

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXXV, 35

SECTIO D

1980

Zakład Anatomii Patologicznej. Instytut Patologii Klinicznej. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Marian Rożynek

Daniel CHIBOWSKI, Janina TRYKSZA

**Badania morfologiczne nad ochronnym wpływem małych dawek
czterochlorku węgla na tkankę wątroby**

Морфологические исследования защитного влияния на ткань печени небольших доз четыреххлористого углерода

Morphological Investigations on a Protective Effect of Small Doses of Carbon Tetrachloride on the Rat Liver

W r. 1966 Floersheim zaobserwował, że po upływie 24 godz. od podania małych dawek CCl_4 myszy wykazywały całkowitą oporność na podwójną dawkę DL_{95} falloidyny. Dambrauskas i Cornish (1) stwierdzili, że szczury, którym podano małe dawki CCl_4 , wykazywały oporność na śmiertelne dawki tej trucizny. Ugazio i wsp. w r. 1971 wykazali, że do szóstej godziny od podania szczurom małej dawki CCl_4 (25 $\mu\text{l}/100$ g wagi ciała), zastosowanej dożołądkowo w oleju parafinowym, nie ujawnia się jej ochronne działanie na tkankę wątroby. Częściowe ochronne działanie pojawia się po 12 godz. od podania małej dawki CCl_4 , a całkowita oporność na dawkę letalną (500 $\mu\text{l}/100$ g wagi ciała) występuje po 24 godz. i utrzymuje się przez 3 dni, po czym zwierzęta stają się ponownie stopniowo wrażliwe na letalne dawki CCl_4 .

Większość autorów (3, 5, 6, 7, 9) uważa, że ta ochronna właściwość małej dawki CCl_4 , stanowiącej 1/20 dawki DL_{95} , jest spowodowana zahamowaniem aktywności enzymatycznego układu wątroby, metabolizującego leki, nazywanego powszechnie oksydazą o funkcji mieszanej (mixed-function-oxidase-MFO), zależnego od cytochromu P-450 (8). Potwierdzeniem tej hipotezy jest wydłużony czas narkozy po heksobarbitalu u zwierząt wykazujących oporność na duże dawki CCl_4 oraz obniżeniu u tych zwierząt aktywności cytochromu P-450. Obniżeniu ulega także metabolizm $^{14}\text{CCl}_{14}$, co zostało potwierdzone zmniejszeniem współczynnika wbudowania ^{14}C do lipidów mikrosomalnych wątroby i zmniejszonym wytwarzaniem $^{14}\text{CO}_2$ (6).

Dane te wskazują, że ochronne działanie małych dawek polega na zmniejszeniu współczynnika metabolizowania CCl_4 na wolne rodniki, co z kolei w znacznym stopniu obniża peroksydację lipidów strukturalnych, która, wg współczesnych poglądów, jest odpowiedzialna za toksyczne działanie CCl_4 (4, 9).

Według innych autorów (10), za toksyczne działanie czterochlorku węgla jest odpowiedzialne nieodwracalne wiązanie się jego metabolitów z komponentami strukturalnymi komórki. Ponieważ w dostępnym piśmiennictwie nie znaleźliśmy oceny zmian histologicznych występujących w wątrobie szczurów po podaniu CCl_4 w dawce DL_{95} , po uprzednim zastosowaniu ochronnej dawki CCl_4 , wynoszącej 1/20 dawki letalnej, postanowiliśmy przebadać to zagadnienie w aspekcie morfologicznym.

MATERIAŁ I METODY

Do badania użyto 70 samców szczurów szczepu Wistar i 10 szczepu Sprague-Dawley (grupa IIIa) o wadze 180–240 g. Zwierzęta karmiono paszą granulowaną LSM i marchwią. Wodę do picia otrzymywały *ad libitum*. Zwierzętom w lekkiej narkozie eterowej podawano dożołądkowo czterochlorek węgla w oleju parafinowym w jednorazowej dawce 25 $\mu\text{l}/100$ g wagi ciała (dawka ochronna). Dawkę toksyczną 500 $\mu\text{l}/100$ g wagi ciała podawano po dawce ochronnej dożołądkowo, wg danych zawartych w tab. 1. Pożywienie odstawiano na 12 godz. przed podaniem CCl_4 w dawce „ochronnej” i letalnej. Po 6 godz. od podania dawki zabezpieczającej oraz dawki letalnej zwierzęta otrzymywały pokarm *ad libitum*.

