

Katedra i Zakład Patomorfologii. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. Daniel Chibowski

Danuta SKOMRA, Daniel CHIBOWSKI

Ocena nefrotoksyczności daunorubicyny oraz wpływu tokoferolu i kwasu askorbinowego na zmiany powstałe w nerkach szczurów. Część II. Badania ultrastrukturalne kłębuszków nerkowych

Assessment of Daunorubicin Nephrotoxicity and Effect of Tocopherol and Ascorbic Acid on Lesions Induced in Rat's Kidneys. Part II. Ultrastructural Studies of Kidney Glomeruli

Badania histologiczne i histochemiczne nerek szczurów otrzymujących daunorubicynę w połączeniu z badaniami biochemicznymi krwi i moczu wykazały, że lek ten wywołuje u szczurów zespół nerczycowy (1, 4, 6, 7, 10).

Celem niniejszej pracy jest ocena zmian w kłębuszkach nerkowych na poziomie ultrastrukturalnym.

MATERIAŁ I METODY

Podział zwierząt na grupy kontrolne i doświadczalne, sposób podawania szczurom daunorubicyny oraz kwasu askorbinowego i tokoferolu został przedstawiony w części I.

Wycinki do badań w mikroskopie elektronowym transmisyjnym utrwalano w 2% aldehydzie glutarowym zbuforowanym 0,2 M buforem kakodylowym, a następnie w 2% czterotlenku osmu i zatapiano w Eponie 812. Skrawki półciemkie barwiono 1% błękitem metylenowym i 1% azurem II. Skrawki ultracienkie kontrastowano nasyconym wodnym roztworem octanu uranylu i płynem Reynoldsa i oceniano je w mikroskopie elektronowym Tesla BS-500.

WYNIKI

Grupy kontrolne

Obrazy ultrastrukturalne kłębuszków nerkowych szczurów ze wszystkich grup kontrolnych odpowiadały opisom normy.

Grupy doświadczalne

Zmiany w obrazie ultrastrukturalnym kłębuszków nerkowych we wszystkich grupach doświadczalnych były podobne i dotyczyły głównie podocytów. W cytoplazmie tych komórek pojawiały się liczne twory wakuolarne (ryc. 1—4). Niektóre z nich były optycznie puste, inne zawierały niehomogenny materiał. Otoczone były szorstką lub gładką błoną. Największe z nich osiągały wielkość porównywalną z wielkością jądra podocyta (ryc. 1). Niektóre komórki śródbłonka zwierały drobne wakuole o podobnym wyglądzie jak wakuole stwierdzone w obrębie podocytów. Często spotykanym zjawiskiem było poszerzenie kanałów siateczki śródplazmatycznej szorstkiej.

Wypustki stopowate podocytów ulegały ogniskowemu stopieniu (ryc. 2—4), które miało nieco bardziej rozległy charakter w grupach doświadczalnych II (A II) i IV (B II) niż w grupach I (A I) i III (B I). Na powierzchni podocytów zwróconej do przestrzeni moczowej pojawiały się mikrokosmki będące wypustkami cytoplazmatycznymi tych komórek (ryc. 3, 4). Błony podstawne pętli nacyniowych kłębuszków wykazywały ogniskowe pogrubienia bez obecności gęstych złogów (ryc. 2, 4).

DYSKUSJA

Za najbardziej charakterystyczny wykładnik poantracyklinowych uszkodzeń nerek uważa się wakuole pojawiające się w obrębie różnych struktur kłębuszka nerkowego (1—3, 6, 10, 13). Wakuolizacji ulegają głównie podocyty (1, 3, 9, 10), ale opisywane są również wakuole w obrębie nabłonka ściennego (2, 6, 13), a także śródbłonka (6). W naszych badaniach proces wakuolizacji dotyczył głównie podocytów, wakuole pojawiały się również w pojedynczych komórkach śródbłonka.

