
Zakład Badań Podstawowych. Instytut Medycyny Pracy i Higieny Wsi w Lublinie
Kierownik: doc. dr hab. Włodzimierz Tyburczyk

Jadwiga LATUSZYŃSKA

**Badania doświadczalne nad embriotoksycznym wpływem fosfamidonu
na nabłonek kanalików krętych nerki. II. Badania histologiczne
i histochemiczne ***

Экспериментальные исследования эмбриотоксического влияния фосфамидона на эпителий извилистых канальцев почки. II. Гистохимические и гистологические исследования

Experimental Research on the Embryotoxic Influence of Phosphamidon
on the Epithelium of Renal Convoluted Tubules. II. Histological and Histochemical
Studies

W badaniach makroskopowych, stanowiących przedmiot części I, stwierdzono wyraźne embriotoksyczne działanie fosfamidonu na płody szczurze oraz zwrócono uwagę na możliwość teratogennego oddziaływania tego preparatu. W części II celem badań histologicznych i histochemicznych jest prześledzenie wpływu fosfamidonu na nabłonek kanalików krętych I rzędu nerek noworodków szczurzych.

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Badania prowadzono na 91 szczurach szczepu Wistar, samicach, w wieku 3—4 mies.

Do zatruwania zwierząt stosowano 93,3% fosfamidon techniczny. Preparat zawieszano w oleju z oliwek i podawano szczurom sondą dożołądkowo w ilości 1/2 LD₅₀ w dawkach pojedynczych i 1/10 LD₅₀ w dawkach wielokrotnych.

Zwierzęta doświadczalne zostały podzielone na 7 grup. Dokładny podział przedstawiono w części I. Zwierzęta 6 pierwszych grup otrzymywały dawki jednorazowe

* Wyrażam podziękowanie Panu Prof. Drowi hab. Maciejowi Latałskiemu, pod którego kierunkiem prowadzone były badania.

w 8. (grupa I), 9. (grupa II), 10. (grupa III), 11. (grupa IV), 12. (grupa V) i 13. (grupa VI) dniu ciąży. Ostatnia, grupa VII szczurów zatrutowana była wielokrotnie w okresie od 8. do 13. dnia ciąży włącznie. Równolegle prowadzone były grupy kontrolne.

Nerki do badań histologicznych i histochemicznych pobierano od noworodków pod narkozą, tuż po urodzeniu. Nerki do badań histologicznych i histochemicznych pochodziły od 50 noworodków (5 od każdej samicy) z każdej grupy.

W badaniach histologicznych utrwalano nerki w zobojętnionej formalinie, rozcieńczonej w stosunku 1 : 9. Preparaty o grubości 7 μm krojono na mikrotomie saszczkowym, barwiono hematoksyliną i eozyną.

Histochemiczne badania aktywności fosfatazy zasadowej i adenozynotrójfosfatazy wykonywano w nerkach utrwalonych w ciągu 24 godz. w utrwalczu Backera, w temp. 4°C.

Odczyn histochemiczny na aktywność fosfatazy zasadowej wykonywano według metody Gomoriego, inkubacja 30'. Dla uzyskania odczynu na adenozynotrójfosfatazę (ATP-azę) stosowano metodę Wachsteina i Meisel, używając CaCl_2 zamiast soli magnezowych w celu uwidocznienia ATP-azy w błonach komórkowych, inkubacja 45'. Po inkubacji skrawki zamykano w glicerożelatynie. Preparaty oglądano w mikroskopie świetlnym „Ergaval” produkcji Carl Zeiss — Jena. W tym samym mikroskopie wykonywano mikrofotografie.

WYNIKI BADAŃ WŁASNYCH

Jednorazowe i wielokrotne podawanie oleju samicom w różnych okresach ciąży nie wpływało na budowę mikroskopową nefronu u ich potomstwa. Z tego względu w analizie wyników badań postanowiono materiał kontrolny potraktować jako jedną grupę, z którą porównano materiał pochodzący ze wszystkich grup doświadczalnych.

