TADEUSZ SYROWATKA, BOŻENA WIADROWSKA, JERZY PIOTROWSKI, TERESA NAZAREWICZ

BADANIE WPŁYWU ANALOGÓW DDT NA AKTYWNOŚĆ WYBRANYCH ENZYMÓW U SZCZURÓW W DOŚWIADCZENIU OSTRYM

Z Zakładu Toksykologii Sanitarnej Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. T. Syrowatka

Badano wpływ równoczesnego podawania N-nitrozodietyloaminy i fenarimolu oraz nuarimolu na zmiany aktywności wybranych układów enzymatycznych, takich jak: G-6-P-aza, ATP-aza, GGTP-aza w wątrobie, surowicy i moczu szczurów.

WSTĘP

Z licznych badań [4, 5, 17, 18] wynika, że ekspresja fenotypu nowotworowego jest procesem przynajmniej dwustopniowym, składającym się z fazy inicjacji i promocji. Eksperymenty na zwierzętach [4, 5, 16] potwierdzają, że wśród chemicznych kancerogenów można wyróżnić: 1) kancerogeny niekompletne, posiadające jedynie zdolność do inicjacji procesu nowotworowego, 2) czynniki wspomagające, między innymi tzw. promotory wyzwalające i przyspieszające ekspresję fenotypu nowotworowego, 3) kancerogeny kompletne, które poza zdolnością do inicjacji procesu nowotworowego dopełniają go na drodze promocji.

Wg ostatnich doniesień [17, 21, 22] do grupy epigenetycznych kancerogenów klasy promotorów raka wątroby zakwalifikowano induktory monooksygenaz, do których należą między innymi fenobarbital oraz szereg stosowanych pestycydów chloroorganicznych (lindan, DDT i prawdopodobnie analogi DDT).

Do grupy induktorów monooksygenaz należą dwa fungicydy fenarimol (α-(2-dichlorofenylo)α-4-chlorofenylo)-5-pirymidynometanol) oraz jego analog nuarimol (α(2-chlorofenylo/α)/-4-fluorofenylo)-5-pirymidynometanol), wprowadzone w Polsce do stosowania w ochronie roślin. W związku z powyższym, wydawało się celowe podjęcie badań biochemiczno-toksykologicznych w aspekcie promocyjnego oddziaływania tego typu preparatów.

Ogólnie wiadomo [11, 13, 14], że wczesnym wskaźnikiem inicjacji procesu nowotworowego jest pojawienie się w wątrobie zespołów komórek charakteryzujących się kompletnym brakiem adenozynotrójfosfatazy (ATP-azy) kanalikowej i znacznym obniżeniem adenozynotrójfosfatazy cytoplazmatycznej. Innym czułym wskaźnikiem są zmiany w aktywności hydrolazy epoksydowej (wzrost aktywności) i glukozo-6-fosfatazy (G-6-P-azy) (zanik aktywności), pojawienie się „wysepek" o wysokiej aktywności γ-glutamylotranspeptydazy (GGTP-azy).

W niniejszej pracy podjęto badania wpływu równoczesnego podawania

N-nitrozodietyloaminy (NDEA) i fenarimolu oraz nuarimolu na zmiany aktywności wybranych układów enzymatycznych, takich jak: G-6-P-aza, ATP-aza i GGTP-aza, w wątrobie, surowicy i moczu szczurów.

Według danych literaturowych [2, 3, 6, 22] enzymy te można traktować jako enzymy wskaźnikowe, które pojawiają się lub zanikają w zespołach komórek zmienionych nowotworowo.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Badania wykonywano na białych szczurach samicach szczepu *Wistar*. Masa początkowa zwierząt wynosiła 120—150 g. Badanie trwało 9 tygodni. Kontrolowano masę zwierząt, ilość spożytej wody i paszy. Następujące związki w roztworze olejowym podawano sondą do żołądka: N-nitrozodietyloaminę f-my *Sigma;* fenarimol techniczny produkcji Zakładów Chemicznych „Azot" w Jaworznie o czystości 98,9%; nuarimol techniczny f-my *Elanco Lilly Research Centre Limited* o czystości 98%.

