ich błon do łączenia się ze ścianą komórkową bądź z błoną wczesnych wakuoli (6).

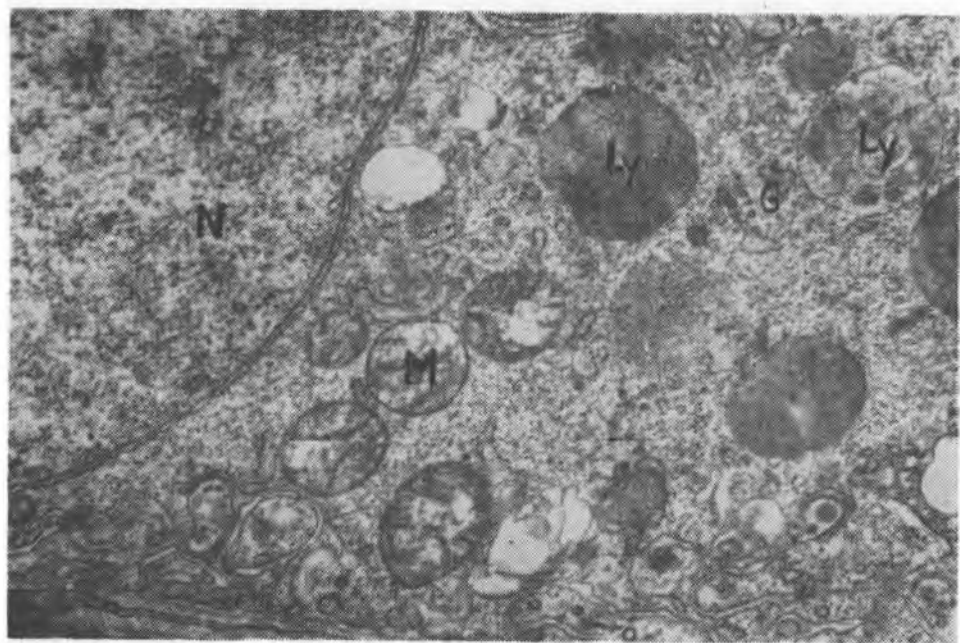
W warunkach patologicznych ma miejsce nasilenie procesów autolizy i fagocytozy w komórkach kanalików krętych I rzędu. Przy wzmożeniu tych procesów następuje zwiększenie ilości lizosomów.

W badaniach własnych, dotyczących komórek nabłonkowych kanalików krętych I rzędu nerek noworodków szczurzych, obserwowano zwiększenie ilości i wielkości lizosomów we wszystkich grupach doświadczalnych, tak po podaniu dawek jednorazowych, jak i wielokrotnych. Lizosomy o różnej gęstości elektronowej i różnych kształtach występowały na terenie całej komórki. Niektóre z nich były kilkakrotnie większe od lizosomów występujących w grupie kontrolnej. Zmiany te szczególnie uwidaczniały się w grupach doświadczalnych II, III i IV. Obserwowany wzrost ilości lizosomów potwierdziły badania histochemiczne na aktywność fosfatazy kwaśnej. Zmiany te świadczą o wzmożonym procesie fagocytozy zachodzącym w komórkach proksymalnych nerki noworodków.

