

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXXVI, 33

SECTIO D

1981

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

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

Ewa K I F E R

**Histochemiczne badania nerki szczura białego po podawaniu związku
fosforoorganicznego Sadofos**

Гистохимические исследования почки белых крыс после введения
фосфоорганического препарата Садофос

Histochemical Examinations of a White Rat's Kidney after the Administration
of the Phosphoroorganic Compound Sadofos

Związki fosforoorganiczne, szeroko stosowane w rolnictwie i gospodarce człowieka, przynoszą wymierne korzyści, ale jednocześnie stwarzają duże niebezpieczeństwo dla zdrowia i życia człowieka oraz zwierząt. Związki te, jak również ich metabolity mogą przedostawać się do organizmu, powodując zatrucia lub trwałe uszkodzenia układu nerwowego czy narządów wewnętrznych (4, 6). Wywierają one również wpływ na aktywność enzymów, zaburzają czynność narządów jak też wykazują działanie rakotwórcze i teratogenne (2, 7, 8, 9).

Celem pracy było zbadanie wpływu malationu na aktywność niektórych enzymów w nerkach szczurów w różnych warunkach doświadczalnych.

MATERIAŁ I METODYKA

Badania przeprowadzono w okresie wiosenno-letnim na szczurach białych rasy Wistar, samcach w wieku 3—5 miesięcy, o masie ciała 150—220 g, pochodzących z hodowli wsobnej. Zwierzęta były karmione dietą standardową. Szczury w ilości 40 sztuk podzielono na 5 grup po 8 zwierząt w każdej. Zwierzętom doświadczalnym podawano preparat handlowy Sadofos płynny 30 (zawierający 30% substancji czynnej — malationu), rozcieńczany wodą destylowaną. Preparat w postaci emulsji podawano przed karmieniem, sondą dożołądkowo w ilości 0,75 ml do 1,2 ml jednorazowo (w zależności od masy ciała), przeliczając dawkę na ilość substancji czynnej.

Grupa I doświadczalna — zwierzęta otrzymywały Sadofos w ilości 1/120 LD₅₀ malationu (ca 10 mg/kg m.c.) przez 6 dni.

Grupa II doświadczalna — dawka jak w grupie I podawana przez 20 dni.

Grupa III doświadczalna — Sadowos podawano w dawce $1/4$ LD₅₀ malationu (ca 300 mg/kg m.c.) przez 6 dni.

Grupa IV doświadczalna — dawka jak w grupie III podawana przez 20 dni.

Grupa V kontrolna — zwierzęta otrzymywały wodę destylowaną.

Po odpowiednim okresie podawania preparatu zwierzęta dekapitowano i pobierano lewą nerkę do badań histochemicznych. Część nerki utrwalano w płynie Bakera przez 24 godz. i skrawano na mikrotomie mroźniowym, wykonując reakcje na aktywność fosfataz zasadowej i kwaśnej wg metody Gomoriego, na aktywność ATP-azy wg metody Wachsteina i Meisel w modyfikacji Vorbrodta. Pozostały, nie utrwalony materiał z nerki zamrażano w temp. -25°C i krojono w kriostacie typu Slee. Następnie wykrywano enzymy oddechowe: dehydrogenazę bursztynianową wg metody Nachlasi i wsp., dehydrogenazę izocytrynianową, kwasu L-glutaminowego, mleczanową i glukozo-6-fosforanową wg metody Pearse'a oraz reduktazy tetrazolowe NADH i NADPH wg metody Farbera.

Do wszystkich odczynów histochemicznych wykonano kontrolne reakcje w środowisku nie zawierającym substratu.

BADANIA WŁASNE

Grupa I doświadczalna (10 mg/kg m.c. — 6 dni)

W porównaniu z grupą kontrolną nie zauważono różnic w intensywności i rozmieszczeniu odczynu enzymatycznego w żadym z badanych enzymów.

