

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXXVI, 32

SECTIO D

1981

Zakład Histologii i Embriologii. Instytut Biologiczno-Morfologiczny. Akademia Medyczna
w Lublinie

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Józef Staszyc

Ewa KIFER

**Wpływ Lebaycidu na histochemicznie oznaczaną aktywność niektórych
enzymów w nerkach szczurów**

Влияние Лебайцида на гистохимические определения активности некоторых
энзимов в почках крыс

The Effect of Lebaycide on the Histochemically Determined Activity of some
Enzymes in Rats' Kidneys

Fention jest substancją czynną Lebaycidu, preparatu stosowanego powszechnie w ochronie sadów owocowych. Fention należy do grupy związków fosforoorganicznych. Główny tor działania tych związków polega na blokowaniu esterazy cholinowej i w konsekwencji prowadzi do zaburzeń w funkcjonowaniu układu nerwowego (9). Fention jako pochodna kwasu tionofosforowego nie wiąże bezpośrednio esterazy cholinowej, jak estry kwasu fosforowego, a musi ulec przemianie metabolicznej (utlenienie lub przemiana izomeryczna) do związków fosforowych. Liczne badania wskazują na ujemny wpływ związków fosforoorganicznych na czynność innych narządów i enzymów (2, 10).

W dostępnej literaturze nie spotkano badań nad wpływem fentionu — Lebaycidu na narządy wewnętrzne. Dlatego postanowiono prześledzić wpływ fentionu w zatruciu podostrym na aktywność niektórych enzymów w czynnych odcinkach kanalików nerek szczurów, ponieważ fention oraz jego metabolity są z organizmu usuwane przez nerki.

MATERIAŁ I METODYKA

Szczury białe rasy Wistar, karmione standardową dietą, w wieku 3—5 miesięcy w liczbie 40 szt. podzielono na 5 grup po 8 zwierząt w każdej. W czterech grupach doświadczalnych szczurom podawano sondą dożołądkowo Lebaycid w zawie-

sinie wodnej, przeliczając dawkę na ilość substancji czynnej fentionu (Lebaycid zawiera 50% fentionu).

Grupa I doświadczalna — szczurom podawano Lebaycid w ilości 1/8 LD₅₀ fentionu (ca 25 mg/kg m.c.) przez 6 dni.

Grupa II doświadczalna — dawka jak w grupie I podawana przez 20 dni (codziennie przez 6 dni, następnie co drugi dzień).

Grupa III doświadczalna — Lebaycid podawano w ilości 1/4 LD₅₀ fentionu (ca 50 mg/kg m.c.) przez 6 dni (5 razy).

Grupa IV doświadczalna — dawka jak w grupie III podawana przez 20 dni (codziennie przez 3 dni, następnie co 2 dni).

Grupa V kontrolna — podawano wodę destylowaną.

Po skończonym okresie podawania pestycydu zwierzęta dekapitowano i pobierano lewą nerkę do badań. Świeże wycinki nerki zamrażano i krojono w kriostacie typu Slee. Na otrzymanych skrawkach przeprowadzono reakcje histochemiczne na aktywność: dehydrogenazy bursztynianowej wg metody Nachlasa, dehydrogenaz: izocytrynianowej, mleczanowej i glukozy-6-fosforanowej wg metody Pearse'a. Pozostałą część nerki utrwalano w płynie Bakera przez 24 godz. i skrawano na mikrotomie mroźniowym. Następnie wykonano reakcje na aktywność fosfataz kwaśnej i zasadowej wg metody Gomoriego oraz na aktywność ATP-azy wg metody Wachsteina i Meisel w modyfikacji Vorbrodta.

Do przeprowadzonych reakcji wykonano kontrole w środowisku bez substratu. Wyniki reakcji histochemicznych z grup doświadczalnych porównywano do uzyskanych w nerkach zwierząt kontrolnych.