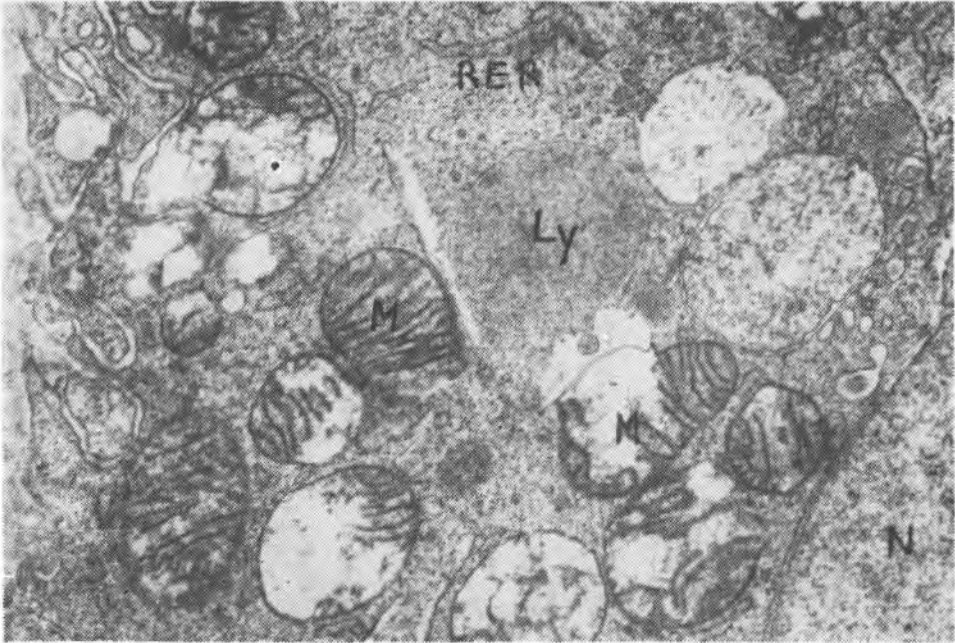
O b u c h o w s k a (7) po długotrwałym zatruczeniu szczurów etanolem obserwowała wyraźne zwiększenie ilości ciał lizosomalnych w komórkach nabłonkowych kanalików proksymalnych nerki szczurów.