Szczury podzielono na następujące grupy po 10 sztuk zwierząt w każdej z nich: I — kontrola, II — zwierzęta otrzymywały przez 5 początkowych dni doświadczenia 8 mg (NDEA)/kg masy ciała, III — zwierzętom podawano od drugiego tygodnia doświadczenia 1/10 LD_{50} fenarimolu, IV — zwierzęta otrzymywały NDEA jak w grupie II i następnie do końca badania 1/10 LD_{50} fenarimolu, V — zwierzętom podawno od drugiego tygodnia badania 1/10 LD_{50} nuarimolu, VI — zwierzęta otrzymywały NDEA jak w grupie II, a następnie do końca doświadczenia 1/10 LD_{50} nuarimolu.

Po 9 tygodniach doświadczenia zbierano mocz z ostatniej doby i dokonano sekcji wszystkich szczurów. Pobierano krew i izolowano następujące narządy: wątrobę, płuca, serce, nerki i śledzionę, które ważono a wycinki wątroby pobierano do oceny histopatologicznej. Wycinki te umieszczano w 4% roztworze formaliny, a do oznaczeń histochemicznych zamrażano w temp. —20°C. Preparaty histologiczne z wątroby wykonywano stosując technikę barwienia hematoksyliną i eozyną. Tłuszcz barwiono metodą „Oil red" wg *Gridley*. [12]

Badania histochemiczne

Skrawki wątroby o grubości 10 μ przygotowywano w kriostacie.

Do oznaczeń aktywności G-6-P-azy zastosowano metodę stosowaną w Zakładzie Biologii Nowotworów Instytutu Onkologii w Gliwicach [10]. Do wykrywania aktywności ATP-azy stosowano metodę *Wachsteina* i *Neisela* [20]. Aktywność GGTP-azy wykrywano metodą *Alberta i wsp.* [1].

Oznaczenia biochemiczne

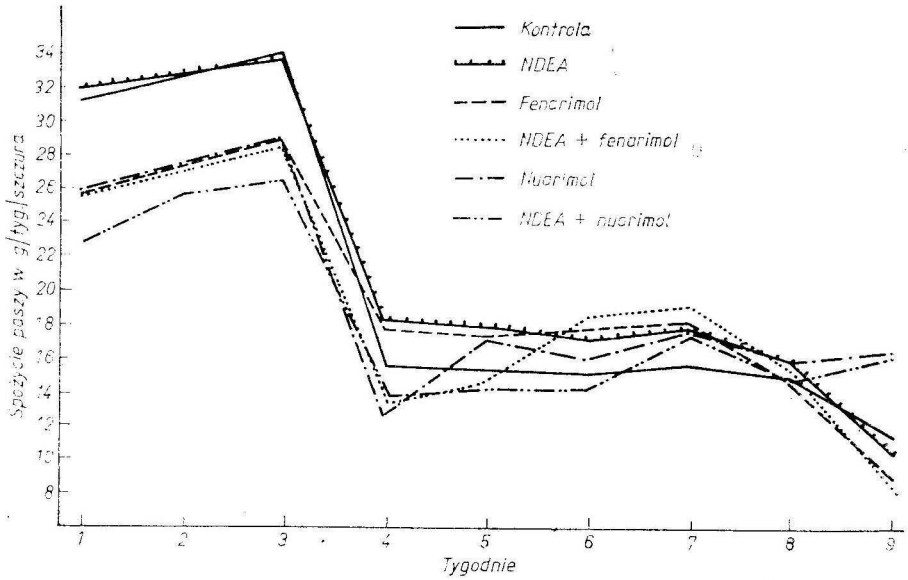
Aktywność G-6-P-azy oznaczano w surowicy i homogenacie wątroby (2,5%) weług metody *Koide* i *Oda* [9]. Próbki z glukozo-6-fosforanem jako substratem o pH 6,5 inkubowano w temp. 37°C, po czym mierzono uwolniony fosforan metodą spektrofotometryczną przy długości fali 680 nm dla surowicy i 660 nm dla wątroby. Przy oznaczaniu aktywności G-6-P-azy w homogenacie wątroby zastosowano jako odczynnik redukujący kwas 1-amino-2-naftolo-4-sulfonowy w roztworze $NaHSO_3$ i Na_2SO_3.

Aktywność γ-gdutamylotranspeptydazy oznaczano w moczu, surowicy i homogenacie wątroby (2,5%). Zastosowano zestaw testów „Biomed" Wytwórni Surowic i Szczepionek w Krakowie. Zasada metody polega na przeprowadzeniu reakcji enzymatycznej, w której pod wpływem GGTP z γ-glutamylo-α-naftyloamidu uwalnia się α-naftyloamina, którą oznacza się spektrofotometrycznie po przerwaniu reakcji enzymatycznej i wywołaniu barwy p-dimetyloaminobenzaldehydem. Natężenie barwy jest proporcjonalne do stężenia uwolnionej α-naftyloaminy, a tym samym do aktywności GGTP w badanej próbce.

