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

Tamara MAJSTRUK-MAJEWSKA,
Teresa BŁAŻEJEWSKA, Wiesława ZARANKO

Wpływ Sefrilu na odczyny histochemiczne w kanalikach głównych nerki szczura

Влияние Сефрила на гистохимические реакции в главных канальцах почки крыс

The Effect of Sefril on Histochemical Response in the Main Tubules
of the Rat Kidney

Sefril to antybiotyk o wybiórczej toksyczności, znacznie większej w stosunku do drobnoustrojów niż do komórek gospodarza. Jednak, przyjmowany w dużych dawkach, może powodować poważne objawy uboczne w organizmie człowieka (1, 6, 9). Biorąc pod uwagę fakt, że lek ten prawie w całości wydalany jest z moczem w stanie nie zmienionym (1, 6, 10), a nie spotkano w piśmiennictwie danych na temat wpływu Sefrilu na układ enzymatyczny nerki, postanowiono przebadać histochemiczne i morfologiczne ewentualne zmiany powstałe w nerkach zwierząt doświadczalnych po podaniu tego antybiotyku.

MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto szczurów białych (samców) szczepu Wistar, które podzielono na 3 grupy: dwie doświadczalne i jedną kontrolną. Zwierzęta grupy I doświadczalnej otrzymywały codziennie przed porannym karmieniem dożołądkowo lek w dawce 500 mg/kg c.c. przez okres 7 dni. Szczury grupy II doświadczalnej otrzymywały przez taki sam okres lek w dawce 2000 mg/kg c.c. Grupa kontrolna zamiast antybiotyku otrzymywała wodę destylowaną. Po 24 godz. od ostatniego podania Sefrilu szczury dekapitowano i pobierano nerki do badań histochemicznych i histologicznych. Materiał utrwalano w płynie Bakera i płynie Carnoya. Aktywność fosfatazy

kwaśnej i fosfatazy zasadowej wykrywano według metody Gomoriego, tiaminowej pyrofosfatazy — według metody Novikoffa i Goldfischera, glikogen — według metody McManusa. Z metod standardowych zastosowano barwienie hematoksyliną i eozyną.

WYNIKI BADAŃ

F o s f a t a z a k w a ś n a (Fk)

W nerkach grupy kontrolnej silny odczyn, wskazujący na obecność enzymu, występował w postaci drobnych ziarnistości w cewkach krętych I rzędu. Lokalizował się on szczególnie w okolicach: przypodstawnej i okołojądrowej komórek nabłonka. Ciałka nerkowe oraz cewki kręte II rzędu reakcji nie wykazywały (ryc. 1).

U zwierząt grupy I doświadczalnej znaczna aktywność występowała przede wszystkim w okolicy przypodstawnej cewek krętych I rzędu. Poza tym obraz podobny był do kontrolnego. W nerkach szczurów grupy II doświadczalnej nastąpiło różnicowanie aktywności Fk w poszczególnych nefronach. W istocie korowej obserwowano cewki kręte I rzędu zarówno z dużym nagromadzeniem ziarnistości wypełniających niemal równomiernie całą cytoplazmę komórek nabłonka, jak i cewki posiadające ziarnisty odczyn jedynie w okolicach przypodstawnych. Inne struktury, wchodzące w skład części korowej narządu, odczynu nie wykazywały (ryc. 2).

F o s f a t a z a z a s a d o w a (Fz)

W grupie kontrolnej najbardziej intensywny odczyn posiadał rąbek szczoteczki nabłonka cewek krętych I rzędu, szczególnie w okolicy przyrdzennej kory nerki. Niewielką aktywność enzymu obserwowano w jądrach i błonach komórkowych cewek krętych I i II rzędu oraz w ciałkach nerkowych (ryc. 3).

W grupie I doświadczalnej silniejszy odczyn uwidocznił się w rąbku szczoteczkowym cewek krętych I rzędu leżących w strefie przyrdzennej kory niż w strefie podtorebkowej. Ta ostatnia wykazywała niższą aktywność Fz od obrazu kontrolnego.