BADANIA HISTOLOGICZNE

Zróznicowane kanaliki nerkowe występowały w środkowej i przyrdzennej warstwie kory. Z reguły otaczały one niedojrzałe jeszcze ciała nerkowe. Kanaliki nerkowe I rzędu przypominały kanaliki zwierząt dorosłych, tylko ich luźne utkanie w obfitej niedojrzałej tkance łącznej świadczyło o niedojrzałości nerki.

Poprzecznie lub ukośnie poprzecinane kanaliki I rzędu zbudowane były z komórek sześciennych. Granice między komórkami z zasady nie były widoczne. Cytoplazma komórkowa barwiła się kwasochłannie i wykazywała z reguły ziarnistą strukturę. Jądra o kształcie przeważnie okrągłym ułożone były w środkowej części komórki.

W okolicach jądra i w częściach szczytowych niektórych komórek widoczne były przejaśnienia. Rąbek szczoteczkowy występujący w świetle kanalików nie zawsze był wyraźnie widoczny.

U noworodków doświadczalnych kanaliki proksymalne zbudowane były z komórek o cytoplazmie tak ziarnistej, jak i homogennej.

W grupach doświadczalnych I, II i III oraz u noworodków z grupy VII kanaliki proksymalne zbudowane były z komórek, w których przeważała cytoplazma o strukturze homogennej. Komórki te barwiły się bardziej zasadochłonnie niż komórki z cytoplazmą ziarnistą. W świetle kanalików można było spotkać zasadochłonny, homogeny wysięk. Obserwowane zmiany przemawiały za ogniskowym przyćmieniem mięszowym kanalików krętych pierwszego rzędu. Zmiany te były bardziej nasilone w grupach doświadczalnych I i II (ryc. 1), czyli u noworodków, których matkom podawano fosfamidon w 8. i 9. dniu ciąży. W grupach doświadczalnych IV, V i VI większość komórek nabłonkowych posiadała cytoplazmę porowatą. Widoczne to było szczególnie w okolicy jąder i w częściach szczytowych komórek.

BADANIA HISTOCHEMICZNE

Fosfataza zasadowa (Fz)

W rąbku szczoteczkowym czynnych kanalików krętych nerki u noworodków z grupy kontrolnej występował intensywny odczyn na fosfatazę zasadową. Aktywności tego enzymu nie obserwowano w warstwie nefrotwórczej i w kanalikach leżących tuż pod nią. Odczyn dyfuzyjny na fosfatazę zasadową stwierdzono również w wierzchołkowych częściach cytoplazmy komórek nabłonkowych, w których wystąpił dodatni odczyn w rąbku szczoteczkowym (ryc. 2). W jądrach komórkowych i w kłębku nie obserwowano obecności tego enzymu.

Nieznaczny spadek aktywności odczynu obserwowano w grupach doświadczalnych I, II i III (ryc. 3). W grupach IV, V i VII natomiast wystąpił nieznaczny wzrost aktywności tego enzymu (ryc. 4).

Adenozynotrójfosfataza (ATP-aza)

Odczyn histochemiczny na adenozynotrójfosfatazę występował przede wszystkim w ścianach dużych naczyń krwionośnych, w naczyniach okołokanalikowych i w naczyniach kłębka (ryc. 5). Odczyn występujący w sieci naczyniowej kłębka zależny był od jego dojrzałości i najsilniej zaznaczał się w ciałkach nerkowych leżących tuż przy części rdzennej.

W rąbku szczoteczkowym kanalików krętych I rzędu nie stwierdzono odczynu na obecność tego enzymu. Dodatnia reakcja na adenozynotrójfosfatazę występowała natomiast w błonach komórkowych części pod-

stawowej komórki i w graniczącej z nią cytoplazmie komórek nabłonka kanalików proksymalnych.

Nieznaczne obniżenie aktywności enzymu obserwowano w nerkach noworodków, których matkom podawano fosfamidon 9. i 10. dnia ciąży (grupy doświadczalne II i III), ryc. 6. W pozostałych grupach doświadczalnych aktywność adenozynotrójfosfatazy utrzymywała się na tym samym poziomie co w grupie kontrolnej.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Zmiany morfologiczne i wady wrodzone w nerkach noworodków, których matki poddane były działaniu pestycydów, opisywało w swoich pracach wielu autorów (2, 8).

