

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XXIX, 34

SECTIO D

1974

Institut Medycyny Pracy i Higieny Wsi w Lublinie
Dyrektor: prof. dr hab. n. med. Wiesław Hołobut
Zakład Histologii i Embriologii. Instytut Biologiczno-Morfologiczny. Akademia Medyczna
w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Stanisław Grzycki

Zofia STANKIEWICZ, Krystyna CZERNY

**Ciężar ciała oraz histochemiczny obraz niektórych narządów mięsistych
szczurów żywionych roślinami z rejonów zanieczyszczonych
związkami azotu**

Вес тела и гистохимическая картина некоторых паренхиматозных органов крыс,
которые питались растениями, выращенными в районе, загрязненном азотными
соединениями

Body Weight and Histochemical Picture of some Parenchymatous Organs
of Rats Fed with Plants from Areas Contaminated by Nitrogen Compounds

Dotychczasowe badania wpływu przemysłowych zanieczyszczeń środowiska związkami azotu mineralnego, dotyczyły głównie zmian składu chemicznego roślin uprawianych w rejonie zakładów azotowych, pojawiania się w nich nadmiernej ilości azotanów, oraz strawności i przyswajalności białek roślin uprawianych w różnej odległości od głównych źródeł zanieczyszczenia atmosfery i gleby związkami azotu mineralnego głównie tlenkami azotu, amoniakiem (5, 6, 7, 8, 9). W dalszym etapie prac zmierzających do wyjaśnienia zmian biologicznych właściwości odżywczych roślin uprawianych w rejonach przemysłowych zanieczyszczeń środowiska związkami azotu mineralnego podjęto badania, których celem było określenie wpływu podawania zwierzętom diet zawierających rośliny z upraw o różnym stopniu zanieczyszczeń na ciężar ciała oraz histochemiczny obraz tkanek wątroby i tarczycy zwierząt doświadczalnych.

MATERIAŁ I METODY

Rośliny: zielonki owsa i kapustę pastewną, pobierano z doświadczalnych upraw polowych zlokalizowanych w odległości około 300 m od wytwórni saletry amonowej i z pól kontrolnych oddalonych od zakładu przemysłowego o około 6 km. Szczegóły dotyczące warunków upraw, pielęgnacji i zbioru, opisane zostały w pracach Siuty i współpr. (4). Doświadczenia biologiczne przeprowadzono na 96 szczurach szczepu

Tab. 1. Skład diet
The composition of

Rodzaje diet	Symbol diety	Zawartość		
		Produkt badany	rejon upraw	
Diety zawierające równe ilości produktów	Ow. A I	Owies	Azoty	35,0
	Ow. K I		Kontrola	35,0
Diety zawierające równe ilości białek badanych roślin	Kap. A II	Kapusta	Azoty	25,0
	Kap. K II		Kontrola	25,0
Diety wzbogacane kazeiną i glutenem	Kap. A III	Kapusta	Azoty	20,0
	Kap. K III		Kontrola	40,0

Wistar w wieku 30 ± 2 dni o średnim początkowym ciężarze ciała około 60 g. Sposób doboru i karmienia zwierząt był zgodny z metodyką zalecaną przez Millera i Bendera (1, 2). Zwierzęta przez okres 90 dni karmiono *ad libitum* dietami, których skład ilustruje tab. 1. Diety przygotowano wg schematu diety bezbiałkowej Millera i Bendera wprowadzając na miejsce skrobi pszennej, susze zielonki owsa lub kapusty w ilościach zależnych od celu założonego w doświadczeniach. Skład diet doświadczalnych ilustruje tab. 1.

W doświadczeniu pierwszym zwierzęta otrzymywały dietę I (symbole diet Ow. A I, Ow. K I) zawierające jednakowe ilości suszów zielonki owsa oraz z upraw doświadczalnych i kontrolnych.

