

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XXIII, 14

SECTIO D

1968

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii. Wydział Lekarski. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr med. Stanisław Grzycki
Katedra i III Klinika Chorób Wewnętrznych. Wydział Lekarski.
Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: doc. dr med. Witold Szewczykowski

Ireneusz WOLAŃSKI

**Badania nad wpływem ostrego zatrucia kwasem dwuchlorofenoksy-
octowym (2, 4 D) na niektóre odczyny histochemiczne w komórkach
nefronów nerki szczura**

Влияние острого отравления дихлорфеноксиуксусной кислотой (2, 4 D)
на некоторые гистохимические реакции в клетках нефронов почек у крыс

Studies of the Effect of Acute Toxaemia with Dichlorophenoxyacetic Acid
on some Histochemical Reactions of Nephrons in the Kidney Rat Cells

Stosowanie w rolnictwie środków ochrony roślin, obok niewątpliwych korzyści materialnych, kryje w sobie niebezpieczeństwo zatrucić tymi związkami. Część z nich, o małym i średnim stopniu toksyczności, rzadko daje kliniczne objawy zatrucia, lecz może powodować uszkodzenie narządów wewnętrznych. Pod wpływem zatrucia najczęściej ulegają uszkodzeniu narządy mięsiste. Czułym wskaźnikiem, świadczącym o uszkodzeniu komórek, są zmiany cytochemiczne. Postanowiłem prześledzić w nerkach zachowanie się RNA, fosfatazy kwaśnej, oraz fosfatazy zasadowej pod wpływem ostrego zatrucia kwasem dwuchlorofenoksyoctowym (2,4D), powszechnie stosowanym w rolnictwie, jako środek chwastobójczy (8).

MATERIAŁ I METODYKA

Do badań użyłem szczury białe rasy Wistar, o ciężarze ciała od 150 do 180 g, które zatrulałem podając im zgłębnikiem do żołądka 110 mg preparatu 2.4 D rozpuszczonego w 3 ml wody. Dawka ta była mniejsza od LD₅₀, która u szczura wynosi 660 mg na kg wagi ciała (3, 4). Ogółem zatruto 12 szczurów. 4 zwierzęta przeżyjące w tych samych warunkach i będące na tej samej diecie, stanowiło grupę kontrolną. W 3, 7, 13, 21 dniu po zatruciu, w uspianiu eterowym, skrwawiano po trzy szczury zatrute i jednego z grupy kontrolnej. U wszystkich zabitych zwierząt pobierano do badań nerki. Część wycinków z tych nerek utrwalano w płynie Carnoy, zatapiano w parafinie i po skrojeniu wykonywano preparaty, które po odparafinowaniu barwiono wg metody Bracheta na kwasy rybonukleinowe (1).

Część wycinków po utrwaleniu w zimnym płynie Bakera i skrojeniu w mikrotomie zamrażającym, aktywowano wg metody Gomoriego na kwaśną i zasadową fosfatyzę (2). Opisy otrzymanych mikrofotografii od 1 do 16 w tekście.

BADANIA WŁASNE

Grupa kontrolna. W istocie korowej nerki intensywność wysycenia RNA wykazuje, że ilość tego kwasu w komórkach nabłonka nefronów była jednakowa. Nie stwierdzało się różnicy w stopniu zabarwienia nefronów będących zarówno w strefie podtorebkowej, jak i przyrdzennej. (ryc. 1). Odczyn pyroninochłonny występował również w komórkach ciałek nerkowych. Odnosiło się jednak wrażenie, że nie był on tak intensywny, jak w kanalikach nerkowych. RNA występował w postaci grudek i drobnych ziarenek rozmieszczonych równomiernie w cytoplazmie komórkowej oraz w jąderkach. Jąderka były podobnej wielkości, jednakowo wysyczone i blisko siebie ułożone. Po zadziałaniu krystaliczną rybonukleazą, opisywane ziarnistości w cytoplazmie i jąderkach znikwały, co utwierdzało nas w przekonaniu, że zawierały one kwas rybonukleinowy (7).

Odczyn enzymatyczny na fosfatyzę kwaśną (Fk) wystąpił w komórkach nabłonka kanalików moczowych oraz w cewkach zbiorczych. W rąbku szczoteczkowym cewek krętych I rzędu odczyn na Fk był słabszy niż w pozostałej części nabłonka cewki. Zaznaczył się również odczyn na Fk w komórkach podścieliska łącznotkankowego istoty korowej (ryc. 2) oraz w blaszce podstawowej kanalików. Nie zauważono dodatnich odczynów w blaszkach torebki Bowmana ciałek nerkowych (ryc. 3). Fk w wykazanych strukturach występowała w postaci drobnych ziarenek i pojedynczych grudek. Ziarenka te układały się w strefie Golgiego.