Nerka noworodka w swej budowie znacznie odbiega od budowy nerki organizmu dorosłego (7). Na przekroju poprzecznym tuż pod torebką narządu widoczna jest wyraźna warstwa nefronotwórcza. Zajmuje ona od 1/4 do 1/3 części korowej nerki noworodka (3).

Funkcjonalne procesy zachodzące w nerce są ściśle związane z poszczególnymi częściami nefronu, a w nerce noworodka dodatkowo z jej rozwojem strukturalnym.

W nerce noworodka występują jednocześnie nefrony znajdujące się w różnych stadiach rozwojowych i zlokalizowane w różnych warstwach kory. Wykazują one tak funkcjonalne, jak i strukturalne różnice, które mogą być zależne od ich stadium rozwojowego.

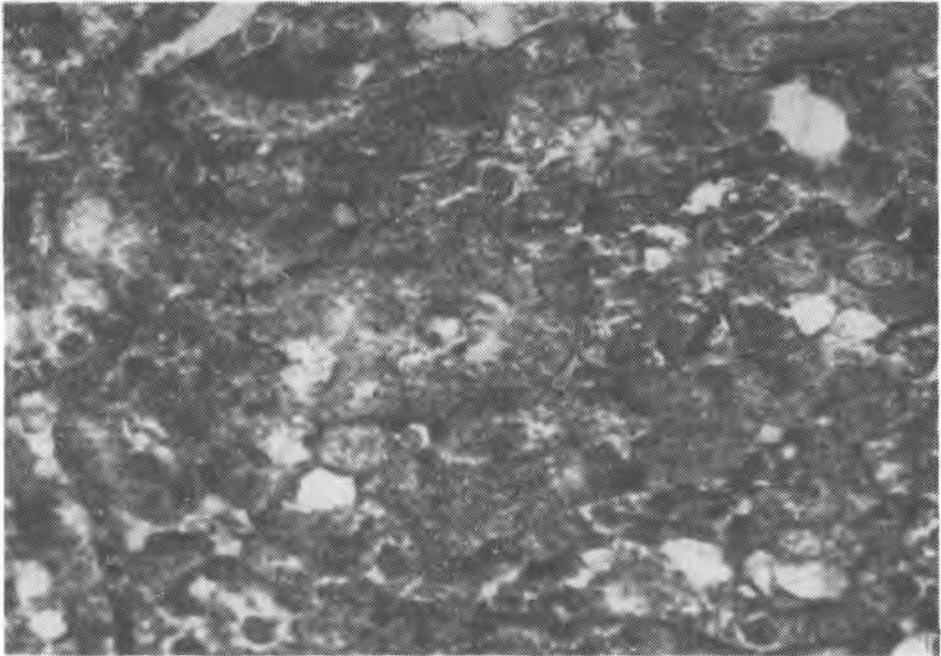
Na s h (6) twierdzi, że starsze stadia rozwojowe nefronów zlokalizowane są bliżej warstwy rdzeniowej, młodsze — w powierzchniowej części kory.

Z badań własnych wynika, że fosfamidon podawany ciężarnym samicom, tak w dawkach wielokrotnych, jak i pojedynczych, wpływał na powstawanie u noworodków przycmienia mięszonego cytoplazmy komórek nabłonkowych kanalików nerkowych pierwszego rzędu. Zmiany te były nieco mniej nasilone po jednorazowym podaniu preparatu w grupach doświadczalnych V i VI.