Grupa II doświadczalna (10 mg/kg m.c. — 20 dni)

W odniesieniu do grupy kontrolnej reakcja histochemiczna na fosfatazę kwaśną wykazała wzmożenie aktywności enzymu w części korowej nerki. Liczniejsze ziarna produktu reakcji lokalizowały się przede wszystkim w środkowej części cytoplazmy komórek nabłonka kanalików krętych. Odczyn na reduktazę tetrazolową NADH w niewielkich obszarach istoty korowej nerki występował wyraźnie przy podstawie komórek nabłonka kanalików głównych w odróżnieniu od grupy kontrolnej, gdzie był rozmieszczony dość równomiernie w całej cytoplazmie komórek (ryc. 1 i 2). Intensywność reakcji enzymatycznych pozostałych badanych enzymów była podobna do ujawnionej w grupie kontrolnej.

Grupa III doświadczalna (300 mg/kg m.c. — 6 dni)

W nerkach zwierząt tej grupy, prócz typowego odczynu na fosfatazę kwaśną, wystąpił w części korowej słaby dyfuzyjny odczyn w jądrach komórek nabłonka kanalików jak również w rąbku szczoteczkowym. Re-

akcja na ATP-azę w wielu kanalikach krętych I rzędu wykazała słabszą niż w grupie kontrolnej aktywność enzymu w rąbku szczoteczkowym i cytoplazmie (ryc. 3 i 4). Osłabienie odczynu na ATP-azę było najwyraźniejsze w kanalikach podtorebkowych. Reduktaza tetrazolowa NADH wykazywała miejscami, podobnie jak w grupie II, przypodstawne zlokalizowanie produktu reakcji. Reakcja histochemiczna na aktywność reduktazy tetrazolowej NADPH wykazała zróżnicowanie aktywności enzymu w sąsiadujących komórkach nabłonka w kanaliku głównym, szczególnie w przyrzeniowej części kory nerki. W nerkach zwierząt porównawczych w komórkach jednego kanalika obserwowano jednakowe nasilenie odczynu. Odczyn na dehydrogenazę mleczanową ujawnił w kanalikach krętych I i II rzędu wzmożoną aktywność enzymu, przejawiającą się zwiększoną ilością ziaren formazanowych rozmieszczonych w całej cytoplazmie, a nie, jak w nerkach zwierząt kontrolnych, w środkowej i przypodstawnej części cytoplazmy (ryc. 5 i 6). Badania pozostałych enzymów nie wykazały różnic w odniesieniu do grup kontrolnych.

Grupa IV doświadczalna (300 mg/kg m.c. — 20 dni)

W komórkach nabłonka kanalików głównych nerki odczyn na fosfatazę kwaśną był silniejszy niż w grupie zwierząt kontrolnych i poprzednich doświadczalnych. Liczne fosfatazopozytywne ziarna produktu reakcji występowały w całej cytoplazmie komórek i często zlewały się, tworząc duże konglomeraty (ryc. 7 i 8). Reakcja histochemiczna na ATP-azę ujawniała w części korowej nerki, wyraźniej jak w grupie III, kanaliki I rzędu z bardzo słabym odczynem w rąbku szczoteczkowym obok kanalików wykazujących nasilenie odczynu podobne do występującego w grupie kontrolnej. W odniesieniu do nerek zwierząt porównawczych, w komórkach kanalików krętych I rzędu ujawnił się dyfuzyjny odczyn fosfatazy zasadowej w cytoplazmie i jądrach komórkowych prócz typowego odczynu w rąbku szczoteczkowym. W omawianej grupie zwierząt obserwowano wyraźne osłabienie reakcji na reduktazę tetrazolową NADPH. Intensywność odczynu podobną do występującej w grupie kontrolnej zachowały kanaliki pod torebką narządu i w bezpośrednim kontakcie z ciałkami nerkowymi. Odczyn reduktazy tetrazolowej NADH lokalizował się podobnie jak w grupie III doświadczalnej, często przy podstawie komórek nabłonkowych kanalików. Dehydrogenaza mleczanowa, jak w grupie III, wykazała odczyn silniejszy w porównaniu z grupą kontrolną. Nasilenie i rozmieszczenie odczynów na pozostałe badane dehydrogenazy było zbliżone do obserwowanych w grupie zwierząt kontrolnych.

