

Zakład Histologii i Embriologii. Pracownia Cytologii Doświadczalnej.
Instytut Biologiczno-Morfologiczny. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Stanisław Grzycki

Józef STASZYC, Krystyna CZERNY, Ewa KIFER,
Elżbieta JĘDRZEJEWSKA

Badania histotopchemiczne nad wpływem leków przeciwastmatycznych na cytofizjologię nerki

Гистотопохимические исследования влияния противоастматических средств
на цитофизиологию почек

Histotopochemical Studies on the Influence of Antiasthmatic Drugs on the
Cytophysiology of a Kidney

Astmopent, izoprenalina, i salbutamol należą obecnie do najczęściej stosowanych leków przeciwastmatycznych. Działanie swoje wywierają one przez stymulację receptorów adrenergicznych β_2 . Receptory adrenergiczne rozmieszczone są w całym organizmie i dlatego też dłuższe stosowanie wymienionych leków prowadzić może do zmian w czynności także i innych narządów, a nawet do powstania szkodliwych objawów. Dlatego też zagadnienie to stanowi przedmiot szerokiego zainteresowania lekarzy, producentów leków oraz licznych pracowni naukowych.

Celem naszej pracy jest przedstawienie wyników badań nad wpływem astmopentu, izoprenaliny i salbutamolu na nerki zwierząt w warunkach doświadczalnych.

BADANY MATERIAŁ I METODYKA

Doświadczenia wykonano na królikach szczepu Wistar, obu płci, o ciężarze ciała ca 1,5—2,5 kg i dorosłych samcach szczurów białych, też w liczbie 70 sztuk. Astmopent, izoprenalinę i salbutamol — firmy „Polfa”, podawano przez 43 dni (tab. 1 i 2). Króliki i szczury żywiono dietą standardową. Po całkowitym skrwawieniu zwierząt pobierano wycinki z nerek. Materiał utrwalano w 10% obojętnej formalinie, a do odczynów na tłuszcze — w płynie Bakera. Preparaty parafinowe barwiono hematoksyliną Mayera i wodnym roztworem 1% eozyiny, a skrawki uzyskane na mikrotomie mroźeniowym traktowano sudanem czarnym wg Romeisa (1943).