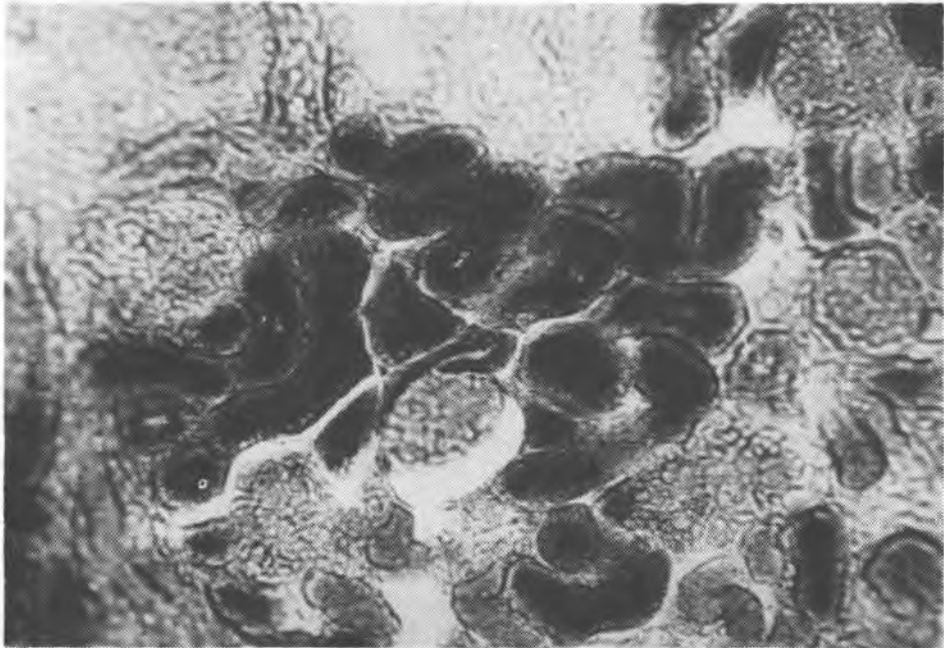
Podobne zmiany otrzymywała G l u k h o v a (2) podając polichlorek pinenu ciężarnym samicom w pierwszej i drugiej połowie ciąży.

W badaniach własnych ziarnistą i homogenną cytoplazmę w komórkach nabłonkowych kanalików proksymalnych oraz wysięki w świetle kanalików obserwowano we wszystkich grupach doświadczalnych.

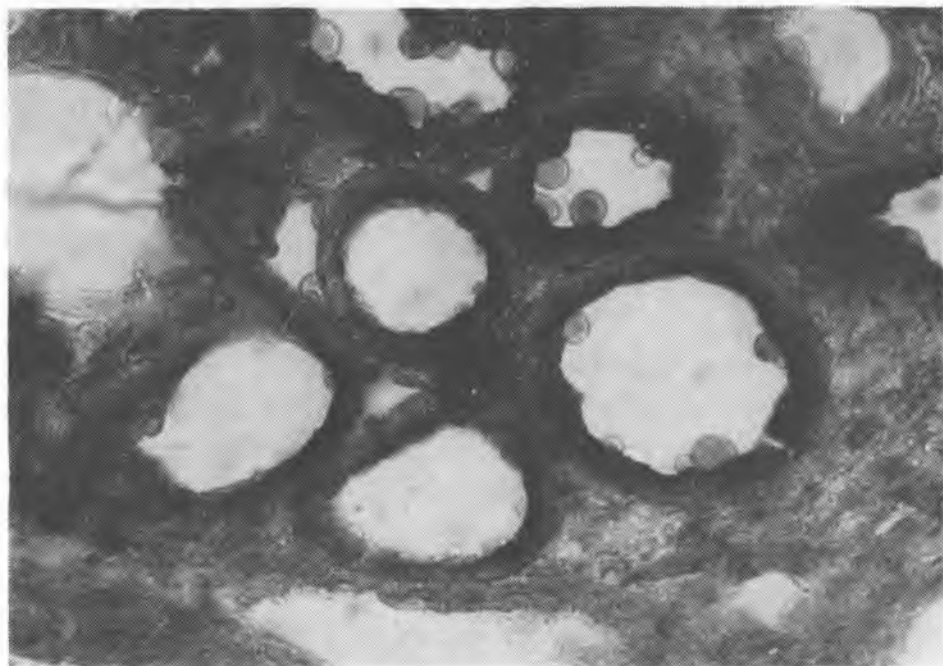
Obecność białkowo-polisacharydowej substancji w świetle kanalików oraz zwiększona homogenność cytoplazmy komórkowej są charakterystyczne dla drugiej połowy życia płodowego, w związku z tym można by