Nie ma jednoznacznych poglądów co do mechanizmu tworzenia się wakuoli w strukturach kłębuszka. Jedna z hipotez sugeruje, że wakuole powstają z rozszerzonych cystern siateczki śródplazmatycznej szorstkiej (2, 6). Ten mechanizm wydaje się najbardziej prawdopodobny, gdyż podobnie jak w doświadczeniu Sternberga (6) oraz Fajardo i wsp. (2) w materiale badanym często obserwowaliśmy zjawisko poszerzenia kanałów szorstkiej siateczki śródplazmatycznej, a błony otaczające wakuole często posiadały rybosomy. Koncepcji tej przeciwstawiają się Giroux i wsp. (3), którzy w swoim materiale doświadczalnym wyjątkowo rzadko spotykali poszerzenie cystern siateczki śródplazmatycznej szorstkiej. Nie stwierdzali oni także rybosomów na błonach wakuoli tworzących się w podocytach. Należy podkreślić, że w ich doświadczeniu nasilenie wakuolizacji podocytów było znacznie większe niż obserwowane przez innych badaczy. Nie jest wykluczone, że przyczyną tego było użycie do doświadczenia szczurów po jednostronnej nefrektomii.

Inną teorią, usiłującą wyjaśnić obecność wakuoli w strukturach kłębuszka, jest koncepcja tworzenia się ich w przestrzeniach powstałych w wyniku częściowego oddzielenia się uprzednio przylegających do siebie komórek, szczególnie nabłonka ściennego (2). Mechanizm ten nie znajduje jednak potwierdzenia w obserwacjach ultrastrukturalnych, ponieważ oceniając wczesne fazy uszkodzenia poantracyklinowego nerek nie stwierdzono w żadnym przypadku oddzielania się komórek pomimo obecności wakuoli w cytoplazmie podocytów (1, 3, 6, 9, 13).

Kolejna hipoteza zakłada powstawanie wakuoli z wpukleń błony komórkowej (2, 3). Wydaje się ona szczególnie interesująca, gdyż jej potwierdzenie mogłoby stanowić dowód na poparcie teorii wiążącej toksyczne działanie antybiotyków antracyklinowych z uszkodzeniem struktur błonowych komórki. Niewykluczone jest również, że nie jeden, a kilka mechanizmów odpowiada za powstawanie wakuoli w kłębuszkach nerkowych.

Obserwowane przez badaczy wakuole mogą być tworamami dużymi, zniekształcającymi strukturę kłębuszka i uwidaczniającymi się już w mikroskopie świetlnym (2, 3, 5, 10, 11, 13) lub mogą mieć niewielkie rozmiary i ujawniać się dopiero w mikroskopie elektronowym (1, 6). W naszych badaniach wakuole były widoczne dopiero w mikroskopie elektronowym. Osiągały one wymiary od drobnych tworów pęcherzykowych do wielkości równej średnicy jądra podocyta. Były puste lub zawierały niehomogenny materiał. Wydaje się, że o wielkości wakuoli mógł w pewnym stopniu decydować rodzaj antybiotyku antracyklinowego użytego do doświadczenia. Po zastosowaniu bowiem daunorubicyny nie stwierdzono istnienia dużych, widocznych w mikroskopie świetlnym, wakuoli (6—8, 12). Natomiast wakuole tego typu były obserwowane w doświadczeniach z użyciem adriamycyny (2, 3, 5, 10, 11, 13). Możliwe, że na stopień wakuolizacji podocytów mogła mieć także wpływ droga podania leku. Ołbrzymie, zniekształcające kłębuszek, wakuole opisywano bowiem po podaniu antracykliny w postaci wstrzyknięć dożylnych (2, 3, 5, 10, 11, 13). W naszych badaniach, podobnie jak w doświadczeniu Walskiego (12), gdy podawano daunorubicynę dootrzewnowo, nie spostrzegano tego typu wakuoli.

Inną istotną zmianą stanowiącą morfologiczny wykładnik poantracyklinowego uszkodzenia nerek było zjawisko stapiania się wypustek stopowatych podocytów (1—3, 5—7, 9). Bertani i wsp. (1) obserwowali to zaburzenie już po 28 h od podania adriamycyny. W miarę upływu czasu stapianie się wypustek stopowatych stawało się coraz bardziej rozległe (2, 3, 6, 7). W doświadczeniu przeprowadzonym w grupie szczurów otrzymujących daunorubicynę przez 5 tygodni i uśmiercanych bezpośrednio po zaprzestaniu podawania leku (grupa A I) stapianie się wypustek stopowatych miało niewielkie nasilenie i jedynie ogniskowy charakter. Nie stwierdzono zależności pomiędzy nasileniem tych zaburzeń a stosowaniem antyoksydantów, gdyż zmiany o podobnym charakterze występowały również w grupie III doświadczałnej (B I), otrzymującej oprócz daunorubicyny kwas askorbinowy i tokoferol. Natomiast wydaje się, że

o nasileniu zmian może decydować czas, jaki upłynął od podania antracykliny, gdyż do bardziej rozległego stapiania się wypustek stopowatych dochodziło u szczurów żyjących o 3 tygodnie dłużej (w grupach doświadczalnych A II i B II). Podobne zjawisko obserwowali i inni (1, 6), badając nasilenie zmian w nerkach w zależności od czasu.

