

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XXXIII, 5

SECTIO D

1978

Zakład Chemii Toksykologicznej. Instytut Analizy i Technologii Farmaceutycznej.
Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: doc. dr hab. Stanisław Szczepaniak

Jerzy OCHYŃSKI

**Ultrastruktura komórek wątrobowych szczura
w ostrym i skróconym przewlekłym zatruciu Bromfenwinfosem**

Ультраструктура клеток печени крысы в остром и сокращённом хроническом
отравлении Бромфенвинфосом

Ultrastructure of Rat Liver Cells in Acute and Shortened Chronic Poisoning with
Bromphenvinphos

Praca jest kontynuacją badań (2, 5, 6, 7) związanych z oceną toksykologiczną nowego polskiego preparatu stonkobójczego Bromfenwinfosu (nazwa kodowa IPO-62). Substancją aktywną tego preparatu jest 2-bromo-1-(2,4-dwuchlorofenylo)winylo-dwuetylofosforan. Ilościowa ocena dystrybucji Bromfenwinfosu w ustroju szczura wykazała, że wątroba jest narządem aktywnie uczestniczącym w przemianach Bromfenwinfosu (7). Na podstawie porównawczych badań histochemicznych stwierdzono, że najbardziej istotne zmiany w odczynach histochemicznych hepatocytów występują w zatruciu jednorazowym ostrą dawką $1/2 DL_{50}$ i skróconym przewlekłym przy stosowaniu dawki $1/5 DL_{50}$ przez okres 3 miesięcy (5). Wydała się zatem celowa ocena zmian ultrastruktury komórek wątroby szczura po uprzedniej, analogicznej jak przy badaniach histochemicznych, ekspozycji na wymieniony związek.

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Badanie ultrastruktury komórek wątroby przeprowadzono na białych szczurach samcach rasy Wistar o c.c. 230—250 g, pochodzących z jednej hodowli wsobnej Łomna-Las, które karmiono dietą laboratoryjną LSM, podając wodę *ad libitum*. Zwierzęta podzielono losowo na 3 grupy po 5 sztuk w każdej: grupa I — kontrolna, grupy II i III — doświadczalne. Bromfenwinfos o zawartości 92% substancji czynnej

otrzymano z Instytutu Przemysłu Organicznego w Warszawie. Ostra toksyczność dożołądkowa w roztworze olejowym, wyrażona jako DL_{50} , dla szczurów samców wynosi 83,7 mg/kg (3). Badany związek w roztworze oliwy podawano zwierzętom do żołądka przy pomocy sondy. W przypadku zatrucia ostrego szczury głodzone 12 godz. Objętość podawanych dawek wynosiła 0,5 cm³/230 g c.c.

Grupa I kontrolna otrzymywała olej z oliwek. Grupa II — zatrucie ostre, otrzymywała jednorazowo dawkę 41 mg/kg, tj. 1/2 DL_{50} . Zwierzęta dekapitowano po ustąpieniu drgawek, tj. po 10 godz. Grupa III — zatrucie 3-miesięczne, otrzymywała codziennie dawkę 16,74 mg/kg, tj. 1/5 DL_{50} , zwierzęta dekapitowano w ostatnim dniu doświadczenia.

Materiał tkankowy przeznaczony do badań w mikroskopie elektronowym utrwalano w temp. 0—4°C w ciągu 2 godz. w buforze kakodylanowym o *pH* 7,2, zawierającym 6% aldehydu glutarowego i następnie dotrwalano w 1% roztworze kwasu osmowego. W ten sposób przygotowany materiał odwadniano metanolem i zatapiano w mieszaninie Eponu 812. Polimeryzowane bloczki krojono na ultramikrotomie Tesla BS 490 i kontrastowano octanem uranylu i cytrynianem ołowiu. Obserwację preparatów i elektronogramy wykonano w mikroskopie elektronowym Tesla BS 616 *.

WYNIKI BADAŃ

Śmiertelność szczurów notowano tylko w przypadku ostrego zatrucia (1/2 DL_{50}). W tej grupie (II) padł w okresie doświadczenia 1 szczur. Pozostałe zwierzęta przeżyły okres doświadczenia w stanie dobrym.

