

JANUSZ A. MADEJ, HAMDY SALEM

Aktywność wybranych niespecyficzných fosfataz oraz alfa-esterazy w narządach świnek morskich w ostrym i przewlekłym zatruciu Karbatoxem

Z Zakładu Anatomii Patologicznej Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego AR we Wrocławiu

„Karbatox zawiesinowy 75”, zawierający 75% substancji aktywnej 1-naftylo-N-metylokarbaminianu, znalazł zastosowanie w ochronie roślin, tępieniu owadów i ektopasożytów zwierząt domowych oraz jako środek grzybobójczy. Substancje czynne tego związku hamują aktywność esteraz cholinowych (20), jednak znacznie słabiej i krócej aniżeli związki fosforoorganiczne (1, 12). Hamowanie to jest łatwo odwracalne i aktywność esteraz wraca do normy już po 1—3 dniach od chwili zatrucia Karbatoxem (1).

Wśród prac nad toksycznym działaniem Karbatoxu u zwierząt (1, 7, 8, 9, 11, 12, 15, 18) tylko w jednej z nich (8) przedstawiono obraz zmian histochemicznych w narządach kur — po zatruciu tym związkiem. Dlatego też w niniejszej pracy postanowiono prześledzić zachowanie się niektórych fosfataz niespecyficzných tj. fosfatazy zasadowej (FZ) i fosfatazy kwaśnej (FK) oraz esterazy niespecyficznej (EN) — alfa-esterazy w narządach świnek morskich i sprawdzić, w jakim stopniu aktywność tej ostatniej jest hamowana przez Karbatox.

Materiał i metody

Do badań użyto 20 dorosłych świnek morskich, samców, w wieku 8 miesięcy, o wyrównanym ciężarze ciała (600 g). Zwierzęta trzymano i karmiono według ogólnie przyjętych norm i podzielono je na trzy grupy:

I grupa doświadczalna (zatrucie ostre) — 10 zwierząt, którym jednorazowo podano *per os* do żołądka (sondą igłową) Karbatox w ilości 500 mg/kg c.c. w 3 ml wody destylowanej,

II grupa doświadczalna (zatrucie przewlekłe) — 5 zwierząt, którym podawano czterokrotnie *per os* Kar-

batox (jak wyżej) w ilości 200 mg/kg c.c. w wodzie destylowanej, w odstępach tygodniowych,

III grupa kontrolna — 5 zwierząt, którym podawano *per os* wodę destylowaną.

Zwierzęta z grupy I zabijano przez skrwawienie po 24 godzinach od chwili rozpoczęcia doświadczenia, a zwierzęta grupy II po 1 miesiącu. W identycznym czasie zabijano zwierzęta kontrolne. Bezpośrednio po zabiciu zwierząt pobierano od nich wycinki z nerek, wątroby, płuc i śledziony, utrwalano je w zimnym płynie Bakera przez 18 godzin i krojono z nich skrawki mrożone grubości 10 mikronów. FZ wykrywano metodą precypitacyjną Gomoriego (5), a FK metodą Gomoriego w modyfikacji Vorbrodta (22, 23). Oba enzymy ujawniano inkubując skrawki przez 40 minut w temp. 37°C z wyjątkiem nerek, które przy FZ inkubowano przez 10 minut. EN ujawniono metodą Nachlas-Seligmana (14) w modyfikacji Gomoriego (6), inkubując skrawki w temp. 18°C 5 i 10 minut. Kontrolę reakcji enzymatycznych dla wszystkich enzymów wykonywano na skrawkach narządów bez użycia substratu (kontrola dodatnia).

Jednocześnie pobierano do badań histopatologicznych wycinki nerek, wątroby, śledziony i płuc, utrwalano w 7% zbuforowanej formalinie i barwiono rutynowo hematoksyliną Delafielda-cozyną.

Wyniki

Wyniki badań histoenzymatycznych w narządach świnek morskich przedstawiono schematycznie w tab. 1.

Fosfataza zasadowa: w nerkach zwierząt kontrolnych wyraźny odczyn na FZ lokalizuje się na poziomie rąbka szczoteczkowego kanalików krętych. U zwierząt doświadczalnych grupy I notuje się silny wzrost reakcji, przy niezmienionej jak w kontroli lokalizacji enzymu. W grupie II odczyn w rąbku szczoteczkowym kanalików jest na poziomie kontroli, pojawia się natomiast w komórkach mesangium kłębka nerkowego.

