

Zakład Histologii i Embriologii. Instytut Biologiczno-Morfologiczny.  
Pracownia Cytologii Doświadczalnej. Akademia Medyczna w Lublinie  
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Stanisław Grzycki

Józef STASZYC

**Badania doświadczalne nad wpływem Foschlora  
na pierwotnie uszkodzoną wątrobę**

Экспериментальные исследования влияния фосхлора на первичное поражение  
печени

Experimental Studies on the Effect of Foschlora on a Primarily Damaged Liver

Znane są przypadki śmiertelnego zatrucia ludzi związkami fosforoorganicznymi (K r u p a i wsp. 1974). Zaobserwowano również, że po wprowadzeniu ich nawet w dawkach dopuszczalnych do organizmu żywego wywołują one u pewnej tylko części zwierząt zmiany chorobowe o różnym stopniu nasilenia (S t r o g o n o w, 1969). Pomimo stosunkowo licznych supozycji nie wyjaśniono całokształtu przyczyn zmiennej reaktywności ustroju zwierzęcego na stosowane w rolnictwie pestycydy. Dlatego właśnie postanowiono prześledzić odczyny cytoenzymatyczne wątroby uszkodzonej operacyjnie i poddanej działaniu Foschlora (związek fosforoorganiczny firmy Azoty w Jaworznie).

MATERIAŁ I METODY

Badania wykonano na jednorocznych szczurkach białych (ca 180 g), hodowli wsobnej, podzielonych na zespoły A i B, w których były po 3 analogiczne grupy doświadczalne. Szczurom zespołu A, (grupy I, II, III) w narkozie eterowej wycinano jeden płat wątroby, a zespołu B (grupy I, II, III) — dwa płaty. Grupy kontrolne odpowiednie dla poszczególnych zespołów składały się ze zwierząt po hepatektomii i pozornie operowanych. Poza tym była jeszcze grupa porównawcza wspólna dla całego eksperymentu, której zwierzęta nie podlegały żadnym zabiegom. Samice grup doświadczalnych IA i IB w 8 godzin od zabiegu otrzymały jednorazowo sondą doprzelykową Foschlora rozcieńczony w wodzie w ilości 50 mg/kg c.c. Samice grup doświadczalnych IIA i IIB w ciągu 16 godzin od zabiegu otrzymały tą samą drogą 100 mg/kg c.c. Foschlora (2×50). Samice grup doświadczalnych IIIA i IIIB w 24-

-godzinnym okresie pooperacyjnym otrzymały w sumie 150 mg/kg c.c. tego związku (3×50). W tych przedziałach czasu zwierzęta kontrolne otrzymywały wodę, która była rozcieńczalnikiem Foschloru. Przed i po zabiegach szczury przebywały w nie zmienionych warunkach hodowlanych i miały stały dostęp do picia i jedzenia. Dla uniknięcia wpływu wahań dobowych w aktywności enzymatycznej zawsze w 8 godzin po ostatnim wprowadzeniu Foschloru dekapitowano zwierzęta i pobierano wątrobę do badania na: fosfatazę kwaśną, fosfatazę zasadową, adenozyotrójfosfatazę, glikozo-6-fosfatazę, glikogen, dehydrogenazy bursztynianową i mleczanową.

#### BADANIA WŁASNE

**Fosfataza kwaśna (Fk).** W porównaniu z materiałem kontrolnym w grupie IA nie obserwowano różnic w aktywności Fk. Enzym ten w formie drobnych ziarenek Pbs wypełniał cytoplazmę hepatocytów (ryc. 1). Natomiast w grupie IB uformowały się pojedyncze większe skupiska Fk (ryc. 2). Podobne konglomeraty Fk utworzyły się w komórkach ograniczających drogi żółciowe śródzrazikowe grup II i III zespołu A (ryc. 3). Na preparatach pochodzących z grup IIB i IIIB obok lizosomów była i dyfuzyjna komponenta Fk (ryc. 4).

**Fosfataza zasadowa (Fz).** W grupie IA nasiliły się reakcje na Fz w śródbłonku zatok i błonach komórkowych (ryc. 5). W grupach drugich obu zespołów oraz w IIIA naczynia krwionośne i przestrzenie wrotno-żółciowe cechowały się wysoką aktywnością Fz (ryc. 6). W grupie IIIB w cytoplazmie hepatocytów położonych w częściach brzeżnych zrazików pojawił się delikatny odczyn dyfuzyjny.