Aktywność fosfatyzę zasadowej (Fz) wykazano zarówno w kanalikach nerkowych przyrdzennych, jak i podtorebkowych. Enzym ten występował w cytoplazmie oraz błonie jądrowej komórek nabłonka kanalików (ryc. 4). W cytoplazmie tworzyła ona drobne ziarenka, które zlewały się w przywierzchołkowych częściach komórek w większe skupiska. Silniejsza reakcja fosfatazo-dodatnia wystąpiła w rąbku szczoteczkowym cewek krętych I rzędu, niż w cytoplazmie.

Grupy doświadczalne. 3 dzień zatrucia. W komórkach nabłonka cewek krętych I rzędu, w polu przyjądrowym, obniżył się dodatni odczyn Bracheta. Również w pętłach Henlego, a szczególnie w części wstępującej zmniejszyła się ilość ziarenek pyroninochłonnych. Jąderka były nierównomiernie wybarwione. Intensywność odczynów na RNA w ciałkach nerkowych była nieco większa niż w kanalikach (ryc. 5). Było to wyraźnie zaznaczone w strefie podtorebkowej.

W kanalikach moczowych pojawił się nierównomierny odczyn na Fk (ryc. 6). W komórkach nabłonka cewek krętych I rzędu wzrosły odczyny fosfatazo-dodatnie a w cewkach II rzędu wystąpił odczyn dyfuzyjny. W komórkach nabłonka cewek krętych I rzędu było więcej lizosomów niż w grupie kontrolnej. Były one zlokalizowane w strefie Golgiego. Zauważono również, że aktywność nefronów przyrdzennych była słabsza niż podtorebkowych, czego nie obserwowano w grupie kontrolnej.

W rąbku szczoteczkowym cewek krętych I rzędu obserwowano się zmniejszenie intensywności odczynów na Fz. Również i w pozostałych odcinkach części głównej kanalika moczowego odczyn na Fz w cytoplazmie nabłonka były mniejsze (ryc. 7). Podobnie jak w materiale kontrolnym nie wykazano tego enzymu w kłębkach naczyniowych i cewkach zbiorczych.

7 dzień zatrucia. Cytoplazma i jąderka we wszystkich częściach nefronu wykazywały obniżenie stężenia kwasu rybonukleinowego (ryc. 8), jąderka natomiast — zmiany położenia i wielkości nawet w sąsiednich komórkach. Nie obserwowano się różnic intensywności wybarwienia RNA w cytoplazmie w zależności od jego położenia. Dolne nefrony dawały podobne odczyny, jak i podtorebkowe. Błony podstawowe kanalików nerkowych w niektórych nefronach nie wykazywały podobnej grubości.

W części głównej kanalików nerkowych wzrosła ilość dużych grudek aktywnych na fosfatazę kwaśną (ryc. 9). W kłębkach naczyniowych i pętłach Henlego wystąpił odczyn dyfuzyjny. Pojawiły się również delikatne odczyny w blaszkach torebki Bowmana, których nie obserwowano w materiale kontrolnym. Większe odczyny były również w pościelisku łącznotkankowym.

W cewkach krętych I rzędu uległy dalszemu obniżeniu odczynu histochemiczne na Fz. Obniżenie to dotyczyło przede wszystkim rąbka szczoteczkowego (10). W cewkach krętych II rzędu zmniejszyła się również ilość ziarenek aktywnych na Fz. Dotyczyło to przeważnie większych ziarenek.

13 dzień zatrucia. Budowa strukturalna kanalików moczowych oraz ciałek nerkowych uległa jakby zatarciu. Ilość RNA uległa dalszemu obniżeniu. Odczyn barwny na kwas RN wystąpił w formie drobnych ziarenek, jak i dyfuzyjnego zabarwienia całej cytoplazmy (ryc. 11).

Reakcje enzymatyczne na Fk wykazywały dalszy wzrost. Fz była głównie rozmieszczona w ziarnistościach komórek, odpowiadających lizosomom. W rąbku szczoteczkowym nie było wzrostu aktywności na Fk. Można było w epicytach kłębków Malpighiego zauważyć wystąpienie reakcji dodatnich na Fk (ryc. 12). Również w cewkach zbiorczych wzrosły odczyny na ten enzym. W kłębkach naczyniowych wystąpił delikatny odczyn na Fz, którego w poprzednich grupach nie obserwowano (ryc. 13).

Wyraźna aktywność na Fz zaznaczyła się w blaszce trzewnej i ściennej torebki Bowmana. Odczyn na Fz w cewkach krętych I rzędu nie różnił się od odczynu z 7 dnia po zatruciu. Wyraźny natomiast odczyn wystąpił w elementach komórkowych tkanki podścieliskowej. Tkanki tej było jak gdyby więcej w porównaniu z materiałem kontrolnym.

21 dzień zatrucia. Otrzymane preparaty wskazywały na wzrost intensywności odczynu pyroninochłonnego tak w cytoplazmie, jak i jąderkach (ryc. 14). Pobudzenie odczynów nie było jednakowo silne we wszystkich odcinkach kanalików moczowych. Można sądzić, że w nieuszkodzonych nefronach zapas RNA wzrósł do wartości obserwowanych w grupie kontrolnej.

