

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

Barbara CISZEWSKA-POPIOŁEK,
Marianna KOSTRUBIEC

**Histochemiczne badania łożyska szczurów
po doświadczalnym podawaniu leku psychotropowego w okresie ciąży**

Гистохимические исследования плаценты крыс после опытного применения
психотропного препарата в период беременности

Histochemical Analysis of Rat Placentae following Experimental Administration
of Psychotropic Drug during Gestation Period

Przy leczeniu ciężarnych należy pamiętać, że nawet małe dawki terapeutyczne mogą przenikać przez łożysko, a niedojrzałość i niewydolność systemu enzymatycznego płodu ogranicza znacznie zdolność metabolizowania leku przez tkanki płodowe (1, 6). Do naszych badań wybrano jeden z leków psychotropowych, które, jak wiadomo, w ostatnich latach są często nadużywane i stosowane bez kontroli lekarza. Sinequan — chlorowodorek doksepiny łączy w sobie cechy trankwilizera i leku przeciwdepresyjnego. Jest szeroko stosowany nie tylko w psychiatrii, lecz także jako lek wspomagający w wielu schorzeniach ogólnych. Dobrze wchłania się z przewodu pokarmowego i szybko jest metabolizowany (4). Opisany jako lek bezpieczny, dobrze tolerowany przez chorych z niewielkimi tylko objawami ubocznymi (5, 7, 10). Mimo braku dowodów teratogennego działania Sinequanu nie zaleca się podawania go ciężarnym.

Pamiętając o tym, że prawidłowy metabolizm bariery łożyskowej ma decydujący wpływ na przemianę materii i rozwój płodu, podjęto badania histoenzymatyczne łożyska w celu zanalizowania wpływu Sinequanu podawanego w okresie ciąży na aktywność niektórych enzymów hydrolitycznych w łożysku szczura.

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Badania przeprowadzono na 70 łożyskach pobranych od ciężarnych 3-miesięcznych samic szczurów białych. Zwierzęta podzielono na grupy: kontrolną oraz dwie grupy doświadczalne. Wszystkie zwierzęta przebywały przez cały okres doświad-

czenia w tych samych warunkach i na tej samej standardowej diecie. Samicom z grup doświadczalnych podawano od drugiego dnia ciąży codziennie doustnie Sinequan firmy Pfizer: 1) w grupie doświadczalnej I w dawce 0,31 mg/kg m.c., 2) w grupie doświadczalnej II w dawce 4,41 mg/kg m.c. Przyjmowano, że zapłodnienie następowało po upływie 12 godz. od dopuszczenia samca w okresie rui. Łożyska do badań pobierano we wszystkich grupach w 21 dniu ciąży. Materiał utrwalano w 10% formalinie obojętnej do badań morfologicznych oraz w płynie Bakera do badań enzymatycznych.

Przeprowadzono barwienie hematoksyliną i eozyną skrawków parafinowych. Na skrawkach mrożonych wykrywano obecność następujących enzymów hydrolytycznych: adenozynotrójfosfatazy i glukozy-6-fosfatazy wg metody Wachsteina i Meisel, fosfataz zasadowej i kwaśnej wg metody Gomoriego.

BADANIA-WŁASNE

Grupa kontrolna

Barwienie hematoksyliną i eozyną wykazało prawidłową strukturę i barwliwość łożysk kontrolnych. Badaniem histochemicznym stwierdzono duży odczyn na adenozynotrójfosfatazę w labiryncie, szczególnie w śródbłónkach naczyń płodowych i komórkach trofoblastycznych (ryc. 1). Intensywna reakcja na fosfatazę zasadową widoczna była w ścianach naczyń krwionośnych, komórkach olbrzymich oraz nabłonku trofoblastycznym. Fosfatazododatnie ziarna ułożone gęsto obok siebie zlewały się w konglomeraty (ryc. 2). Dużą aktywność fosfatazy kwaśnej wykazano w komórkach trofoblastycznych labiryntu oraz komórkach olbrzymich. Odczyn miał charakter ziarnisty (ryc. 3). Dodatnią reakcją na glukozy-6-fosfatazę stwierdzono w naczyniach płodowych, w komórkach trofoblastycznych i olbrzymich (ryc. 4).