BADANIA WŁASNE

Doświadczenia przeprowadzone na królikach

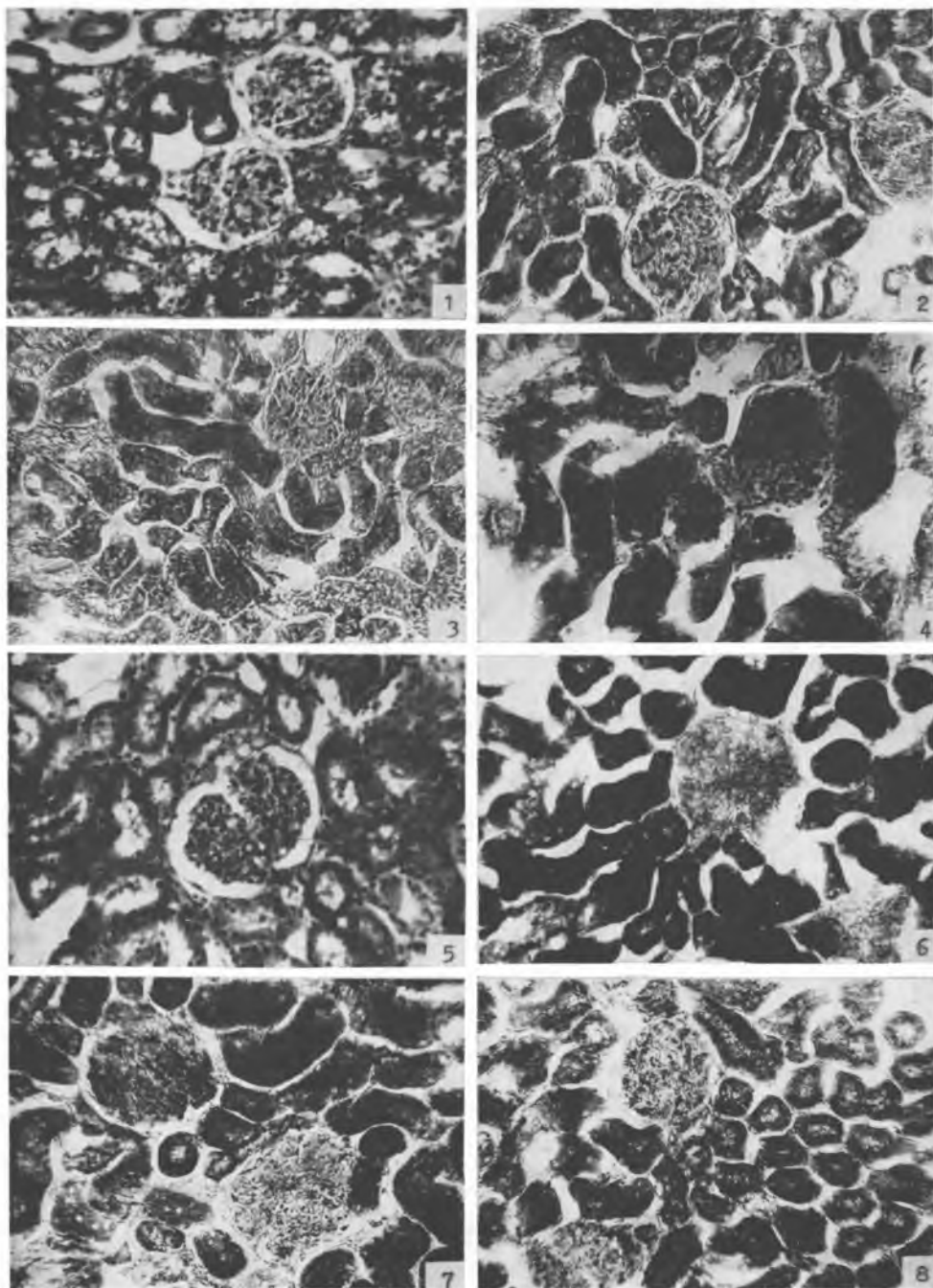
Podobnie jak w grupach kontrolnych również i po astmopencie (0,5—1,0 mg/kg c.c.) podawanym dootrzewnowo i dożylnie kuliste jądra komórek nabłonka kanalików głównych wybarwiały się hematoksyliną na kolor fioletowoniebieski (ryc. 1). Cytoplazma i jąderka barwiły się eozyną

Tab. 1. Zestawienie materiału doświadczalnego, króliki
A list of the experimental material, rabbit

Grupa i liczba zwierząt w grupie	Dootrzewnowo			Dożylnie			
	Rozpuszczalnik woda w ml	Astmo-pent mg/kg c.c.	Izoprenalina mg/kg c.c.	Salbutamol	Rozpuszczalnik woda w ml	Astmo-pent mg/kg c.c.	Salbutamol
Kontrolna, 5	5				5		
II doświad. 5	5		1,0		5	0,5	
III doświad. 5	5		5,0		5	2,5	
IV doświad. 5	5			0,2	5		0,5
V doświad. 5	5			3,0	5		1,5
VI doświad. 5	5	1,0			5	0,5	
VII doświad. 5	5	3,0			5	1,5	

Tab. 2. Zestawienie materiału doświadczalnego, szczury
A list of the experimental material, rats