Od chwili podania dawki toksycznej obserwowano zachowanie się zwierząt, a zwierzęta, które padły, poddano sekcji. Wycinki wątroby pobierano z płata centralnego i utrwalano w 10% zbuferowanej formalinie. Preparaty parafinowe barwiono H+E. Śmiertelność i czas przeżycia zwierząt przedstawiono w tab. 1.

Tab. 1. Wpływ małej dawki (1/20 DL_{95}) CCl_4 na czas przeżycia zwierząt po podaniu dawki DL_{95}

Effect of a small dose of (1/20 DL_{95}) CCl_4 on the survival time of the animals which were given DL_{95}

Grupa doświadczalna	Godziny po podaniu CCl_4 w dawce 1/20 DL_{95}	Dawka letalna CCl_4 DL_{95} (500 $\mu\text{l}/100$ g wagi ciała)	Liczba szczurów, które przeżyły Ogólna liczba zwierząt
I	—	500 $\mu\text{l}/100$ g wagi ciała	4/30
II	24	500 $\mu\text{l}/100$ g wagi ciała	4/10
III	36	500 $\mu\text{l}/100$ g wagi ciała	2/10
IIIa	36	500 $\mu\text{l}/100$ g wagi ciała	3/10
IV	40	500 $\mu\text{l}/100$ g wagi ciała	6/10
V	48	500 $\mu\text{l}/100$ g wagi ciała	6/10

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Uzyskane wyniki w eksperymencie *in vivo* wykazały, że ochronne działanie czterochlorku węgla w dawce 1/20 DL_{95} jest mniejsze niż używali to inni autorzy (1, 2, 3, 5, 6, 7, 9). Zmiany histologiczne u zwie-

rząt, które padły pomimo zastosowania ochronnej dawki czterochlorku węgla (1/20 DL₉₅), wykazywały nie mniejszy stopień nasilenia martwicy hepatocytów niż należałoby się tego spodziewać, a przeciwnie, cechy martwicy były bardziej zaawansowane (ryc. 1, 2). Prawdopodobnie wynika to z dłuższego czasu przeżycia zwierząt po zastosowaniu dawki ochronnej. Średnia przeżycia zwierząt w grupie I wynosiła 35 godz., a w grupach II, III, IIIa, IV i V 41 godz. Morfologiczne wykładniki regeneracji wątroby po tygodniu i po dwu tygodniach od podania dawki letalnej mają podobny stopień nasilenia w grupie II, III, IIIa, IV i V, jak w grupie I (ryc. 3, 4).

Na podstawie przeprowadzonych badań nie stwierdza się zasadniczych różnic morfologicznych, które mogłyby tłumaczyć, dlaczego po uprzednim zastosowaniu małej dawki czterochlorku węgla, stanowiącej 1/20 dawki DL₉₅, większy procent zwierząt przeżywa dawkę letalną. Badania *in vivo* wskazują na to, że optymalne ochronne działanie 1/20 dawki DL₉₅ występuje w czasie 40—48 godz. po podaniu czterochlorku węgla. Stwierdzona większa śmiertelność zwierząt po 36 godz. niż po 24 godz. jest trudna do interpretacji i wydaje się wynikiem przypadkowym. Istnieje także możliwość, że zastosowany przez nas czterochlorek węgla, produkcji „POCH”, zawiera substancje, które mogą zwiększać jego hepatotoksyczne działanie. Rozbieżności naszych wyników z danymi z piśmiennictwa można tłumaczyć różną zawartością cytochromu P-450 w wątrobie poszczególnych szczurów.