Grupa I kontrolna

Hepatocyty zwierząt z grupy kontrolnej posiadały typową budowę submikroskopową. Jądra komórkowe kształtu okrągłego lub owalnego otoczone były dwublaszkową błoną i posiadały skupienia chromatyny przylegające do wewnętrznej blaszki jądrowej. W większości komórek w obrębie karioplazmy występowały jąderka. Błony komórkowe sąsiadujących komórek miały zwykle przebieg prosty i w niektórych odcinkach ograniczały światło kanalików żółciowych z wnikającymi doń mikrokosmkami (ryc. 1). W komórkach wątrobowych występowały liczne mitochondria o kształtach okrągłych lub owalnych. Macierz ich posiadała umiarkowaną gęstość elektronową. Grzebienie ułożone były poprzecznie w stosunku do długiej osi. Cytoplazmę podstawową wypełniały liczne przekroje błon gładkich i mniej liczne — szorstkich (ryc. 1). Poza tym w cytoplazmie obecne były skupienia ziaren glikogenu i rybosomy (ryc. 1). Komórki wątrobowe zawierały także lizosomy i peroksyzomy (ryc. 1).

* Elektronogramy wykonane zostały w Pracowni Mikroskopii Elektronowej Instytutu Biologiczno-Morfologicznego AM w Lublinie dzięki uprzejmości Pana prof. dr. hab. M. Latańskiego, dr A. Pawłowskiej-Tochman i dr J. Sokółowskiej-Hallip, za co składam Im serdeczne podziękowanie.

Grupa doświadczalna II

Po ostrym zatruciu zwierząt Bromfenwinfossem w dawce $1/2 DL_{50}$ obserwowano zmiany w strukturze i lokalizacji niektórych organelli komórkowych wątroby. Zmiany dotyczyły głównie zaburzeń budowy mitochondriów. Część mitochondriów wykazywała balonowate rozdęcia przy zachowanej otoczce (ryc. 2 i 3), inne posiadały zwiększoną gęstość elektro-nową macierzy i zaburzenia w układzie grzebieni (ryc. 3). Oprócz opisanych wyżej spotykano także mitochondria zbudowane prawidłowo (ryc. 2). Cysterny i kanały gładkiej i szorstkiej siatki śródplazmatycznej były często poszerzone (ryc. 2 i 3). Poszerzeniu ulegała także przestrzeń między blaszkami błony jądrowej (ryc. 3). W hepatocytach tej grupy doświadczalnej częściej niż w grupie kontrolnej spotykano ciała tłuszczowe (ryc. 3). Obserwowano także wzrost ilości struktur lizosomalnych.

Grupa doświadczalna III

Przy dłuższym, 3-miesięcznym podawaniu szczurom Bromfenwinfosu w dawce $1/5 DL_{50}$ mitochondria, podobnie jak i w zatruciu ostrym, wykazywały cechy degeneracji. Część mitochondriów charakteryzowała się niewielkimi obrzmieniami (ryc. 4) i przejaśnieniem substancji rdzennej (ryc. 4 i 5). W cytoplazmie hepatocytów obserwowano równocześnie wyraźny wzrost ilości gładkiej siatki śródplazmatycznej (ryc. 6) oraz znacznej wielkości opustoszenia cytoplazmy, które związane są prawdopodobnie ze zmniejszeniem się ilości glikogenu w komórce (ryc. 5). Ponadto spotykano dość duże nagromadzenie ciał lipidowych (ryc. 5) i lizosomów.