W nerkach zwierząt grupy II doświadczalnej część korowa wykazywała strukturę zatartą. Słaba aktywność występowała w rąbku szczoteczkowym cewek krętych I rzędu, leżących w strefie podtorebkowej, nieco silniejsza w strefie przyrdzennej. W błonach podstawnych nabłonka odczyn był negatywny (ryc. 4).

Tiaminowa pyrofosfataza (TPP-aza)

Bardzo silna ziarnista reakcja występowała u zwierząt grupy kontrolnej w ciałkach nerkowych oraz we wszystkich naczyniach krwionośnych nerki. Pozytywny odczyn zaznaczał się również w okolicy przyjądrowej komórek nabłonka cewek krętych I rzędu, przy czym zauważono, że w niektórych nefronach aktywne ziarnistości występowały bardzo obficie, w innych było ich mało lub zupełnie brak. Cewki z silniejszym odczy-nem spotykano głównie w nefronach leżących w strefie podtorebkowej nerki. W cewkach krętych II rzędu odczynu na TPP-azę nie stwierdzono albo był bardzo słaby (ryc. 5).

W nerkach grupy I doświadczalnej intensywność zabarwienia znacznie osłabła. Ciałka nerkowe i naczynia krwionośne zareagowały wprawdzie dość mocno, jednak cewki kręte I rzędu, szczególnie w okolicy przyrdzennej, wykazywały słabszą reakcję.

W grupie II doświadczalnej ciałka nerkowe wykazywały silną reakcję, natomiast w cewkach krętych I rzędu obserwowano odczyn dyfuzyjny. W okolicy przypodstawnej komórek nabłonka spotykano niewiele aktywnych ziarnistości. W okolicy podtorebkowej nerki ilość ich w cewkach była większa. Cewki kręte I rzędu, należące do różnych nefronów, różniły się między sobą ilością barwnego produktu i intensywnością odczynu (ryc. 6).

Glikogen

W nerkach grupy kontrolnej umiarkowany odczyn na glikogen występował w ciałkach nerkowych, w mezangium oraz w błonie podstawnej śródbłonka naczyń. Zareagowała również błona podstawna blaszki ściennej i trzewnej torebki Bowmana. W cewkach krętych I rzędu, leżących w obszarze podtorebkowym nerki, rąbek szczoteczkowy wykazywał reakcję umiarkowaną, natomiast w obszarze przyrdzennym — dość silną. W cewkach krętych II rzędu reakcję umiarkowaną stwierdzono jedynie w błonie podstawnej (ryc. 7).

W porównaniu z grupą kontrolną w grupie I doświadczalnej nie zauważono widocznych różnic, natomiast w ciałkach nerkowych obserwowano zwiększony odczyn. W cytoplazmie cewek krętych I i II rzędu wystąpiła reakcja dyfuzyjna. Błony podstawne cewek zareagowały umiarkowanie, natomiast słabszy odczyn wystąpił w rąbku szczoteczkowym. Nie obserwowano różnic w zabarwieniu między cewkami leżącymi w strefie podtorebkowej i przyrdzennej (ryc. 8).

Barwienie hematoksyliną i eozyną

W nerkach grupy kontrolnej oraz grupy I doświadczalnej obraz histologiczny był prawidłowy i raczej nie wykazywał różnic między obiema grupami (ryc. 9). Zauważalne zmiany mikroskopowe wystąpiły w nerkach grupy II doświadczalnej. Kłębuszki naczyń krwionośnych obkurczyły się, a to spowodowało powiększenie się szczeliny między blaszkami torebki Bowmana. Komórki nabłonka cewek krętych I rzędu wykazywały większą kwasochłonność aniżeli analogiczne komórki nerek kontrolnych (ryc. 10).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Piśmiennictwo dotyczące Sefrilu zapewnia, że antybiotyk ten jest przez chorego bardzo dobrze tolerowany, jednak przy upośledzonej czynności nerek należy zmodyfikować jego dawkowanie (10).