PIŚMIENNICTWO

1. Dambrauskas T., Cornish H. H.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **17**, 83—97, 1970.
2. Floersheim G. L.: *Biochem. Pharmacol.* **15**, 1589—1593, 1966.
3. Glende E. A. Jr.: *Biochem. Pharmacol.* **2**, 1697—1702, 1972.
4. Kanclerz A., Zbytniewski Z.: *Post. Hig. Med. Dośw.* **32**, 177—199, 1978.
5. Ugazio G. i wsp.: *Gastroenterology* **60**, 1, 108, 1971.
6. Ugazio G. i wsp.: *Exp. Mol. Pathol.* **16**, 281—285, 1972.
7. Ugazio G. i wsp.: *Exp. Mol. Path.* **18**, 281—289, 1973.
8. Pużyńska L.: *Pol. Tyg. Lek.* **35**, 1387—1390, 1978.
9. Recknagel R. O., Ugazio G., Koch R. R., Glende F. A.: *New Perspectives in the Study of Experimental Carbon Tetrachloride. The Liver*, Baltimore 1973, 150—160.
10. Villarruel M. i wsp.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **41**, 337—344, 1977.

Otrzymano 10 XII 1979.

OBJAŚNIENIA RYCIN

Ryc. 1. Wątroba po działaniu dawki toksycznej CCl_4 (500 $\mu\text{l}/100$ g wagi ciała). Widoczne rozległe zmiany martwicze, stłuszczenie oraz przepojenie krwiotoczne prawie całego obszaru zrazika. Barwienie H+E. Pow. ok. 200 \times .

Ryc. 2. Wątroba po działaniu dawki toksycznej po uprzednim zastosowaniu dawki ochronnej (25 $\mu\text{l}/100$ g wagi ciała). Zmiany podobne jak na ryc. 1. Stopień nasilenia zmian intensywniej zaznaczony. Barwienie H+E. Pow. ok. 200 \times .

Ryc. 3. Wątroba dwa tygodnie po podaniu dawki toksycznej CCl_4 (grupa I). Wyraźnie widoczne cechy regeneracji hepatocytów w obwodowych częściach zrazika (→). Barwienie H+E. Pow. ok. 200 \times .

Ryc. 4. Wątroba dwa tygodnie po podaniu dawki toksycznej po uprzednim zastosowaniu dawki ochronnej CCl_4 (1/20 DL_{95}) — grupa II. Zmiany podobne do widocznych na ryc. 3 (→). Barwienie H+E. Pow. ok. 200 \times .

РЕЗЮМЕ

Авторы исследовали влияние предохранительного действия на ткань печени крыс небольших доз четыреххлористого углерода. Они обнаружили, что 1/20 дозы DL_{95} четыреххлористого углерода, введенная перед летальной дозой, от 40 до 48 часов, увеличивает выживание животных о 13,3% до 60%. 100% выживание животных, наблюдаемое другими авторами не подтвердилось. Существенных различий между группой животных, которым вводилась лишь токсическая доза, а группой, которой вводилась защитная доза выносящая 1/20 DL_{95} четыреххлористого углерода, морфологическими исследованиями не обнаружено.

SUMMARY

Influence of a protective effect of small doses of carbon tetrachloride on the rat liver was examined. The results showed that 1/20 dose of DL_{95} of carbon tetrachloride, administered 48 hours prior to the lethal dose, increased the survival of the animals from 13.3 to 60 per cent. A 100 per cent survival of the animals, reported by other authors, has not been confirmed by us. Morphological analysis did not reveal any significant differences among the animals which were administered the toxic dose only and those which were earlier given the protective dose (1/20 dose of DL_{95}).