W doświadczeniu drugim zwierzęta otrzymywały dietę II (symbole diet K. A II i K.K. II). Zawierała ona również dodatek jednakowych ilości suszu kapusty z obu porównywanych rejonów upraw. Podawanie zwierzętom tych diet powodowało znaczne różnice zawartości białka w pożywieniu zwierząt grupy doświadczalnej i kontrolnej, co było spowodowane blisko dwukrotnie wyższą zawartością azotu ogólnego i białka ($N \times 6,25$) w produktach z rejonu zakładów azotowych. Diety te były jednak dobrym modelem dla określenia zmian biologicznej wartości odżywczej roślin z pól doświadczalnych i kontrolnych.

W doświadczeniu trzecim podano zwierzętom diety zawierające optymalną ilość białka dla szczurów (około 28 g% BD) symbole diet K.A. III i K.K. III, wzbogacono ją dodatkiem jednakowej ilości kazeiny i glutenu. Podczas doświadczenia zwierzęta przetrzymywane były w jednakowych warunkach i otrzymywały badane diety i wodę *ad libitum*. Kontrolę ciężaru ciała zwierząt przeprowadzano początkowo co dwa dni, a po 14 dniach obserwacji co 7 dni oznaczając przy tym spożycie diety.

Po zakończeniu doświadczeń zwierzęta usypiano. Część materiału przekazano do badań składu chemicznego ciała. Od szczurów wybranych z każdej grupy doświadczalnej drogą losową pobrano do badań histochemicznych tkanki wątroby i tarczycy. Jedną część tkanki wątroby utrwalano w płynie B a k e r a (10). Na preparatach ciętych na mikrotomie mrożeniowym wykonano odczyny na aktywność enzymów: fosfatazy kwaśnej metodą wg Gomoriego oraz pirofosfatazy tiaminowej wg Nowikoff i Goldfischer (3). Badano również tłuszcze, barwiąc preparaty błękitem Nilu. Drugą część tkanki odwadniano i zamykano w parafinie. Skrawki bar-

doświadczalnych
experimental diets

składników w %%

kazeina	gluten	skrobia pszenna	sacharoza	smalec	Mieszanki	
					wit.	min.
—	—	25,0	15,0	15,0	5,0	5,0
—	—	25,0	15,0	15,0	5,0	5,0
—	—	35,0	15,0	15,0	5,0	5,0
—	—	35,0	15,0	15,0	5,0	5,0
3,0	20,0	20,0	15,0	15,0	5,0	2,0
3,0	20,0	—	15,0	15,0	5,0	2,0

wiono hematoksyliną i eozyną oraz wykonywano reakcje histochemiczne na cukrowce: odczyn PAS na mukopolisacharydy obojętne i barwienie błękitem alcajanowym, wykazujące obecność mukopolisacharydów kwaśnych. Inne wycinki wątroby utrwalano w mieszaninie bezwodnej wg Gendre, zamykano w parafinie i na preparatach wykazywano obecność glikogenu, stosując przy tym amoniakalny roztwór karminu Besta. Preparaty kontrolne trawiono diastazą krystaliczną. Wycinki tarczycy, utrwalane wg Bakera, odwadniano i zamykano w parafinie. Preparaty barwiono hematoksyliną i eozyną oraz wykonywano reakcje histochemiczne na mukopolisacharydy obojętne i kwaśne metodami stosowanymi w badaniach wątroby.

WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE

Spożycie i wydajność wzrostowa diety I zawierającej dodatek równych ilości suszów zielonki owsa z upraw doświadczalnych i kontrolnych ilustruje tab. 2. Zestawione w tabeli wyniki wskazują, że żywiąc zwierzęta dietą z dodatkiem 95% zielonki owsa z rejonu doświadczalnego Azoty, uzyskiwano wyższe przyrosty ciężaru ciała szczurów (0,70 g na szczura na dobę w porównaniu z kontrolą: 0,25 g na szczura na dobę). Dla uzyskania 1 g przyrostu rzeczywistego ciężaru ciała należało podać zwierzętom karmionym dietą zawierającą owies z rejonu doświadczalnego Azoty blisko trzykrotnie niższą ilość diety. W świetle tych wyników stwierdzić można, że dodatek zielonki owsa z rejonu Azoty pozwala na osiągnięcie wyższych przyrostów ciężaru ciała badanych zwierząt w porównaniu do przyrostów zwierząt grup kontrolnych.