Grupa I doświadczalna

Badania morfologiczne nie wykazały odchyień od normy. Zmniejszyła się natomiast znacznie aktywność reakcji na fosfatazę zasadową w labiryncie. Fosfatazododatnie ziarenka w komórkach trofoblastycznych były mniej intensywnie wysyczone i luźniej rozrzucone w cytoplazmie. W śródbłónkach naczyń płodowych aktywność enzymu była także mniejsza niż w kontroli (ryc. 5). Zaobserwowano niewielki wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej. Charakter odczynu i jego lokalizacja pozostały bez zmian. Zwiększyła się też nieznacznie aktywność glukozy-6-fosfatazy w niektórych miejscach labiryntu. Wzrosła liczba pozytywnych ziarenek w komórkach trofoblastycznych oraz intensywność odczynu w śródbłónkach

naczyniowych. Nie zmieniły się natomiast aktywność, rozmieszczenie i charakter odczynu na adenozyntrójfosfatazę w porównaniu z grupą kontrolną.

Grupa II doświadczalna

Barwienie hematoksyliną i eozyną nie wykazało różnic w porównaniu z materiałem kontrolnym. Zaobserwowano spadek intensywności reakcji na adenozyntrójfosfatazę w komórkach trofoblastycznych. Świadczy o tym mniejsza ilość słabiej wysyconych ziarenek enzymododatnich. Duży odczyn utrzymywał się nadal w śródbłonkach płodowych naczyń krwionośnych (ryc. 6). Aktywność odczynu na fosfatazę zasadową była znacznie mniejsza niż w grupie kontrolnej, lecz utrzymywała się na poziomie poprzedniej grupy. Znacznie wzrosła aktywność fosfatazy kwaśnej w porównaniu z kontrolą. W porównaniu z grupą I doświadczalną wzrost aktywności był niewielki. Intensywnie wysycone ziarna, świadczące o aktywności tego enzymu, zlewały się w duże konglomeraty (ryc. 7). Nastąpił dalszy wzrost aktywności glukozo-6-fosfatazy we wszystkich komórkach beleczek trofoblastycznych. Najsilniejszy odczyn występował w śródbłonkach naczyń (ryc. 8).

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAN

Duża aktywność badanych przez nas enzymów hydrolitycznych w obrębie labiryntu w łożyskach grupy kontrolnej świadczy o tym, że jest on miejscem intensywnych procesów metabolicznych zachodzących na tym obszarze i miejscem właściwej wymiany matczy-no-płodowej. Komórki trofoblastu wykazują obfitość struktur cytoplazmatycznych oraz dużą aktywność porównywaną z najbardziej czynnymi metabolicznie komórkami wątrobowymi (2).

Opisany w naszym doświadczeniu spadek aktywności fosfatazy zasadowej po podaniu Sinequanu w dawce 0,31 mg/kg m.c. oraz adenozyntrójfosfatazy po podaniu leku w dawce 4,41 mg/kg m.c. może świadczyć o zaburzeniach w transporcie przezłożyskowym. Oba bowiem enzymy związane są z błonami komórki i odpowiedzialne za prawidłowy przebieg tego procesu (3). Wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej w łożyskach doświadczalnych w naszych badaniach był proporcjonalny do dawki podawanego leku. Nasilenie aktywności tego enzymu lizosomalnego może oznaczać zwiększenie procesów katabolicznych lub uwalnianie aktywatorów enzymów. Zaobserwowano wzrost aktywności glukozo-6-fosfatazy również proporcjonalnie do dawki zastosowanego leku. Enzym ten katalizuje

końcowy etap przemian glikogenu łożyskowego (9). Nasilenie jego aktywności może świadczyć o zwiększonej przepuszczalności struktur błonias-tych łożyska oraz zwiększonym transporcie glukozy przez błony siatki śródplazmatycznej.