Kolejną zmianą obserwowaną w badaniach poantracyklinowych zmian w nerkach było pojawienie się mikrokosmków na powierzchni podocytów zwróconej do przestrzeni moczowej (1—3, 6, 7). Zmiany te występowały również w naszym doświadczeniu. Wydaje się, że powstanie mikrokosmków będących cienkimi cytoplazmatycznymi wypustkami podocytów związane jest ze zmianami czynnościowymi ich błony cytoplazmatycznej (3).

Podawanie antracyklin doprowadza również do pojawienia się zmian w obrębie błony podstawnej kłębuszków. Zmiany te dotyczą tylko części kłębuszków i mają charakter ogniskowy (2, 4, 6). Fajardo i wsp. (2) opisują pogrubienie, zdwojenie lub nieregularności w błonie podstawnej, jednak bez odkładnia gęstych złogów. Sternberg (6) stwierdza symetryczne i regularne pogrubienie z proporcjonalnym ubytkiem blaszki rozrzedzonej wewnętrznej i zewnętrznej bądź pogrubienie nieregularne z podródbłonkowymi złogami ziarnistego materiału.

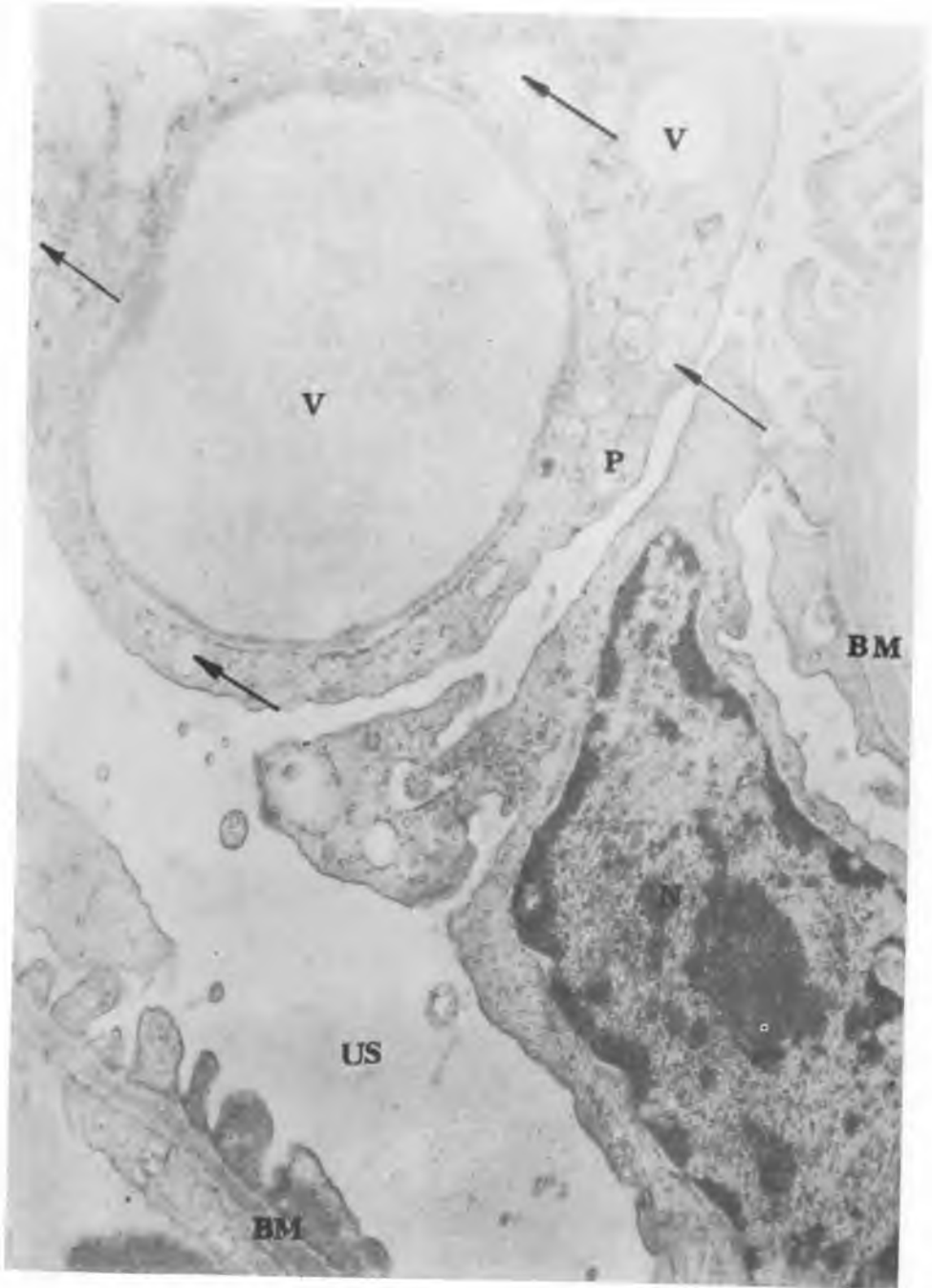
Zmiany obserwowane przez nas przypominają opisywane przez Fajardo i wsp. (2). We wszystkich grupach doświadczalnych dotyczyły one pojedynczych kłębuszków i polegały na ogniskowym pogrubieniu błon podstawnych, bez obecności gęstych złogów.