Z uprzednio prowadzonych badań składu chemicznego roślin wynika, że kapusta uprawiana w rejonie przemysłowym zawierała znacznie wyższą zawartość azotu ogólnego, blisko trzykrotnie wyższą zawartość azotów, przy niższej zawartości błonnika i popiołu w porównaniu do roślin z upraw kontrolnych. W tab. 2 przedstawiono spożycie oraz przyrosty

Tab. 2. Średnie spożycie, wydajność wzrostową oraz przyrosty ciężaru ciała (pozorny i rzeczywisty) zwierząt żywionych dietami zawierającymi dodatek równych ilości badanych suszów zielonki owsa i kapusty
Average uptake, growth yields and body weight gains (apparent and real) in the animals fed diets containing equal amounts of the dried green mass of oats and cabbage

	Zielonka owsa z upraw		Kapusta z upraw	
	Azoty	Kontrola	Azoty	Kontrola
Spożycie diety wg szczura na dobę	3,1	3,2	3,02	2,87
Przyrost ciężaru ciała w g/sz/dobę				
pozorny	-0,25	-0,55	—	—
rzeczywisty	-0,70	-0,21	0,48	0,43
Spożycie diety na 1 g przyrostu rzeczywistego	4,43	12,80	6,68	6,80
Stosunek przyrostu rzeczywistego do ilości spożytego białka NPR	2,68	1,31	1,6	2,1

ciężaru ciała zwierząt żywionych dietami zawierającymi 25% dodatek suszów kapusty z obu porównywanych upraw. Pomimo blisko dwukrotnie wyższej zawartości białka w diecie z dodatkiem suszów kapusty z upraw doświadczalnych, rzeczywiste przyrosty ciężaru ciała zwierząt karmionych tą dietą, nie były wyższe w porównaniu do przyrostów zwierząt kontrolnych.

W doświadczeniu III, w którym zastosowano diety zawierające optymalną dla szczurów zawartość białka, uzyskiwano zbliżone przyrosty ciężaru ciała obu porównywanych grup zwierząt (tab. 3).

Badania histochemiczne tkanek wątroby szczurów karmionych dietą zawierającą 35% zielonki owsa z rejonu Azoty wykazywały żywą aktyw-

Tab. 3. Porównanie średnich przyrostów ciężaru ciała oraz ilości spożytej diety i białka w doświadczeniu III prowadzonym w stanie wzrostu (28 g% BD)
A comparison between the average gains in body weights and the uptake of diets and protein in experiment III during growth (28 g% BD)

	Kapusta z upraw	
	Azoty	Kontrola
Ilość spożytej diety w g/szczura/dobę	8,5	8,4
Przyrost ciężaru ciała w g/szczura/dobę	2,78	2,69
Stosunek przyrostu pozornego do ilości spożytego białka (PER)	1,23	1,26

ność fosfatazy kwaśnej i pirofosfatazy tiaminowej (ryc. 1). W centralnej części zrazików występowało dużo mukopolisacharydów obojętnych oraz glikogenu. W badanych preparatach nie stwierdzono stłuszczenia wątroby. Wygląd pęcherzyków oraz intensywność odczynów histochemicznych tarczycy zwierząt nie różniły się od występujących u zwierząt zdrowych hodowanych w warunkach doświadczalnych. W przypadku karmienia zwierząt dietami zawierającymi susze zielonki owsa z rejonu Azoty, nie stwierdzono niekorzystnych zmian zarówno w badaniach tkanki wątrobowej, jak i gruczołu tarczycowego. Silniejsza w porównaniu do kontroli aktywność badanych enzymów, zdolność wątroby do gromadzenia glikogenu, fakt że w preparatach nie stwierdzano występowania stłuszczenia komórek, przemawiać mogą nawet za dodatnim wpływem produktu uzyskiwanego z pól doświadczalnych w rejonie Azoty.