BADANIA WŁASNE

Fosfataza kwaśna (AcP). Pozytywny odczyn w grupie kontrolnej ujawnił się w postaci dość licznych brunatnych ziaren w cytoplazmie komórek nabłonka kanalików nerkowych. Ziarna te najliczniej lokalizowały się w środkowej części cytoplazmy w strefie przyjądrowej. W kanalikach nefronów górnych ziarna produktu reakcji były grubsze, a w dolnych drobniejsze (ryc. 1). W grupie I doświadczalnej odczyn na fosfatazę kwaśną był silniejszy niż w grupie kontrolnej, co wyraźniej zaznaczyło się w kanalikach nefronów dolnych. Jeszcze wyraźniejsze wzmoczenie odczynu na tę hydrolazę w kanalikach nefronów dolnych obserwowano w grupie II doświadczalnej (ryc. 2). Również w grupie III doświadczalnej nasilony odczyn wystąpił w kanalikach nefronów dolnych. Ziarna produktu reakcji były liczniejsze i częściej jak w grupie kontrolnej wykazywały tendencje do grupowania się. Podawanie 20-dniowe fentionu w większej dawce (grupa IV) powodowało nasilenie reakcji enzymatycznej w całej części korowej, tak w nefronach dolnych, jak i w górnych. W nefronach części przyrdzennej kory ziarenka fosfatazopozytywne były podobnie duże jak w korze właściwej i często zlewały się w duże konglomeraty.

Fosfataza zasadowa (ALP). W grupie kontrolnej wyraźny odczyn na fosfatazę zasadową występował w rąbku szczoteczkowym kanalików głównych (ryc. 3) i słaby dyfuzyjny odczyn zaznaczył się w wierzchołkowej części cytoplazmy komórek tych kanalików. Podawanie fentionu w dawce 25 mg/kg m.c. przez 6 dni (grupa I) nie wywoływało zauważalnych w mikroskopie zmian w odczynie na fosfatazę zasadową w zestawieniu z grupą kontrolną, natomiast dawka ta stosowana przez 20 dni (grupa II) powodowała wzrost odczynu histochemicznego rąbka szczoteczkowego kanalików głównych (ryc. 4), szczególnie w środkowej i podtorebkowej części kory nerki. Słabą pozytywną reakcją na tę hydrolazę obserwowano w nielicznych ciątkach nerkowych. W porównaniu z grupą kontrolną większa dawka fentionu podawana przez 6 i 20 dni (grupa III i grupa IV) obniżała reakcję na fosfatazę zasadową w rąbku szczoteczkowym kanalików głównych nefronów przyrdzennych. Osłabienie odczynu na fosfatazę zasadową było wyraźniejsze po 6 dniach podawania fentionu niż po 20 dniach.

Adenozynotrójfosfataza (ATP-aza). W nerkach zwierząt kontrolnych pozytywną reakcją na aktywność enzymu obserwowano w naczyniach krwionośnych w części korowej i rdzennej nerki. Wysoką aktywność ATP-azy ujawniła sieć naczyniowa kłębków nerkowych. Pozytywny odczyn wystąpił w rąbku szczoteczkowym kanalików głównych, nasilając się w kierunku istoty rdzennej nerki. Porównując z grupą kontrolną, w grupach doświadczalnych I i II zauważono wzmożony odczyn na ATP-azę w rąbku szczoteczkowym i cytoplazmie komórek kanalików głównych nerki, szczególnie w środkowej części kory. W grupach III i IV silniejszą, jak w grupie kontrolnej, reakcją na ATP-azę obserwowano w zewnętrznej i środkowej strefie kory nerki. Nasilenie reakcji enzymatycznej zmniejszało się w kierunku istoty rdzennej, odwrotnie jak w grupie kontrolnej. Poza wzmożonym odczynem w rąbku szczoteczkowym, pozytywna reakcja ujawniła się w tkance łącznej podścieliska oraz częściej jak w materiale porównawczym w karioplazmie lub błonie jądrowej w komórkach nabłonka kanalików głównych nerki.

Dehydrogenaza izocytrynianowa (ICDH). Na preparatach kontrolnych odczyn na dehydrogenazę cytrynianową był równomierny w części korowej i strefie zewnętrznej części rdzennej nerki, a wyraźnie słabszy w strefie wewnętrznej istoty rdzennej. Najsilniejszą reakcją dały kanaliki kręte I rzędu, gdzie odczyn lokalizował się głównie w środkowej i podstawnej części cytoplazmy komórek nabłonka tych kanalików. W grupie I doświadczalnej odczyn był podobnie intensywny i rozmieszczony jak w grupie kontrolnej. W pozostałych grupach zwierząt otrzymujących fention (grupy II, III i IV) reakcja na ICDH była nierównomiernie osłabiona. Bardzo wyraźne osłabienie odczynu ujawniło się w

grupie IV ($1/4$ LD₅₀ przez 20 dni). Kanaliki kręte I rzędu we wszystkich grupach, jak w kontroli, wykazywały odczyn najsilniejszy.