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Przeprowadzone doświadczenia wykazują, że Bromfenwinfos w stosowanych dawkach uszkadza mitochondria. Przejawem tego było zatarcie ultrastruktury mitochondriów, co przemawia za zakłóceniami procesów utleniania i redukcji. Ponieważ opisywane mitochondria posiadały nie-naruszoną błonę zewnętrzną, można uważać, że zmiany tego typu mają charakter odwracalny (4). Nasuwa to przypuszczenie, że krótkotrwała i skrócona przewlekła intoksykacja Bromfenwinfossem wywołuje bądź uszkodzenie, bądź też odwracalne zablokowanie enzymów mitochondrialnych. Obniżenie zawartości glikogenu w komórkach można wiązać z zaburzeniami przemian węglowodanowych, co stwierdzono również w poprzednich badaniach nad wpływem Bromfenwinfosu na niektóre odczyny histochemiczne wątroby i żołądka szczura (5).

W toku oceny ultrastruktury komórek mięszu wątroby stwierdzono poszerzenie cystern i kanałów gładkiej i szorstkiej siatki śródplazmatycznej oraz wyraźny wzrost elementów siateczki endoplazmatycznej gładkiej. Na podstawie uzyskanych wyników można przypuszczać, że Bromfenwinfos w komórce wątrobowej początkowo gromadzi się w siatce śródplazmatycznej, gdzie dochodzi do skontaktowania z oksydazami o mieszanym działaniu, znajdującymi się w warstwach lipidowo-białkowych błon siateczki śródplazmatycznej. Wskazuje to na ścisłą łączność funkcjonalną tych organelli komórkowych z oksydacyjną reakcją O-deetylacji, w wyniku której powstaje mało toksyczny mono-desetylo-bromfenwinfos, główny metabolit Bromfenwinfosu u psa i szczura (7).

Hipoteza ta wymaga jednak dalszych badań o charakterze dynamicznym, co pozwoliłoby określić kolejność zaangażowania poszczególnych organelli komórkowych i ich wzajemną współpracę w trakcie przemian metabolicznych. Nasuwa się również konieczność wykonania badań autoradiograficznych w mikroskopie elektronowym, które w sposób jednoznaczny zlokalizowałyby Bromfenwinfos na poziomie molekularnym.

Przedstawione wyniki są zgodne z patomorfologicznymi badaniami Szczurka (8), wskazującymi, że Bromfenwinfos podany szczurom w paszy w dawce 1920 mg/kg przez okres 4, 8, 13 tygodni wywołuje w komórkach wątrobowych zmiany dotyczące mitochondriów, siateczki śródplazmatycznej i lizosomów. Tego typu zmiany opisał również Beskid i wsp. (1) w toku zatruwania szczurów Malationem.

PIŚMIENNICTWO

1. Beskid M., Kłós H., Suwała Z., Szyszkowska A., Wójcik J.: Roczniki PZH 24, 741—748, 1973.
2. Bronisz H., Ochyński J.: Oznaczenie toksyczności ostrej IPO-62 u psów. Symp. Toksykol. Pol. Tow. Farm. Poznań 1974.
3. Eksperymentalny insektycyd fosforoorganiczny z grupy enolofosforanów. Biuletyn informacyjny Instytutu Przemysłu Organicznego, Warszawa 1972.
4. Obuchowska D., Pawłowska-Tochman A.: Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, Sectio D 28, 63—66, 1973.
5. Ochyński J.: Wpływ Bromfenwinfosu na niektóre odczyny histochemiczne wątroby i żołądka szczura. Roczniki PZH 28, 85—91, 1977.
6. Ochyński J.: Wchłanianie i wydalanie IPO-62 ¹⁴C u szczurów. Symp. Toksykol. Pol. Tow. Farm. Poznań 1974.
7. Ochyński J.: Biotransformacja Bromfenwinfosu u zwierząt wyższych. Symp. Toksykol. Pol. Tow. Farm. Lublin 1976.
8. Szczurek Z.: Badania patomorfologiczne nad toksycznością i patomechanizmem działania IPO-62, nowego insektycydu produkcji krajowej. Streszczenie pracy habilitacyjnej. Med. Pracy 25, 221—224, 1974.

OBJAŚNIENIA RYCIN

Ryc. 1. Grupa kontrolna. Fragment komórki wątrobowej. BC — kanalik żółciowy, ER — siatka śródplazmatyczna szorstka, M — mitochondria, P — peroksysomy, R — rybosomy, Re — siatka śródplazmatyczna gładka. Pow. ok. 42 000×.

