

MARIA PEŹIOŁ-LASZCZYŃSKA, DANUTA WOŹNIAK, LARYSSA OŁOWSKA

ZMIANY MORFOLOGICZNE I HISTOENZYMATYCZNE W WĄTROBIE MYSZY BIAŁEJ PO ZATRUVANIU FENOLEM W WARUNKACH KRÓTKOTRWAŁEJ I PRZEWLEKŁEJ EKSPOZYCJI

Z Zakładu Histologii i Embriologii Instytutu Biostruktury Pomorskiej Akademii
Medycznej w Szczecinie
Kierownik: doc. dr hab. H. Olędzka-Słotwińska

Opisano zmiany morfologiczne i histoenzymatyczne w wątrobie myszy białej wywołane 5-dniowym i 5-miesięcznym podawaniem fenolu w stężeniach 5, 50 i 500 mg/dm³ wody studziennej. Stwierdzono zwyrodnienie komórek wątrobowych jak również zmiany w intensywności odczynów enzymów oddechowych i hydrolitycznych.

Powszechnie wiadomo, że do wód powierzchniowych są stale odprowadzane duże ilości różnego rodzaju produktów, które są wytworem działalności przemysłu, rolnictwa a także i warunków egzystencji człowieka.

Do skażeń niebezpiecznych dla życia hydrosfery zaliczyć można związki fenolowe [11]. Związki te po przedostaniu się do organizmów żywych mogą wywoływać działanie toksyczne, lub komplikować proces uzdatniania wody. Z tego też względu zagadnienie to budzi ciągle żywe zainteresowanie, mimo że problemem tym zajmuje się wielu badaczy od szeregu lat [5, 10, 11, 12, 13].

Fenol wprowadzony do przewodu pokarmowego wchłania się bardzo szybko. W ustroju związek ten ulega sprzężeniu z kwasem glukuronowym lub siarkowym i wydalaniu z moczem. Częściowo zostaje utleniony do produktów o budowie chinoidowej [11]. Połączenia substancji toksycznych z kwasem glukuronidowym i siarkowym są związkami polarnymi i nie ulegają łatwo resorpcji zwrotnej w jelicie. Mogą one ulegać resorpcji zwrotnej, jeżeli zostaną uprzednio zhydrolizowane [10].

Według Williamsa i wsp. [cyt. za 7] fenole mogą wywierać toksyczne działanie na organizm jedynie w postaci wolnej nie sprzężonej z kwasem glukuronowym lub siarkowym. Jeżeli jednak proces sprzężenia ulegnie jakiemuś zakłóceniu, lub dawka fenolu jest tak duża, że sprzężanie przebiega wolniej, następuje zatrucie. Unieczynnianie substancji toksycznych odbywa się zasadniczo w wątrobie. Siateczka endoplazmatyczna gładka odgrywa zasadniczą rolę w procesach biotransformacji zarówno wewnątrzustrojowych produktów przemian jak i substancji obcych — ksenobiotyków [6].

Ponieważ wątroba jest głównym narządem zaangażowanym w procesie biotransformacji związków fenolowych wydawało nam się celowe prześledzić zmiany morfologiczne i histoenzymatyczne w tym narządzie.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 40 samcach myszy białych (*Mus musculus*) szczepu CFW, dojrzałych płciowo, o masie od 25 do 28 g. Przez cały okres trwania eksperymentu zwierzęta karmiono standardową paszą granulowaną dla myszy typu LSM.

Zarówno w doświadczeniu krótkotrwałym trwającym 5 dni jak i w przewlekłym trwającym 5 miesięcy, zwierzęta podzielono na 3 grupy doświadczalne (A, B, C) oraz grupę kontrolną (K).

Fenol podawano w roztworach wodnych w następujących stężeniach: w grupie A — 5 mg fenolu/dm³ wody studziennej, w grupie B — 50 mg fenolu /dm³ wody studziennej i w grupie C — 50 mg fenolu/dm³ wody studziennej. Po przeliczeniu odpowiadało to: w gr. A — 0,09 mg/kg masy ciała, w gr. B — 0,9 mg/kg m. c. i w gr. C — 9 mg/kg m. c. myszy.