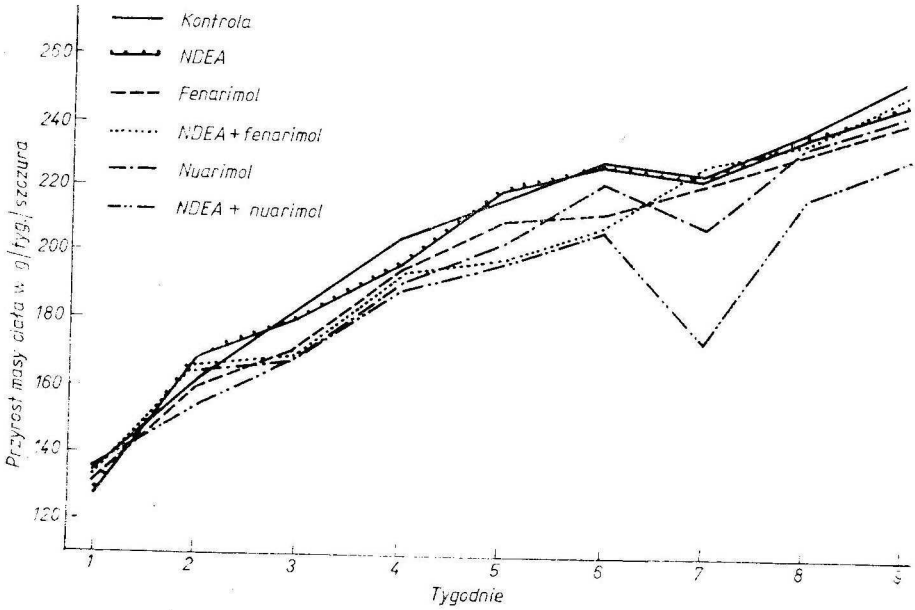
Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej testem *t-Studenta*.

WYNIKI I OMÓWIENIE

Wpływ N-nitrozodietyloaminy, fenarimolu i nuarimolu oraz ich łącznego podawania szczurom na spożycie paszy i przyrost masy ciała ilustrują rycina 1 i rycina 2.



Ryc. 1. Wpływ podawania NDEA, fenarimolu i nuarimolu na spożycie paszy przez samice szczurów w doświadczeniu 9-tygodniowym.



Ryc. 2. Wpływ podawania NDEA, fenarimolu i nuarimolu na przyrost masy ciała samic szczurów w doświadczeniu 9-tygodniowym.

W początkowych trzech tygodniach eksperymentu wyższe spożycie paszy obserwowano w grupie kontrolnej oraz w grupie otrzymującej NDEA niż u pozostałych zwierząt (grupa III, IV, V, VI). W czwartym tygodniu doświadczenia wyraźny spadek spożycia paszy wystąpił u wszystkich badanych szczurów.

Masa ciała zwierząt do 6 tygodnia doświadczenia wykazywała tendencję wzrostową we wszystkich grupach doświadczalnych, po czym zaobserwowano wyraźny spadek masy ciała w grupie zwierząt otrzymujących nuarimol oraz NDEA łącznie z nuarimolem. Po zakończeniu cyklu doświadczalnego masa ciała szczurów nie wykazywała statystycznie znamiennych różnic w badanych grupach w porównaniu z kontrolą.

U szczurów, którym podawano fenarimol oraz NDEA z fenarimolem, stwierdzono w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi 2-krotny wzrost masy wątroby. W grupie zwierząt otrzymujących nuarimol obserwowano 1,25-krotny wzrost masy wątroby.

W oznaczeniach histochemicznych obserwowano w porównaniu z kontrolą spadek aktywności G-6-P-azy i ATP-azy we wszystkich grupach zwierząt, z wyjątkiem grupy szczurów otrzymujących NDEA.

W grupie III (fenarimol) i IV (NDEA + fenarimol) stwierdzono bardzo silne zahamowanie aktywności badanych enzymów. Występowanie tzw. pozytywnych wysepek o bardzo intensywnym zabarwieniu brunatnoczerwonym, zwłaszcza w grupie III (fenarimol) i IV (NDEA-fenarimol) świadczy o wysokiej aktywności GGTP.