Ryc. 2. Grupa doświadczalna. Fragment komórki wątrobowej. ER — siatka śródplazmatyczna szorstka, M — mitochondria, Re — siatka śródplazmatyczna gładka. Pow. ok. 42 000×.

Ryc. 3. Grupa doświadczalna. Fragment komórki wątrobowej. ER — siatka śródplazmatyczna szorstka, M — mitochondria, GL — ziarna glikogenu, L — krople lipidowe, N — jądro komórkowe. Pow. ok. 42 000×.

Ryc. 4. Grupa doświadczalna. Fragment komórki wątrobowej. ER — siatka śródplazmatyczna szorstka, M — mitochondria, N — jądro komórkowe, P — peroksysomy, Re — siatka śródplazmatyczna gładka. Pow. ok. 42 000×.

Ryc. 5. Grupa doświadczalna. Fragment komórki wątrobowej. ER — siatka śródplazmatyczna szorstka, L — krople lipidowe, M — mitochondria, S — opustoszenie cytoplazmy po glikogenie. Pow. ok. 42 500×.

Ryc. 6. Grupa doświadczalna. Fragment komórki wątrobowej. L — krople lipidowe, M — mitochondria, Re — siatka śródplazmatyczna gładka. Pow. ok. 42 500×.

РЕЗЮМЕ

Обеим группам крыс по 5 штук вводилось в желудок металлическим зондом растворы Бромфенвинфоса в масле как однократные дозы $1/2 DL_{50}$ и дозы $1/5 DL_{50}$ в течении 3 месяцев. Изменения морфологии гепатоцитов в течении опытов касались главным образом нарушений структуры митохондрий, расширения каналов гладких и шероховатых цистернов внутрисплазматической сети и иногда наблюдалось увеличение разреза внутрисплазматической сети. Во многих клетках обнаружено значительную убыль цитоплазмы связанную с убытком гликогена. Оценивая представленные исследования в сравнении с результатами предыдущих исследований проведенных гистохимическими методами (5), кажется, что главными клеточными органеллами принимающими участие в преобразовании Бромфенвинфоса являются митохондрия, внутрисплазматическая сеть и лизосомы.

SUMMARY

Two groups of 5 rats each were given oil solutions of Bromphenvinphos in one dose of $1/2 DL_{50}$ and in a dose of $1/5 DL_{50}$ during a period of 3 months into the stomach by a stomach-tube. Changes in morphology of hepatocytes in the course of experiments denoted mainly disturbances in mitochondrial structure, extension of channels and cisterns of smooth and rough endoplasmic reticulum and sometimes an increase in the number of smooth endoplasmic reticulum profiles was observed. In many cells considerable cytoplasmic emptiness connected with a decrease of glicogen was found. The presented experiments in comparison with the previous results obtained from histochemic methods (5) suggest that the main cell organelles taking part in Bromphenvinphos changes are mitochondria, endoplasmic reticulum and lysosomes.

EXPLANATION OF FIGURES

Fig. 1. Control group. Fragment of hepatic cell. BC — bile canaliculus, ER — rough endoplasmic reticulum, M — mitochondria, P — peroxysomes, R — ribosomes, Re — smooth endoplasmic reticulum. Magn. ca 42 000X.