Grupa i liczba zwierząt w grupie	Dootrzewnowo			Dożądawkowo			
	Rozpuszczalnik woda w ml	Astmo-pent mg/kg c.c.	Izoprenalina mg/kg c.c.	Salbutamol	Rozpuszczalnik woda w ml	Astmo-pent mg/kg c.c.	Salbutamol
Kontrolna, 5	2,5				2,5		
II doświad. 5	2,5		1,0		2,5	4,0	
III doświad. 5	2,5		25,0		2,5	200,0	
IV doświad. 5	2,5			0,2	2,5		2,0
V doświad. 5	2,5			15,0	2,5		200,0
VI doświad. 5	2,5	1,0			2,5	4,0	
VII doświad. 5	2,5	15,0			2,5	200,0	



jednolicie i przypominały materiał porównawczy. Po zastosowaniu wzrastających dawek tego leku (1,5—3,0 mg/kg c.c.) obserwowano w cewkach krętych I rzędu obok komórek z normalnymi odczynami na tłuszcze cewki o zmniejszonej sudanofilności. W kanalikach tych reakcje na lipidy lokalizowały się nadal tylko w cytoplazmie (ryc. 2). W pętłach Henlego i wstawkach tłuszcze intraplastmatyczne — chylomikrony dawały odczyny jak w materiale kontrolnym. Szerokość światła kanalików moczowych oraz wysokość komórek nabłonka były fizjologicznej wielkości.

Po podaniu izoprenaliny w dawkach 0,5 i 1,0 mg/kg c.c. odczyny barwne uzyskane przy użyciu hematoksyliny i eozyiny, obraz morfologiczny nefronów i zrębu nerki podobne były do uwidocznionych w grupach porównawczych. Przy obliczaniu metafaz nie znaleziono istotnych różnic w zestawieniu z grupą kontrolną. Po zwiększeniu dawek leku do 2,5—5,0 mg/kg c.c. nie stwierdzono zmian w odczynach cytochemicznych jąder i w wyglądzie cytoplazmy komórek nabłonka kanalików. Naczynia włosowate i śródbłonki większych naczyń nie wykazywały też dodatkowych odczynów. Bez względu na dawkę izoprenaliny dość obfite tłuszcze wewnątrzkomórkowe miały kształt kuleczek różnej wielkości, rozrzuconych na całym obszarze cytoplazmy. Lipidy występowały również i pod postacią rozproszoną (ryc. 3).

Na preparatach barwionych hematoksyliną i eozyiną, a pochodzących ze zwierząt, którym podano salbutamol w dawkach 0,2 i 0,5 mg/kg c.c., rozmieszczenie kłębków, kanalików nefronów i cewek zbiorczych podobne było do materiału kontrolnego. Błona jądrowa wyraźnie odgraniczała się od cytoplazmy, a wybarwiona chromatyna widoczna była w postaci drobnych ziarenek lub większych grudek — chromocentrów. Po zwiększeniu dawek leku do 1,5 i 3,0 mg/kg c.c. komórki nabłonka czynnych części kanalików moczowych nie przedstawiały również wyraźnych odchyłeń od normy kontrolnej. Nie znaleziono też pobudzenia podziałów mitotycznych. Przestrzeń międzyblaszkowa torebek Bowmana i światło kanalików nerkowych były nie zmienione.

Podobnie jak w grupie kontrolnej tak i w materiale zwierząt eksperymentalnych oprócz typowych kropelek sudanofilnych różnej średnicy występowały lipidy i pod postacią rozproszoną. Jak stwierdziliśmy, sposób podawania oraz wielkość dawki leku nie miały wpływu na rozmieszczenie i natężenie odczynów specyficznych na tłuszcze (ryc. 4).

Doświadczenia przeprowadzone na szczurach

Astmopent zastosowany w dawkach 1,0 i 4,0 mg/kg c.c. nie zmieniał obrazu histologicznego nerek (ryc. 5). Barwliwość komórek była dobra. Zasadochłonne jądra w cewkach krętych I rzędu układały się bliżej podstawy komórek, a w pętłach Henlego były lekko wysklepione ku światłu.

Cytoplazma komórek miała prawidłową liczbę kwasochłonnych ziarnistości.