Podawanie antyoksydantów nie dało wyników pozwalających na uznanie ich korzystnego wpływu na obraz zmian powstających w wyniku nefrotoksycznego działania daunorubicyny.

Otrzymane wyniki badań można próbować interpretować dwojako. Po pierwsze, można uznać za prawdopodobne, że działanie poprzez wolne rodniki nie jest jedynym mechanizmem odpowiedzialnym za nefrotoksyczny wpływ daunorubicyny. Stąd też hamowanie przez antyoksydanty peroksydacji lipidów błon biologicznych nie daje wyraźnego osłabienia toksycznego uszkodzenia nerki przez ten cytostatyk. Po drugie, nasilenie zmian morfologicznych w nerkach obserwowane przez nas było niezbyt duże, stąd nawet ewentualnie korzystny wpływ antyoksydantów byłby w tym przypadku trudny do uchwycenia.

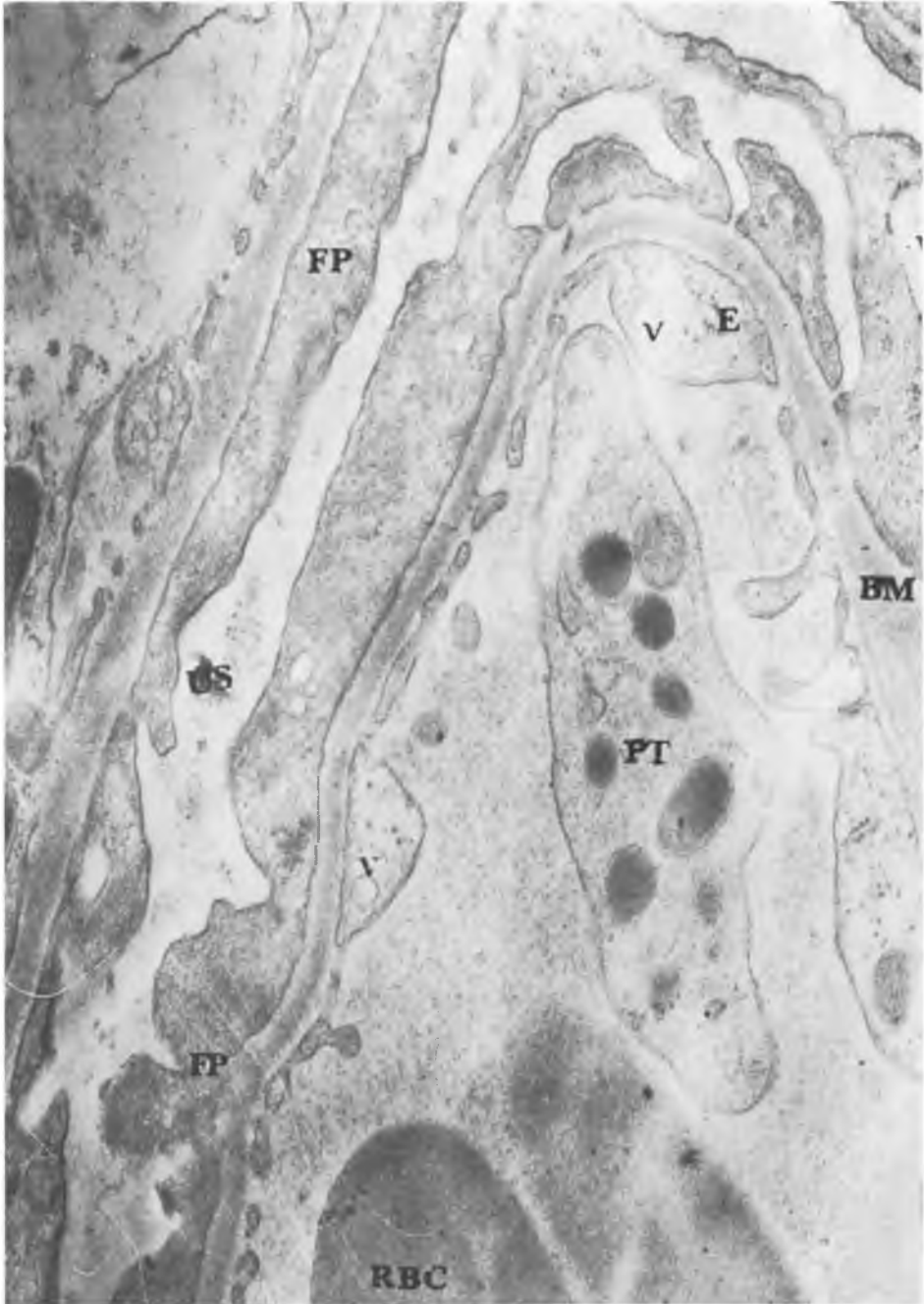
Wnioski

1. Daunorubicyna jest lekiem nefrotoksycznym dla szczurów.
2. Ultrastrukturalnymi wykładnikami nefrotoksycznego działania daunorubicyny obserwowanymi po 5 tygodniach podawania leku są: a) stopień wypustek stopowatych podocytów, b) obecność wakuoli w podocytach i poje-