Szczurom grupy I doświadczalnej podawano dawkę leku zbliżoną do maksymalnej, stosowanej dla ludzi dorosłych (500 mg/kg), natomiast zwierzętom grupy II doświadczalnej celowo zwiększono ją czterokrotnie (2000 mg/kg). Okazało się, że zmiany histologiczne i histochemiczne, które wystąpiły w nerkach, dotyczą przede wszystkim osobników grupy II doświadczalnej, a więc po tak dużej dawce Sefrilu, jakiej normalnie ludziom się nie stosuje.

Standardowe barwienie hematoksyliną i eozyną wykazało, że stosowane w grupie I doświadczalnej dawki leku nie wywołały widocznych zmian w obrazie mikroskopowym nerek, natomiast podawanie dawki czterokrotnie większej w tym samym okresie spowodowało „obkurczenie” się kłębuszków nerkowych oraz zwiększoną kwasochłonność cytoplazmy w nabłonku cewek krętych I rzędu. Trudno ocenić, czy zjawisko to było niebezpieczne dla zwierzęcia (krótki okres podawania leku), sądzić jednak należy, że normalna czynność nerek została zaburzona (12).

Badając wpływ Sefrilu na aktywność Fk zauważono, że wraz ze wzrostem dawki aktywność malała, a przynajmniej stawała się mniej równomierna. Zmniejszenie aktywności tego enzymu wskazywałoby na osłabienie reakcji metabolicznych komórek kanalików głównych, spowodowane dużymi dawkami leku. Zgodnie z opinią wielu autorów (4, 11, 12) fakt zmniejszenia aktywności Fk świadczy o specyfice fizjologicznego trawienia substancji. Porównanie uzyskanych wyników w grupach doświadczalnych I i II może mieć duże znaczenie przy dobieraniu odpowiedniej dawki leku.

Fosfataza zasadowa, odgrywająca zasadniczą rolę w resorpcji zwrotnej glukozy (12), wykazywała również słabszy odczyn w nerkach grupy II doświadczalnej. Zmniejszenie aktywności enzymu pod wpływem leku nasuwa podejrzenie zmian w transporcie przez błony komórkowe, głównie wspomnianej wyżej glukozy (11, 12).

Bardziej zróżnicowaną reakcję wykazywała TPP-aza, bowiem już w grupie I doświadczalnej zauważalne były zmiany intensywności zabarwienia, nasilające się w nerkach grupy II doświadczalnej. Odkurczone ciała nerkowe zwierząt po dużej dawce leku reagowały silnie dodatnio natomiast kanaliki główne wykazywały odczyn dyfuzyjny. Biorąc pod uwagę fakt, że struktury Golgiego są czynnie zaangażowane w metabolizmie komórek (7, 12), zmniejszenie odczynu na TPP-azę w grupie II doświadczalnej wskazuje na obniżenie funkcji życiowych komórek nabłonka. Zmianom tym towarzyszy zmniejszenie liczby czynnych lizosomów.

Wiadomo, że aparat Golgiego może uczestniczyć w syntezie materiałów wydzielniczych bogatych w polisacharydy, a występująca tam TPP-aza bierze udział w przemianach węglowodanowych (7, 12). Dlatego też przeprowadzono również odczyny na glikogen. Okazało się, że dopiero w nerkach grupy II doświadczalnej zaobserwowano przesunięcie reakcji PAS dodatniej w porównaniu z kontrolą. Zwiększony odczyn dyfuzyjny występował w cytoplazmie cewek krętych I i II rzędu, natomiast słabą aktywność obserwowano w rąbku szczoteczki. Fakt ten świadczyć może o zaburzeniach gospodarki węglowodanowej spowodowanych podaniem Sefrilu. Podobne wyniki uzyskali inni autorzy (3, 7, 8, 12) badając wpływ różnych związków na komórki kanalików głównych nerki.