**Adenozyotrójfosfataza (ATP-aza).** Intensywność odczynów na ATP-azę w błonach komórkowych, cytoplazmie i śródbłonku naczyń była większa w grupie IA niż w regenerującej wątrobie nie poddanej działaniu Foschloru. Zmiany te były jeszcze istotniejsze w materiale grupy IB, gdzie uwidoczniły się wyraźnie drogi żółciowe śródzrazikowe (ryc. 7). W grupach II i III zespołu A reakcje na ATP-azę w błonach fizjologicznych nie miały już takiego mocnego wybarwienia. W części środkowej zrazików grup IIB i IIIB w licznych komórkach odczyn enzymatyczny ATP-azy był wyraźnie osłabiony, a nawet dyfuzyjny (ryc. 8).

**Glikozo-6-fosfataza (G-6-P).** W grupie IA ziarenka G-6-P wybarwiały się w całej cytoplazmie wszystkich komórek gruczołowych. W hepatocytach leżących w pobliżu przestrzeni wrotnych odczyn na G-6-P był większy niż w części centralnej zrazików (ryc. 9). W komórkach grupy IB reakcje na G-6-P były słabsze niż w grupie poprzedniej. W grupach drugich i trzecich obu zespołów obniżyło się nasilenie aktywności enzymatycznej. Produkty reakcji odpowiadające G-6-P układały się w licznych hepatocytach w duże zespoły (ryc. 10).

**Glikogen.** W zestawieniu z grupą porównawczą w hepatocytach zwierząt pozornie operowanych i po resekcji jednego oraz dwóch płatów

było mniej ziarenek PAS dodatnich, które zidentyfikowano jako glikogen. W grupie IA reakcje PAS były silniejsze w komórkach tworzących środek zrazików niż leżących na obwodzie. W licznych hepatocytach grupy IB zauważono polaryzację glikogenu. W grupach II i III zespołu A w porównaniu z odczynami kontrolnymi reakcje PAS nie były jednakowo nasilone nawet w obrębie jednego zrazika (ryc. 11). W analogicznych grupach zespołu B występowały komórki z nieznaczną ilością glikogenu obok hepatocytów z dużymi ziarnami tego wielocukru (ryc. 12). Wahania takie miały miejsce przeważnie w komórkach położonych blisko żyły środkowej, a więc w pasie stałego spoczynku.

**D e h y d r o g e n a z a b u r s z t y n i a n o w a (DB).** W grupach pierwszych obu zespołów w pobliżu triad wątrobowych odczyn barwny na DB nie były tak intensywne jak w materiale kontrolnym. Również w grupach IIA i IIIA obserwowano w okolicy żył środkowych dalszy ubytek ziarn dwuformazanu (ryc. 13). Na materiale z grup IIB i IIIB ilość uwidoczniionych mitochondriów, w których lokalizuje się DB, była wyraźnie zmienna i zależna od strefy zrazika (ryc. 14).

**D e h y d r o g e n a z a m l e c z a n o w a (DM).** Podobnie jak w odczynach kontrolnych w grupach IA i IB najsilniejsze reakcje na DM utrzymywały się w hepatocytach otaczających żyły środkowe (ryc. 15). W grupach II i III zespołu A w komórkach centralnej części zrazików nastąpił dalszy wzrost aktywności na DM. W grupie IIB w porównaniu z IIA wybarwiono więcej ziaren DM. Pobudzenie aktywności tego enzymu szczególnie w hepatocytach okolicy przestrzeni bramnych stwierdzono i w grupie IIIB (ryc. 16).

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Obserwacje histoenzymatyczne przeprowadzono w szczytowym okresie regeneracji wątroby (K a r o ń, 1973). Ze względu na ewentualny wpływ kolchicyny na aktywność enzymów nie wykonywano obliczeń indeksu mitotycznego. Wprowadzenie grupy zwierząt pozornie operowanych pozwoliło na rozgraniczenie wpływu samego zabiegu od działania Foschloru na pozostałą część wątroby. Zastosowane dawki Foschloru ustalono na podstawie wyników obserwacji efektu cytopatogenego w pracach poprzednich (S t a s z y c i w s p., 1973, 1974).