Na podstawie zaobserwowanych zmian w aktywności badanych enzy-mów można przypuszczać, że uległy zaburzeniu procesy metaboliczne w łożysku. Ponieważ w życiu wewnątrzmacicznym płód i łożysko są funkcjo-nalnie ściśle uzależnione od siebie (8), może to niekorzystnie odbić się także na metabolizmie tkanek płodowych.

Wnioski

1. Podawanie Sinequanu przez cały okres ciąży w dawce 0,31 mg/kg m.c. spowodowało zmniejszenie aktywności fosfatazy zasadowej oraz nie-wielki wzrost fosfatazy kwaśnej i glukozy-6-fosfatazy. Nie zmieniła się aktywność adenozynotrójfosfatazy.

2. Podawanie Sinequanu w dawce 4,41 mg/kg m.c. przez cały okres ciąży spowodowało zmniejszenie aktywności adenozynotrójfosfatazy i fos-fatazy zasadowej oraz znaczny wzrost fosfatazy kwaśnej i glukozy-6-fos-fatazy.

3. Na podstawie zaobserwowanych zmian enzymatycznych przypusz-cza się, że nastąpiły zaburzenia procesów metabolicznych w łożysku, zwłaszcza po podaniu większych dawek leku.

PIŚMIENNICTWO

1. A b u c e w i c z A. i w s p.: Mechanizmy łożyskowego transportu leków. *Pol. Tyg. Lek.* **26**, 1174, 1971.
2. C z y ż e w s k a - L i e b h a r d t M.: Ocena łożyska szczura w ciąży poprzedzonej podawaniem syntetycznych pochodnych estradiolu i progesteronu na podstawie badań histoenzymatycznych i histochemicznych. Praca habilitacyjna, Warszawa 1976.
3. F i r t h J. A. i w s p.: The Localization and Properties of Membrane Adenosine Triphosphatases in the Guinea-Pig Placenta. *Histochemistry* **61**, 157, 1979.
4. H o b b s D. C.: Distribution and Metabolism of Doxepin. *Biochem. Pharm.* **18**, 1941, 1969.
5. K ę d r o w a S.: Ocena kliniczna leku Sinequan. *Wiad. Lek.* **25**, 1595, 1972.
6. M a z u r H., P i e k a c z H.: Mechanizm przenikania substancji przez barierę krew—łożysko. *Farm. Pol.* **4**, 273, 1970.
7. P i w o w a r s k a W.: Ocena kliniczna leku Sinequan. *Pol. Tyg. Lek.* **26**, 1747, 1971.
8. S z u k a l s k i B.: Przemiany hormonów sterydowych w jednostce płodowo-łożyskowej. *Endokr. Pol.* **27**, 521, 1976.

9. Warwas M.: Enzymy łożyska i błon płodowych. Post. Hig. i Med. Dośw. **29**, 501, 1975.
10. Żydowicz Z. i wsp.: Sinequan jako lek wspomagający w leczeniu chorych z chorobą wrzodową żołądka i dwunastnicy. Lekarz Wojsk. **49**, 386, 1973.

Otrzymano 15 I 1982.

OBJASNIENIA RYCIN

Ryc. 1. Reakcja na adenozynotrójfosfatazę w łożysku szczura z grupy kontrolnej. Pow. ok. 160X.

Ryc. 2. Reakcja na fosfatazę zasadową w łożysku szczura z grupy kontrolnej. Pow. ok. 160X.

Ryc. 3. Reakcja na fosfatazę kwaśną w łożysku szczura z grupy kontrolnej. Pow. ok. 160X.

Ryc. 4. Reakcja na glukozo-6-fosfatazę w łożysku szczura z grupy kontrolnej. Pow. ok. 160X.