Dehydrogenaza D-glukozo-6-fosforanowa (DG-6-P). W nerkach zwierząt kontrolnych pozytywną reakcję obserwowano w kanalikach krętych I i II rzędu, silniejszą w cewkach grubych, a słabszą w pozostałych odcinkach nefronu. Fention w dawce $1/8$ LD₅₀ podawany przez 6 dni nie powodował zmian w aktywności tej dehydrogenazy, a po 20 dniach podawania zauważono słabszy odczyn w promieniach rdzennych oraz obniżenie aktywności we wszystkich odcinkach nefronu po 6-dniowym podawaniu większej dawki pestycydu. Natomiast w grupie zwierząt otrzymujących większą dawkę fentionu przez 20 dni (grupa IV) odczyn był silniejszy i lokalizował się, wyraźniej jak w grupie kontrolnej, przy podstawie komórek. Przypodstawne zlokalizowanie odczynu najwyraźniej zaznaczyło się w cewkach krętych II rzędu.

Dehydrogenaza mleczanowa (LDH). Reakcja na dehydrogenazę mleczanową wykazała wysoką aktywność enzymu w komórkach nabłonka cewek krętych I i II rzędu oraz cewek grubych. Ciałka nerkowe, cewki cienkie i zbiorcze dały odczyn wyraźnie słabszy. Produkt reakcji lokalizował się w środkowopodstawnej części komórek nabłonkowych kanalików, wokół jąder komórkowych. W grupach I i II obraz mikroskopowy odczynu na LDH nie był zmieniony. U zwierząt otrzymujących większą dawkę fentionu ($1/4$ LD₅₀) zauważono więcej ziaren produktu reakcji, które przesłaniały jądra komórkowe (grupa III) i lokalizowały się wyraźniej w podstawnej części cytoplazmy komórek kanalika dalszego (grupa IV).

Dehydrogenaza bursztynianowa (SDH). Pozytywną reakcję na aktywność SDH wykazała część korowa i strefa zewnętrzna części rdzennej nerki. Najsilniejszy odczyn ujawniły cewki grube pętli Henlego, a najslabszy cewki cienkie i zbiorcze. W kanalikach krętych I i II rzędu i cewkach grubych produkt reakcji lokalizował się głównie w przypodstawnej części cytoplazmy komórek nabłonkowych (ryc. 5). W grupach doświadczalnych I i II (mniejsza dawka — 6 i 20 dni) odczyn na SDH był silniejszy we wszystkich odcinkach nefronu. Nasilenie reakcji enzymatycznej było wyraźniejsze po krótszym czasie podawania fentionu. Wzmożenie odczynu przejawiało się liczniejszymi ziarnami monoi dwuformazanu, rozmieszczonymi na terenie całej cytoplazmy komórek nabłonkowych (ryc. 6). Po podawaniu większej dawki fentionu (grupa III i IV) zaznaczyło się przesunięcie produktu reakcji enzymatycznej do środkowej części cytoplazmy, przede wszystkim w komórkach cewek grubych pętli Henlego. Przemieszczenie ziaren formazanowych było wyraźniejsze po dłuższym czasie podawania pestycydu (grupa IV).