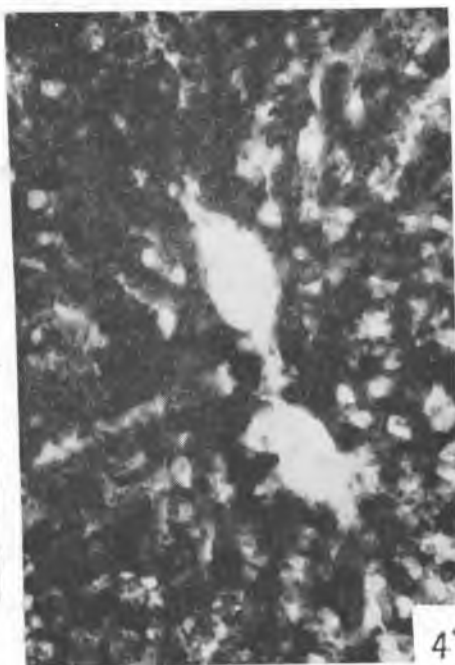
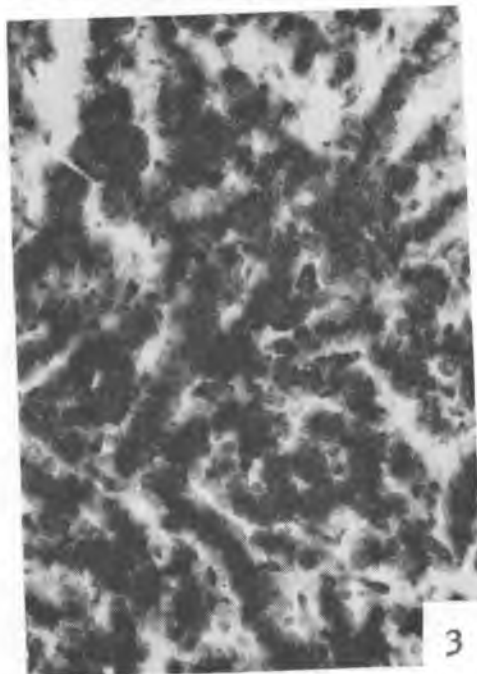
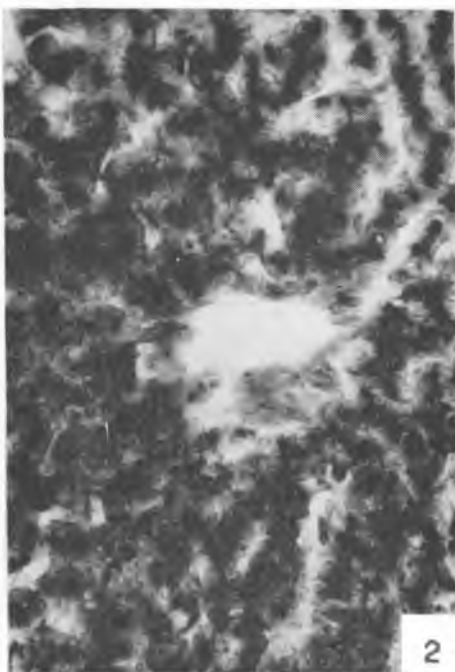
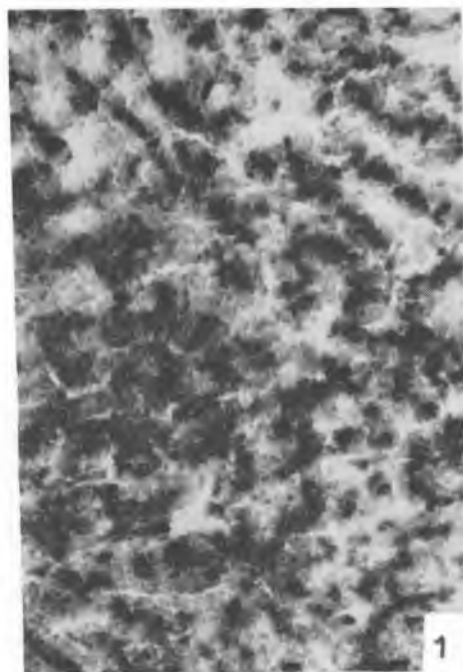
Foschlor w dawce 50 mg/kg c.c. pobudzał aktywność Fk. Wpływ ten jednak uzależniony był od rozległości uszkodzenia wątroby, ponieważ w grupie IB, gdzie amputowano dwa płaty, pojawiły się wzdłuż kanalików żółciowych duże skupiska fosfatazododatnich ziarnistości. Wskazywały one na uszkodzenie metabolizmu hepatocytów przez aktywację enzymów lizosomalnych. W grupach, gdzie wycięto dwa płaty i podano 150 mg/kg c.c. Foschloru, wystąpił odczyn dyfuzyjny świadczący o zwiększonej prze-