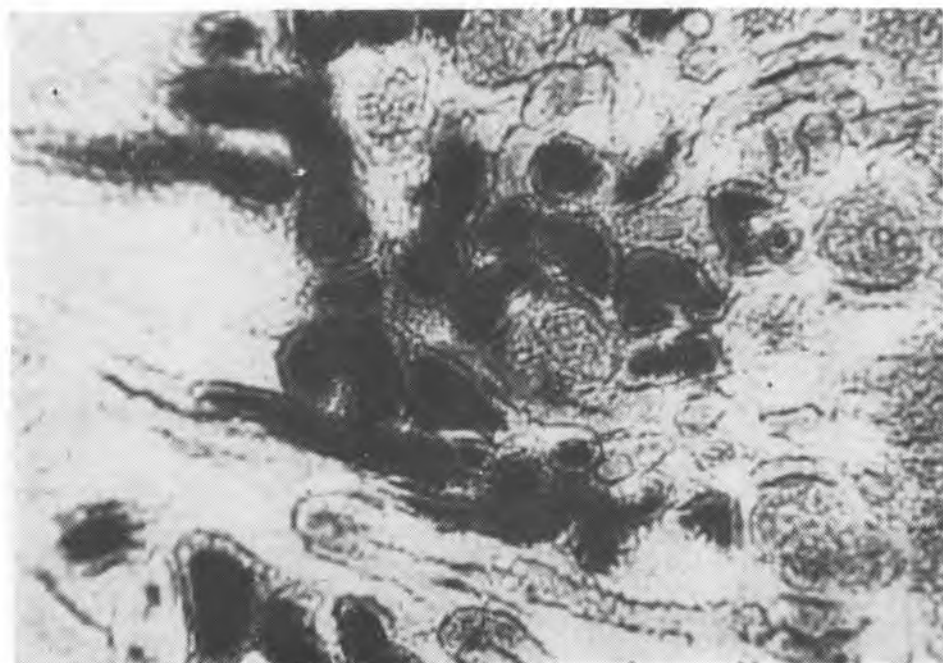
Ryc. 1



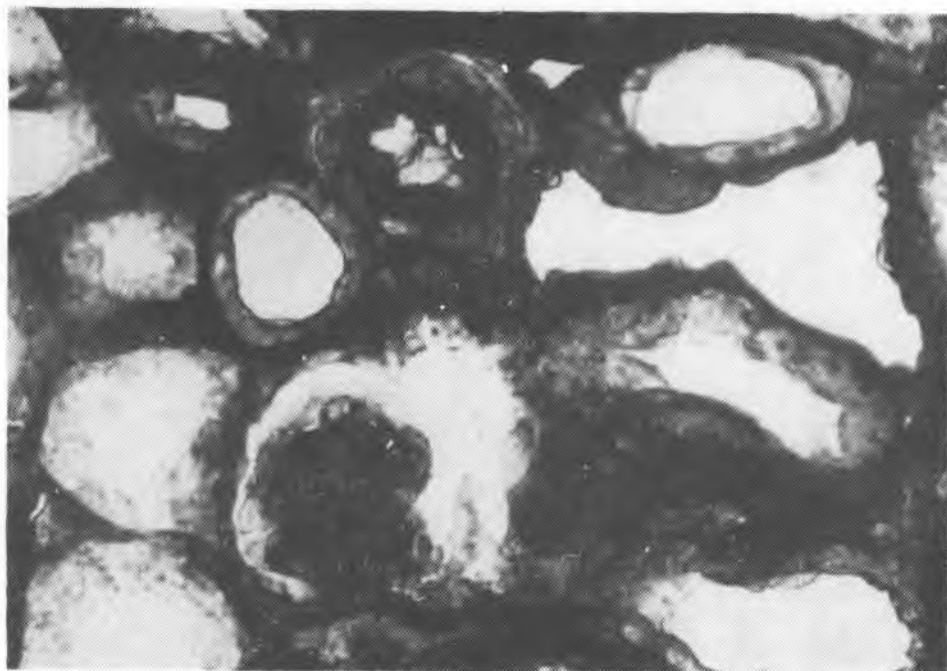
Ryc. 2



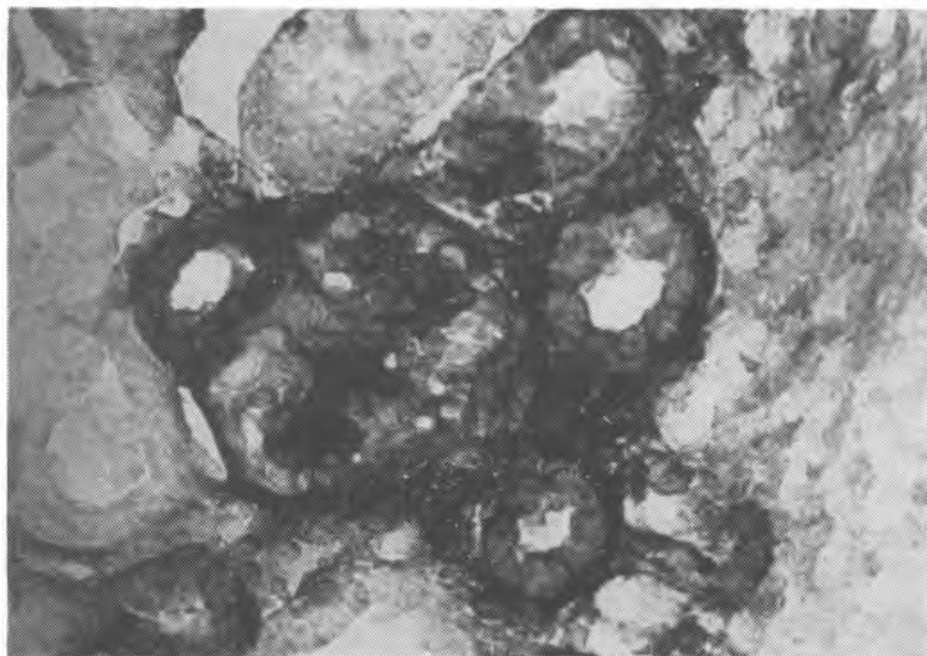
Ryc. 3



Ryc. 4



Ryc. 5



Ryc. 6

przypuszczać, że fosfamidon podany ciężarnym samicom wpływa w pewnym stopniu na zahamowanie procesów rozwojowych tej części nefronu. Widoczne to jest szczególnie po wielokrotnym podaniu fosfamidonu oraz po podaniu jednorazowym w grupach I, II, III, IV i V.

Obserwowane w niniejszych badaniach odchylenia w nasileniu odczynów na obecność fosfatazy zasadowej i adenozyotrójfosfatazy były nieznaczne.

Hiller i wsp. (4) stwierdzili, że fosfataza zasadowa pojawia się w nerkach płodów szczura w chwili rozpoczęcia pracy kanalików, tj. na kilka dni przed urodzeniem. U noworodków występuje ona w rąbku szczoteczkowym kanalików proksymalnych otaczających już dojrzałe ciałka nerkowe, ułożone bliżej części rdzennej.

Nieznaczny wzrost aktywności fosfatazy zasadowej w rąbku szczoteczkowym kanalików proksymalnych obserwowano w obecnych badaniach w grupie noworodków, których matkom podawano fosfamidon wielokrotnie oraz po podaniu dawek pojedynczych w 11. i 12. dniu ciąży. Wzrost odczynu na fosfatazę zasadową można tłumaczyć aktywacją procesu resorpcji glukozy ze światła kanalików proksymalnych. Po zatruciu związkami fosforoorganicznymi i innymi pestycydami dochodzi bowiem do wzrostu poziomu glukozy we krwi zwierząt. Obserwacje takie poczynili M a d e j s k i i J u s z k i e w i c z (5) prowadząc badania na kurach. Stwierdzili oni wzrost poziomu glukozy we krwi kur, przy równoczesnym spadku glikogenu w wątrobie.