W warunkach krótkotrwałej i przewlekłej ekspozycji roztwory wodne fenolu wprowadzano dożołądkową sondą metalową w ilości 0,5 ml dziennie, jednorazowo, w godzinach południowych. W ten sam sposób otrzymywały wodę studzienną myszy z grupy kontrolnej.

Zwierzęta, którym podawano fenol przez okres 5 dni, 5-ciu miesięcy oraz zwierzęta grupy kontrolnej, dekapitowano po upływie 24 godz. od podania ostatniej dawki badanego związku.

Materiał do badań pobierano natychmiast po dekapitacji zwierząt. Wycinki wątroby utrwalano w oziębionym płynie Bakera (+4°C) i na otrzymanych skrawkach wykonano metodą precypitacyjną Gomoriego [9] odczyn na fosfatazę kwaśną (FK) oraz metodą Wachsteina i Meisel [9] odczyn na adenozynotrójfosfatazę (ATP-azę). Do pozostałych badań histoenzymatycznych wycinki wątroby zamrażano suchym lodem i krojono w kriostacie. Na otrzymanych skrawkach wykonano odczyny na następujące enzymy: glukozo-6-fosfatazę (G-6-F) metodą Wachsteina i Meisel [9] oraz enzymy oddechowe: dehydrogenazę bursztynianową (DB) wg Nachlasa [9] i oksydazę cytochromową (OC) wg Burstona [9]. Materiał do badań morfologicznych utrwalano w płynie Schaffera, a skrawki parafinowe barwiono hematoksyliną i eozyną (H—E).

WYNIKI BADAŃ

I. Badania morfologiczne (barwienie H-E)

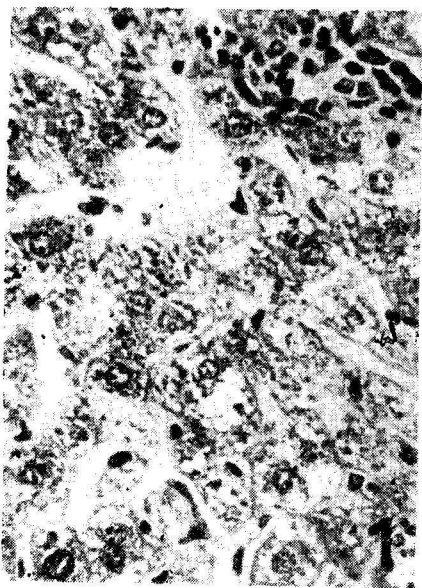
Grupa kontrolna (K)

W obrazie histologicznym miąższ wątroby wykazywał prawidłową budowę. Budowa zrazikowa i beleczkowa narządu była zachowana, a komórki wątrobowe posiadały jednolicie kwasochłonną cytoplazmę.

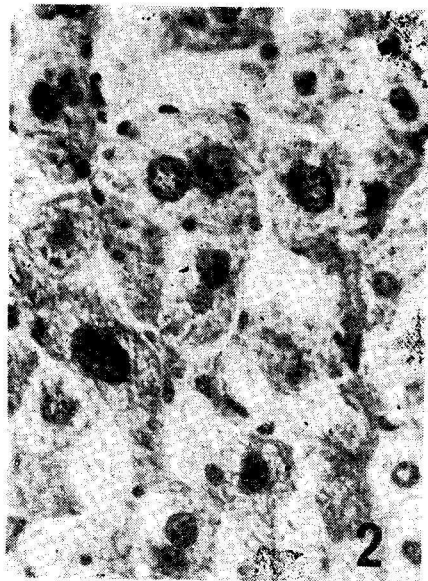
Zatrucie krótkotrwałe (5 dni). W wątrobie zwierząt otrzymujących fenol przez okres 5 dni stwierdzono zmiany w komórkach miąższu. Nasilenie tych zmian było proporcjonalne do wielkości stosowanej dawki. W gr. A stwierdzono tylko objawy słabego przekrwienia oraz w hepatocytach położonych najbliższej przestrzeni wrotno-żółciowej skupienie grudek chromatyny na obwodzie jąder. W gr. B zmiany były podobne lecz nieco silniej wyrażone. W gr. C natomiast poza zmianami powyżej opisanymi obserwowano w hepatocytach strefy zewnętrznej zrazika wątrobowego wakuolizację cytoplazmy.