W wątrobie zwierząt kontrolnych reakcja dodatnia obejmuje sieć nacyniową, błony komórkowe hepa-

Tab. 1. Odczyny histoenzymatyczne w narządach świnek morskich w ostrym i przewlekłym zatruciu Karbatoxem

Narządy	Grupy zwierząt	Zatrucie ostre			Zatrucie przewlekłe		
		FZ	FK	EN	FZ	FK	EN
Nerki	K	++	++	+++	++	++	+++
	D	+++	+	++	++	+	++
Wątroba	K	++	+++	++	++	+++	++
	D	++	+	+	+	+	+
Płuca	K	+	++	++	+	++	++
	D	+	+	+	+	+	+
Śledziona	K	+	+	+	+	+	+
	D	+++	++	+++	++	++	+++

Objaśnienia: K = zwierzęta kontrolne; D = zwierzęta doświadczalne; + = odczyn dodatni; ++ = odczyn silnie dodatni; +++ = odczyn bardzo silnie dodatni; FZ = fosfataza zasadowa; FK = fosfataza kwaśna; EN = esteraza niespecyficzna.

tocytów narządu oraz komórki Browicz-Kupffera. Przy zatruciu ostrym (grupa I), wyraźny wzrost reakcji obserwuje się w komórkach Browicz-Kupffera, a słabszy w ścianie żył śródkowych i naczyń triady wątroby. W grupie II natomiast, reakcja dodatnia w komórkach Browicz-Kupffera wyraźnie obniża się w stosunku do kontroli, zaś w naczyniach krwionośnych jest podobna jak w grupie I.

W płucach świnek kontrolnych reakcja dodatnia lokalizuje się w śródbłonku i przydane naczyń, nabłonku oskrzelikowym, komórkach ścian pęcherzyków oraz błonach komórkowych limfoblastów i limfocytów grudek chłonnych. W I grupie reakcja lokalizuje się podobnie jak w kontroli, ale jest nierównomierna. Najsilniej reagują nabłonki oskrzelików i śródbłonki naczyń, słabiej zaś komórki ścian pęcherzyków płucnych. W II grupie, nierównomierną reakcję notuje się tylko w nabłonku oskrzelików. Część komórek tego nabłonka reaguje silniej, część zaś znacznie słabiej jak w kontroli.

W śledzenie zwierząt kontrolnych reakcja dodatnia lokalizuje się w ścianie naczyń krwionośnych, komórkach żernych miazgi czerwonej oraz błonach komórkowych limfoblastów i limfocytów grudek chłonnych. W zatruciu ostrym (grupa I) znaczny wzrost reakcji notuje się w komórkach żernych miazgi czerwonej oraz limfocytach, leżących na obwodzie grudek chłonnych. W zatruciu przewlekłym natomiast (grupa II), wzrost reakcji obserwuje się tylko w limfocytach grudek chłonnych.

Fosfataza kwaśna: w nerkach zwierząt kontrolnych, drobnoziarnisty odczyn, odpowiadający lizosomom, zlokalizowany jest w cytoplazmie komórek nabłonka kanalików krętych i samotnych komórkach mezenchymalnych tkanki podścieliskowej. U świnek grupy I obserwuje się spadek reakcji dodatniej, przy zachowanej ilości i wielkości lizosomów. W grupie II reakcja ma charakter dyfuzyjny i jest rozproszona w całej cytoplazmie komórek.

W wątrobie zwierząt kontrolnych dodatni odczyn występuje w odpowiadających lizosomom ziarnistościach cytoplazmy, wyznaczających biegun wydzielniczy komórki, w cytoplazmie komórek Browicz-Kupffera oraz w śródbłonku naczyń krwionośnych. W obu grupach doświadczalnych notuje się wyraźny spadek reakcji, zwłaszcza w strefie centralnej zrazika wątrobowego. Natomiast wzrost dodatniej reakcji wykazują komórki Browicz-Kupffera, pod postacią grubych ziarnistości, oraz nieliczne leukocyty, tkwiące w świetle naczyń krwionośnych.

W płucach grupy kontrolnej wyraźny, drobnoziarnisty odczyn obejmuje nabłonki oskrzelików, fagocyty przegródek międzypęcherzykowych i grudek chłonnych oraz makrofagi. W I i II grupie obserwuje się wyraźny spadek odczynu przy takiej samej lokalizacji jak u zwierząt kontrolnych.