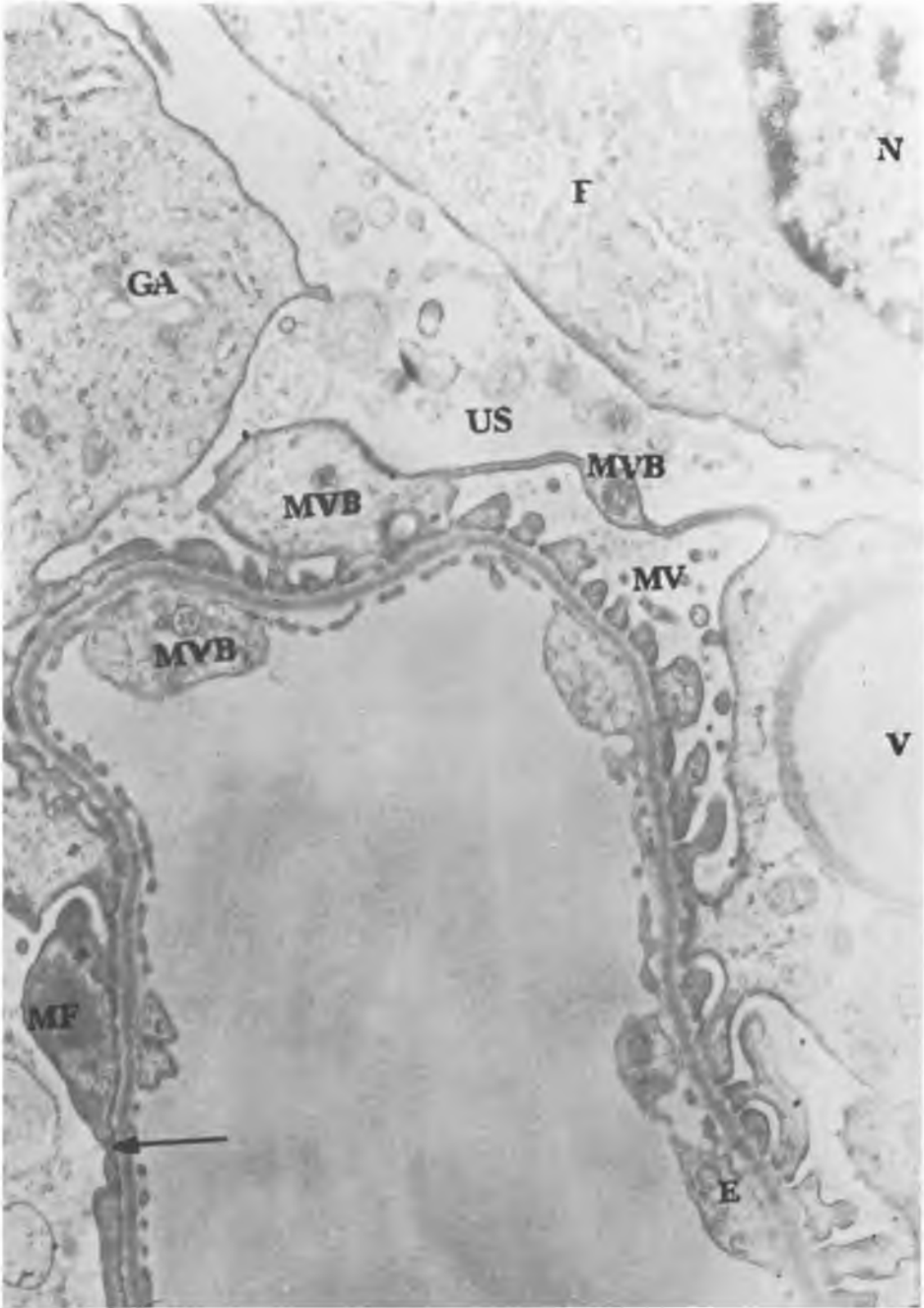
Ryc. 1

Danuta Skomra, Daniel Chibowski



Ryc. 2

Danuta Skomra, Daniel Chibowski



Ryc. 3



Ryc. 4

Danuta Skomra, Daniel Chibowski

dynczych komórkach śródbłonna, c) tworzenie mikroosmków na powierzchni podocytów zwróconej do światła przestrzeni moczowej, d) ogniskowe pogrubienie błon podstawnych pętli naczyńowych kłębuszków nerkowych.

3. Zmiany ultrastrukturalne nie wykazują tendencji do ustępowania po 3 tygodniach od zakończenia podawania leku.

4. Nie stwierdza się istotnego wpływu antyoksydantów na zmiany morfologiczne w nerkach szczurów powstałe w wyniku działania daunorubicyny, co pozwala przypuszczać, że mechanizm peroksydacji lipidów nie odgrywa zasadniczej roli w nefrotoksyczności daunorubicyny u szczurów.

PIŚMIENNICTWO

1. Bertani T. i wsp.: Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats. Sequence of pathologic events. *Lab. Invest.* **46**, 16, 1982.
2. Fajardo L. F. i wsp.: Adriamycin nephrotoxicity. *Lab. Invest.* **43**, 242, 1980.
3. Giroux L. i wsp.: Adriamycin-DNA nephrotoxicity in rats. *Lab. Invest.* **50**, 190, 1984.
4. Philips F. S. i wsp.: Some observations on the toxicity of adriamycin (NSC-123127). *Cancer Chemother. Rep.* **6**, 177, 1975.
5. Rossman P. i wsp.: Experimental adriamycin nephropathy. Fine structure, morphometry, glomerular polyanion and cell membrane antigens. *J. Path.* **169**, 99, 1993.