Wyniki badania wątroby szczurów karmionych dietami zawierającymi dodatek jednakowych ilości kapusty z obu porównywanych rejonów wskazują, że budowa zrazików wątrobowych szczurów karmionych produktem z rejonu Azoty była zatarta, a przestrzenie okołonaczyniowe szerokie. Obserwowano słabą aktywność fosfatazy kwaśnej (ryc. 2) oraz stłuszczenie hepacytów we wszystkich strefach zrazików. Należy przy tym podkreślić, że w preparatach przygotowanych z tkanek wątroby zwierząt z grup kontrolnych również czasami spotykano dezintegrację beleczek wątrobowych, poszerzenie przestrzeni okołonaczyniowych. Odczyn na fosfatę kwaśną był na ogół dyfuzyjny, słaby był również odczyn na aktywność TPP-azy, wątroba była często stłuszczona. Badania wątroby szczurów karmionych dietą wzrostową z dodatkiem kapusty z rejonu Azoty wykazały żywą aktywność enzymów, silne odczyny na mukopolisacharydy (ryc. 3) i glikogen. Nie obserwowano również stłuszczenia. Preparaty przygotowane z tkanek zwierząt grup kontrolnych nie różniły się od preparatów tkanek zwierząt żywionych dietą fizjologiczną.

Badania tarczycy szczurów karmionych równą ilością kapusty z rejonu Azoty wykazały spłaszczenie komórek nabłonka gruczołowego i obfity koloid. W tarczycy obu grup zwierząt spotykano słabo aktywne pęcherzyki z niskim nabłonkiem wydzielniczym i obfitym koloidem wewnątrz pęcherzyków (ryc. 4). W tkankach szczurów karmionych dietą wzrostową nabłonek pęcherzyków był często płaski. Wewnątrz pęcherzyków stwierdzano obfity koloid oraz duże nagromadzenie tkanki łącznej między pęcherzykami gruczołowymi.

Podawanie zwierzętom diet zawierających dodatek kapusty Azoty powoduje, że nie wpływają one dodatnio (jak to miało miejsce w przypadku zielonki owsa) na obraz tkanki wątrobowej. Odczyny dyfuzyjne na aktywność fosfatazy kwaśnej wskazywać mogą nawet na uszkodzenia

narządu. Podkreślić należy równocześnie, że zmiany w narządach obserwowano również w grupie zwierząt żywionych dietami zawierającymi kapustę uprawianą w rejonie kontrolnym. Uzyskane wyniki badań histochemicznych tkanek wątroby i tarczycy zwierząt karmionych dietami zawierającymi dodatek różnych ilości kapusty przemawiają za ujemnym wpływem dodatku kapusty na obraz badanych narządów. Ostateczne wnioski można będzie wysunąć po obserwacjach długotrwałych i wielopokoleniowych.

WNIOSKI

Na podstawie uzyskanych wyników należy przyjąć, że: 1) podawanie zwierzętom diet zawierających susze zielonki owsa z upraw w rejonie przemysłowych zanieczyszczeń związkami azotu nie powodowało w badanych cechach zmian wskazujących na ujemne skutki skarmiania, 2) żywienie zwierząt przez okres 90 dni dietami zawierającymi 25% dodatek kapusty powodowało występowanie zmian przemawiających za ujemnym wpływem na wzrost zwierząt oraz histochemiczny obraz badanych narządów.

Nadmiar azotu pozabiałkowego w roślinach uprawianych w rejonie przemysłowych zanieczyszczeń, może ograniczać wykorzystanie niektórych gatunków roślin do bezpośredniego zastosowania ich w żywieniu.