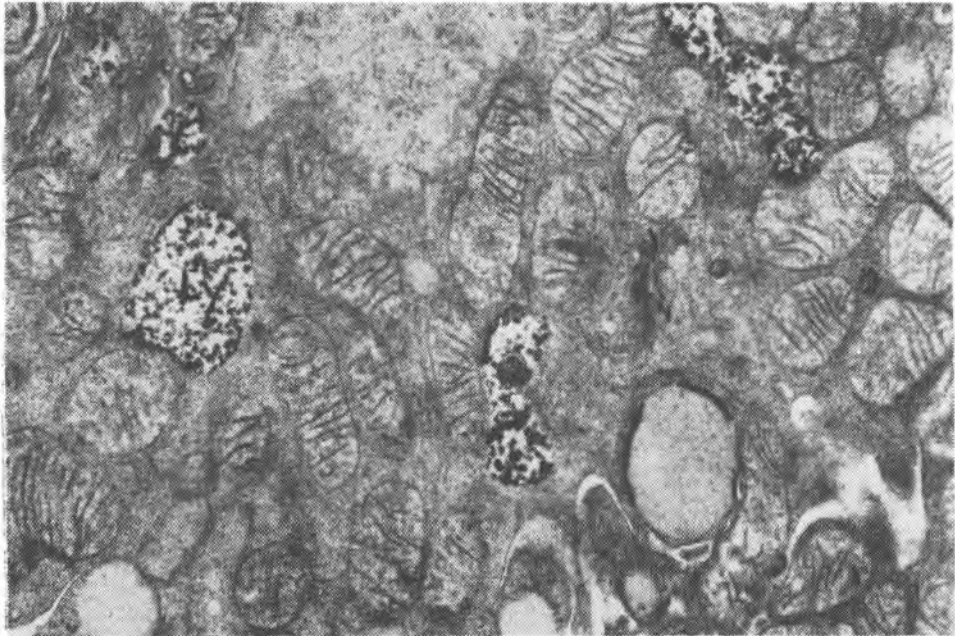
Ryc. 1



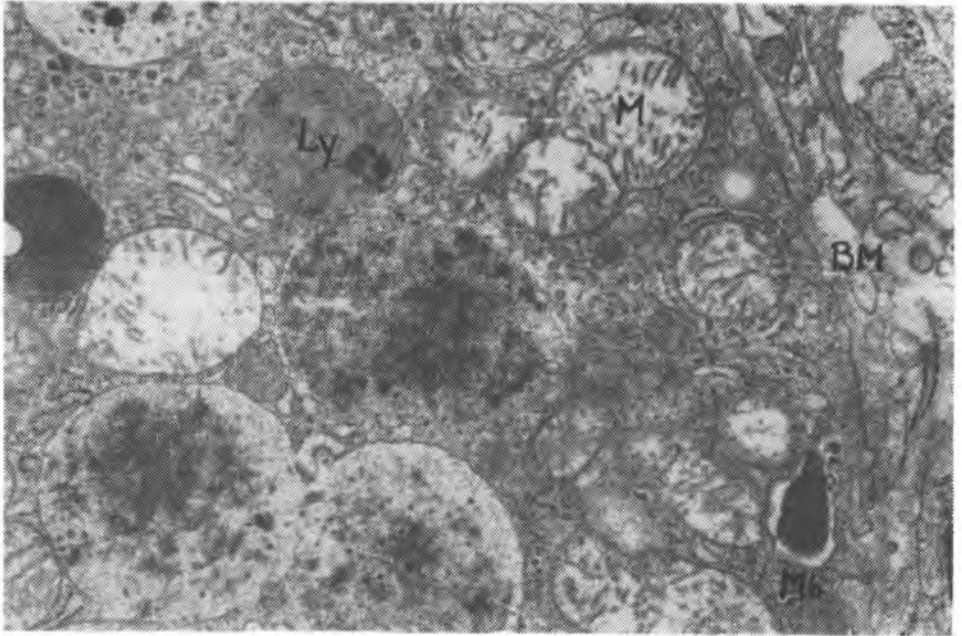
Ryc. 2



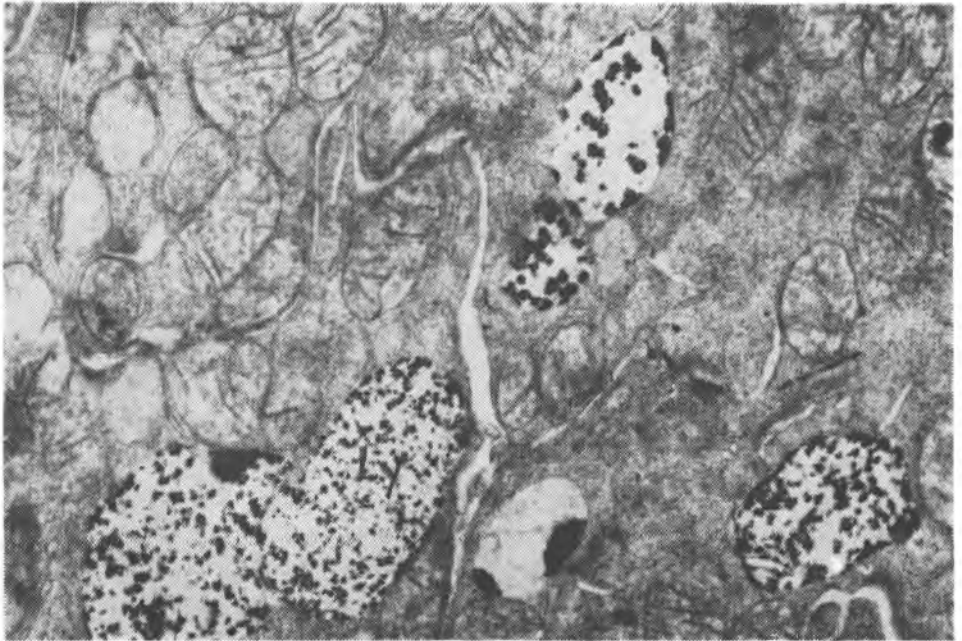
Ryc. 3



Ryc. 4



Ryc. 5



Ryc. 6





Podobne zmiany w ultrastrukturze kanalików krętych nerki noworodków szczurzych, które zaszły po podaniu ciężarnym samicom leczniczych dawek ampicyliny, obserwowali Latański i Rzeszowska (5). Zmiany te dotyczyły wakuoli, lizosomów i mitochondriów. Na szczególną uwagę zasługiwał wzrost liczby lizosomów wtórnych. Zmiany w mitochondriach polegały na zniszczeniu większości grzebieni oraz przejaśnień w obrębie macierzy przy zachowaniu ciągłości otoczki.

Mitochondria, jak podaje Jokelainen (4), powstają w komórkach blastemalnej czapeczki, z której tworzone są następnie pęcherzyki. Większość mitochondriów ułożona jest w komórkach nieregularnie, przyjmuje w tej fazie rozwoju kształt okrągły lub owalny. W trakcie tworzenia się struktur S i kanalików ilość mitochondriów znacznie wzrasta i wybierają one kształt wydłużony.