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Fention podawany szczurom w dawce $1/4 LD_{50}$ powodował po 3 codziennych dawkach wystąpienie objawów klinicznych zatrucia związkami fosforoorganicznymi (objawy muskarynowe i nikotynowe), a dawka $1/8 LD_{50}$ — po 6 dniach. W związku z tym w dalszym etapie doświadczenia preparat podawano co drugi dzień i obserwowano częściowe lub całkowite ustąpienie objawów zatrucia. Kliniczne objawy zatrucia związkami fosforoorganicznymi są powodowane przede wszystkim inhibitowaniem acetylocholino w mózgu (3). Pa nek i wsp. (8) sugerują, że nie ma korelacji między występowaniem zaburzeń metabolizmu tkankowego a stopniem zahamowania acetylocholinoesterazy. Wyniki przeprowadzonych badań histochemicznych, jak się wydaje, potwierdzają te sugestie, ponieważ obserwowane zmiany enzymatyczne nie były aż tak znamienne. Podawanie 6-dniowe fentionu w dawce $1/8 LD_{50}$ powodowało wystąpienie klinicznych objawów zatrucia, a badania enzymatyczne wykazały w tej grupie zwierząt niewielkie zmiany w odczynach na aktywność fosfatazy kwaśnej, dehydrogenazy bursztynianowej i fragmentarycznie ATP-azy. Natomiast po dłuższym okresie podawania pestycydu objawy kliniczne zatrucia ustępowały, a zmiany w obrazach histochemicznych nerki były większe. Aktywność fosfatazy kwaśnej zwiększała się wraz z dawką i czasem działania fentionu. Wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej po podawaniu związków fosforoorganicznych obserwowali liczni autorzy (4, 10). Nasilenie odczynu na fosfatazę kwaśną — markera lizosomów — można wiązać ze wzmoczoną fago- i pinocytozą, trawieniem materiału zarówno pozakomórkowego, jak i wewnątrzkomórkowego (7) i może świadczyć o zaburzeniu czynności komórki oraz o nasileniu się normalnego metabolizmu (4). Równocześnie obserwowane nasilenie reakcji enzymatycznej na aktywność ATP-azy i dehydrogenazy bursztynianowej przemawiałoby za wzmoczeniem metabolizmu tlenowego i aktywnego transportu przez błonę komórkową w kanaliku nerkowym (6). Zmiany odczynu na fosfatazę zasadową, wzmoczenie po mniejszej dawce fentionu potwierdza nasilenie aktywnego transportu, natomiast obniżenie odczynu w grupach III i IV (po większej dawce) zaprzecza przypuszczeniu wzmoczonej reabsorpcji w kanaliku głównym nerki. Związki fosforoorganiczne oraz inne pestycydy podnoszą poziom cukru we krwi zwierząt (5), a zmniejszają ilość glikogenu w wątrobie (1). Być może, zbyt intensywna resorpcja zwrotna glukozy w kanaliku głównym po pewnym czasie osłabia wydolność komórek.

Wyniki przeprowadzonych badań histochemicznych hydrolaz i dehydrogenaz sugerują, że Lebaycid wywiera ujemny wpływ na czynność ko-

mórek nefronu. Zaburzenie funkcji nerki zwiększa się z czasem działania tego związku i dlatego przy długotrwałych pracach z tym preparatem fosforoorganicznym należy zachować dużą ostrożność.

PIŚMIENICTWO

1. Beskid M. i wsp.: Wpływ Malationu na niektóre odczyny enzymów oddechowych i ultrastrukturę mitochondriów wątroby szczura. Roczn. PZH **24**, 741, 1973.
2. Biernat S., Giermaziak A.: Zmiany patomorfologiczne w mięśni sercowym i we wsierdziu królika po ostrym zatruciu Intrationem i po niektórych związkach odtruwających. Pat. Pol. **25**, 59, 1974.
3. Faff J.: Zagadnienie wskaźników biochemicznych zatrucia związkami fosforoorganicznymi w zależności od budowy chemicznej inhibitora. Med. Pracy **22**, 415, 1971.
4. Grzycki S. i wsp.: Recherches sur la topographie fonctionnelle des enzymes hydrolytiques dans l'épithélium des tubes contournés du rein. Acta Histochem. **47**, 350, 1973.
5. Gupta P.: Malathion Induced Biochemical Changes in Rats. Acta Pharmacol et Toxicol. **35**, 191, 1974.
6. Karbowski A. i wsp.: Zachowanie się ATP-azy, dezoksyrybonukleazy II oraz fosfatazy kwaśnej w nerkach szczurów zatrutowanych przewlekle czterochlorkiem węgla. Med. Pracy. **24**, 141, 1973.
7. Ludwicki J.: Enzymy lizosomalne. Bromat. Chem. Toksykol. **5**, 225, 1972.
8. Panek R. i wsp.: Badania nad właściwościami farmakologicznymi i mechanicznymi działania Fenchlorfosu. Bromat. Chem. Toksykol. **21**, 151, 1973.
9. Sośnierz M. i wsp.: Zmiany neuropatologiczne u szczurów zatrutowanych przedziorkofosem. Neuropatol. Pol. **11**, 109, 1973.
10. Woźniak F.: Badania histochemiczne i morfologiczne nad wpływem przewlekłego stosowania niektórych insektycydów na mikrostrukturę gonady męskiej szczura białego. Rozprawa habilitacyjna. Lublin 1976.

Otrzymano 31 XII 1980.