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Malation jest pochodną kwasu dwutiofosforowego. Występuje jako substancja czynna w preparatach handlowych Sadofos i Aerosol do szklarni. Jest on uważany za mało szkodliwy i zaliczany do IV klasy toksyczności.

Malation stosowany w warunkach powyższego doświadczenia nie powodował zmian aktywności takich enzymów, jak dehydrogenazy: bursztynianowa, glutaminianowa i izocytrynianowa. Mała dawka malationu ($1/120 LD_{50}$), stosowana przez 20 dni, powodowała tylko wzmożenie odczynu na fosfatazę kwaśną w części korowej nerki i zmiany lokalizacji reduktazy tetrazolowej NADH w komórkach nabłonka kanalików głównych nerki.

Malation podawany w dużej dawce (po 20 dniach — grupa IV) wzmacniał aktywność fosfatazy kwaśnej. W cytoplazmie komórek nabłonkowych kanalików nerki pojawiły się duże konglomeraty produktu reakcji. Wzmożenie odczynu na fosfatazę kwaśną, jako wykładnika funkcji lizosomów, świadczy prawdopodobnie o nasileniu się procesów trawiennych w komórkach kanalików (5). Konglomeraty produktu reakcji mogą być związane z pojawieniem się dużych lizosomów. Zjawisko takie jest odwracalne i związane z zaburzeniem funkcji komórki lub z nasileniem normalnego metabolizmu wskazującego wzmożoną fago- i pinocytozę (3). Przy zatruciach innymi związkami fosforoorganicznymi często obserwowano wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej w wielu narządach (1, 3, 9).

Pojawienie się pozytywnego odczynu fosfatazy zasadowej w cytoplazmie i jądrach komórkowych, przy nie zmienionym odczynie w rąbku szczoteczkowym kanalików krętych I rzędu (grupa IV), może sugerować aktualną syntezę tego enzymu. Przemawiałby za tym również fakt, że fosfataza zasadowa stanowi składnik aktywny nukleoproteidów i lokalizacja jej w komórce nie jest stała (3).

Niejednolite osłabienie aktywności ATP-azy w rąbku szczoteczkowym kanalików głównych nerki (grupa III i IV) jest zgodne z wynikami otrzymanymi przez innych autorów po stosowaniu związków fosforoorganicznych (3). Zróżnicowanie aktywności enzymów w korze nerki prawdopodobnie wiąże się z tym, że nie wszystkie nefrony równocześnie uczestniczą w transporcie i zatrucie dotyczyło tylko niektórych z nich (3).

Wzrost aktywności dehydrogenazy mleczanowej (grupy III i IV) wskazuje na nasilenie się procesu glikolizy beztlenowej. Zwiększoną aktywność tego enzymu obserwowano również po działaniu innych związków fosforoorganicznych (7, 9).

Reduktazy tetrazolowe NADH i NADPH, jako dehydrogenazy koenzymów mitochondrialnych, utleniają wszystkie koenzymy typu I i II we

wszystkich zawierających je dehydrogenazach substratów. Przeprowadzone doświadczenie wykazało zmiany lokalizacji reduktazy tetrazolowej NADH i nierównomierne osłabienie aktywności reduktazy tetrazolowej NADPH w grupach III i IV.

Zmiany w odczynach na powyższe dehydrogenazy sugerują zaburzenie procesów oddechowych w komórkach nabłonka kanalików nerkowych, a łącznie ze zmianami fosfataz wskazują na zaburzenie czynności kanalików nerkowych.