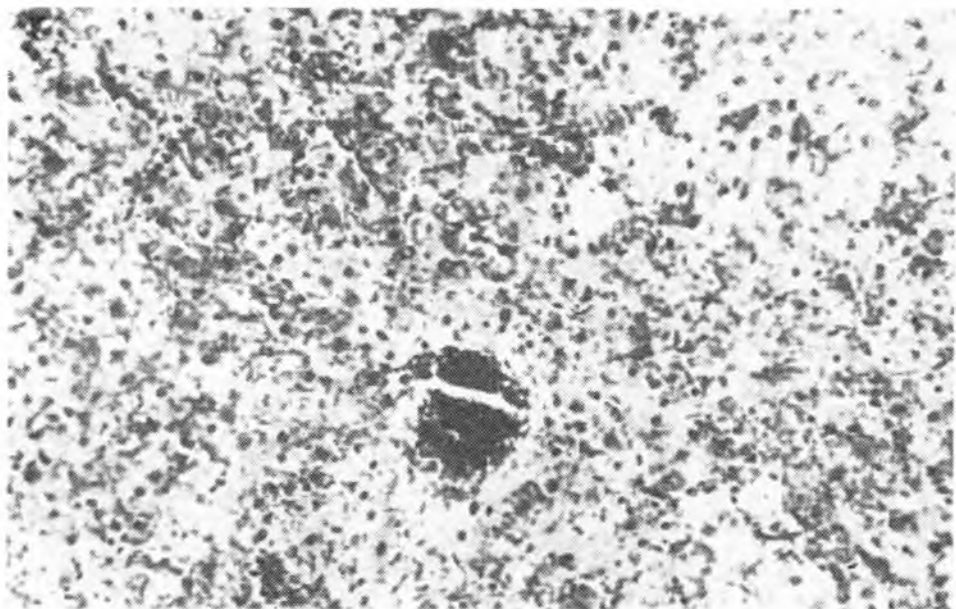
EXPLANATION TO FIGURES

Fig. 1. The liver after treatment with toxic dose of CCl_4 (500 μl per 100 g of body weight). Large necrotic areas, fatty degeneration and hemorrhagic congestion of almost the whole lobule. Hematoxylin and eosin staining. Magn. ca. 200 \times .

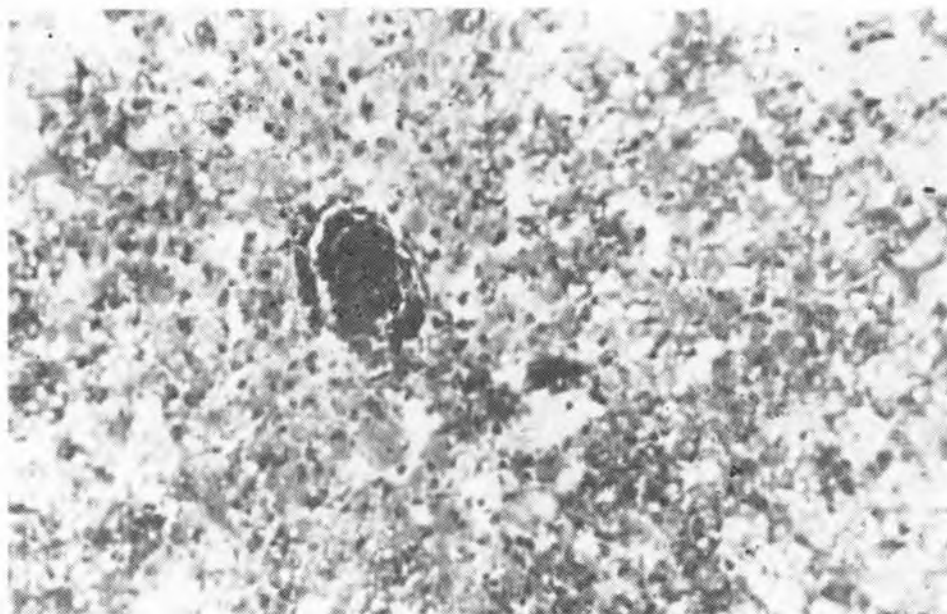
Fig. 2. The liver after treatment with toxic dose following earlier administration of a protective dose (25 μl per 100 g of body weight). Changes similar to those as seen in Fig. 1. Hematoxylin and eosin staining. Magn. ca. 200 \times .

Fig. 3. The liver, two weeks after administration of a toxic dose of CCl_4 (group I). Signs of hepatocyte regeneration in the peripheral parts of the lobule are visible (→). Hematoxylin and eosin staining. Magn. ca. 200 \times .