W śledzenie zwierząt obu grup doświadczalnych obserwuje się intensywniejszą reakcję w komórkach żernych grudek chłonnych, niż u zwierząt kontrolnych.

Esteraza niespecyficzna: w nerkach zwierząt kontrolnych równomierny dodatni odczyn występuje w komórkach kanalików krętych i zbiorczych, jak również w endocytach pętli nacyniowych kłębuszków Malpighiego. U świnek obu grup doświadczalnych notuje się wyraźny spadek reakcji w nabłonku kanalików krętych nerek, silniejszy przy podstawie komórek, słabszy przy ich wierzchołku.

W wątrobie zwierząt kontrolnych równomierny, wyraźny odczyn ujawniają hepatocyty (zwłaszcza leżące tuż przy żyłce centralnej), nabłonki międzyzrazikowych przewodów żółciowych i naczynia triady narządu. Przy zatruciu ostrym (grupa I) następuje spadek reakcji w hepatocytach obwodowych stref zrazika, wzrost zaś w komórkach Browicz-Kupffera i ujawnienie się reakcji w leukocytach, tkwiących w świetle naczyń krwionośnych. Przy zatruciu przewlekłym (grupa II) reakcja jest nierównomierna, sil-

na w centrum zrazika, bardzo słaba w strefie pośredniej i na obwodzie.

W płucach świnek kontrolnych intensywna reakcja uwidacznia się w nabłonku oskrzelików i nabłonku oddechowym, a nieco słabsza w śródbłonku sieci nacyniowej oraz makrofagach grudek chłonnych. W I grupie doświadczalnej obserwuje się nieznaczny wzrost reakcji w fagocytach ścian pęcherzyków płucnych, w grupie II natomiast, silniej niż w kontroli, reagują makrofagi grudek chłonnych, a reakcja w nabłonku oskrzelików jest nierównomierna.

W śledzenie zwierząt kontrolnych wyraźnie reagują histocyty i makrofagi miazgi czerwonej i białej oraz śródbłonki naczyń zatok. W obu grupach doświadczalnych notuje się bardzo silny wzrost odczynu w namnożonych komórkach żernych narządu. W cytoplazmie zaś makrofagów obserwuje się liczne, silnie reagujące wakuole.

Badaniem histopatologicznym w nerkach, wątrobie i płucach zwierząt grupy I stwierdza się nieznaczne zaburzenia hemodynamiczne, sprowadzające się do znacznego wypełnienia krwią całej sieci nacyniowej tych narządów. W śledzenie oraz narządach świnek grupy II i III nie dostrzega się istotnych zmian.

Omówienie wyników

Z przeprowadzonych badań wynika, że Karbatox w nieznacznym stopniu obniża aktywność esterazy niespecyficznej w wątrobie świnek morskich, co manifestuje się osłabieniem odczynu na ten enzym w strefach obwodowych zrazików narządu. Równocześnie stwierdzono w obrębie zrazików wątroby spadek aktywności fosfatazy kwaśnej, przy jednoczesnym wzroście fosfatazy zasadowej.

Podobne zmiany jak w badaniach własnych, obserwowali u kur Houszka i wsp. (8), po doświadczalnym zatruciu zwierząt Sevinem oraz Udenem. Autorzy (8) wykazali, że uszkodzenie obwodu zrazika wątrobowego jest uwarunkowane blokadą esterazy niespecyficznej — odpowiedzialnej między innymi za degradację tłuszczów w komórce. Karbatox zatem, podobnie jak i związki fosforoorganiczne (1, 12, 15) powoduje obniżenie aktywności esterazy niespecyficznej w wątrobie świnek morskich. Spadek zaś aktywności fosfatazy kwaśnej w wątrobie, świadczy prawdopodobnie o funkcjonalnej depolaryzacji hepatocytów, oraz o zakłóceniu ich czynności wydzielniczych (21, 25).

Istotną zmianą obserwowaną w badaniach własnych była wzmożona aktywność fosfatazy zasadowej w obrębie naczyń krwionośnych wątroby. Spostrzeżenie to ma duże znaczenie, gdyż jak wiadomo, odczyn na FZ w naczyniach krwionośnych pozwala na dokładne przesledzenie ukrwienia badanej tkanki czy narządu. Ponadto wzrost aktywności tego enzymu w obrębie naczyń krwionośnych może świadczyć o ich zwiększonej przepuszczalności (4).