PIŚMIENNICTWO

1. Beskid M. i wsp.: Wpływ malationu na obraz histochemiczny i niektóre odczyny histochemiczne wątroby szczura. *Roczn. PZH* **24**, 529, 1973.
2. Chmielnicka J. i wsp.: Wpływ niektórych pestycydów na aktywność enzymów proteolitycznych przewodu pokarmowego. *Brom. Chem. Toksykol.* **5**, 159, 1972.
3. Grzycki S. i wsp.: Recherches sur la topographie fonctionnelle des enzymes hydrolytiques dans l'épithelium des tubes contournés du rein. *Acta Histochem.* **47**, 350, 1973.
4. Janicki K.: Pestycydy — Gleba — Człowiek. WP, Warszawa 1972.
5. Ludwicki J.: Enzymy lizosomalne. *Bromat. Chem. Toksykol.* **5**, 255, 1972.
6. Sośnierz M. i wsp.: Zmiany neuropatologiczne u szczurów zatrutowanych przedziorkofosem. *Neuropatol. Pol.* **11**, 109, 1973.
7. Staszyc J., Kifer E.: Badania nad wpływem preparatu fosforoorganicznego na organizm ciężarnych szczurów i płodów oraz na komórki w hodowli tkankowej. *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, Sectio D*, **29**, 249, 1974.
8. Toś-Luty S. i wsp.: Badania toksyczności Chlorfenwinfosu dla zarodków kurzych. *Bromat. Chem. Toksykol.* **5**, 339, 1972.
9. Woźniak F.: Badania histochemiczne i morfologiczne nad wpływem przewlekłego stosowania niektórych insektycydów na mikrostrukturę gonady męskiej szczura białego. Rozprawa habilitacyjna. Akad. Med. Lublin 1976.

Otrzymano 31 XII 1980.

OPIS RYCIŃ

Ryc. 1. Grupa kontrolna. Nerka szczura. Reakcja na reduktazę tetrazolową NADH w kanalikach nerki. Metoda wg Farbera. Pow. ca 100×.

Ryc. 2. Grupa II doświadczalna. Nerka szczura. Reakcja na reduktazę tetrazolową NADH przy podstawie komórek. Metoda wg Farbera. Pow. ca 140×.

Ryc. 3. Grupa kontrolna. Nerka szczura. Reakcja na ATP-azę. Metoda wg Wachsteina i Meisel. Pow. ca 100×.

Ryc. 4. Grupa III doświadczalna. Nerka szczura. Osłabiony odczyn na ATP-azę w rąbku szczoteczkowym kanalików. Metoda wg Wachsteina i Meisel. Pow. ca 100×.

Ryc. 5. Grupa kontrolna. Nerka szczura. Reakcja na aktywność dehydrogenazy mleczanowej. Metoda wg Pearse'a. Pow. ca 100×.

Ryc. 6. Grupa III doświadczalna. Nerka szczura. Wzmóżony odczyn na aktywność dehydrogenazy mleczanowej w kanalikach. Metoda wg Pearse'a. Pow. ca 100×.

Ryc. 7. Grupa kontrolna. Nerka szczura. Reakcja na aktywność fosfatazy kwaśnej. Metoda wg Gomoriego. Pow. ca 100X.

Ryc. 8. Grupa IV doświadczalna. Nerka szczura. Wzmóżony odczyn na aktywność fosfatazy kwaśnej w kanalikach. Metoda wg Gomoriego. Pow. ca 100X.

РЕЗЮМЕ

Белым крысам-самцам вводился Садофос в двух дозах в течение 6 и 20 дней. Определялось влияние применяемого фосфороорганического препарата на энзиматическую активность избранных гидролаз и дегидрогеназ в почке. Небольшая доза препарата (пестицида) не вызывала существенных изменений активности исследуемых энзимов. Зато, после применения большой дозы наблюдалось повышение активности кислой фосфатазы и лактатной дегидрогеназы, а ослабление (понижение) гистохимической реакции на аденозин-3' фосфатазу и тетразольную редуктазу (НАДПН) и изменение размещения реакции на тетразольную редуктазу НАДН. На основании наблюдаемых изменений активности энзимов можно предполагать функциональное расстройство нефрона.

SUMMARY

Male white rats were being administered Sadofos in two doses for 6 and 20 days. The effect of this phosphoroorganic compound on the enzymatic activity of selected hydrolases and dehydrogenases in the kidney was estimated. A small dose of the pesticide did not produce any significant changes in the activity of enzymes under study. However, after applying a larger dose an increase in the acid phosphatase activity and lactic dehydrogenase activity, and a decrease in the histochemical reaction to ATP-ase and NADPH tetrazolium reductase was noticed. A change in the reaction localization for NADH tetrazolium reductase was also observed. The changes observed in the activity of enzymes can suggest some disturbances in nephron function.