Porównując Sefril z innymi cefalosporynami, nie odnotowano nefrotoksyczności spowodowanej jego podaniem (6, 9, 10), jednak stosowanie bardzo wysokich dawek leku wywołuje u zwierząt doświadczalnych opisane wyżej zmiany. Wydaje się zatem, że lekarz, przystępując do wyboru antybiotyku dla danej jednostki chorobowej, powinien wiedzieć o wszystkich aspektach pozytywnych i negatywnych Sefrilu.

W n i o s k i

1. Dawki Sefrilu zbliżone do maksymalnych, stosowanych u ludzi dorosłych, nie powodowały w nerkach zwierząt doświadczalnych zauważalnych zmian histologicznych i histochemicznych.

2. Dawki leku czterokrotnie większe zaburzały obraz mikroskopowy struktur czynnych kory nerki oraz zmieniały odczyny enzymatyczne.

3. Zauważalne zmiany mogą świadczyć o zaburzeniach trawienia wewnątrzkomórkowego (Fk), przepuszczalności błony komórkowej (Fz), syn-

tezy materiałów wydzielniczych (TPP-aza) oraz przemian węglowodanowych (glikogen).

PIŚMIENNICTWO

1. Danysz A., Jeliaszewicz J.: Podstawy antybiotykoterapii. Wydawn. Katalogów i Cenników, Warszawa 1976.
2. Gomba S. i wsp.: Studies on the Histochemistry of Phosphatase Enzymes in the Juxtaglomerular Complex. *Histochemie* 8, 264, 1967.
3. Le Hir M., Dubach U. C.: The Cellular Specificity of Lecitin Binding in the Kidney. I. A Light Microscopical Study in the Rat. *Histochemistry* 74, 521, 1982.
4. Jacobsen N. i wsp.: On the Localization of Some Phosphatase in Three Different Segments of the Proximal Tubules in the Rat Kidney. *J. Histochem. Cytochem.* 15, 456, 1967.
5. Jasmin G.: Histochemie enzymatique du néphron chez le rat. *Acta Histochem.* 26, 160, 1967.
6. Jeliaszewicz J.: Cefalosporyny — obecny stan wiedzy. PZWL, Warszawa 1978.
7. Kaplan S. E., Novikoff A. B.: The Localization of Adenosine Triphosphatase Activity on Rat Kidney. Electron Microscopic Examination of Reactions Product in Formol-Calcium Fixed. *J. Histochem. Cytochem.* 7, 295, 1959.
8. Kugler P.: Aminopeptidase A is Angiotensinase A. I. Quantitative Histochemical Studies in the Kidney Glomerulus. *Histochemistry* 74, 229, 1982.
9. Podlewski J. K., Chwalibogowska-Podlowska A.: Leki współczesnej terapii. PZWL, Warszawa 1978.
10. Sefril. *Terapia i Leki* 1, 21, 1977.
11. Stachura J. i wsp.: The Influence of Cyclophosphamide on Some Hydrolases and Oxidizing Enzymes in the Livers and Kidneys of Mice. *Acta Med. Pol.* 9, 319, 1968.
12. Staszyc J.: Badania cytotopochemiczne nefronów po operacyjnym podwiązaniu tętnicy nerkowej u szczurów. *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, Sectio D* 27, 99, 1972.

Otrzymano 28 IX 1982.

OBJAŚNIENIA RYCIŃ

Ryc. 1. Aktywność Fk w nerce szczura kontrolnego. Metoda Gomoriego. Pow. ok. 200X.

Ryc. 2. Aktywność Fk w nerce szczura grupy II doświadczalnej. Metoda Gomoriego. Pow. ok. 200X.

Ryc. 3. Aktywność Fz w nerce szczura kontrolnego. Metoda Gomoriego. Pow. ok. 200X.

Ryc. 4. Aktywność Fz w nerce szczura grupy II doświadczalnej. Metoda Gomoriego. Pow. ok. 200X.

Ryc. 5. Aktywność TPP-azy w nerce szczura kontrolnego. Metoda Novikoffa i Goldfishera. Pow. ok. 200X.

Ryc. 6. Aktywność TPP-azy w nerce szczura grupy II doświadczalnej. Metoda Novikoffa i Goldfishera. Pow. ok. 200X.