Ryc. 5. Reakcja na fosfatazę zasadową w łożysku szczura z grupy I doświadczalnej. Pow. ok. 160X.

Ryc. 6. Reakcja na adenozynotrójfosfatazę w łożysku szczura z grupy II doświadczalnej. Pow. ok. 160X.

Ryc. 7. Reakcja na fosfatazę kwaśną w łożysku szczura z grupy II doświadczalnej. Pow. ok. 160X.

Ryc. 8. Reakcja na glukozo-6-fosfatazę w łożysku szczura z grupy II doświadczalnej. Pow. ok. 160X.

РЕЗЮМЕ

В опыт взяли 70 плацент беременных самок белых крыс. Животные разделены на группы: контрольную и две опытные. Самки опытных групп получали от 2 дня беременности ежедневно перорально Sinequam фирмы Pfizer. Первая опытная группа получала препарат в дозе 0,31 мг/кг в.т., а вторая опытная группа в дозе 4,41 мг/кг в.т. Плаценты брали в опыт на 21 день беременности. Опытный материал (плаценты) закреплено жидкостью Бакера и заморожено. В замороженных срезах обнаружено присутствие аденозинотрифосфатазы, щелочной фосфатазы, кислой фосфатазы, а также глюкозо-6-фосфатазы.

На основе проведенных наблюдений, замечено изменения в активности исследованных ферментов по сравнению с контрольными плацентами. Первая опытная группа отличалась понижением активности щелочной фосфатазы, небольшим ростом активности кислой фосфатазы и глюкозо-6-фосфатазы, а также постоянством активности аденозинотрифосфатазы. В плацентах второй опытной группы замечено понижение активности аденозинотрифосфатазы и щелочной фосфатазы и значительный рост активности кислой фосфатазы и глюкозо-6-фосфатазы. Вышепредставленные изменения могут свидетельствовать о расстройстве метаболических процессов в плаценте.

SUMMARY

The examinations of 70 placentae, taken from pregnant females of white rats, were carried out. The animals were divided into two experimental groups and one control. The experimental animals were given orally Sinequan (Pfizer), every day in a dose of 0.31 mg/kg of body weight (group I) and 4.41 mg/kg of body weight (group II), starting with the second day of gestation. The placentae were taken on the 21st day of gestation and preserved in Baker's solution. The presence of the following hydrolytic enzymes was detected on frozen preparations: adenosine-3-phosphatase, alkaline phosphatase, acid phosphatase and glucose-6-phosphatase.

As a result of the observations, variations in the activity of the examined enzymes in comparison with that of the control placentae have been shown. In experimental group I, the observations have shown a decreased activity of alkaline phosphatase and a small increase in the activity of acid phosphatase and glucose-6-phosphatase. The activity of adenosine-3-phosphatase, however, has not changed. In the placentae of experimental group II, the observations have shown a decreased activity of adenosine-3-phosphatase and that of alkaline phosphatase, and a considerably increased activity of acid phosphatase and glucose-6-phosphatase. The above variations may prove disorders, in the metabolic processes in the placentae.

EXPLANATION TO FIGURES

Fig. 1. Reaction to adenosine-3-phosphatase in the rat placenta. Control group. Magn. ca. 160X.

Fig. 2. Reaction to alkaline phosphatase in the rat placenta. Control group. Magn. ca. 160X.

Fig. 3. Reaction to acid phosphatase in the rat placenta. Control group. Magn. ca. 160X.