Zatrucie przewlekłe (5 miesięcy). W doświadczeniu przewlekłym, podobnie jak i w doświadczeniu krótkotrwałym, nasilenie zmian w komórkach wątrobowych było uzależnione od wielkości stosowanej dawki. W gr. A i B w hepatocytach zlokalizowanych najbliższej przestrzeni wrotno-żółciowej stwierdzono wakuolizację cytoplazmy, skupienie grudek chromatyny na obwodzie jąder oraz obrzęk pojedynczych komórek wątrobowych. Ponadto obserwowano niewielkie nacieki zapalne o przewodzie komórek limfoidalnych (ryc. 1). W grupie C zmiany były najsilniej wyrażone. Zarówno w części obwodowej jak i w okolicy żyły centralnej zrazika wątrobowego obserwowano obrzęk hepatocytów oraz wakuolizację cyto-

plazmy. Jądra niektórych komórek były powiększone, a pojedyncze, olbrzymie jądra wykazywały nieregularne kształty. Spotykano jądra pyknotyczne, ciemno, jednolicie barwiące się jak również jądra pęcherzykowe z pojedynczymi grudkami chromatyny (ryc. 2). Poza zmianami degeneracyjnymi obserwowano także ogniskową martwicę hepatocytów.



Ryc. 1. Niewielki naciek zapalny o przewodze komórek limfoidalnych w wątrobie myszy z gr. B zatrutej przewlekle fenolem. Barw. hematoks-eozyną pow. ok. 450x



Ryc. 2. Obrzęk licznych hepatocytów oraz pojedyncze olbrzymie jądra o nieregularnych kształtach w wątrobie myszy z gr. C zatrutej przewlekle fenolem. Barw. hematoks-eozyną pow. ok. 450x

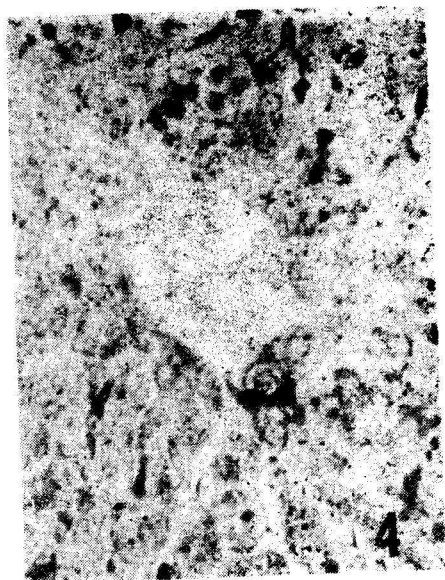
II. Badania histoenzymatyczne

Fosfataza kwasna (FK)

Na preparatach wątroby grupy kontrolnej drobnoziarnisty produkt reakcji był rozmieszczony wzdłuż kanalików żółciowych (ryc. 3). W doświadczeniu krótkotrwałym obserwowano w gr. A, B i C stopniowy wzrost odczynu na FK — najsilniej wyrażony w gr. C. Natomiast w doświadczeniu przewlekłym w gr. A i B odczyn był zbliżony do normy, a w grupie C stwierdzono spadek intensywności odczynu badanego enzymu w stosunku do kontroli (ryc. 4).