Po dootrzewnowej iniekcji 15,0 mg/kg c.c. tego leku lipidy intraplazmatyczne uformowane w różnej wielkości kuleczki, ułożone były podobnie jak w grupie porównawczej. Podniesienie dawki astmopentu do 200,0 mg/kg c.c. wywołało w pojedynczych kanalikach krętych zwiększenie sudanofilności. Część kropelek sudanofilnych zlewała się w duże zespoły, o średnicy nie przekraczającej jądra komórkowego (ryc. 6). W nabłonku nefronów nie było dodatkowych podziałów mitotycznych. Naczynia krwionośne, wypełnione prawidłową ilością elementów morfotycznych krwi, zachowały normalną średnicę światła.

W porównaniu z grupą kontrolną izoprenalina aplikowana we wzrastających dawkach nie miała uchwytne go wpływu na cytomorfologiczny obraz nerki. Hematoksylina uwidoczniła prawidłowe jądra komórkowe o wyraźnym zrębie chromatynowym. Eozyna dokładnie i równomiernie zabarwiła cytoplazmę komórek wszystkich odcinków nefronów i kuliste jąderka leżące centralnie lub na obwodzie jądra. Ilość podziałów mitotycznych nie uległa zmianie. Barwiąc tłuszcze sudanem czarnym wyczerzono najdrobniejsze kropelki lipomikronów rozmieszczonych w cytoplazmie komórek kanalików moczowych (ryc. 7). Ziaren sudanofilnych nie stwierdzono w karioplazmie. W zestawieniu z materiałem porównawczym naczynia krwionośne i otaczająca ich tkanka łączna nie wykazywały różnic.

Po wprowadzeniu salbutamolu do organizmu w dawkach 0,2 i 2,0 mg/kg c.c. komórka nabłonka nefronów zachowała swoją morfologiczną indywidualność. Jądra zajmowały nadal w komórkach czynnych części kanalików swoje typowe położenie. Nie zmieniona struktura cytoplazmy i jąderka dawała normalne odczyny po działaniu eozyną. Nie obserwowano wybroczyn i zwiększenia ilości figur mitotycznych po żadnej ze stosowanych dawek leku. Lipidy ukształtowane w kuleczki barwiły się wybiórczo sudanem. Położenie tych specyficznych elementów było podobne do stwierdzanych w materiale porównawczym. Po 200,0 mg/kg c.c. salbutamolu część lipidów była rozproszona w cytoplazmie (ryc. 8). W obrębie jądra reakcje na tłuszcze były ujemne. Delikatne odczyny, podobnie jak na preparatach kontrolnych, zanotowano w kłębkach nerkowych.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Każdy lek wprowadzony do organizmu żywego ulega przekształceniom chemicznym, a produkty rozpadu mogą niekiedy obok działania terapeutycznego wykazywać niepożądane efekty farmakologiczne. Podstawowym warunkiem prawidłowego stosowania leków jest więc dokładna i wszech-

stronna znajomość mechanizmu ich kinetyki i wywoływanych przemian (Roguski 1968, Kubikowski 1973). Większość leków, podobnie jak zastosowane przez nas, jest wydalana przez układ moczowy, przy czym nefrotoksyczność może wystąpić między innymi w 2 mechanizmach, tj. nadwrażliwości i bezpośrednim uszkodzeniu mięszu nerkowego.

Astmopent, siarczan orciprenaliny (siarczan 1/3,5 dwu hydroksy-fenyl-/-2-izopropylaminoetanolu) jest syntetyczną pochodną pirokatechiny i posiada dwie grupy wodorotlenowe w pozycji meta. Po zastosowaniu go w dawkach 3,0 i 200,0 mg/kg c.c. obserwowano zmiany nasilenia odczynów sudanofilnych zarówno u królików, jak i u szczurów. W porównaniu z materiałem kontrolnym lokalizacja reakcji na lipidy nie była zmieniona. Biorąc to pod uwagę można sądzić, że zastosowane dawki tego sympatykomimetycznego leku mogą mieć pewne działanie metaboliczne, ale nie zmieniają w nerkach całokształtu przemian glikogenolizy i lipolizy (Semczuk i wsp. 1974). Być może również, że zmiany te miały miejsce tylko w nefronach będących w różnym stanie fizjologicznej czynności. Nie wyklucza się także reakcji osobniczych, ponieważ zmiany te nie występowały w całym materiale.