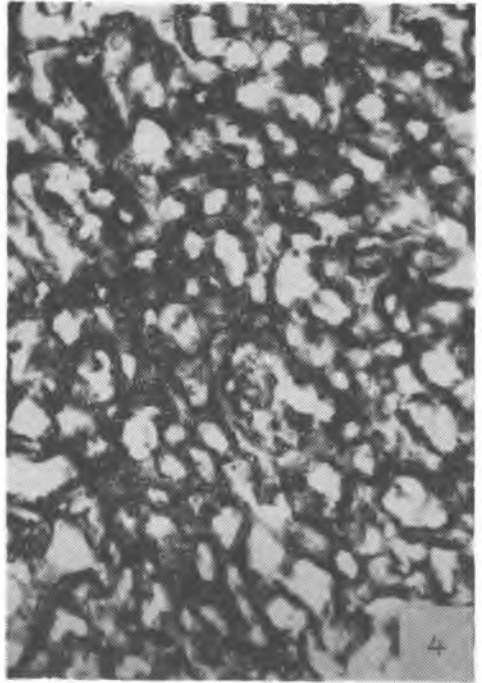
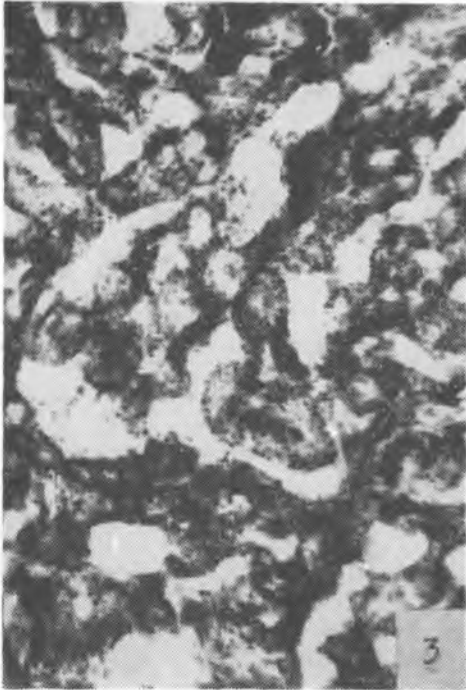
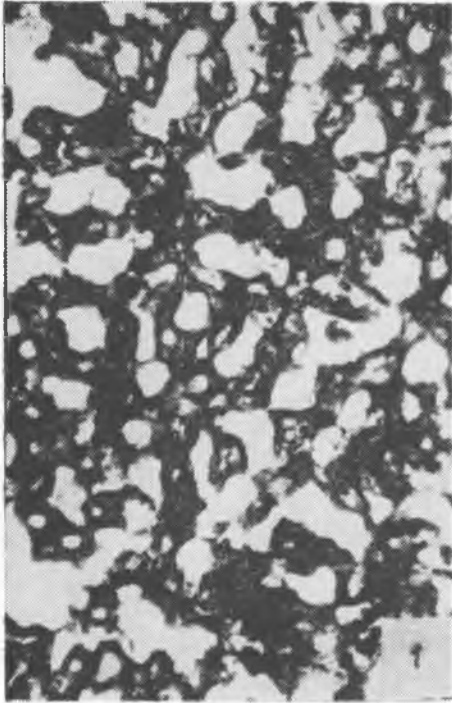
Fig. 4. Reaction to glucose-6-phosphatase in the rat placenta. Control group. Magn. ca. 160X.