Ryc. 7. Glikogen w nerce szczura kontrolnego. Metoda McManusa. Pow. ok. 200X.

Ryc. 8. Glikogen w nerce szczura grupy II doświadczalnej. Metoda McManusa. Pow. ok. 200X.

Ryc. 9. Nerka szczura kontrolnego zabarwiona hematoksyliną i eozyną. Pow. ok. 200X.

Ryc. 10. Nerka szczura grupy II doświadczalnej zabarwiona hematoksyliną i eozyną. Pow. ok. 200X.

РЕЗЮМЕ

Крысам (самцам) подано Сефрил в дозе 500 или 2000 мг/кг веса тела. По истечении 7 дней были взяты вырезки почки для гистологических и гистохимических исследований. Гистологические исследования проведено методом гематоксилина и эозина, а гистохимические — путем выявления активности кислой фосфатазы, щелочной фосфатазы, тиаминовой пирогосфатазы и гликогена. Исследования показали, что увеличение дозы препарата (2000 мг/кг) вызывало изменения активности энзимов в главных канальцах почки, а также понижение активности кислой фосфатазы, щелочной фосфатазы и гликогена. Активность тиаминовой пирогосфатазы увеличивалась. Замечено также „отжимание” нервных клубочков.

SUMMARY

Male rats were given Sefril in a dose of 500 or 2000 mg/kg of the body weight. After seven days kidney samples were taken for histological examination by the hematoxylin and eosin method. Other examinations were also made in order to detect acid phosphatase, alkaline phosphatase, thiamine pyrophosphatase activities and the presence of glycogen. The examinations showed that increased drug doses (2000 mg/kg) caused variations in the enzyme activity in the main kidney tubules. Due to increased Sefril doses, acid phosphatase, alkaline phosphatase activities and the presence of glycogen decreased while thiamine pyrophosphatase activity increased. The result showed the shrinkage of the kidney glomerules.

EXPLANATION TO FIGURES

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

Fig. 2. Acid phosphatase activity in the kidney, experimental group II. Gomori's method. Magn. 200X.

Fig. 3. Alkaline phosphatase activity in the kidney of control rat. Gomori's method. Magn. 200X.

Fig. 4. Alkaline phosphatase activity in the kidney, experimental group II. Gomori's method. Magn. 200X.

Fig. 5. Thiamine pyrophosphatase activity in the kidney of control rat. Novikoff and Goldfischer method. Magn. 200×.

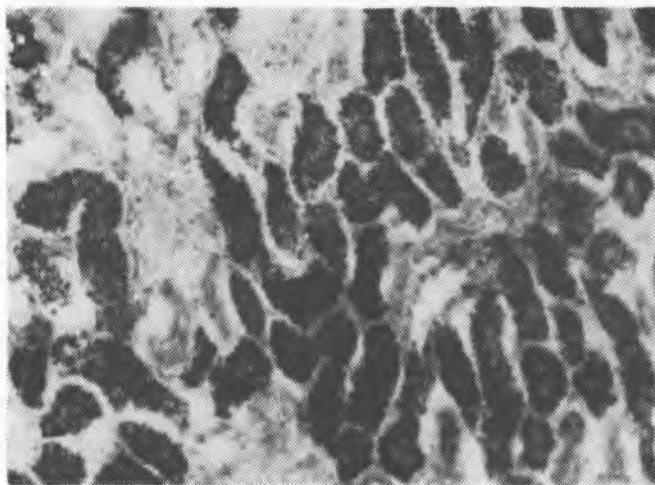
Fig. 6. Thiamine pyrophosphatase activity in the kidney, experimental group II. Novikoff and Goldfischer method. Magn. 200×.

Fig. 7. Glycogen in the kidney of control rat. McManus method. Magn. 200×.