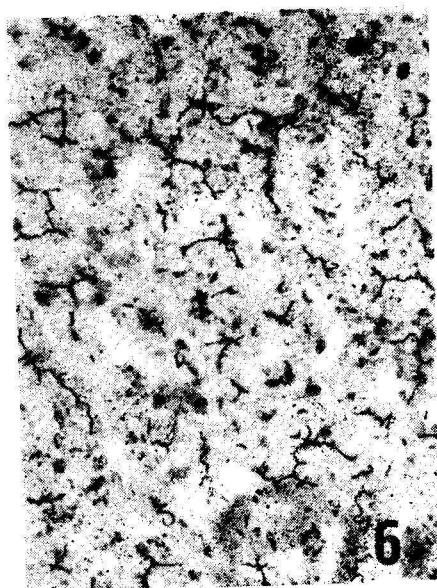
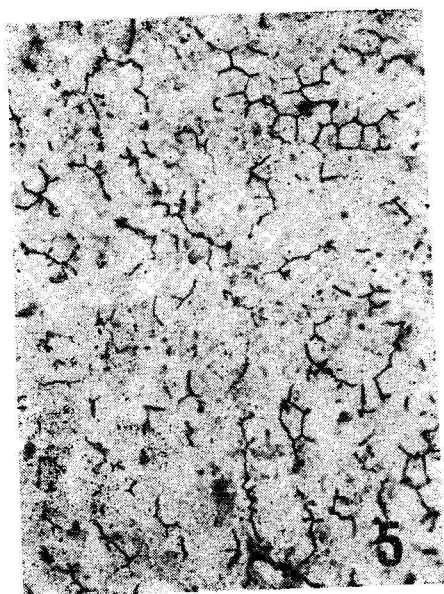
Adenozynotrójfosfataza (ATP-aza)

U zwierząt kontrolnych odczyn na ATP-azę był zlokalizowany w kanalikach żółciowych (ryc. 5). Po krótkotrwałym zatruciu stwierdzono w gr. A, B i C stopniowy wzrost intensywności odczynu badanego enzymu manifestującego się pogrubieniem kanalików żółciowych, najsilniej zaznaczonym w gr. C. Kanaliki te były czasami poprzerywane i lekko poskręcane z bocznymi odgałęzieniami dochodzącymi w głąb cytoplazmy hepatocytów (ryc. 6). Po przewlekłym zatruciu zwierząt fenolem



Ryc. 3. Odczyn na FK w komórkach wątrobowych myszy z grupy kontrolnej. Met. Gomoriego pow. ok. 450x.

Ryc. 4. Spadek intensywności odczynu na FK w komórkach wątrobowych myszy z gr. C. zatrutowanej przez okres 5 miesięcy fenolem. Met. Gomoriego pow. ok. 450x.



Ryc. 5. Odczyn na ATP-azę w komórkach wątrobowych myszy z grupy kontrolnej. Met. Wachsteina i Meisel pow. ok. 210x.

Ryc. 6. Wzrost intensywności odczynu na ATP-azę w komórkach wątrobowych myszy z gr. C zatrutowanej krótkotrwale fenolem. Met. Wachsteina i Meisel pow. ok. 210x.

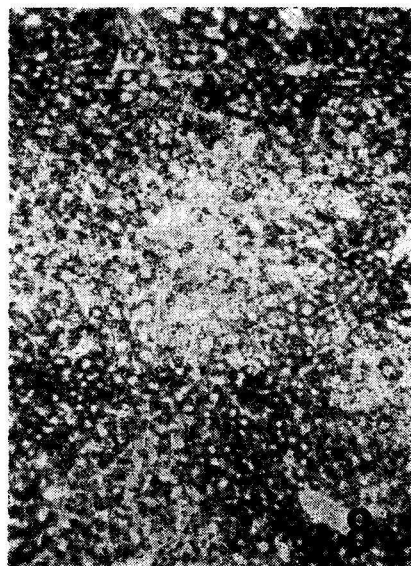
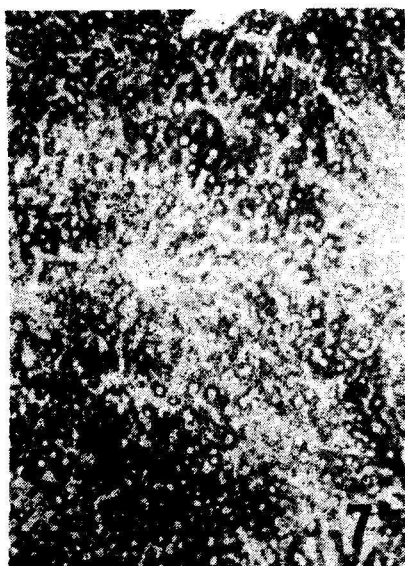
stwierdzono w gr. A i B również stopniowy wzrost intensywności odczynu na ATP-azę. W gr. C natomiast obserwowano znaczny spadek intensywności tego enzymu w porównaniu z normą.