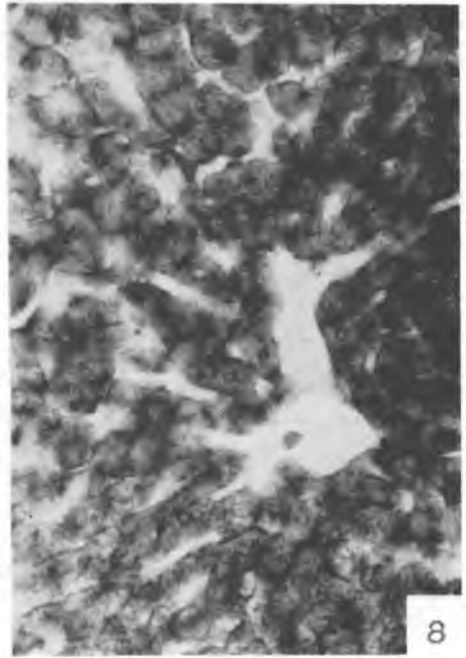
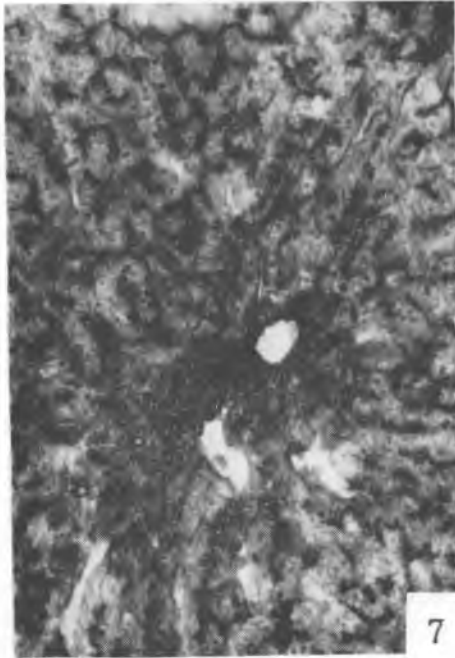
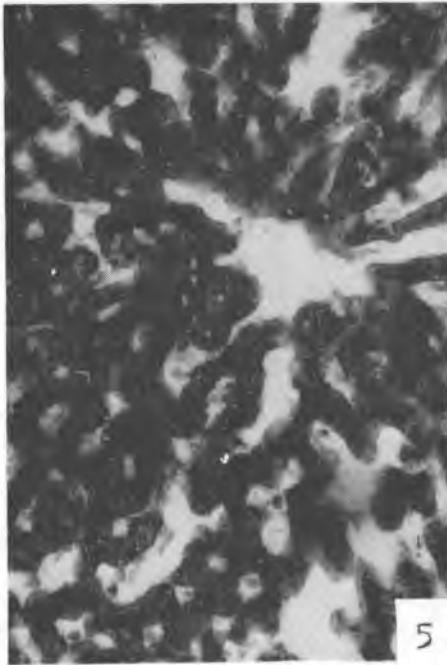
puszczalności osłonki lizosomalnej i przechodzeniu fosfatazy kwaśnej do cytoplazmy. Nie wyklucza się, że w wyniku wzmożonej przepuszczalności błon lizosomów ułatwiony jest kontakt między enzymem a substratem.