Intensywność dodatnich odczynów na Fk w kanalikach nerkowych była nierównomierna (ryc. 15). Spotykało się preparaty przypominające grupę kontrolną, ale były również cewki kręte I rzędu o wzmoczonej i obniżonej aktywności na Fk. Również w elementach komórkowych podścieliska łącznotkankowego aktywność na Fk była silniejsza niż w grupie kontrolnej. W kanalikach głównych podtorebkowej i środkowej części kory nerkowej wystąpiły silne odczyny na Fz. Stopień ich aktywności przypominał materiał kontrolny (ryc. 16). Ponadto utrzymywały się tutaj jeszcze dodatnie odczyny w kłębkach naczyniowych i torebce Bowmana. Również błona podstawowa kanalików moczowych dawała dość silne odczyny na Fz. Aktywność i rozmieszczenie Fz w strefie błony jądrowej i cytoplazmie była jak w grupie kontrolnej, w rąbku szczoteczkowym dawała ona natomiast silniejsze odczyny.

WYNIKI BADAŃ I WNIOSKI

Brachet (1) i inni stwierdzili, że nerki są ubogie w RNA, który w jąderku związany jest z histonami a w cytoplazmie z kwaśnymi proteinami. Sądzi się, że w związku z tym istnieje zależność między ilością RNA w cytoplazmie, a syntezą białek w komórce (6). Obserwowane obniżenie stężenia kwasu rybonukleinowego pod wpływem zatrucia może wskazywać na zaburzenia syntezy białek. Pod wpływem 2,4 D nastąpiła zmiana aktywności Fk w nefronach oraz pozostałych elementach strukturalnych nerki. Świadczą one o zmianie metabolizmu komórkowego, który prowadzi do wystąpienia wyraźnie zaznaczonych zmian morfologicznych w 13 dniu po zatruciu. W pierwszych dniach po zatruciu zmniejszyła się aktywność Fz w części głównej kanalików nerkowych oraz rąbku szczoteczkowym cewek krętych I rzędu. Wahania aktywności Fz obserwowano nie tylko w szczególnie czynnych fizjologicznie odcinkach nefronu, ale również w pętłach Henlego, cewkach zbiorczych i kłębkach naczyniowych. Zmiany aktywności fermentu związanego z aktywnym

transportem przez błony fizjologiczne w wyniku zatrucia mogą być spowodowane działaniem 2,4 D na elementy białkowe Fz. Mechanizm tych zmian mógł polegać na blokowaniu grup karboksylowych lub aminowych (5). Obserwowane w naszym doświadczeniu zmiany aktywności Fz w nefronach mogą przemawiać za zaburzeniami gospodarki węglowodanowej pod wpływem zatrucia (9). Zauważone zmiany Fz już w pierwszych dniach po zatruciu mogą przemawiać za zmianą rytmu pracy nerek.

PISMIENICTWO

1. Brachet J.: Le role biologique des acides nucleiques. Bruxelles 1959.
2. Gomori G.: Histochem. Cytochem. 3, 478—484. 1955.
3. Handbook of Toxicology. U. S. of America. 1, 84—85, 1956.
4. Hill E. C.: Journ. Ind. Hyg. Toxicology, 29, 85—95, 1947.
5. Kośmider S., Jonek J., Gajos S.: Pol. Przegl. Radiol. i Med. Nuklear. 29, 215—225, 1965.
6. Kruszyński J.: Fol. Morph. 25, 113—123, 1965.
7. Krygier A., Bielańska-Osuchowska Z.: Skrypt metod histochemicznych. W-wa 1963.
8. Rusiecki W.: Toksykologia środków ochrony roślin. W-wa 1966.
9. Wachstein M.: Journ. Exp. Med. 84, 25—36. 1946.

Otrzymano 21 V 1968.

РЕЗЮМЕ

Исследовались изменения, которые наблюдались в некоторых гистохимических реакциях, происходящих в клетках нефронов почек крыс на 3, 7, 13 и 21 дни после отравления дихлорфеноксиуксусной кислотой (2, 4 D). Проведены реакции на кислую и щелочную фосфатазы, а также на нуклеиновые кислоты. Полученные гистохимические картины свидетельствуют о действии 2, 4 D на метаболизм клеток эпителия нефронов почек у крыс.

SUMMARY

The author studied variations of some histochemical reactions in the cells of the nephron of the rat kidney on the 3rd, 7th, 13th, and 21st day of poisoning with dichlorophenoxyacetic acid (2,4 D). Reactions to acid and alkaline phosphatase and nucleic acids were performed. The obtained histochemical pictures testify to the activity of 2,4 D on the metabolism of epithelial cells of the nephrons of the rat kidney. Explanation of figures in the text.