W grupach, w których fosfamidon podawano matkom 8., 9. i 10. dnia ciąży, obserwowano nieznaczne osłabienie odczynu na fosfatazę zasadową w porównaniu z grupą kontrolną. Spadek ten może świadczyć o pewnego stopnia zaburzeniu czynności resorpcyjnej, jak i o opóźnieniu procesów rozwojowych tej części nefronów, stwierdzonych w tych grupach badaniami histologicznymi, a powstałych przypuszczalnie pod wpływem działania fosfamidonu.

Adenozyotrójfosfataza należy do fosfataz specyficznych. Brak odczynu na adenozyotrójfosfatazę w rąbku szczoteczkowym kanalików krętych nerki noworodków można tłumaczyć, opierając się na doświadczeniu przeprowadzonym przez B e y t h a i G u t h m a n a (1), którzy badając ontogenezę ATP-azy w nerce królika, stwierdzili zależność ilości tego enzymu od wieku nerki.

Z badań własnych wynika, że aktywność odczynu na adenozyotrójfosfatazę, zależną od jonów Ca^{++} , w nerkach noworodków szczurzych nie uległa dużym odchyleniom. Nieznaczne odchylenie odczynu w ścianach naczyń krwionośnych oraz w błonach komórek kanalikowych — przynależniowych obserwowano w nerkach noworodków, których matkom podawano fosfamidon 9. i 10. dnia ciąży. W tych samych grupach obser-

wowano obniżenie aktywności fosfatazy zasadowej w rąbku szczoteczkowym kanalików proksymalnych. Świadczyć to może o zaburzeniu transportu przez błony komórkowe w tej części kanalików.

Z przeprowadzonych badań wynika, że fosfamidon podawany ciężarnym samicom w okresie organogenezy i na początku fetogenezy w dawkach jednorazowych i wielokrotnych, okazał się preparatem embriotoksycznym. Wyraziło się to zarówno wzrostem resorpcji płodów w grupach doświadczalnych, jak i obserwowanymi zmianami histologicznymi i histochemicznymi w nerkach noworodków. Teratogenne działanie preparatu stwierdzono tylko po podaniu ciężarnym samicom wysokiej dawki pojedynczej 8. dnia ciąży.

Z badań naszych, jak i innych autorów wynika, że zachodzi potrzeba wnikliwej oceny w zakresie embriotoksyczności wszystkich związków chemicznych stosowanych w rolnictwie przed ich wprowadzeniem do masowego użycia.

Wnioski

1. Badania histologiczne wykazały obecność przyćmienia mięszonego kanalików nerkowych. Zwiększona homogenność cytoplazmy oraz obecność wysięku w świetle kanalików proksymalnych nerki świadczą o pewnym zahamowaniu rozwoju tej części nefronu.

2. Badania histochemiczne pozwoliły stwierdzić występowanie odchyleń enzymatycznych w nerkach noworodków szczurzych. Przemawia to za nieznacznym upośledzeniem transportu przez błony komórkowe.

PIŚMIENNICTWO

1. Beyth Y., Guthmann Y.: Ontogenesis of Microsomal ATP-ase in the Rabbit Kidney. *Biochim. Biophys. Acta* **191** (1), 195, 1969.
2. Glukhova L. G.: Morfologichni zmini v organakh potomstva shchurvi pri otruenii samok polikhlorpinenom. *Pediatr. Akush. Ginekol.* **6**, 44, 1977.
3. Goncharewskya D. A., Dloucha H.: The Development of Various Generations of Nephrons during Postnatal Ontogenesis in the Rat. *Anat. Rec.* **3** (182), 367, 1975.
4. Hiller S. i wsp.: Sur la phosphatase alcaline et les polysaccharides dans l'appareil uro-génital au cours du développement du rat. *Compt. Rend. de l'Assoc. des Anatom.* XLVI Réunion Montpellier 1959, s. 355.
5. Madejski Z., Juszkiewicz T.: Wpływ zatrucia ekatinem na niektóre wskaźniki biochemiczne u kur. *Pol. Arch. Wet.* **10** (1), 1, 1966.
6. Nash M. A., Edelmann C. M.: The Developing Kidney. *Nephron.* **11**, 71, 1973.