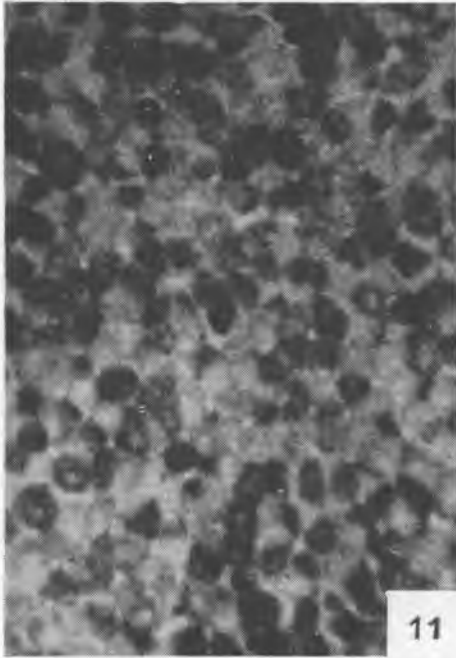
Wzrost aktywności Fz związanej z procesami podziału i różnicowania się komórek wskazywał w grupie IA na pobudzenie produkcji białka cytoplazmatycznego. W pozostałych grupach po lobektomii dwóch płatów i obciążeniu Foschlorem odczynny na tę hydrolazę zmalały. Świadczyć to może o zmianach ilościowych i jakościowych w transporcie przez błony komórkowe.

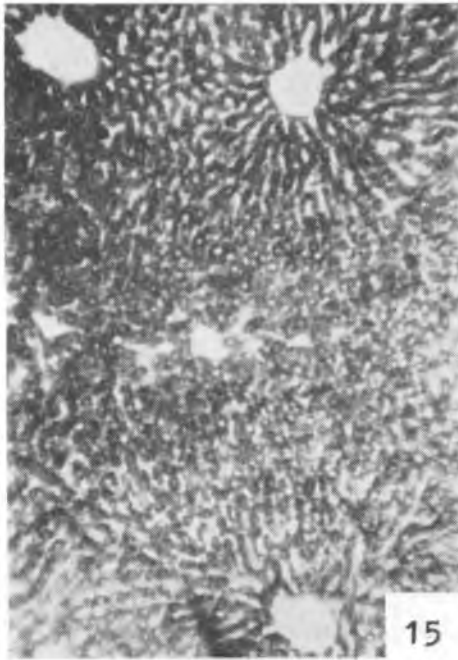
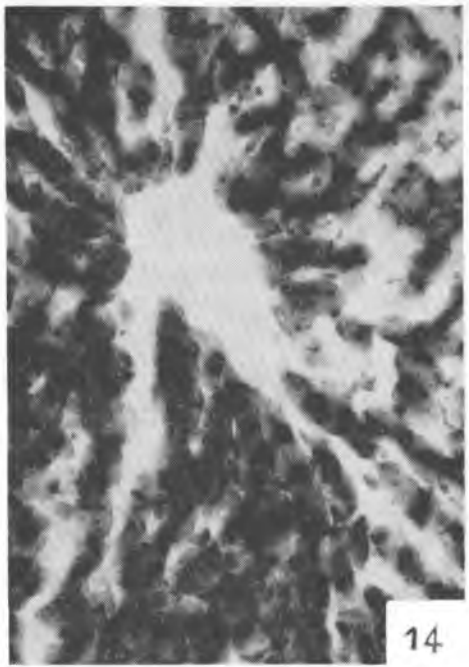
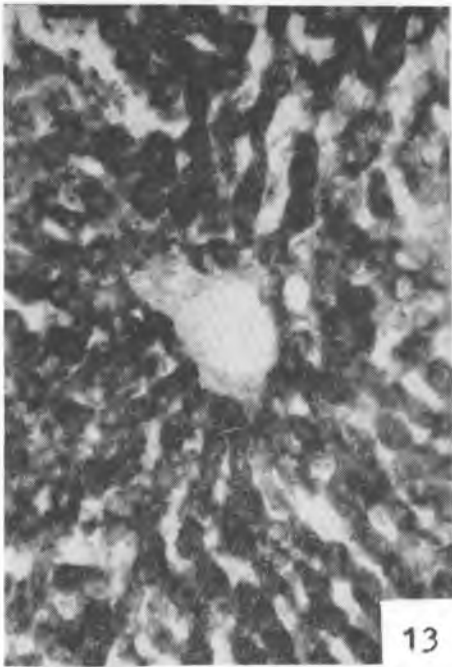
Regeneracja przebiega na drodze pośrednich podziałów komórkowych, co prowadzi do wyrównawczego rozrostu pozostałych płatów wątroby (Jassina, 1970, Karoń, 1973). Do tego potrzebny jest wzmożony dopływ energii zmagazynowanej w ATP (Kuć, 1971). Oceniając aktywność ATP-azy w grupie IA można sądzić, że dawka 50 mg/kg c.c. Foschloru nie upośledza w procesie metabolicznym uwalniania energii. Natomiast dawki 100 i 150 mg/kg c.c. Foschloru, szczególnie przy uszkodzonej wątrobie, obniżają aktywność ATP-azy i hamują resyntezę kwasu adenozyntrójfosforowego. W takim mechanizmie działania ADP nie zamienia się w ATP. Ograniczona synteza ATP powoduje zaburzenie przepuszczalności błon komórkowych i mitochondrialnych. Potwierdzeniem tego jest osłabienie reakcji fosfatazy zasadowej i glikozo-6-fosfatazy, markera retikulum endoplazmatycznego. Utrudnione są więc przemiany glikogenu wątrobowego na glikozę, co prowadzi do zmian w gospodarce lipidów (Popow i wsp. 1973).