Według Jopka i wsp. (9) Karbatox może wywoływać w organizmie zwierzęcym wstrząs chemiczny o charakterze anafilaktycznym. Cytowani autorzy (9) obserwowali bowiem w obrazie mikroskopowym narządów kur, zatrutych tym związkiem, zaburzenia w krążeniu (przekrwienia, wylewy krwi), spowodowane zwiększoną przepuszczalnością naczyń krwio-

nośnych, a więc podobne do zaburzeń, jakie obserwuje się przy zatruciu zwierząt związkami fosforoorganicznymi. Obserwacje te, potwierdzają również nasze badania u świńek morskich przy ostrym ich zatruciu, u których podobnie jak u kur (9) obserwowano silne przekrwienie całej sieci naczyniowej wątroby, nerek i płuc.

Już po 24 godzinach, a więc po jednorazowym zastosowaniu Karbatoxu, obserwowano spadek aktywności fosfatazy kwaśnej w nerkach, przy czym ilość i wielkość lizosomów w komórkach nabłonka nie wykazywała różnic. Świadczy to prawdopodobnie o tym, że jednorazowa dawka Karbatoxu powoduje obniżenie aktywności metabolicznej lizosomów lub zmniejsza przepuszczalność ich lipoproteinowych błon. Natomiast w zatruciu przewlekłym (grupa II) obserwowano w nerkach reakcję dyfuzyjną, która jest wyrazem uszkodzenia błon lizosomalnych i przechodzenia zawartości lizosomów do cytoplazmy komórki (2, 3, 13, 24). Podobne uszkodzenie nerek u świńek morskich obserwowano po naskórnym stosowaniu u nich 4% roztworu Neguvonu (10), gdyż związek ten (15, 16) podobnie jak i Karbatox, szybko wydalany jest z moczem z organizmu zwierzęcego.

Wyraźny wzrost aktywności esterazy niespecyficznej, fosfatazy kwaśnej i zasadowej notowano w makrofagach, histiocytach i limfocytach śledziony oraz płuc, jak również w komórkach Browicz-Kupffera w wątrobie. Szczególnie wyraźnie dało się to zauważyć w makrofagach śledziony przy EN. W cytoplazmie tych komórek spotykano bowiem liczne, silnie reagujące wakuole trawienne (fagosome). Wzrost zatem aktywności badanych fosfataz (FK i FZ) i esterazy niespecyficznej w tych komórkach, świadczy o zwiększonej ich czynności fagocytarnej (19). Podobny wzrost aktywności komórek żernych przy doświadczalnym zastosowaniu u zwierząt związków fosforoorganicznych obserwowali inni autorzy (10, 17).

Piśmiennictwo

1. Chmielewski B. N.: *Veterinaria*, Moskwa 8, 59, 1966.
2. De Duve C.: *Exptl. Cell Research Suppl.* 7, 169, 1959.
3. De Duve C., Pressman B. C., Gianetto R., Watiour R., Appelmanns F.: *Biochem. J.* 50, 604, 1959.
4. Fortak W.: *IV Sympozjum PTH*, 1966.
5. Gomori G.: *Microscopic Histochemistry*, The Univer. of Chicago Press, 1953.
6. Gomori G.: *J. Histochem. Cytochem.* 3, 479, 1955.
7. Hassan A.: *Biochemical Pharmacology*, Pergamon Press, 1971.
8. Houszka M., Jopek Z., Salem H.: *Weterynaria*, Wrocław 30, 129, 1973.
9. Jopek Z., Kotz J.: *Weterynaria*, Wrocław 30, 121, 1973.
10. Madej J. A., Salem H.: *Weterynaria*, Wrocław 33, 131, 1975.
11. Maier — Bode H.: *Ostat. Pestic. Izdat. „Mir”*, 1966 (tłum. ros.).
12. Mikołajczak B.: *Weterynaria*, Wrocław 30, 91, 1973.
13. Molendowicz J.: *Folia Histochem. Cytochem.* 6, 261, 1968.
14. Nachlas M. M., Seligman A. M.: *J. natn. Cancer Inst.* 9, 415, 1949.
15. Paulson G. G., Feil V. J.: *Poult. Sci.* 5, 48, 1969.
16. Puyear R. L.: *Toxic. appl. Pharmac.* 22, 621, 1972.
17. Roodyn D. B.: *Enzyme cytology*, Academic Press, 1968.
18. Smalley H. E., Hara P. J.: *Toxic. appl. Pharmac.* 14, 409, 1969.
19. Szmigielski S., Litwin J., Zupańska B., Królikowska J.: *Post. Hig.* 19, 1, 1965.
20. Weil S., Woodside M. D., Cespenster C. P., Smytsh J. R.: *Toxic. appl. Pharmac.* 21, 390, 1972.
21. Wolna E.: *Post. Hig.* 2, 215, 1968.
22. Vorbrodt A.: *Folia morph.* 4, 271, 1956.