Izoprenalina, a przede wszystkim jej metabolit 3-metyloksyizoprenalina wykazują właściwości blokujące betareceptory. Lek ten wywiera swoje działanie przez wpływ na cykliczny 3'5'-AMP, z tym że metabolizm jego jest nieco inny niż pozostałych katecholamin (Książek 1972), ponieważ jest inaktywowany przez enzym katecholamino-tleno-metylo-transferazę (COMT).

Stosując barwniki zasadochłonne i kwasochłonne oraz wybiórcze metody barwienia lipidów, nie stwierdzono zmian cytochemicznych wskazujących na dezorganizację w przemianie i dynamice jądroplazmy i cytoplazmy pod wpływem różnych dawek izoprenaliny. Zgodnie więc z teorią Erlicha (1970) sądzi się, że nerki królika i szczura nie zmieniają swojej przemiany materii pod wpływem podanych dawek tego leku. Ponadto biorąc pod uwagę sugestie Wassera (1960) można uważać, że w nerkach nie występują farmoreceptory układu adrenergicznego beta wrażliwe na izoprenalinę.

Salbutamol pod względem chemicznym jest 2-butyloamino 1-4 hydroksy-3-hydroksymetylo/-fenyloetanolem. Budową swoją przypomina izoprenalinę (Głowacka i wsp. 1975), nie ulega jednak rozkładowi pod wpływem COMT, dzięki czemu w dużym odsetku wydalana się z moczem w formie nie zmienionej (Różniewski i wsp. 1976).

W analizie obrazów cytochemicznych zwrócono szczególną uwagę na pętle Henlego i wstawki, gdyż tutaj wydzielana jest większość związków chemicznych wprowadzanych do organizmu z zewnątrz. Salbutamol okazał się lekiem nie wywołującym wpływu toksycznego i farmakodynamicznego

nego i na te części kanalików moczowych. Do badań zastosowano leki o działaniu na receptory beta₂. Według doniesień Blooma i Goldmana (1966) związki te łącząc się z aktywnym centrum adenocyklazy hydrolizują ATP i powodują powstanie cyklicznego 3'5'-AMP, stymulującego przemianę węglowodanową i tłuszczową. Użyte przez nas dawki wszystkich trzech leków nie wywołały jednak wystąpienia istotnych zmian w obrazach mikroskopowych nerek, choć były one wielokrotnie wyższe od aplikowanych dotychczas w leczeniu. Można więc przypuszczać, że również u człowieka dawki te nie spowodują wystąpienia objawów nefrotoksycznych.

PIŚMIENNICTWO

1. Bloom B. M., Goldman J. M.: *Advan. Drug. Res.* **3**, 121—166, 1966.
2. Ehrlich P.: *Hippokrates* **41**, 366—377, 1970.
3. Głowacka M., Borek-Pyzik B., Jezierska-Schier A., Kobylińska-Lisicka D.: *Terapia i Leki* **6**, 242—248, 1975.
4. Książek A.: *Ośrodkowe działanie leków wpływających na obwodowy receptor adrenergiczny typu beta (praca doktorska)*, Lublin 1972.
5. Kubikowski P.: *Terapia i Leki* **1**, 3—12, 1973.
6. Roguski J.: *Biuletyn Informac.* **18**, 33—37, 1968.
7. Romeis R.: *Taschenbuch der Mikroskopischen Technik*, Berlin 1943.
8. Roźniewski J., Gondorowicz K., Szmidt M., Grabski Wł.: *Terapia i Leki* **5**, 137—140, 1976.
9. Semczuk B., Klonowski S., Czerwonka R., Gołąbek W., Czop S., Czarnecki J.: *Terapia i Leki* **10**, 441—449, 1974.
10. Wasser P. G.: *J. Pharm. Pharmacol.* **12**, 577—594, 1960.

Otrzymano 9 VI 1976.