Synteza glikogenu rozpoczyna się w komórkach gruczołowych wątroby położonych w pobliżu żył środkowych, w tzw. pasie stałego spoczynku. W grupie IA odczynny PAS wskazywały, że metabolizm hepatocytów był nie naruszony. W grupie IB pojawiła się polaryzacja ziarenek PAS dodatnich. W pozostałym materiale doświadczalnym wahania jakościowe i ilościowe specyficznych ziarnistości dowodziły obniżonych rezerw glikogenu. Przesunięcia te mogą być wynikiem bezpośredniego cytotoksycznego działania Foschloru lub wzmożonego rozpadu glikogenu przy jego ograniczonej syntezie (Zawistowski i wsp. 1973). Nastąpiło rozprężenie fosforylacji oksydacyjnej z pobudzeniem glikozy beztlenowej. Potwierdzeniem tego rozumowania jest obniżona aktywność DB. Wiadomo, że glikogenoliza, ze względu na ilość wyzwolanej energii, jest dla komórek gruczołowych wątroby mało korzystna. Zmienione reakcje DB i ATP-azy świadczą o uszkodzeniu nie tylko funkcji, ale i struktury mitochondriów. Osłabieniu odczynów na DB towarzyszył wzrost aktywności DM, która w procesie glikogenolizy katalizuje przenoszenie wodoru z  $\text{NADH}_2$  na kwas pirogronowy, w wyniku czego powstaje kwas mlekowy. Energia wyzwolona w tym procesie nawet w warunkach niedotlenienia pozwala na utrzy-











manie pewnej równowagi procesów anabolicznych i katabolicznych. Zmiany glikolizy oraz cyklu pentozano-fosforanowego wskazują na wzmożenie syntezy tłuszczów.