Glukoza-6-fosfataza (G-6-F)

W grupie kontrolnej produkt reakcji na G-6-F był rozmieszczony w całej cytoplazmie hepatocytów. Silniejszy odczyn obserwowano w komórkach części obwodowej zrazika, słabszy w okolicy żyły centralnej. Po krótkotrwałej ekspozycji, w gr. A i B stwierdzono nieznaczny wzrost odczynu na G-6-F w porównaniu z grupą kontrolną, bez uchwytnych zmian w lokalizacji. Natomiast w gr. C zauważono znaczny spadek intensywności badanego enzymu w stosunku do kontroli zarówno w części centralnej jak i obwodowej zrazika. Podobnie po przewlekłej ekspozycji, w gr. A i B obserwowano stopniowy wzrost odczynu na G-6-F, a w gr. C silny spadek intensywności tego enzymu w stosunku do kontroli.

Dehydrogenaza bursztynianowa (DB) i oksydaza cytochromowa (OC)

U zwierząt kontrolnych odczyn na DB i OC (ryc. 7) w komórkach zrazika wątrobowego był silniejszy w części obwodowej, słabszy w okolicy żyły centralnej. W doświadczeniu krótkotrwałym, w gr. A i B stwierdzono nieznaczne nasilenie odczynu na te enzymy w porównaniu z grupą kontrolną (ryc. 8). W gr. C natomiast obserwowano gwałtowny spadek odczynu na DB i OC, tak w środkowej jak i obwodowej części zrazika. Podobne zmiany w intensywności odczynów na DB i OC jak w doświadczeniu krótkotrwałym stwierdzono w doświadczeniu przewlekłym.



Ryc. 7. Odczyn na OC w komórkach wątrobowych myszy z grupy kontrolnej. Met. *Burstone'a* pow. ok. 100x.

Ryc. 8. Niewielki wzrost intensywności odczynu na OC w komórkach wątrobowych myszy z gr. A zatrutowanej przez okres 5 dni fenolem. Met. *Burstone'a* pow. ok. 100x.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W literaturze, dotychczasowe wyniki badań po zatrutowaniu zwierząt fenolem nie zawsze są zgodne. Niektórzy autorzy jak: *Chyba* i wsp. [1], po długotrwałej ekspozycji tego czynnika toksycznego na białe szczury nie stwierdzili zmian histopatologicznych w wątrobie. Inni autorzy jak: *Kurnatowski* [8] po przewlekłym zatrutowaniu świnek morskich parami fenolu i *Grigoriew* [3] po 21-dniowym zatrutowaniu myszek i królików parami fenolu, dopatryli się w wątrobie tych zwierząt dość rozległych zmian patologicznych. W świetle tych faktów można wnioskować, że zwierzęta laboratoryjne są w różnym stopniu odporne na zatrucie fenolem. Znajduje to również potwierdzenie w pionierskich badaniach *Deichmanna* i wsp. [2], którzy wykazali, że najbardziej wrażliwe na zatrucie fenolem są świnki morskie, mniej króliki a najbardziej odporne są szczury. Nasze wyniki badań wskazują, że myszy należą do zwierząt bardzo wrażliwych na zatrucie fenolem.

Na podstawie uzyskanych wyników badań, można stwierdzić, że po zatrutowaniu myszy fenolem rozwijają się zmiany wsteczne manifestujące się zwyrodnieniem wodniczkowym oraz uszkodzeniem struktur białkowych doprowadzających niekiedy do martwicy komórek. Powszechnie wiadomo [4], że zwyrodnienie wodniczkowe związane jest z pojawieniem się w cytoplazmie hepatocytów wodniczek, które, jak wyjaśniają badania w mikroskopie elektronowym, najczęściej powstają na skutek poszerzenia kanałów siateczki endoplazmatycznej. Stwierdzona przez nas wielopostaciowość komórek wątrobowych, w trakcie przeprowadzonego doświadczenia znajduje także potwierdzenie w badaniach innych autorów [3].