W grupach V (nuarimol) i VI (NDEA+nuarimol) „wysepki" aktywności GGTP-azy występowały w mniejszym stopniu i charakteryzowały się słabszym zabarwieniem. Natomiast w grupie II szczurów (NDEA) nie obserwowano różnic w odniesieniu do kontroli.

Badania histochemiczne potwierdzono oznaczeniami biochemicznymi.

Znamienny spadek aktywności G-6-P-azy wystąpił w wątrobie szczurów otrzymujących fenarimol (grupa III) i NDEA z fenarimolem (grupa IV), natomiast w grupie V, otrzymującej nuarimol obserwowany spadek nie był statystycznie znamienny. Natomiast w surowicy badanych zwierząt stwierdzono nieznamienny spadek aktywności G-6-P-azy (grupy: III, IV, V, VI).

W oznaczeniach biochemicznych aktywność GGTP-azy w wątrobie szczurów otrzymujących fenarimol była wyższa w porównaniu z grupą potraktowaną NDEA z fenarimolem, co nie odpowiada wynikom badań histochemicznych.

Statystycznie znamienny wzrost aktywności tego enzymu w moczu wykazano w grupie zwierząt otrzymujących NDEA, nuarimol i NDEA+ +nuarimol.

Natomiast w surowicy znamienność tą zaobserwowano w grupie szczurów, którym podawano fenarimol oraz NDEA z fenarimolem.

Ocena histopatologiczna preparatów przygotowanych z wątroby zwierząt po podaniu fenarimolu (grupa III), NDEA z fenarimolem (grupa IV), nuarimolu (grupa V) i NDEA z nuarimolem (grupa VI) wykazała zmiany przejawiające się stłuszczeniem różnego stopnia w obwodowych częściach zrazików wątroby.

Uzyskane wyniki nie odbiegają od publikowanych przez innych autorów dla induktorów monooksygenaz, takich jak fenobarbital, DDT, polibromowe dwufenyle itp. [7, 8, 14].

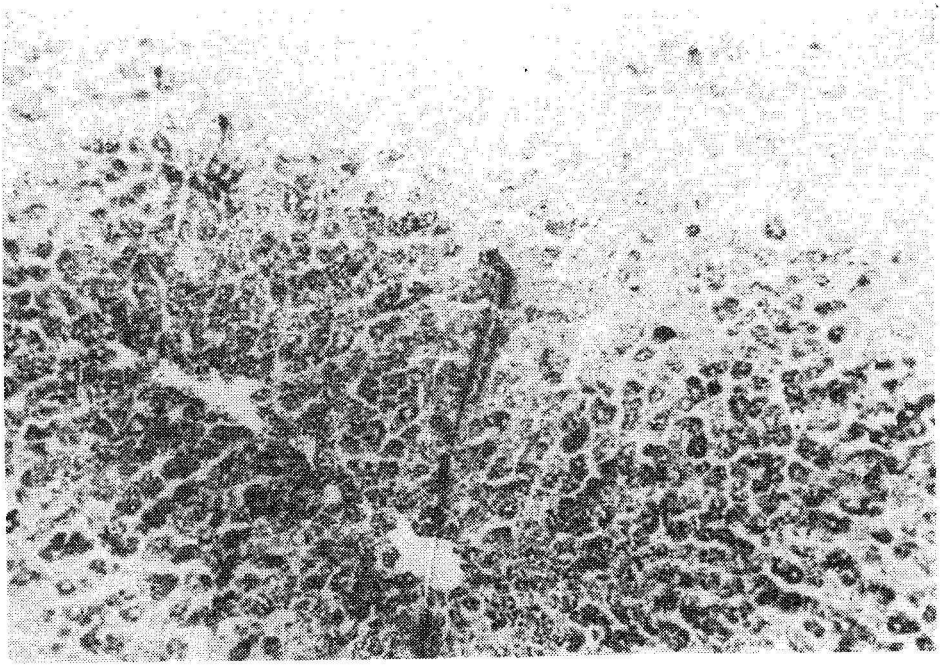
Tabela I. Średnie masy ciała i narządów szczurów w doświadczeniu 9-tygodniowym