Brachet (2) donosi, że mitochondria w tkankach embrionalnych i dojrzałych komórkach wykazują taką samą delikatną strukturę. Jednak w czasie rozwoju widoczne są wyraźne zmiany w kształcie mitochondriów, w ich budowie wewnętrznej, ilości i lokalizacji (4).

W badaniach własnych mitochondria w kanalikach proksymalnych nerek noworodków szczurzych, pochodzących od samic kontrolnych, posiadały różnorodne kształty. Zarówno po wielokrotnym, jak i jednorazowym podaniu fosfamidonu mitochondria ulegały obrzmieniu, a ich struktura wewnętrzna — rozrzedzeniu. Obserwowano zmiany w ilości i budowie grzebieni mitochondrialnych, a czasami całkowity ich zanik. W pojedynczych przypadkach spotykano mitochondria z przerwaną otoczką. Nieco mniejsze nasilenie zmian wystąpiło w grupach doświadczalnych I i VI, tj. w mitochondriach noworodków, których matki otrzymywały fosfamidon 12. i 13. dnia ciąży.

Zmiany obserwowane w mitochondriach są potwierdzeniem przyćmienia mięszowego, widocznego w komórkach kanalików proksymalnych w badaniach histologicznych.

Jak wynika z badań prowadzonych przez Staszycą i Kifer (10), foschlor, podawany ciężarnym samicom od 2. dnia ciąży w dawkach wielokrotnych, przechodził przez łożysko i wpływał na spadek aktywności dehydrogenazy bursztynianowej, szczególnie w komórkach fibroblastopodobnych 21-dniowych zarodków szczurzych. Świadczyłoby to o częściowym upośledzeniu procesu oddychania komórkowego.

Wielu autorów obserwowało zmiany w strukturze mitochondriów, zachodzące po zadziałaniu różnych czynników fizycznych i chemicznych, a wszystkie one polegały na obrzmieniu, uszkodzeniu błon mitochondrialnych, rozrzedzeniu struktury i zmianach w ilości oraz w ułożeniu grzebieni mitochondrialnych (9).

Mitochondria związane są z procesami oddychania komórkowego oraz z wytwarzaniem energii i jej magazynowaniem. Wraz z całym kompleksem zawartych w nich enzymów odgrywają istotną rolę w procesach resorpcji zwrotnej oraz wydzielania do przesącza. Procesy te, zachodzące w kanalikach proksymalnych nerki, odbywają się na zasadzie transportu aktywnego, przy udziale ATP-azy, adenozyntroójfosfatazy Ca-formolu i fosfatazy zasadowej.

Równoległy spadek intensywności reakcji enzymatycznych na ATP-azę i Fz, obserwowany w badaniach własnych w grupach doświadczalnych II i III, może być odzwierciedleniem zaburzeń występujących w mitochondriach.

Wtórnią konsekwencją zaburzeń w budowie mitochondriów może być również zróżnicowanie ilości mikrociał, co, jak się wydaje, sugerują wyniki badań własnych. W porównaniu z grupą kontrolną we wszystkich grupach doświadczalnych obserwowano większą liczbę mikrociał. W obrębie samych grup doświadczalnych stwierdzono zwiększanie się liczby mikrociał w komórkach grup I, II, III i IV i nieznaczne zmniejszanie się ich liczby w pozostałych grupach. Najwięcej organelli tego typu obserwowano w grupie IV doświadczalnej (podawanie preparatu 11. dnia ciąży) oraz w grupie VII (podawanie preparatu od 8. do 13. dnia ciąży). Wielkość mikrociał i ich gęstość elektronowa nie uległy zmianom.

Mikrociała powstają przez pączkowanie z gładkiej siatki śródplazmatycznej (8). Zawierają w swoim wnętrzu oksydazy. Organella te biorą udział w usuwaniu nadtlenu wodoru, działającego szkodliwie na cytoplazmę, w utlenianiu i produkcji energii. U ssaków uczestniczą w niewielkim stopniu w przemianie tłuszczowo-węglowodanowej, przez produkcję  $\alpha$ -ketokwasów.