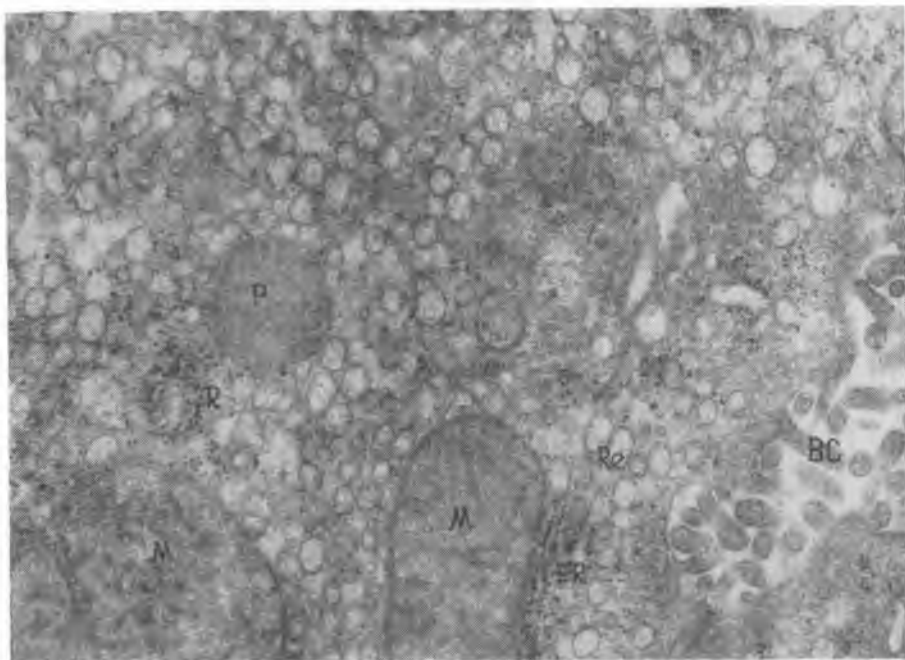
Fig. 2. Experimental group. Fragment of hepatic cell. ER — rough endoplasmic reticulum, M — mitochondria, Re — smooth endoplasmic reticulum. Magn. ca 42 000X.

Fig. 3. Experimental group. Fragment of hepatic cell. ER — rough endoplasmic reticulum, M — mitochondria, GL — glycogen grains, L — lipid drops, N — nucleus. Magn. ca 42 000X.

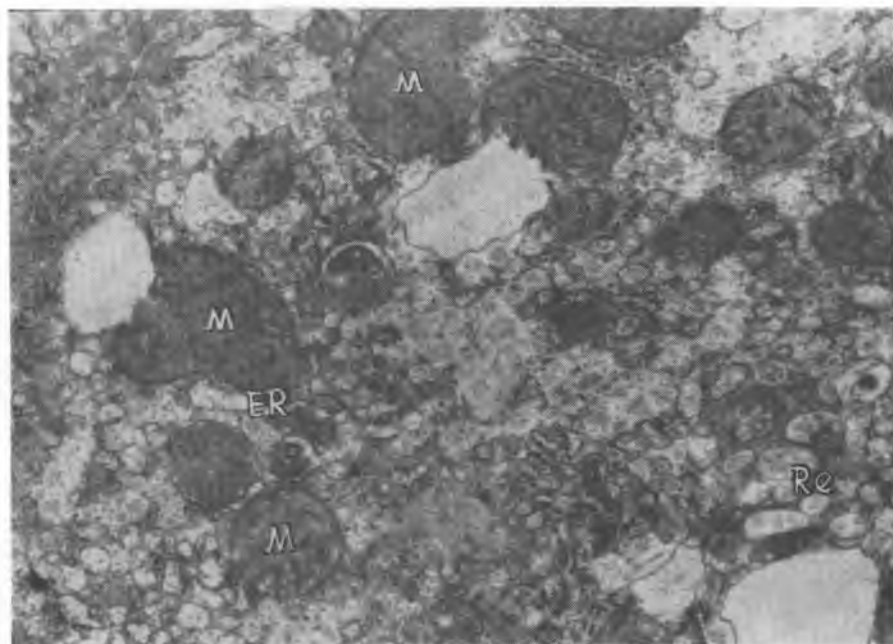
Fig. 4. Experimental group. Fragment of hepatic cell. ER — rough endoplasmic reticulum, M — mitochondria, N — nucleus, P — peroxysomes, Re — smooth endoplasmic reticulum. Magn. ca 42 000X.

Fig. 5. Experimental group. Fragment of hepatic cell. ER — rough endoplasmic reticulum, L — lipid drops, M — mitochondria, S — cytoplasmic emptiness. Magn. ca 42 500X.