OPIS RYCIN

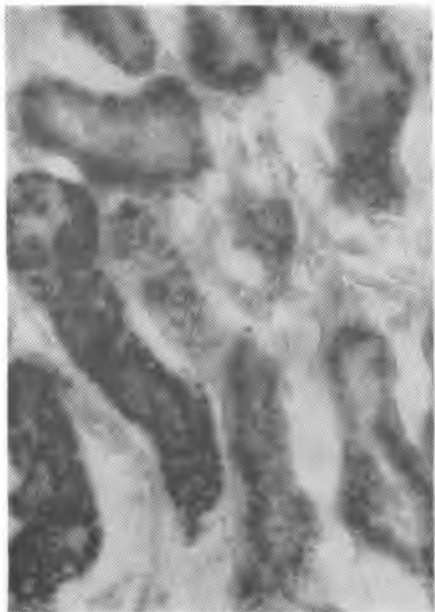
Ryc. 1. Grupa kontrolna. Nerka szczura. Reakcja na aktywność fosfatazy kwaśnej. Metoda wg Gomoriego. Pow. ca. 100X.

Ryc. 2. Grupa II doświadczalna (1/8 LD₅₀ — 20 dni podawania). Nerka szczura. Wzmoczony odczyn na aktywność fosfatazy kwaśnej. Metoda wg Gomoriego. Pow. ca 100X. ~

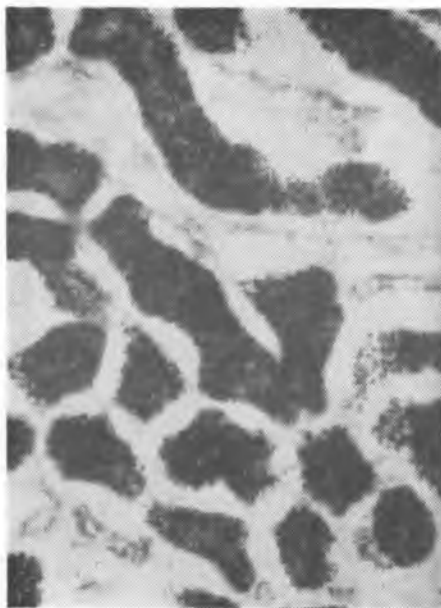
Ryc. 3. Grupa kontrolna. Nerka szczura. Odczyn na aktywność fosfatazy zasadowej. Metoda wg Gomoriego. Pow. ca 100X.

Ryc. 4. Grupa II doświadczalna (1/8 LD₅₀ — 20 dni podawania). Nerka szczura. Wzmoczony odczyn na aktywność fosfatazy zasadowej w rąbku szczoteczkowym kanalików krętych I rzędu. Metoda wg Gomoriego. Pow. ca 100X.

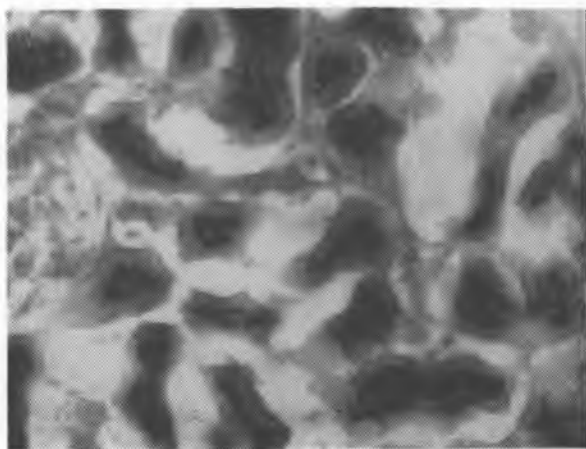
Ryc. 5. Grupa kontrolna. Nerka szczura. Odczyn na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej. Metoda wg Nachlasa. Pow. ca 25X.