Zwiększenie ilości mikrociał w komórkach kanalików krętych I rzędu nerki szczura, zachodzące pod wpływem lindanu, obserwowały Pawłowska-Tochmani i Obuchowska (9).

Obserwowana w niniejszych badaniach, większa w porównaniu z grupą kontrolną, ilość mikrociał może być dowodem na to, że również enzymy występujące w mikrociałach (oksydazy) mogą odgrywać pewną rolę w metabolizmie fosfamidonu w organizmie zwierząt doświadczalnych oraz, w pewnym stopniu, w rekompensacji upośledzonego działania zmienionych mitochondriów.

Równocześnie ze wzrostem ilości mikrociał obserwowano w komórkach kanalików proksymalnych wzrost ilości ciał tłuszczowych, szczególnie w grupach doświadczalnych IV, V, VI i VII.

Według Bielańskiej-Osuchowskiej (1) w komórkach może dochodzić do przemian węglowodanów w tłuszcze. Być może więc, zwiększona ilość ciał tłuszczowych, obserwowana w badaniach własnych,

spowodowana była wzrostem reabsorpcji glukozy, o czym wspomniano wyżej.

Zmiany obserwowane w ułożeniu chromatyny jądrowej w komórkach kanalików proksymalnych nerki w grupach doświadczalnych I, II, III i IV mogą świadczyć o niedojrzałości tego organellum komórkowego.

Obserwowana w mikroskopie świetlnym homogenna cytoplazma odpowiadała w mikroskopie elektronowym miejscom pozbawionym lub ubogim w organella komórkowe.

### Wnioski

1. Zarówno po jednorazowym, jak i po wielokrotnym podaniu fosfamidonu ciężarnym samicom, w komórkach kanalików proksymalnych nerki noworodków stwierdzono zwiększoną fagocytozę, nieznaczne zaburzenia transportu przez błony komórkowe oraz prawdopodobnie upośledzenie oddychania komórkowego.

2. Morfologicznymi wykładnikami tych zmian są: zwiększenie ilości lizosomów oraz zmiany ich struktury wewnętrznej i zaburzenia struktury mitochondriów.

3. Po jednorazowym podaniu fosfamidonu w okresie między 8. a 13. dniem ciąży największą wrażliwość wykazują nerki noworodków pochodzących od samic zatrutowanych 11. dnia ciąży.

4. Obserwowane zmiany w jądrze komórkowym świadczą o upośledzeniu procesów rozwojowych zachodzących w komórkach nabłonkowych kanalików proksymalnych.

### PIŚMIENNICTWO

1. Bielańska-Osuchowska Z.: Embriologia. PWRiL, Warszawa 1971, s. 16.
2. Brachet J.: The Biochemistry of Development. 1 ed., Pergamon Press, New York 1960, s. 320.
3. Ericsson J. L. E.: Transport and Digestion of Hemoglobin in the Proximal Tubule. II Electron Microscopy: Lab. Invest. **14**, 16, 1965.
4. Jokelainen P.: An Electron Mikroscope Study of the Early Development of the Rat Metanephric Nephron. Acta Anat. suppl. **41** (1), 1, 1963.
5. Latański M., Rzeszowska G.: Wpływ leczniczych dawek ampicyliny stosowanych u szczurów podczas ciąży na ultrastrukturę nerek u ich potomstwa. Bromat. Chem. Toksykol. **8** (4), 447, 1975.
6. Ludwicki J. K.: Enzymy lizosomalne. Bromat. Chem. Toksykol. **5** (2), 255, 1972.
7. Obuchowska D.: Badania mikroskopowo-elektronowe nad wpływem etanolu na nabłonek kanalików nerki szczura. Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, Sectio D **29**, 11, 1974.

8. Ostrowski K., Kawiak G.: Cytofizjologia. PZWL, Warszawa 1974.
9. Pawłowska-Tochman A., Obuchowska D.: Ocena ultrastruktury komórek kanalików krętych I rzędu nerki szczura pod wpływem lindanu. *Bromat. Chem. Toksykol.* 7 (2), 207, 1974.
10. Staszyc J., Kifer E.: Badania nad wpływem preparatu fosforoorganicznego na organizm ciężarnych szczurów i płodów oraz na komórki hodowli tkankowej. *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, Sectio D* 29, 249, 1974.