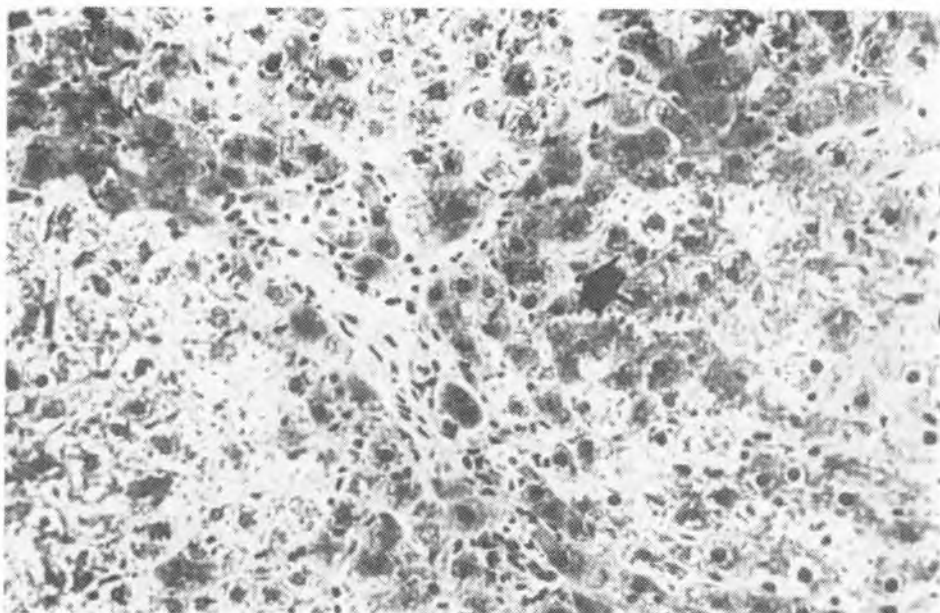
Fig. 4. The liver, two weeks after administration of a toxic dose, the protective dose of CCl_4 1/20 DL_{95} was given earlier (group II). The changes similar to those as seen in Fig. 3 (→). Hematoxylin and eosin staining. Magn. ca. 200 \times .



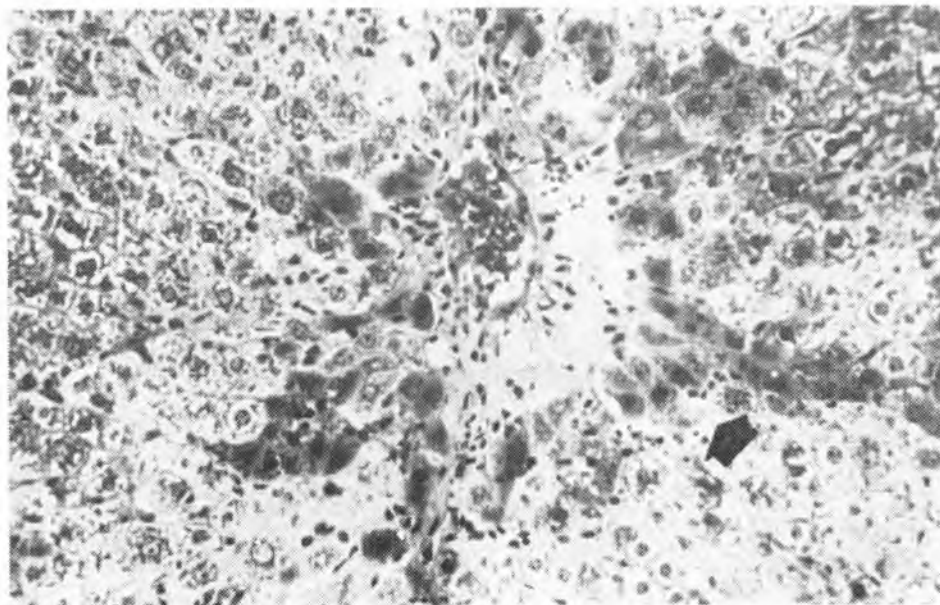
Ryc. 1



Ryc. 2



Ryc. 3



Ryc. 4