EXPLANATION TO FIGURES

Fig. 1. Control group. Kidney of a rat. Reaction to NADH tetrazole reductase activity in the kidney tubules. The method after Farber. Magn. ca 100X.

Fig. 2. Experimental group II. Kidney of a rat. Reaction to NADH tetrazole reductase activity at the basis of cells. The method after Faber. Magn. ca 140X.

Fig. 3. Control group. Kidney of a rat. Reaction to ATP-ase. The method after Wachstein-Meisel. Magn. ca 100X.

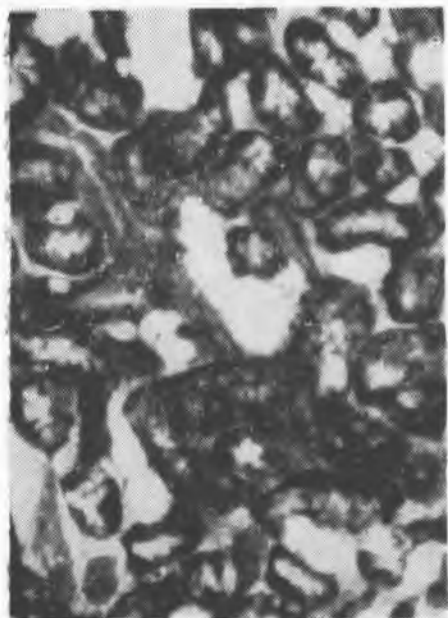
Fig. 4. Experimental group III. Kidney of a rat. Enfeeble reaction for ATP-ase in the brush border tubules. The method after Wachstein-Meisel. Magn. ca 100X.

Fig. 5. Control group. Kidney of a rat. Reaction to lactate dehydrogenase activity. The method after Pearse. Magn. ca 100X.

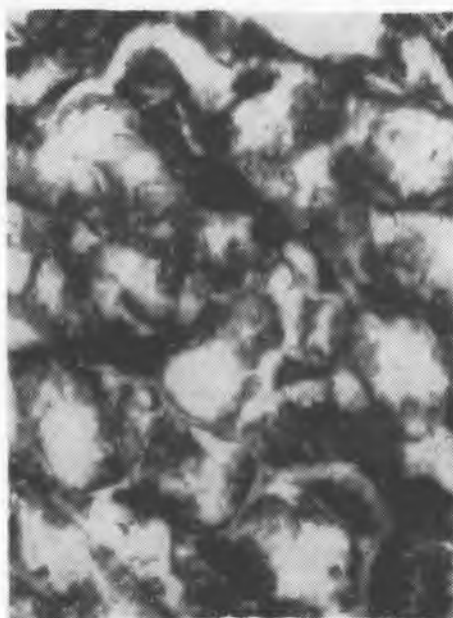
Fig. 6. Experimental group III. Kidney of a rat. An intensive reaction to lactate dehydrogenase activity in the tubules. The method after Pearse. Magn. ca 100X.

Fig. 7. Control group. Kidney of a rat. Reaction to acid phosphatase activity. The method after Gomori. Magn. ca 100X.

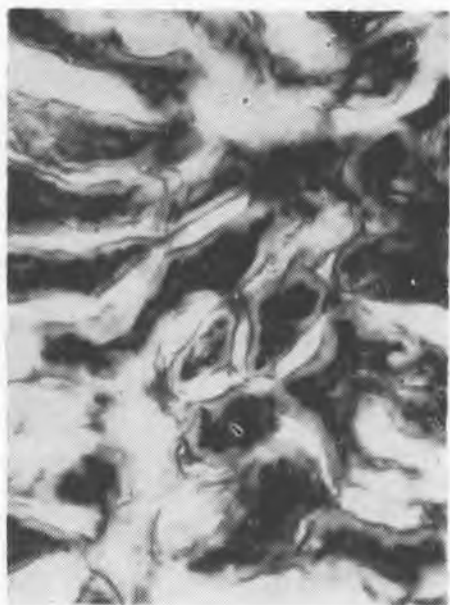
Fig. 8. Experimental group IV. Kidney of a rat. An intensive reaction to acid phosphatase activity in the tubules. The method after Gomori. Magn. ca 100X.