6. Sternberg S. S.: Cross-striated fibrils and other ultrastructural alterations in glomeruli of rats with daunomycin nephrosis. *Lab. Invest.* **23**, 39, 1970.
7. Sternberg S. S., Philips F. S.: Biphasic intoxication and nephrotic syndrome in rats given daunomycin. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **8**, 64, 1967.
8. Sternberg S. S. i wsp.: Renal tumors and other lesions in rats following a single intravenous injection of daunomycin. *Cancer Res.* **32**, 1029, 1972.
9. Suzuki Y. i wsp.: Nephrotic effect of adriamycin in rabbits. *Fed. Proc.* **37**, 320, 1978.
10. Van Hoesel Q. G. i wsp.: Reduced cardiotoxicity and nephrotoxicity with preservation of antitumor activity of doxorubicin entrapped in stable liposomes in the LOU/M Wsi rat. *Cancer Res.* **44**, 3698, 1984.
11. Van Hoesel Q. G. i wsp.: Antitumor effect, cardiotoxicity and nephrotoxicity of doxorubicin in the IgM solid immunocytoma bearing LOU/M Wsi rat. *J. Natl. Cancer Inst.* **72**, 1141, 1984.
12. Wałski M.: Ultrastructural changes in kidney glomeruli in daunomycin nephrosis. *Ann. Med. Sec. Polish Academy Sci.* **19**, 155, 1984.
13. Young D. M.: Pathologic effect of adriamycin (NSC-123127) in experimental systems. *Cancer Chemother. Rep.* **6**, 159, 1975.