PIŚMIENNICTWO

1. Bender R. E., Doell A. B.: *Brit. J. Nutr.* 11, 140—149, 1957.
2. Miller O. S., Bender R. E.: *Brit. J. Nutr.* 9, 382—331, 1955.
3. Novikoff A. B., Goldfischer S.: *Proc. nat. Acad. Anat. Sci. Wasch* 47, 802, 1961.
4. Pearse A. G. E.: *Histochemistry*. Churchill Ltd, London 1961.
5. Siuta i współpr.: *Ochrona i rekultywacja użytków rolnych — sprawozdanie z badań cz. I. Puławy IUNG, Puławy 1972.*
6. Siuta i współpr.: *Zanieczyszczenie atmosfery oraz rekultywacja gruntów zdewastowanych w rejonie Puław, IUNG, Puławy 1973.*
7. Stankiewicz Z., Majewska B., Siuta J., Szponar L.: *Bromat. i Chem. Toksykol.* 6, 49—53, 1973.
8. Stankiewicz Z., Szponar L., Jastrzębska J.: *praca w druku (red. „Nowe Rolnictwo”)*.
9. Stankiewicz Z., Jastrzębska J., Majewska B.: *Roczn. PZH.* 24, 215—220, 1973.
10. Zawistowski S.: *Technika histologiczna. Histologia oraz podstawy histopatologii*, PZWL, Warszawa 1970.

OBJAŚNIENIE RYCIN

Ryc. 1. Wątroba szczura żywionego zielonką owsa z rejonu zanieczyszczonego. Dieta I. Intensywny odczyn histochemiczny na aktywność TPP-azy. Pow. 1200 X.

Ryc. 2. Wątroba szczura żywionego kapustą z rejonu zanieczyszczonego. Dieta II. Widoczny dość słaby odczyn na aktywność fosfatazy kwaśnej. Pow. 1200 X.

Ryc. 3. Wątroba szczura żywionego kapustą z rejonu zanieczyszczonego oraz kazeiną. Dieta wzrostowa III. Intensywny odczyn histochemiczny PAS na mukopolisacharydy obojętne. Pow. 1200 X.

Ryc. 4. Tarczycza szczura żywionego kapustą z rejonu zanieczyszczonego. Dieta III. Preparat przeglądowy barwiony hematoksyliną i eozyną. Nabłonek gruczołowy płaski, w pęcherzykach obfity koloid. Pow. 1200 X.

РЕЗЮМЕ

Исследовалось влияние растений (входящих в состав кормов), выращенных в загрязненных соединениями минерального азота районах, на вес тела и гистохимическую картину печеночной ткани и щитовидной железы. Подопытные животные на протяжении 90 дней получали диетическое питание, состоящее из сухого зеленого овса сорта „Przebój” и капусты сорта „Пулавская зеленая”. 35%-ое добавление к диете сухого зеленого овса, выращенного в районе азотного предприятия, не повлияло на появление у подопытных животных изменений в печеночной ткани и в щитовидной железе. Диета, содержащая 25% капусты, вызывала понижение веса тела, а также вызывала гистохимические изменения в исследуемых тканях, свидетельствующие об отрицательном влиянии этих диет на организм.

SUMMARY

Examinations were carried out on 96 rats of the Wistar strain at the age of 30 ± 2 days. The object of the examinations was to learn the effect of crops from industrial areas contaminated with compounds of mineral nitrogen on body weight and histochemical picture of liver and thyroid tissues. For a period of 90 days the animals were fed diets containing dried green mass of oats of the variety „Przebój” and cabbages of the variety „Puławska zielona”. Diets containing dried green mass of oats (35%) from crops grown in the areas contaminated by a factory of nitrogen showed no changes in the liver and thyroid tissues of the rats. Diets containing cabbages (25%) caused a decrease in body weight and histochemical changes in the examined tissues pointing to a negative effect of the diets on the animal body.

EXPLANATION TO FIGURES

Fig. 1. Liver of a rat with dried green mass of oats from a contaminated area. Diet I. Intense histochemical reaction to TPP-ase. Magn. 1200 X.

Fig. 2. Liver of a rat fed with cabbage from a contaminated area. Diet II. Weak reaction to acid phosphatase activity. Magn. 1200 X.

Fig. 3. Liver of a rat fed with cabbage from an area contaminated with casein. Growth diet III. Intense histochemical PAS reaction to neutral mucopolysaccharides. Magn. 1200 X.

Fig. 4. Thyroid gland of a rat fed with cabbage from a contaminated area. Diet III. Preparation dyed with haematoxylin and eosin. Flak epithelium of the glands. Abundant colloid in the follicles. Magn. 1200 X.