Jak wynika z całokształtu obserwacji, Foschlor w dawce 50 mg/kg c.c. nie hamuje mechanizmów odtwórczych hepatocytów po częściowej resekcji płatów wątroby szczura. Ta sama dawka przy rozleglejszym uszkodzeniu wątroby wywołuje rozkojarzenie procesów energetycznych. Foschlor w dawce 100 i 150 mg/kg c.c. lub produkty jego rozpadu, przy ubytku ca 40% masy wątroby, w pierwszym okresie obniżają aktywność enzymów zawartych w lizosomach i mitochondriach, a następnie uszkadzają te organelle. Być może, w chorej wątrobie następuje szybciej zahamowanie resyntezy ATP i nasilenie glikogenolizy. Obserwacje nasze pokrywają się w pełni z wynikami innych autorów (Longmire i wsp. 1966, Wiśniewski i wsp. 1972), co można najprawdopodobniej wytłumaczyć odmienną wrażliwością osobniczą użytych zwierząt i innymi warunkami doświadczalnymi. Ponadto mają tutaj wpływ zaburzenia w przenoszeniu podniet nerwowych poprzez hamowanie cholinesterazy oraz technika zabiegu operacyjnego (Karoń, 1973) i związane z tym krążenie, ciśnienie w układzie żyły wrotnej i ogólna reaktywność organizmu szczurów.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Jassina J.: Biull. Eksper. Biol., 12, 83—92, 1970.
2. Karoń H.: Pol. Tyg. Lek., 45, 1780—1782, 1973.
3. Krupa A., Mądro R.: Med. Wiejska, 5, 23—31, 1970.
4. Kuć A.: Folia Morph., 30, 279—283, 1971.
5. Longmire W., Passaro E., Joseph W.: Brit. J. Surg., 53, 852—864, 1966, 1973.
6. Popow J., Sulik M., Kreczko S.: Bromat. Chem. Toksykol., 6, 353—357, 1973.
7. Staszyc J., Kifer E.: Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, sec. D, 28, 75—79, 1973.
8. Staszyc J., Kifer E.: X Zjazd PTA, Wrocław 1974, 120—124, 1974.
9. Strogonow N. S.: Symp. po wodnoj toksikologii, Leningrad, 21, 1969.
10. Wiśniewski K., Szymański A., Panek R.: Bromat. Chem. Toksykol., 2, 146—153, 1972.
11. Zawistowski S., Krechniak J.: Bromat. Chem. Toksykol., 6, 343—352, 1973.

Otrzymano 17 IV 1975.

#### OBJAŚNIENIA RYCN

Ryc. 1. Grupa doświadczalna IA. Szczur. Wątroba. Odczyn na Fk w hepatocytach. Metoda wg Gomoriego. Pow. ok. 400X.

Ryc. 2. Grupa doświadczalna IB. Szczur. Wątroba. Aktywność Fk w lizosomach. Barwienie wg m. Gomoriego. Pow. ok. 400X.

Ryc. 3. Grupa doświadczalna IIIA. Szczur. Wątroba. Duże nagromadzenie lizosomów wzdłuż kanalików żółciowych. Metoda wg Gomoriego. Pow. ok. 400X.

Ryc. 4. Grupa doświadczalna IIIB. Szczur. Wątroba. Odczyn dyfuzyjny na Fk. Metoda wg Gomoriego. Pow. ok. 400X.

Ryc. 5. Grupa doświadczalna IA. Szczur. Wątroba. Aktywność Fz wykazana wg m. Gomoriego. Pow. ok. 400X.

Ryc. 6. Grupa doświadczalna IIIA. Szczur. Wątroba. Wzrost reakcji na Fz w ścianach naczyń i przewodów żółciowych. Metoda Gomoriego. Pow. ok. 400X.

Ryc. 7. Grupa doświadczalna IB. Szczur. Wątroba. Odczyn ATP-azy w kanalikach żółciowych. Metoda Wachstein i Meisel. Pow. ok. 400X.

Ryc. 8. Grupa doświadczalna IIIB. Szczur. Wątroba. Obniżenie aktywności ATP-azy. Metoda Wachstein i Meisel. Pow. ok. 400X.

Ryc. 9. Grupa doświadczalna IA. Szczur. Wątroba. Odczyny G-6-P-azy w komórkach gruczołowych. Metoda Wachstein i Meisel. Pow. ok. 400X.

Ryc. 10. Grupa doświadczalna IIB. Szczur. Wątroba. W licznych hepatocytach duże ilości G-6-P-azy. Metoda Wachstein i Meisel. Pow. ok. 400X.

Ryc. 11. Grupa doświadczalna IIA. Szczur. Wątroba. Nierównomierne odczyny PAS na glikogen. Pow. ok. 400X.

Ryc. 12. Grupa doświadczalna IIIB. Szczur. Wątroba. W pojedynczych komórkach duże ziarna glikogenu. Reakcja PAS. Pow. ok. 400X.

Ryc. 13. Grupa doświadczalna IIA. Szczur. Wątroba. Nierównomierne odczyny na DB w komórkach. Barwienie wg m. Nachlasy i Pearse'a. Pow. ok. 400X.

Ryc. 14. Grupa doświadczalna IIB. Szczur. Wątroba. Duże ziarna dwuformazanu w hepatocytach. Barwienie wg m. Nachlasy i Pearse'a. Pow. ok. 400X.