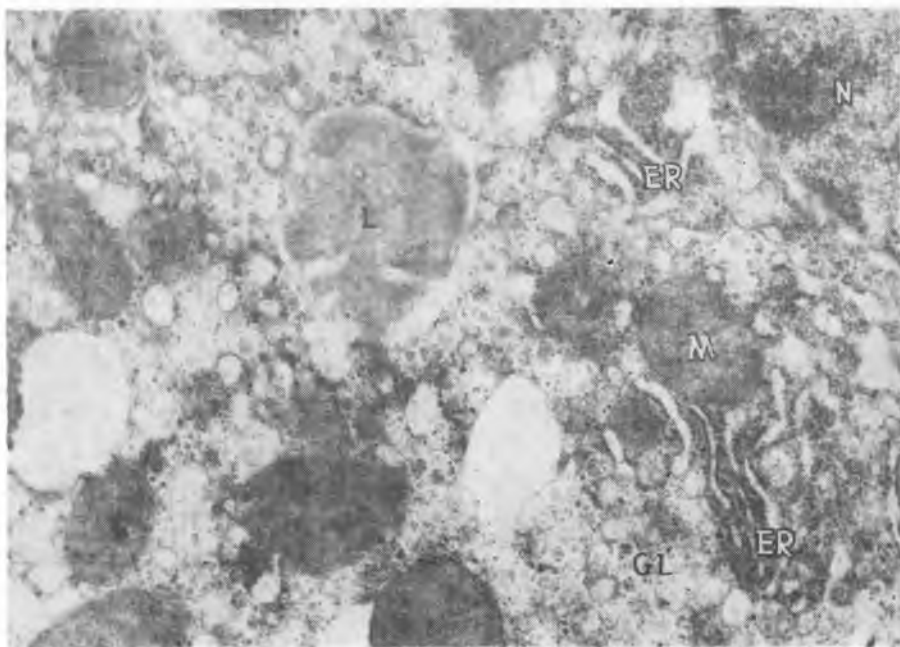
Fig. 6. Experimental group. Fragment of hepatic cell. L — lipid drops, M — mitochondria, Re — smooth endoplasmic reticulum. Magn. ca 42 500X.