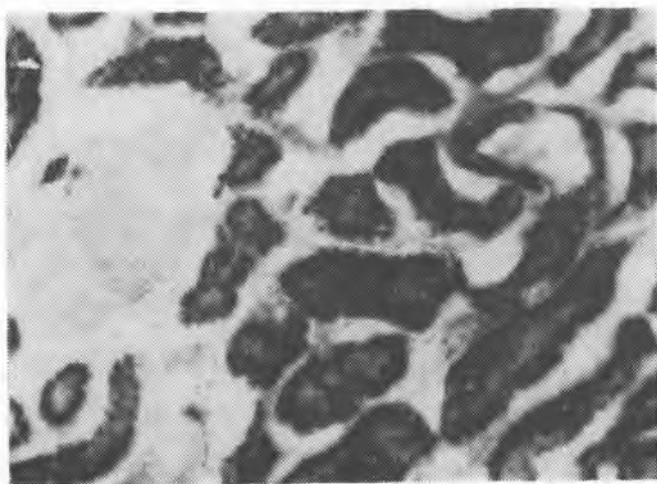
Fig. 8. Glycogen in the kidney, experimental group II. McManus method. Magn. 200×.

Fig. 9. The kidney of control rat. Hematoxylin and eosin method. Magn. 200×.

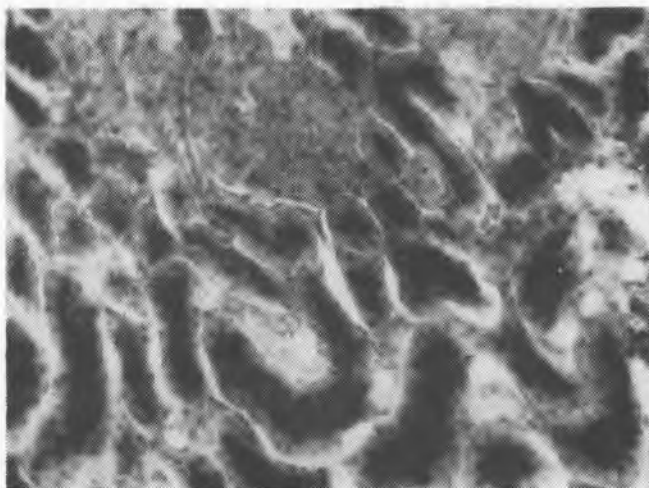
Fig. 10. The kidney, experimental group II. Hematoxylin and eosin method. Magn. 200×.