Masa (średnia)	Kontrola	grupa zwierząt otrzymująca:				
		NDEA	FENARIMOL	NDEA+ FENARIMOL	NUARIMOL	NDEA+ NUARIMOL
Ciała	251,0±5,34	245,0±5,91	240,0±4,18	248,0±15,78	242,0±7,18	228,0±9,44
Wątroby	6,29±0,17	5,90±0,26	12,75±0,60*	12,35±0,92*	7,88±0,36*	6,83±0,28
Płuc	1,67±0,04	1,50±0,12	1,43±0,09	1,60±0,09	1,54±0,12	1,61±0,12
Serca	0,78±0,06	0,78±0,04	0,80±0,04	0,82±0,10	0,76±0,05	0,84±0,13
Nerek	1,38±0,04	1,38±0,02	1,55±0,05*	1,47±0,08	1,47±0,10	1,37±0,05
Śledziony	0,38±0,01	0,38±0,01	0,38±0,02	0,42±0,01	0,33±0,01*	0,37±0,01

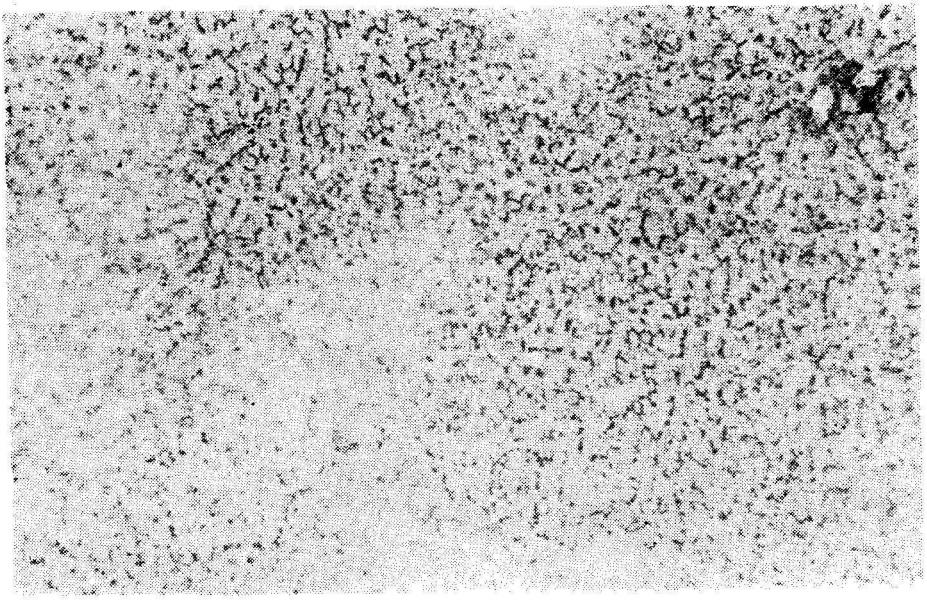
* — $P<0,05$ w porównaniu z grupą kontrolną.

Tabela II. Względna masa narządów w przeliczeniu na 100 g masy ciała

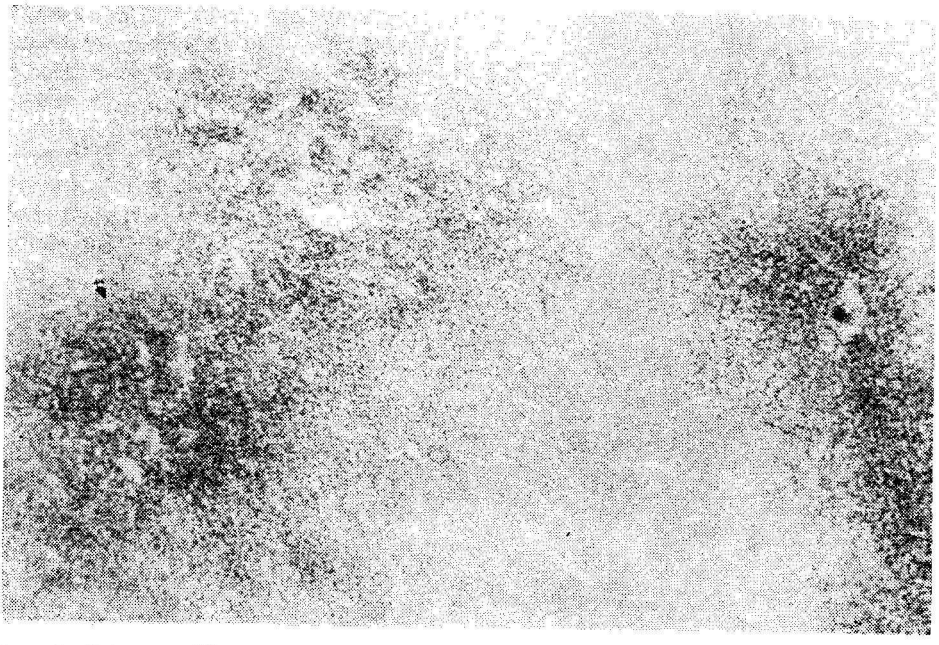
Narząd	Kontrola	grupa zwierząt otrzymująca:				
		NDEA	FENARIMOL	NDEA+ FENARIMOL	NUARIMOL	NDEA+ NUARIMOL
Wątroba	2,51	2,40	5,32	4,97	3,26	3,03
Płuca	0,67	0,61	0,60	0,64	0,63	0,71
Serce	0,31	0,32	0,33	0,33	0,31	0,37
Nerki	0,55	0,54	0,64	0,56	0,61	0,60
Śledziona	0,15	0,15	0,15	0,17	0,14	0,16