Ryc. 15. Grupa doświadczalna IA. Szczur. Wątroba. Odczyny na DM silniejsze w okolicy żyły środkowej. Barwienie wg m. Nachlasy i Pearse'a. Pow. ok. 400X.

Ryc. 16. Grupa doświadczalna IIIB. Szczur. Wątroba. Wzrost aktywności na DM. Barwienie wg m. Nachlasy i Pearse'a. Pow. ok. 400X.

## РЕЗЮМЕ

Автор вырезал самкам белых крыс одну или две доли печени, а потом изменял этим животным фосхлор в дозах 50, 100 или 150 мг/кг веса тела. Проведены энзиматические реакции на активность кислой и щелочной фосфатазы, аденозинтрифосфатазы, глюкозо-6-фосфатазы, сукцинатдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы и на гликоген.

На основе полученных результатов делается вывод, что токсичное действие фосхлора имеет связь со степенью повреждения печени, с дозой и со временем действия этого фосфоорганического препарата.

## SUMMARY

One or two liver lobes were surgically removed from white female rats after which Foschlor was administered in doses of 50, 100, 150 mg/kg to the operated animals.

A histochemical reaction to glycogen as well as cytoenzymatical reactions to alkaline and acid phosphatases, adenosinetriphosphatase, glucose-6-phosphatase, succinic and lactic dehydrogenases were performed.

On the basis of the obtained results, one can come to the conclusion that the toxic effect of Foschlor is related to the damage degree of the liver, doses and the period of this phosphorus-organical preparation.

#### EXPLANATION OF FIGURES

Fig. 1. Experimental group I-A. Rat. Liver. Reaction to acid phosphatase in liver cells. Method acc. to Gomori. Magn. ca 400X.

Fig. 2. Experimental group I-B. Rat. Liver. Acid phosphatase activity in the lysosomes. Gomori's method. Magn. ca 400X.

Fig. 3. Experimental group III-A. Rat. Liver. A large accumulation of lysosomes along the bile canaliculus. Gomori's method. Magn. ca 400X.

Fig. 4. Experimental group III-B. Rat. Liver. Diffusive reaction to acid phosphatase. Gomori's method. Magn. ca 400X.

Fig. 5. Experimental group I-A. Rat. Liver. Alkaline phosphatase activity acc. to Gomori's method. Magn. ca 400X.

Fig. 6. Experimental group III-A. Rat. Liver. An increase of reaction to alkaline phosphatase in the walls of blood vessels and bile ducts. Gomori's method. Magn. ca 400X.

Fig. 7. Experimental group I-B. Rat. Liver. Reaction to adenosinetriphosphatase in bile canaliculus. Wachstein's and Meisel's method. Magn. ca 400X.

Fig. 8. Experimental group III-B. Rat. Liver. A decrease of ATP-ase activity. Wachstein's and Meisel's method. Magn. ca 400X.

Fig. 9. Experimental group I-A. Rat. Liver. Reaction to glucose-6-phosphatase activity in the glandular cells. Wachstein's and Meisel's method. Magn. ca 400X.

Fig. 10. Experimental group II-B. Rat. Liver. An abundance of glucose-6-phosphatase in numerous liver cells. Method acc. to Wachstein and Meisel. Magn. ca 400X.

Fig. 11. Experimental group II-A. Rat. Liver. Irregular PAS-reactions to glycogen. Magn. ca 400X.

Fig. 12. Experimental group III-B. Rat. Liver. Large glycogen granules in the individual liver cells. PAS-reaction. Magn. ca 400X.

Fig. 13. Experimental group II-A. Rat. Liver. Irregular reactions to succinic dehydrogenase in the liver cells. Staining acc. to Nachlas and Pearse. Magn. ca 400X.

Fig. 14. Experimental group II-B. Rat. Liver. Large diformazan granules in the liver cells. Staining acc. to Nachlas and Pearse. Magn. ca 400X.

Fig. 15. Experimental group I-A. Rat. Liver. Reactions to lactic dehydrogenase were stronger in the vicinity of the central vein. Magn. ca 400X.

Fig. 16. Experimental group III-B. Rat. Liver. Note an increase of lactic dehydrogenase activity. Staining acc. to Nachlas and Pearse method. Magn. ca 400X.