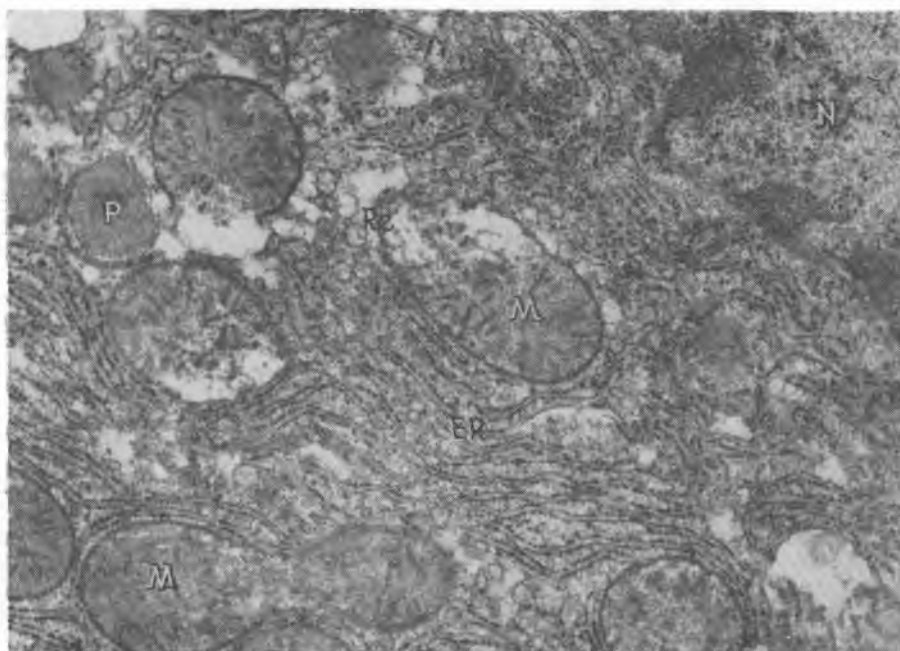
Ryc. 1



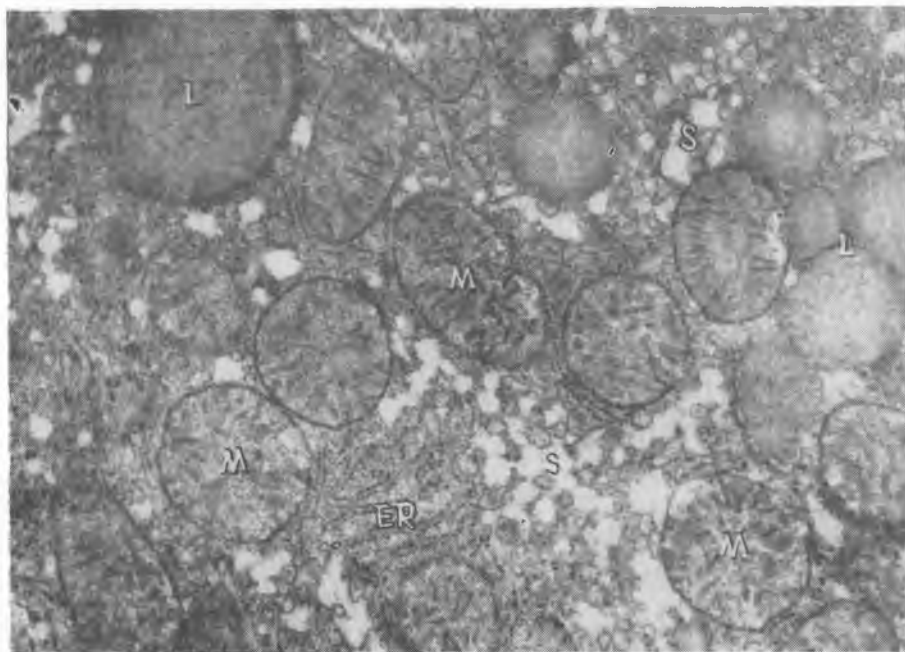
Ryc. 2



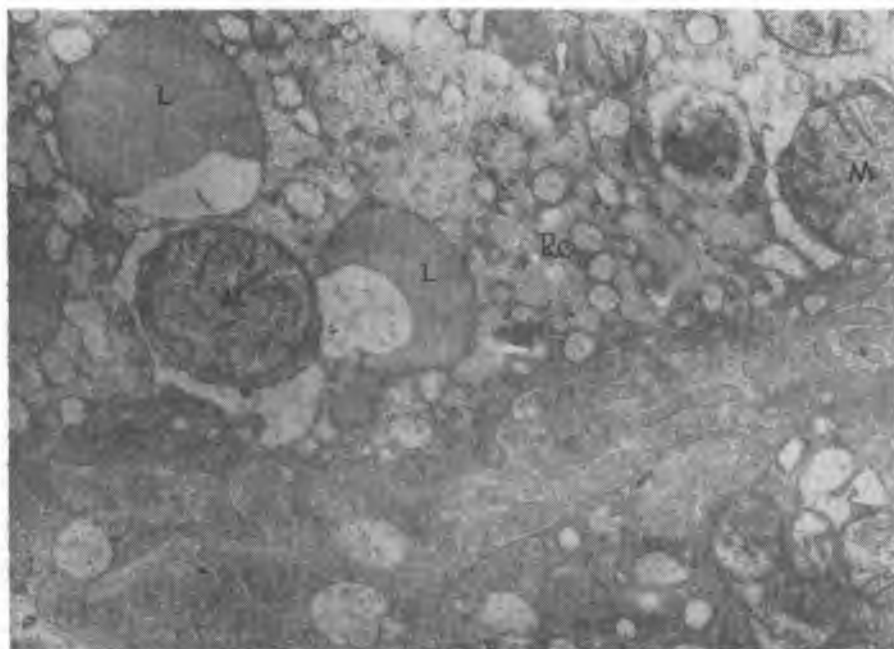
Ryc. 3



Ryc. 4



Ryc. 5



Ryc. 6