7. Oliver J.: Nephrons and Kidneys: A Quantitative Study of Developmental and Evolutionary Mammalian Renal Architectonies. Division Hoeber Medical, New York—London 1968, s. 4.
8. Palmer A. K. i wsp.: Effect of Lindane on Prognancy in the Rabbit and Rat. Toxicol. 9 (3), 239, 1978.

Otrzymano 23 XI 1982.

OBJAŚNIENIA RYCIN

Ryc. 1. Zwierzęta doświadczalne. Ogniskowe przyćmienie mięszone kanalików krętych I rzędu nerki noworodka. Barwienie H+E. Pow. 500×.

Ryc. 2. Zwierzęta kontrolne. Odczyn na fosfatazę zasadową w rąbku szczoteczkowym kanalików krętych I rzędu nerki noworodka. Pow. 250×.

Ryc. 3. Zwierzęta doświadczalne. Odczyn na fosfatazę zasadową w rąbku szczoteczkowym kanalików krętych I rzędu nerek noworodków pochodzących z grup doświadczalnych I, II i III. Pow. 500×.

Ryc. 4. Zwierzęta doświadczalne. Odczyn na fosfatazę zasadową w rąbku szczoteczkowym kanalików krętych I rzędu nerek noworodków z grup doświadczalnych IV, V i VII. Pow. 250×.

Ryc. 5. Zwierzęta kontrolne. Odczyn na adenozynotrójfosfatazę w naczyniach okołokanalikowych i w naczyniach kłębka. Pow. 500×.

Ryc. 6. Zwierzęta doświadczalne. Odczyn na adenozynotrójfosfatazę w grupach doświadczalnych II i III widoczny w naczyniach okołokanalikowych i w naczyniach kłębka. Pow. 500×.

РЕЗЮМЕ

Исследовано влияние фосфамидона на эпителий извилистых канальцев первого ряда почек у новорожденных крыс с особенным предумотрением гистологических и гистохимических исследований. Гистохимические исследования проводились в связи с транспортированием энзимов через клеточную оболочку (щелочная фосфатаза и аденозинтрифосфатаза). Гистологические исследования указывают на паренхиматозные притемнения эпителиальных клеток проксимальных канальцев, что свидетельствует о незначительной дегенерации клеток. Увеличение однородности цитоплазмы и наличие эксудата в свете проксимальных канальцев почки указывают на некоторые замедление развития этой части нефрона. Результаты гистохимических исследований указывают на незначительное отклонение интенсивности реакций на активность щелочной фосфатазы и аденозинтрифосфатазы.

SUMMARY

The influence of phosphamidon on the epithelium of proximal tubules of order I in the kidneys of newborn rats was investigated with particular regard to histological and histochemical studies. The enzymes taking part in transportation through cell membrane (AP and ATP-ase) were examined histochemically. In the histological study, parenchymatous dimness of proximal tubules of epithelial cells was dis-

covered, which provides evidence that there were slight degenerative changes going on in the cells. Increased cytoplasm homogeneity and the presence of exudate in the lumen of proximal tubules of the kidney indicated that the development of this part of nephron was stopped to a certain degree. The results of the histochemical studies showed slight deviations in the intensity of reactions to the activity of AP and ATP-ase.

EXPLANATION TO FIGURES

Fig. 1. Experimental animals. Focal parenchymatous dimness of order-I renal convoluted tubules in the newborn rat. Colouring with H+E. Magn. 500X.

Fig. 2. Control animals. Alkaline phosphatase reaction in the brush border of order-I renal convoluted tubules in the newborn rat. Magn. 250X.

Fig. 3. Experimental animals. Alkaline phosphatase reaction in the brush border of order-I convoluted tubules in the kidneys of newborn rats from experimental groups I, II, III. Magn. 500X.

Fig. 4. Experimental animals. Alkaline phosphatase reaction in the brush border of order-I convoluted tubules in the kidneys of newborn rats from experimental groups IV, V and VII. Magn. 250X.

Fig. 5. Control animals. ATP-ase reaction in the periductal vessels and in the vessels of the glomerule. Magn. 500X.

Fig. 6. Experimental animals. ATP-ase reaction in experimental groups II and III seen in the periductal vessels and in the vessels of the glomerule. Magn. 500X.