Ryc. 1



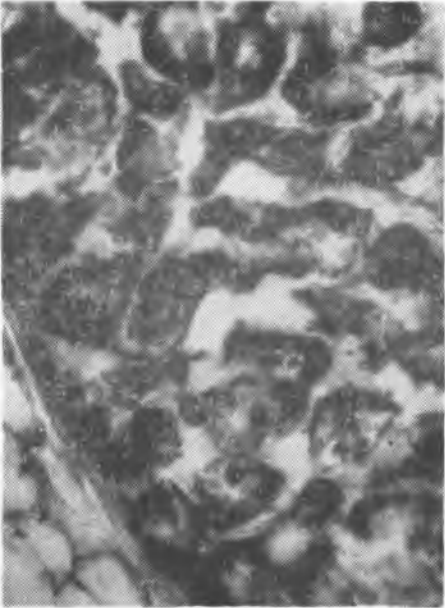
Ryc. 2



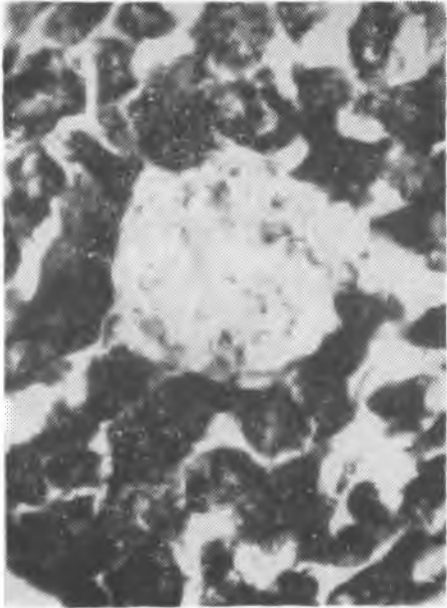
Ryc. 3



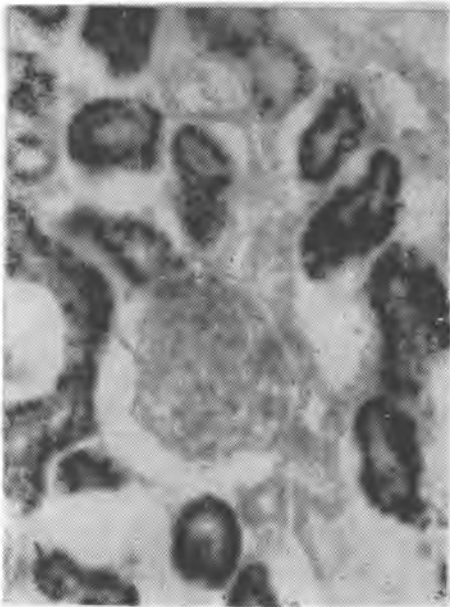
Ryc. 4



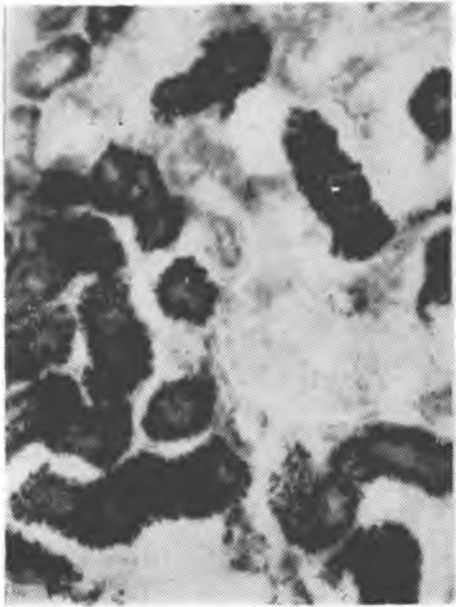
Ryc. 5



Ryc. 6



Ryc. 7



Ryc. 8