Otrzymano 23 XI 1982.

### OBJAŚNIENIA RYCIN

Ryc. 1. Zwierzęta kontrolne. N — jądro, Mv — mikrokosmki, Av — pęcherzyki apikalne, M — mitochondria, Ly — lizosomy, V — wakuole, Mb — mikrociała, RER — siatka śródplazmatyczna szorstka, SER — siatka śródplazmatyczna gładka, G — układ Golgiego. Pow. ok. 18 000×.

Ryc. 2. Zwierzęta doświadczalne. N — jądro, M — mitochondria, Ly — lizosomy, G — aparat Golgiego. Pow. ok. 18 000×.

Ryc. 3. Zwierzęta doświadczalne. N — jądro, M — mitochondria, Ly — lizosomy, RER — siatka śródplazmatyczna szorstka. Pow. ok. 18 000×.

Ryc. 4. Zwierzęta kontrolne. Reakcja na fosfatazę kwaśną w komórkach kanalików krętych I rzędu nerki noworodka szczura. Ly — lizosomy. Pow. ok. 18 000×.

Ryc. 5. Zwierzęta doświadczalne. BM — błona podstawowa, M — mitochondria, Ly — lizosomy, Mb — mikrociała. Pow. ok. 18 000×.

Ryc. 6. Zwierzęta doświadczalne. Reakcja na fosfatazę kwaśną w komórkach kanalików krętych I rzędu nerki noworodka szczura. Ly — lizosomy. Pow. ok. 18 000×.

### РЕЗЮМЕ

Исследовано влияние фосфамидона на эпителий извилистых канальцев первого ряда почек новорожденных крыс. В третьей части настоящей работы обсуждаются результаты субмикроскопических исследований. Во время исследования наблюдались изменения клеточного ядра, митохондрии, лизосомов, микротел и жировых тел. В клеточных ядрах отсутствовали хроматиновые скопления, прилегающие к внутренней пластинке ядерной оболочки. Митохондрии набухли и их внутренняя структура стала разреженной. Отмечены также изменения в строении митохондриального гребня. Изменения в лизосомах касались увеличения их количества и величины. Внутреннее строение лизосомов получилось неоднородное. Количество микротел и жировых тел увеличилось.

### SUMMARY

The influence of phosphamidon on the epithelium of proximal order-I tubules in the kidneys of newborn rats was investigated. The third part of the paper reports the results of submicroscopic studies. In the studies conducted, the changes concerning cell nucleus, mitochondria, lysosomes, microbodies and adipose bodies were observed. In cell nucleus there were no chromatinic agglomerates attached to the

internal lamina of the nucleus membrane. Mitochondria became swollen and their internal structure became rarefied. The changes were also observed in the structure of mitochondrial crista. The changes within lysosomes consisted in an increase of their number and size. The internal structure of lysosomes was also differentiated. The number of microbodies and adipose bodies increased.

#### EXPLANATION TO FIGURES

Fig. 1. Control animals. N — nucleus, Mv — microvilli, Av — apical vesicles, M — mitochondria, Ly — lysosomes, V — vacuoles, Mb — microbodies, RER — rough endoplasmatic reticulum, SER — smooth endoplasmatic reticulum, G — Golgi's system. Magn. ca. 18,000X.

Fig. 2. Experimental animals. N — nucleus, M — mitochondria, Ly — lysosomes, G — Golgi apparatus. Magn. ca. 18,000X.

Fig. 3. Experimental animals. N — nucleus, M — mitochondria, Ly — lysosomes, RER — rough endoplasmatic reticulum. Magn. ca. 18,000X.

Fig. 4. Control animals. Alkaline phosphatase reaction in the cells of order-I renal convoluted tubules in the newborn rat. Ly — lysosomes. Magn. ca. 18,000X.

Fig. 5. Experimental animals. BM — basic membrane, M — mitochondria, Ly — lysosome, Mb — microbodies. Magn. ca. 18,000X.

Fig. 6. Experimental animals. Alkaline phosphatase reaction in order-I renal convoluted tubules in the newborn rat. Ly — lysosomes. Magn. ca. 18,000X.