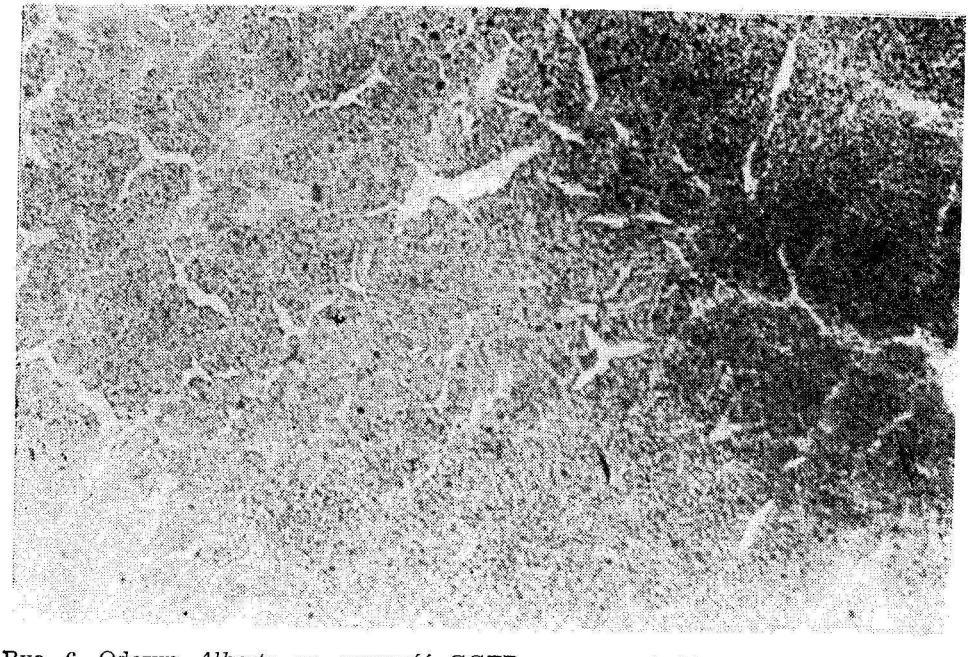
Ryc. 3. Odczyn na czynność G-6-P-azy w wątrobie szczura. Pow. 100x.



Ryc. 4. Odczyn *Wachsteina* i *Meisela* na czynność ATP-azy w wątrobie szczura. Pow. 100x.



Ryc. 5. Odczyn *Alberta* na czynność GGTP-azy w wątrobie szczura. Pow. 100x.



Ryc. 6. Odczyn *Alberta* na czynność GGTP-azy w wątrobie szczura. Pow. 100x.

Tabela III. Aktywność glukozo-6-fosfatazy w surowicy i wątrobie szczurów w doświadczeniu 9-tygodniowym (w jednostkach międzynarodowych)

Aktywność enzymu w:	Kontrola	grupa zwierząt otrzymująca:				
		NDEA	FENARIMOL	NDEA+ FENARIMOL	NUARIMOL	NDEA+ NUARIMOL
Surowicy	3,15±0,60	3,53±0,66 p = 0,696	1,96±0,10 p = 0,187	2,72±0,75 p = 0,696	1,82±0,82 p = 0,253	1,43±0,67 p = 0,097
Wątrobie	30,55±2,34	37,03±2,80 p = 0,113	18,64±2,29 p = 0,007	23,20±1,32 p = 0,056	25,55±2,19 p = 0,185	31,23±2,34 p = 0,845

Tabela IV. Aktywność γ-glutamylotranspeptydazy u szczurów w doświadczeniu 9-tygodniowym (w jednostkach międzynarodowych)