OBJAŚNIENIA RYCIŃ

Ryc. 1. Grupa doświadczalna VI. Królik. W porównaniu z grupą kontrolną nie zmieniona część korowa nerki. Barwienie hematoksyliną i eozyną. Pow. ca 400×

Ryc. 2. Grupa doświadczalna VII. Królik. Nierównomierne odczyny na tłuszcze w kanalikach moczowych. Barwienie wg Romeisa. Pow. ca 400×

Ryc. 3. Grupa doświadczalna II. Królik. Różnej wielkości krople lipidów wybarwione sudanem czarnym. Pow. ca 400×

Ryc. 4. Grupa doświadczalna IV. Królik. Prawidłowy obraz rozmieszczenia reakcji na lipidy. Barwienie wg Romeisa. Pow. ca 400×

Ryc. 5. Grupa doświadczalna VI. Szczur. Fizjologiczny obraz kłębka naczyniowego i kanalików nerkowych. Barwienie hematoksyliną i eozyną. Pow. ca 400×

Ryc. 6. Grupa doświadczalna VII. Szczur. Wzmoczone reakcje na tłuszcze w kanalikach moczowych. Barwienie wg Romeisa. Pow. ca 400×

Ryc. 7. Grupa doświadczalna III. Szczur. Intensywność odczynów na tłuszcze jak w materiale porównawczym. Barwienie wg Romeisa. Pow. ca 400×

Ryc. 8. Grupa doświadczalna V. Szczur. Słabo dodatnie odczyny na tłuszcze w kłębkach nerkowych. Barwienie wg Romeisa. Pow. ca 400×

РЕЗЮМЕ

В течение 43 дней кроликам и крысам вводились астмопент, изопреналин и салбутамол во все увеличиваемых дозах, 20-икратно больших, чем применяемые в клинике. Для исследований брали почки, микротомовые срезы которых окрашивали гематоксилином и эозином по Маеру, а липиды — черным суданом по методу Ромейса (Romeis).

Применяемые дозы лекарственных средств не вызвали появления существенных цитологических и микроскопических изменений в почках. В связи с этим можно предположить, что применяемые дозы не вызовут нефротоксических явлений также и у людей.

SUMMARY

Rats and rabbits were given asthmopent, izoprenalin and salbutamol for 43 days, in progressive doses (from 0,2 up to 200,0 mg/kg of body weight) which reached a 20 — fold higher dose than that applied at the clinic. Kidneys were taken for investigations and then stained with hematoxylin and eosin according to Mayer, the lipids were stained with black Sudan using Romeis's method on mirotome sections. The used doses of the drugs didn't produce the appearance of essential cytochemical and microscopic changes in kidneys. In connection with this, it is supposed that the above doses will not cause the appearance of nephrotoxic symptoms in man.

EXPLANATIONS OF FIGURES

Fig. 1. Sixth experimental group. Rabbit. Unaltered cortex part of kidney in comparison with the control group. Hematoxylin and eosin staining. Magn. approx. 400X.

Fig. 2. Seventh experimental group. Rabbit. Irregular reactions to lipids in urinary tubules. Staining acc. to Romeis. Magn. approx. 400X.

Fig. 3. Second experimental group. Rabbit. Various size droplets of lipids stained by black sudan. Magn. approx. 400X.

Fig. 4. Fourth experimental group. Rabbit. Normal picture of the distribution of reactions to lipids. Staining acc. to Romeis. Magn. approx. 400X.

Fig. 5. Sixth experimental group. Physiological picture of vascula glomerulus and renal tubules. Hematoxylin and eosin staining. Magn. approx. 400X.

Fig. 6. Seventh experimental group. Rat. An increased reaction to lipids in urinary tubules. Staining acc. to Romeis. Magn. approx. 400X.

Fig. 7. Third experimental group. Rat. The intensity of reactions to lipids just as in comparative material. Staining acc. to Romeis. Magn. approx. 400X.

Fig. 8. Fifth experimental group. Rat. A weak positive reaction to lipids in renal glomeruli. Staining acc. to Romeis. Magn. approx. 400X.