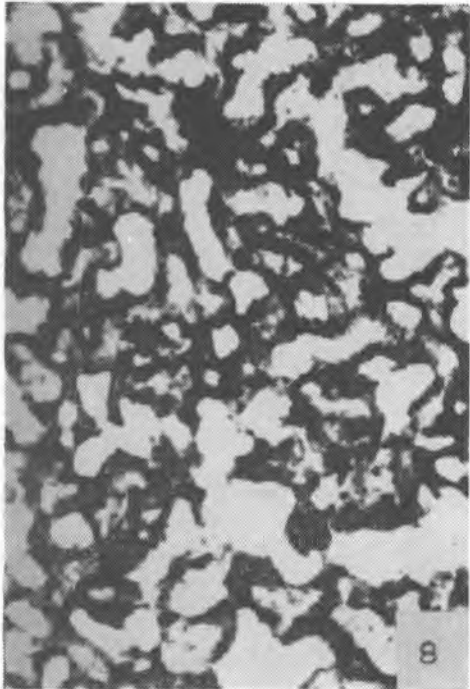
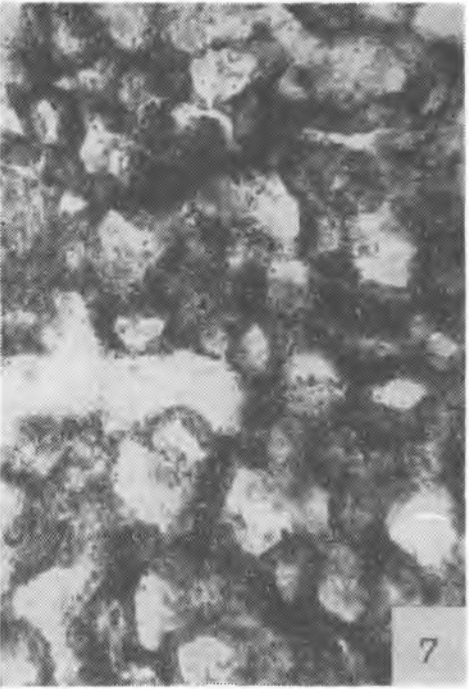
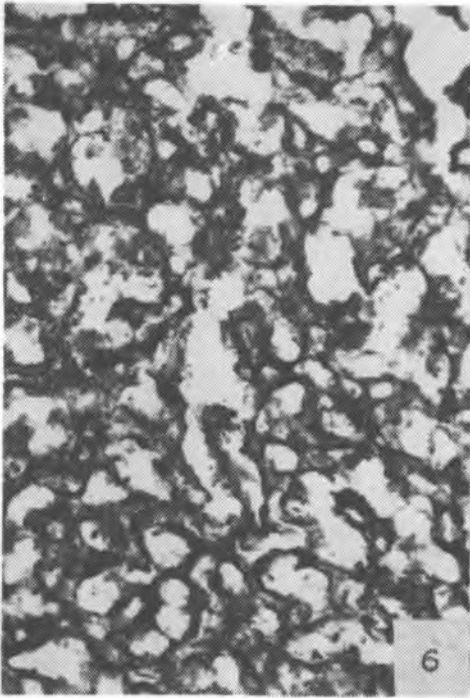
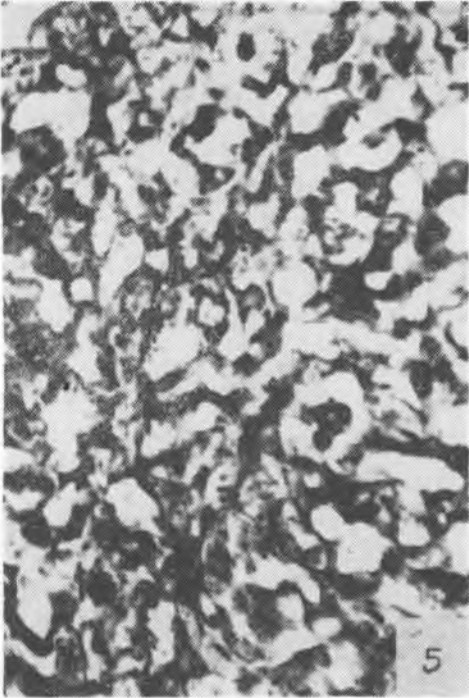
Fig. 5. Reaction to alkaline phosphatase in the rat placenta. Experimental group I. Magn. ca. 160X.

Fig. 6. Reaction to adenosine-3-phosphatase in the rat placenta. Experimental group II. Magn. ca. 160X.

Fig. 7. Reaction to acid phosphatase in the rat placenta. Experimental group II. Magn. ca. 160X.

Fig. 8. Reaction to glucose-6-phosphatase in the rat placenta. Experimental group II. Magn. ca. 160X.





Barbara Ciszewska-Popiolek, Marianna Kostrubiec