Badania histoenzymatyczne wykazały zaburzenie czynności ważnych enzymów odpowiedzialnych za metabolizm hepatocytów. Można przypuszczać, że toksyczne działanie fenolu na komórki wątrobowe wywołało zaburzenie oddychania wewnątrzkomórkowego wyrażające się w doświadczeniu krótkotrwałym i przewlekłym w gr. C gwałtownym spadkiem intensywności odczynu na DB i OC. Za ogólnym zaburzeniem procesów metabolicznych w hepatocytach przemawiają również zmiany intensywności i innych odczynów enzymatycznych: ATP-azy, G-6-F i FK. Stopniowy wzrost intensywności odczynu na FK w doświadczeniu krótkotrwałym w gr. A, B i C i w doświadczeniu przewlekłym w gr. A i B jest prawdopodobnie wynikiem wzmożonego działania enzymów lizosomalnych.

Tak jak i w innych narządach, podobnie i w wątrobie, nasilenie odczynu na FK przemawia za wzrostem procesów litycznych, a także wskazuje na procesy degeneracyjne zachodzące w komórkach. Po krótkotrwałej ekspozycji w gr. A, B i C i po przewlekłej w gr. A i B stwierdzono również wzrost odczynu na G-6-F. Ponieważ enzym ten jest markerem sieci endoplazmatycznej gładkiej związanej z biotransformacją ksenobiotyków [12], można obserwowany wzrost odczynu na G-6-F interpretować jako udział tej sieci w procesie detoksykacji fenolu. Wyniki badań wskazują także, że po przewlekłym zatrutowaniu fenolem w gr. C, gdzie dawka wynosiła 9 mg/kg m. c. myszy, dochodzi do spadku intensywności odczynu wszystkich badanych enzymów. Można przypuszczać, że spadek ten jest prawdopodobnie związany z pogłębiającymi się zmianami zwyrodnieniowymi, mającymi swoje odbicie w badaniach morfo-

logicznych. Być może, że i zwyrodnieniu temu ulegają białka enzymatyczne.

Podsumowując należy wziąć pod uwagę również to, że zmiany obserwowane w hepatocytach, wywołane podawaniem fenolu, są między innymi wynikiem takich czynników jak: wielkości stosowanej dawki oraz czasu trwania eksperymentu.

WNIOSKI

1. Krótkotrwale i przewlekłe zatrucie zwierząt fenolem wywiera działanie hepatotoksyczne pod postacią zmian zwyrodnieniowych oraz powoduje zaburzenie badanych układów enzymatycznych.

2. Nasilenie zmian morfologicznych i histoenzymatycznych w wątrobie jest uzależnione od wielkości stosowanej dawki jak również i czasu trwania doświadczenia.

M. Пензиол-Лациньска, Д. Возняк, Л. Оловска

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПЕЧЕНИ БЕЛЫХ МЫШЕЙ ПОСЛЕ ИНТОКСИКАЦИИ ФЕНОЛОМ В УСЛОВИЯХ КРАТКОВРЕМЕННОЙ И ХРОНИЧЕСКОЙ ЭКСПОЗИЦИИ

Резюме

Исследовалось влияние кратковременного и хронического введения фенола на морфологические и гистохимические изменения в печени белых мышей. Исследование изменений в этом органе казалось целесообразным, так как печень является основным органом, участвующим в процессах биотрансформации феноловых соединений. Эксперимент был произведен на белых мышах породы CFU, которых в кратковременном и хроническом экспериментах подразделили на контрольную группу (К) и 3 экспериментальных группы (А, Б, В). Водный раствор фенола вводили животным внутривентрикулярно через металлический зонд в дозе 0,5 мл/сутки в течение 5 дней и 5 месяцев. В группе А вводили 5 мг фенола в 1 мл колодезной воды, в группе Б — 50 мг фенола/мл и в группе В — 500 мг фенола в 1 мл колодезной воды. Животных декапитировали через 24 часа после введения последней дозы исследуемого вещества.