Otrzymano 1993.12.31.

OBJAŚNIENIA RYCIN

Ryc. 1 Grupa I doświadczalna (A I). W podocycie tworzą się wakuole (V) o szorstkiej błonie otaczającej, zawierające niehomogeny materiał. Widoczne również drobne wakuole o gładkiej błonie otaczającej (strzałki). Błona podstawna (BM) nieznacznie pogrubiona. Pow. ok. 20000 ×.

Ryc. 2. Grupa II doświadczalna (A II). Rozległe stopienie wypustek stopowatych podocytów (FP). Ogniskowe pogrubienie błony podstawnej (BM). Pow. ok. 36 000 ×.

Ryc. 3. Grupa III doświadczalna (B I). Ogniskowe stopienie wypustek stopowatych podocytów (strzałka). W cytoplazmie podocyta obecna wakuola (V) zawierająca niehomogeny materiał

i obrzeżona szorstką błoną. W przestrzeni moczowej (US) widoczne mikrokosmki (MV). Pow. ok. 12 000 ×.

Ryc. 4. Grupa IV doświadczalna (B II). Wakuolizacja i rozległe stopienie wypustek stopowatych podocytów (strzałka). W przestrzeni moczowej (US) widoczne mikrokosmki (MV). Błona podstawna (BM) pogrubiona. Pow. ok. 48 000 ×.

OBJAŚNIENIA SKRÓTÓW

P	—	podocyt	US	—	przeźródź moczowa
E	—	komórka śródbłónka	BM	—	błona podstawna
EP	—	komórka nabłónka ściennego	FP	—	wypustki stopowate
PT	—	płytki krwi	MBV	—	ciało wielopęcherzykowe
RBC	—	erytrocyt	GA	—	aparatus Golgiego
V	—	wakuola	MF	—	mikrofilamenty
MV	—	mikrokosmki	N	—	jądro komórkowe

SUMMARY

Nephrotoxicity of daunorubicin in rats and effect of tocopherol and ascorbic acid on lesions induced in kidneys by daunorubicin were examined. The most significant ultrastructural changes in the glomeruli included the loss of foot processes in visceral epithelial cells and appearance of microvillous and vacuolar formations. The glomerular basement membrane showed minimal thickening. No beneficial influence of tocopherol and ascorbic acid on daunorubicin related nephrotoxicity was observed.

EXPLANATION TO FIGURES

Fig. 1. Experimental group I (A I). There are vacuoles (V) in the podocyte surrounded with rough membrane and containing nonhomogeneous material. There are also visible small vacuoles surrounded with smooth membrane (arrows). Basement membrane (BM) is slightly thickened. Magn. ca 20,000 ×.

Fig. 2. Experimental group II (A II). Widespread fusion of foot processes (FP). Focal thickening of basement membrane (BM). Magn. ca 36,000 ×.

Fig. 3. Experimental group III (B I). Focal fusion of foot processes (arrow). There is a cytoplasmic vacuole of podocyte containing nonhomogeneous material and surrounded with rough membrane (V). Microvilli (MV) present in urinary space (US). Magn. ca 12,000 ×.

Fig. 4. Experimental group IV (B II). Vacuolation of podocytes and widespread fusion of foot processes (arrow). Microvilli (MV) present in urinary space (US). Thickening of basement membrane (BM). Magn. ca 48,000 ×.

EXPLANATION TO SYMBOLS

P	—	podocyte	US	—	uriniferous space
E	—	endotheliocyte	BM	—	basement membrane
EP	—	parietal epithelial cell	FP	—	foot processes
PT	—	platelet	MBV	—	multivesicular body
RBC	—	erythrocyte	GA	—	Golgi apparatus
V	—	vacuole	MF	—	microfilaments
MV	—	microvilli	N	—	nucleus