23. Vorbrodt A.: *Folia morph.* 2, 143, 1957.
24. Vorbrodt A.: *Skrypt metod histochemicznych*, PWN, 1964.
25. Vorbrodt A., Stępieński Z., Krzyżowska-Gruca S.: *Folia histoch.* 4, 7, 1966.

Adres autora: dr Janusz A. Madej, ul. Piastowska 45/10, 50-361 Wrocław.

Мадей Я. А., Салем Х. — Активность неспецифической щелочной (FZ) и кислой (FK) фосфатаз и неспецифической альфа-эстеразы (EN) у морских свинок при острой и хронической интоксикации препаратом Карбатох.

Исследованиям подвергли морских свинок при экспериментальной интоксикации препаратом „Karbatox-zawiesina 75” (содержащим 75% активной субстанции 1-нафтил-N-метилкарбамата). Установили, что препарат вызывает понижение активности неспецифической альфа-эстеразы в печени и сильную стимуляцию фагоцитарной активности макрофагов организма. Установили однако, что как однократное так и многократное применение препарата Karbatox не вызывает существенных гисто-патологических изменений во внутренних органах этих животных.

Madej J. A., Salem H. — The activity of chosen non-specific phosphatases and alpha-esterase in organs of guinea-pigs in acute and chronic Carbatox toxicosis.

There was determined the activity of alkaline phosphatase, acid phosphatase and non-specific esterase in internal organs of guinea pigs experimentally intoxicated with Carbatox 75 (75% of the active substance, i-naphthyl-N-methylcarbamate). It was found a decrease of the activity of non-specific esterase in the liver of intoxicated animals and strong enhancement of phagocytosis. Typical histopathological lesions were not found in internal organs of animals after one or manyfold application of the drug.

MITTAL K. R., INGRAM D. G.: Czynniki wpływające na bakteriocydę surowicy krwi owiec. (Factors involved in bactericidal activity of sheep serum). *Am. J. vet. Res.* 36, 1183—1187, 1975 (8).

Określono działanie bakteriobójcze pełnej krwi, plazmy i surowicy owiec w stosunku do trzech serotypów *Escherichia coli*. Stwierdzono, że najsilniejsze działanie bakteriobójcze w stosunku do szczepu 078:K80 (B) i Lilly wykazuje plazma, następnie pełna krew i surowica. Układ przeciwciało-dopełniacz normalnej surowicy wywiera działanie bakteriobójcze na postacie R szczepu Lilly, natomiast tego działania nie wywierają poszczególne komponenty tego układu. Bakteriocydia surowicy nie zależy od występowania w niej przeciwciał skierowanych przeciwko otoczkom lub rzęskom bakteryjnym. Przypuszcza się natomiast, że przeciwciała o działaniu bakteriobójczym to przeciwciała skierowane przeciwko antygenowi R, który leży wewnątrznie w stosunku do polisacharydowego antygeny „O”.

G.

BUYSSCHER E. V., BERMAN D. T.: Przygotowanie monowalentnych surowic dla immunoglobulin cieląt przy użyciu immunosorbentów z agarozą. (Preparation of monospecific antiserums against porcine immunoglobulins using agarose-linked immunosorbents). *Am. J. vet. Res.* 36, 1323—1326, 1975 (9).

W oparciu o metodę wytrącania immunoglobulin 50% roztworem siarczanu amonowego oraz rozdział chromatograficzny na kolumnach wypełnionych DEAE celulozą, wyizolowano z surowicy prosiąt i serwatki mleka macior immunoglobuliny klasy IgG, IgA i IgM. Otrzymano również na królikach specyficzne surowice odpornościowe dla poszczególnych klas immunoglobulin prosiąt. Monospecyficzność surowic dla łańcuchów gamma, alfa i mi uzyskano po absorpcji na agarozie z CNBr. Zaletą stosowania immunosorbentów jest możliwość wielokrotnego wykorzystania kolumn przez okres co najmniej 6 miesięcy.

G.