Препараты окрашивали гематоксилином и эозином, а также проводили реакции следующих ферментов: кислой и щелочной фосфатазы, глюкозо-6-фосфатазы, АТФ-азы, сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы. Результаты исследований показали, что кратковременная и хроническая интоксикация животных фенолом оказывает гепатотоксическое действие в виде морфологических изменений, а также производит нарушение исследуемых энзиматических систем. Обращено внимание на то, что наблюдаемые изменения в гепатоцитах, вызванные введением фенола, зависят в частности от таких факторов, как: величина вводимой дозы и продолжительность эксперимента.

M. Peziol-Laszczyńska, D. Woźniak, L. Ołowska

MORPHOLOGICAL AND HISTOENZYMATIC CHANGES IN THE LIVER OF WHITE MICE AFTER PHENOL POSONING DURING SHORT-TERM AND LONG-TERM EXPOSURE

Summary

The effects of short-term and long-term administration of phenol were studied on the morphological and histoenzymatic changes in the liver of white mice. It was believed to be useful to study these changes because the liver is the main organ taking part in the process of biotransformation of phenol compounds. The experiment was carried out on CFW white mice divided in the short-term and long-term studies into a control group and 3 experimental groups (K, A, B, C). Aqueous solutions of phenol were administered through a gastric metal tube in

daily amounts of 0.5 ml during 5 days or 5 months. Group A received 5 mg of phenol in 1 dcm³ of well water, group B — 50 mg/dcm³, group C — 500 mg/dcm³. The animals were decapitated 24 hours after the last dose. Histological sections were stained with hematoxylin and eosin and reactions were performed for the following enzymes: acid phosphatase, glucose-6-phosphatase, adenosinetriphosphatase, succinic dehydrogenase and cytochrome oxidase. The results showed that short-term and long-term poisoning of the animals with phenol exerted a hepatotoxic effect with appearance of degenerative changes and disturbances of the studied enzymes. Attention is called also that changes observed in the hepatocytes after phenol poisoning are due, among others, to such factors as the size of the administered dose and duration of exposure.

PIŚMIENNICTWO

1. Chyba A., Szulińska G., Wójcik J., Czyż E.: Wpływ fenolu podawanego z powietrzem i wodą na białe szczury w warunkach długotrwałej ekspozycji. *Roczn. PZH*, 1974, 25, 627. — 2. Deichmann W. B., Kitzmiller K. V., Witherup S.: Phenol studies chronic phenol poisoning with special reference to the effects upon experimental animals of the inhalation of phenol vapor. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 1944, 14, 273. — 3. Grigoriew Z. E.: Toksyczność lietuszczych wieszczestw smoły połukoksowania torfa. *Gig. i Sanit.*, 1953, 2, 26. — 4. Groniowski J.: Patomorfologia. PZWL, Warszawa, 1974. — 5. Gross S., Kurnatowski A., Wrońska T.: Frakcje białek surowicy krwi świńek morskich zatrutowanych parami fenolu. *Med. Pracy*, 1957, 8, 385. — 6. Jones A. L., Mills E. S.: Ultrastructural concepts of drug metabolism. I. The hepatocyte structure and function. *Amer. J. Drug Alcohol Abuse*, 1974, 1/1, 111. — 7. Kongiel-Chabło I.: Wpływ produktów rozkładu fenolu w wodzie chlorowanej na organizm zwierzęcy. *Roczn. PZH*, 1976, 27, 673. — 8. Kurnatowski A.: Zmiany anatomopatologiczne w niektórych wewnętrznych narządach świńek morskich przewlekłe zatrutowanych parami fenolu. *ŁTN*, Łódź, 1960. — 9. Pearse A. G. E.: *Histochemistry Theoretical and Applied*, Churchill, LTD, London, 1961. — 10. Przeździecki Z.: *Biologiczne przemiany substancji toksycznych*. PWN, Warszawa, 1976. — 11. Rusiecki W., Kubikowski P.: *Toksykologia współczesna*. PZWL, Warszawa, 1977. — 12. Williams R. T.: *Detoxication mechanism*. 2 nd. ed. Chapman — Hall, London, 1959. — 13. Wójcik J.: Aktywność białych szczurów jako wskaźnik szkodliwości fenolu. *Roczn. PZH*, 1975, 26, 21.

Dn. 17.III.1980 r.

70-451 Szczecin, ul. Wielkopolska 25/9