Aktywność enzymu w:	Kontrola	grupa zwierząt otrzymująca:				
		NDEA	FENARIMOL	NDEA+ FENARIMOL	NUARIMOL	NDEA+ NUARIMOL
Moczu	50,57±14,7	143,42±11,98 p = 0,002	81,67±4,25 p = 0,189	61,62±19,72 p = 0,626	135,45±22,27 p = 0,000	121,52±7,53 p = 0,010
Surowicy	1,51±0,45	1,95±0,78 p = 0,625	3,82±0,37 p = 0,006	4,49±0,24 p = 0,000	1,87±0,54 p = 0,696	2,80±0,53 p = 0,113
Wątrobie	51,40±5,83	57,34±14,30 p = 0,845	247,60±86,30 p = 0,006	191,98±45,90 p = 0,032	47,96±7,30 p = 0,922	131,16±33,20 p = 0,000

Tabela V. Ocena preparatów histopatologicznych wątroby

Grupy zwierząt otrzymujące:	Liczba zwierząt norma/stłuszczenie	Stwierdzone zmiany
Kontrola	15/6	norma (w 6-ciu preparatach stwierdzono stłuszczenie obwodów 2°)*
NDEA	10/4	norma (w 4-ech preparatach stwierdzono stłuszczenie obwodów 2°)*
Fenarimol	10/3	stłuszczenie obwodów miernego stopnia (2°)*
NDEA+Fenarimol	10/6	stłuszczenie obwodów pojedyńcze małego (1°)* i miernego stopnia (2°)*
Nuarimol	10/6	stłuszczenie obwodów małego (1°) i miernego stopnia (2°) (w jednym preparacie 3° i 3°/4°)*
NDEA+Nuarimol	10/9	stłuszczenie obwodów (1°, 2°, 2°/3°)*

* — stopnie stłuszczeń — w zależności od zajętych hepatocytów.

WNIOSKI

1. Fenarimol i nuarimol wywoływały spadek aktywności G-6-P-azy i ATP-azy oraz wzrost aktywności GGTP-azy w wątrobie szczurów (z wyjątkiem grupy zwierząt otrzymujących nuarimol).
2. Fenarimol i nuarimol indukowały zmiany histopatologiczne w wątrobie przejawiające się stłuszczeniem obwodów.
3. Badane parametry biochemiczne sugerują promujące działanie fenarimolu i nuarimolu na hepatokancerogenność u szczurów.

Т. Сыроватка, Б. Вядровска, Й. Пётровски, Т. Назарэвич

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ АНАЛОГОВ ДДТ НА АКТИВНОСТЬ ИЗБРАННЫХ ФЕРМЕНТОВ У КРЫС В ОСТРОМ ОПЫТЕ

Резюме

Исследовали влияние одновременного подавания N-нитрозодиэтилоамина и фенаримола а тоже науримола на изменения активности избранных энзиматических системов такних как: Г-6-Ф-аза, АТФ-аза, ГГТФ-аза в печени, сыворотке и мочи крыс в девятинедельном остром опыте.

Констатировано понижение активности Г-6-Ф-азы и АТФ-азы а тоже повышение активности ГГТФ-азы в печени крыс (за исключением группы крыс получающих науримол).

Исследованные соединения индуцировали гистопатологические изменения в печени, проявляющиеся ожирением периферических частей.

Полученные результаты исследованных биохимических параметров внушают переводящее действие фенаримола и науримола на гепатоканцерогенность у крыс.

T. Syrowatka, B. Wiadrowska, J. Piotrowski, T. Nazarewicz

THE STUDY OF THE EFFECTS OF DDT ANALOGUES ON THE ACTIVITY OF CERTAIN ENZYMES IN RATS IN ACUTE EXPERIMENT

Summary

The effect was studied of simultaneous administration of N-nitrosodiethylamine and Fenarimol and Nuarimol on changes in the activity of certain enzymatic systems such as G-6-P-ase, ATP-ase, GGTP-ase in the liver, serum and urine of rats in acute 9-week experiment.

A fall was observed of G-6-P-ase and ATP-ase activity and increased GGTP--ase activity in the liver of the rats (with the exception of the rats receiving Nuarimol).

The tested compounds induced histological changes in the liver with peripheral fatty infiltration. The determined biochemical parameters suggest a promoting action of Fenarimol and Nuarimol on the development of liver cancer in rats.