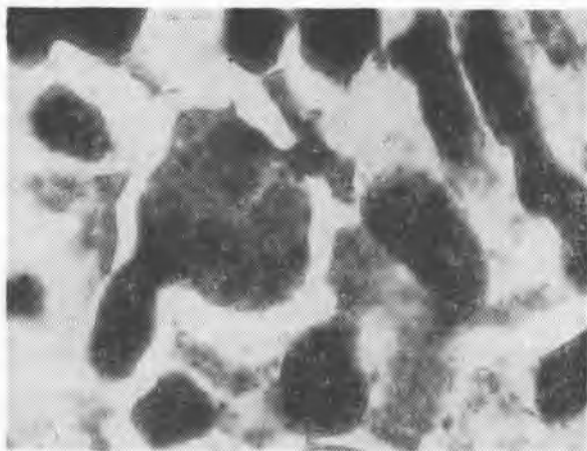
Ryc. 1



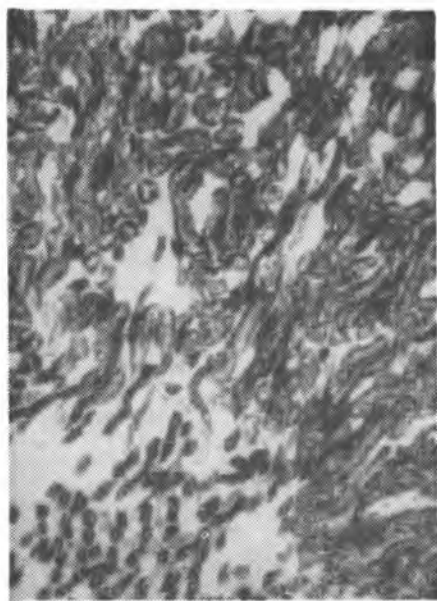
Ryc. 2



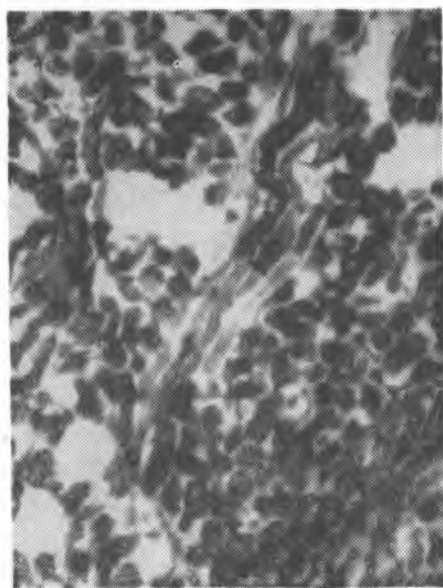
Ryc. 3



Ryc. 4



Ryc. 5



Ryc. 6

Рис. 6. Група I doświadczalna (1/8 LD₅₀ — 6 dni podawania). Nerka szczura. Silna reakcja na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w całej cytoplazmie komórek kanalików nerki. Metoda wg Nachlasa. Pow. ca 25X.

РЕЗЮМЕ

Лебайцид — фосфоорганический препарат применяемый в садоводстве, вводился белым крысам в двух дозах в течение 6 и 20 дней. На почках проведено гистохимические реакции активности фосфатаз: кислой и щелочной, аденозин-3' фосфатазы и дегидрогеназ: сукцинатдегидрогеназы, изолимонной, глюкозо-6-фосфатной и лактатной. Наблюдаемые результаты гистохимических реакций указывают на изменения активности исследованных энзимов и подтверждают расстройство функции почек.

SUMMARY

Lebaycide — a phosphororganic compound used in orcharding was being administered to white rats in two doses for the period of 6 and 20 days. The kidneys underwent histochemical reactions for the activity of acid and alkaline phosphatase, ATP-ase as well as succinic, isocitrate, glucose-6-phosphatic and lactic dehydrogenases. The observed results of the histochemical reactions indicate changes in the activity of enzymes under study and account for disturbances in the kidney function.

EXPLANATION TO FIGURES

Fig. 1. Control group. Kidney of a rat. Reaction to acid phosphatase activity. The method after Gomori. Magn. ca 100X.

Fig. 2. Experimental group II (administered in a dose of 1/8 LD₅₀ — during 20 days). Kidney of a rat. An intensive reaction to acid phosphatase activity. The method after Gomori. Magn. ca 100X.

Fig. 3. Control group. Kidney of a rat. Reaction to alkaline phosphatase activity. The method after Gomori. Magn. ca 100X.

Fig. 4. Experimental group II (administered in a dose of 1/8 LD₅₀ — during 20 days). Kidney of a rat. An intensive reaction to alkaline phosphatase activity in the brush border of the proximal tubules. The method after Gomori. Magn. ca 100X.

Fig. 5. Control group. Kidney of a rat. Reaction to succinic dehydrogenase activity. The method after Nachlas. Magn. ca 25X.

Fig. 6. Experimental group I (administered in a dose of 1/8 LD₅₀ — during 6 days). Kidney of a rat. An intensive reaction to of succinic dehydrogenase activity in the whole cytoplasm of the kidney tubule cells. The method after Nachlas. Magn. ca 25X.