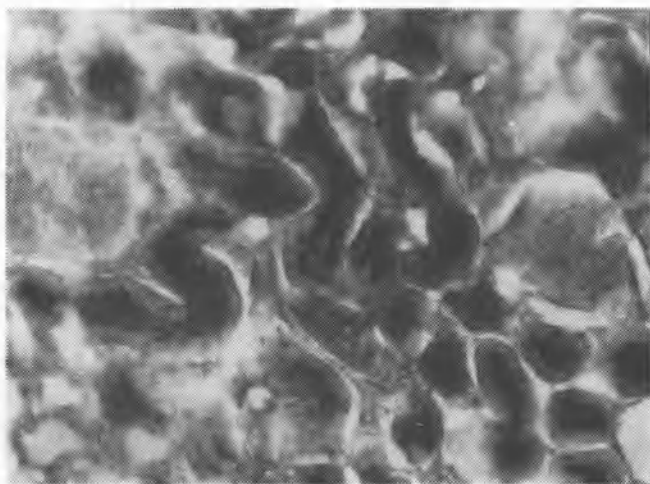
Ryc. 1



Ryc. 2



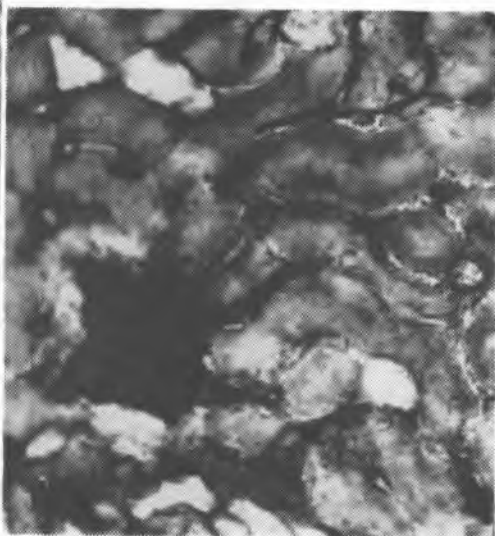
Ryc. 3



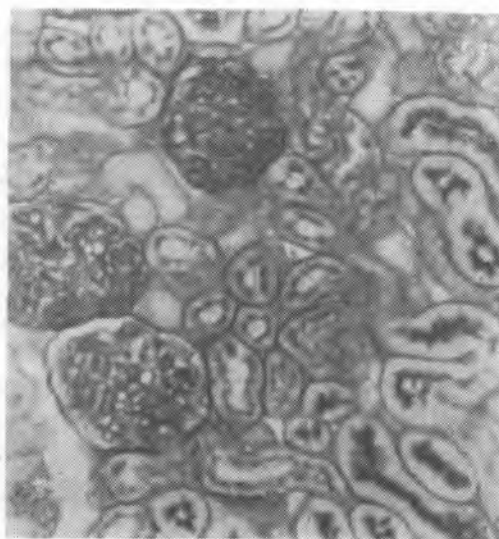
Ryc. 4



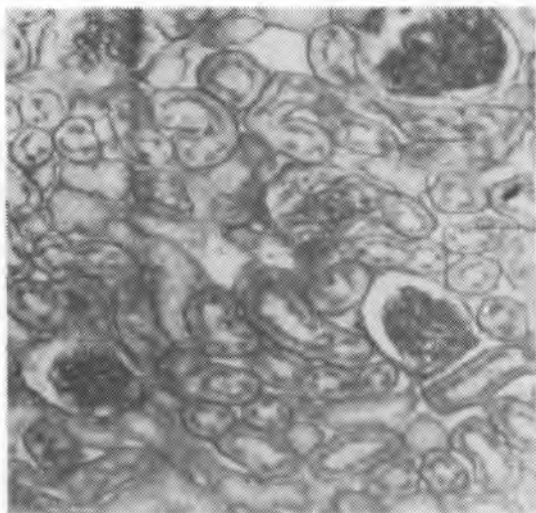
Ryc. 5



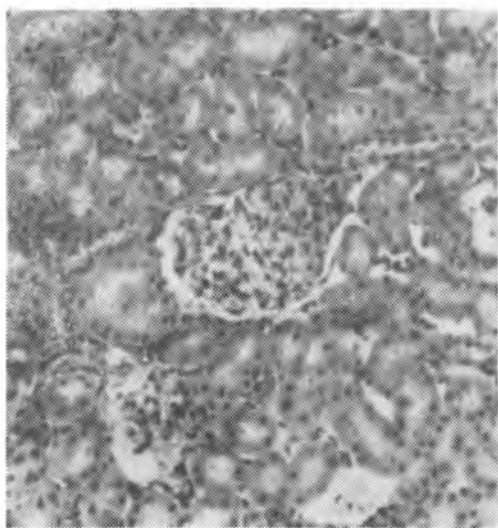
Ryc. 6



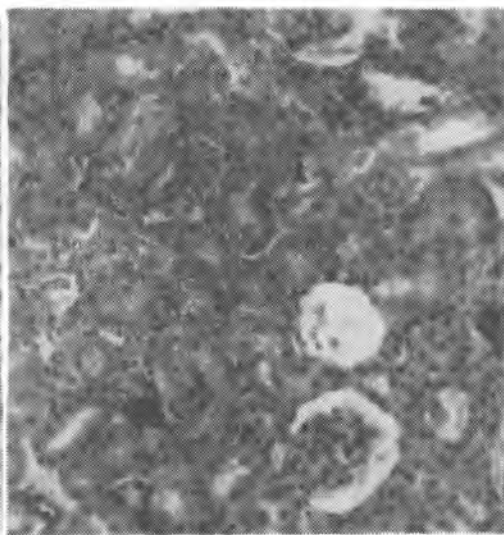
Ryc. 7



Ryc. 8



Ryc. 9



Ryc. 10