PIŚMIENNICTWO

1. *Albert Z., Orłowski M., Szewczuk A.:* Histochemical demonstration of gamma-glutamyl transpeptidase. Nature 1961, 191, 767. — 2. *Deml E., Oesterrle D., Wolf T.,* and *Greim H.:* Age-sex and strain dependent differences in the inducation of enzyme altered islands in rat liver by diethylnitrosamine. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 1981, 100, 125. — 3. ECETOC hepatocarcinogenesis in laboratory rodents relevance for man. Monograph No 4, 1982. — 4. IARC International Technical Report No 83/001 Approaches to classifiying chemical carcinogens according to mechanism of action IARC Lyon, 1983. — 5. International Commision for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens Publication Mut. Res. 1984, 9, 133. — 6. *Ito N., Tsuda H.:* Comparision of various promoting agents on the induction of preneoplastic lesions in the rat liver. IRCDB Cancergram Modification of Carcionogenesis Series CK"4 No 84/04 1982. — 7. *Jensen R. K., Sleight S. D.:* Hepatic tumor-promoting ability of 3,3', 4,4', 5,5'-heksabromobiphenyl the interrelationship between toxicity, induction of hepatic microsomal drug metabolizing enzymes, and tumor-promoting ability. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1983, 71, 163. — 8. *Kitawaga T., Sugano H.:* Enhancing of phenobarbital on the development og enzyme — altered islands and hepatocellular carcinomas initiated by 3'-methyl-4(dimethyl-amino)azobenzene or diethylnitrosamine. Gann. 1964, 69, 679. — 9. *Koide H., Oda T. W.:* Enzymologia kliniczna. *E. Szczeklik* PZWL 1974. — 10. *Krygier-Stojałowska A., Godlewski H. G.:* Topochemiczne metody badań komórek i tkanek. PWN 1975.

11. *Kuhlmann W. D., Krischan R., Kunz W., Guenthner T. M., Oesch F.:* Focal elevation of liver microsomal epoxide hydrolase in early preneoplastic stage and its behaviour in the further course of hepatocarcinogenesis. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1981, 98, 417. — 12. Manual of Histologic and Special Staining Technices. Mc Graw — Hill Book Company INC 1960, 124. — 13. *Scherer E. and Erumelet P.:* Foci of altered liver cells induced by a single lose of diethylnitrosoamine and partial hepatoctomy. Their contribution to hepatocarcinogenesis in the rat. European J. Cancer 1975, 11, 145. — 14. *Scherer E.,* and *Erumelot P.:* Kinetics of induction and growth of enzymedeficient islands involved in hepatocarcinogenesis. Cancer Res. 1976, 36, 2544. — 15. *Schulte Herman R., Ohole G., Schuppler J.:* Enhanced proliferation of putative preneoplastic cells in rat liver folloving treatment with the tumor promoters phenobarbital, hexachlorocyklohexane, steroid compound and nafenopu. Cancer Res. 1981, 41, 62. — 16. *Shinozuka H., Lombard B.:* A comparative study of the efficacy of four barbiturates as promotores of the development of gamma-glutamyltranspeptidase — positive foci in the liver of carcinogen treated rats. Carcinogenesis 1982, 3 (9), 1017. — 17. *Squire R. A.:* Ranking animals carcinogens: a proposed regulatory approach. Science 1981, 214, 880. — 18. *Steffen J.:* Element etiopatogenezy nowotworów. Mechanizmy transformacji, promocji i progresji. Nowotwory 1983, 33, 89. — 19. *Syrowatka T., Palut D.:* Problemy związane z badaniem pestycydów na ich działanie mutagenne (kancerogenne). Roczn. PZH, 1982, 33, 268. — 20. *Wachstein M., Meisel E.:* Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiologic pH. Am. J. Clin. Pathol. 1957, 27, 13.

21. *Weisburger J. H., Willams S. M.:* Chemical Carcinogens in: *Doul J., Klessen D. C., Amdur M. D.:* Toxicology the Basis Sciences of Poisons. Co Inc. NY 1980, 81. — 22. *Williams S. M.:* Classification of genotoxic and epigenetic carcinogens using liver culture assay. Ann. Ny Acad. Sci. 1980, 349, 273. — 23. *Williams G. M.:* Liver carcinogenesis: the role for some chemicals of an epigenetic mechanism of liver-tumor promotion involving medification of the cell membrane IC RDB cancergram Modification of carcinogenesis, 1982, Series CKO4 No 88/04, 21.

Dn. 1987.02.24.
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24.