

KRYSTYNA IZDEBSKA-SZYMONA, JOANNA KOPEĆ-SZLĘZAK<sup>1)</sup>, EWA KOZŁOWSKA,  
NADZIEJA DRELA, SŁAWOMIRA PAŃCZYK<sup>1)</sup>

## CYTOTOKSYCZNOŚĆ NARZĄDOWA WYBRANYCH POLICYKLICZNYCH WĘGLOWODORÓW AROMATYCZNYCH (WWA) U MYSZY<sup>\*)</sup>

### ORGANIC CYTOTOXICITY OF SOME POLICYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS (PAHs) IN MICE

Zakład Immunologii Uniwersytetu Warszawskiego

Kierownik: prof. dr hab. K. Izdebska-Szymona

<sup>1)</sup> Zakład Fizjopatologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii

00-957 Warszawa, ul. Chocimska 5

Kierownik: doc dr hab. J. Kopeć-Szlęzak

*Zbadano cytotoksyczność narządową 7, 12-dimetylobenzenantracenu (DMBA), 3-metylocholantrenu (3-MC) oraz benzo(a)pyrenu (BaP) u myszy. Stwierdzono, że DMBA wykazała najwyraźniejsze działanie toksyczne na komórki narządu limfatycznego (śledziony), natomiast 3-MC i B(a)P spowodowały przede wszystkim zmiany struktury komórkowej wątroby i nerek. Uzyskane wyniki wskazują, że efekty działania zastosowanych WWA uwarunkowane są rodzajem związku a nie wielkością zastosowanej dawki.*

#### WSTĘP

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) stanowią najczęstsze zanieczyszczenia chemiczne środowiska. Powstają w dużych ilościach podczas pirolizy substancji organicznych, zachodzącej w wielu procesach przemysłowych, a także w warunkach niepełnego ich spalania. Występują w powietrzu, w wodzie, w glebie i w żywności [11]. Do organizmów żywych przedostają się przez skórę, układ oddechowy i pokarmowy.

Wiadomo, że pyły zawieszane w powietrzu, np. Górnośląskiego Okręgu Przemysłowego (G.O.P.) zawierają ponad 250 policyklicznych i heterocyklicznych węglowodorów aromatycznych, metale ciężkie i inne niezidentyfikowane związki chemiczne [1]. Nasze poprzednie badania wykazały silne działanie immunotoksyczne tych pyłów w narządach limfatycznych myszy [8]. Znana jest rola WWA w karcinogenezie i mutageniezie [5, 10, 12], inne toksyczne skutki ich działania (np. immunotoksyczne) są nadal przedmiotem zainteresowania [9]. Celem niniejszej pracy jest określenie cytotoksycznego działania wybranych WWA: 7, 12-di-metylobenzenantracenu (DMBA), 3-metylocholantrenu (3-MC) oraz benzo(a)pyrenu (B(a)P) na narządy limfatyczne i mięszone myszy.

<sup>\*)</sup> – praca finansowana przez KBN (projekt nr 1911/4/91)

## MATERIAŁ I METODY

Odczynniki: 7, 12-di-metylobenzatracen (DMBA), Sigma; 3-metylocholanren (3-MC), Sigma; benzo(a)pyren (B(a)P), Sigma; 20% roztwór wodny DMSO.

Zwierzęta: Myszy szczepu *Balb/c*, samice 6–8 tygodniowe z hodowli Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie. Wszystkie myszy poddano kwarantannie przed doświadczeniem. Zwierzęta przez cały czas znajdowały się w pomieszczeniu o temperaturze 22–24°C w 12-godzinnym cyklu światła i ciemności. Myszy otrzymywały pasze standardową i wodę *ad libitum*. Wyboru dawki dokonano na podstawie badań wstępnych, w których myszom podawano WWA w dawkach: 25, 50 i 100 mg/kg masy ciała. Do doświadczenia wybrano dawkę 110 mg/kg. Myszy otrzymywały jednorazowo drogą dootrzewnową dawkę 100 mg/kg zawiesiny WWA w 0,5 ml 20% roztworu wodnego DMSO. Po okresie 7 dni oznaczano: względną masę narządów, zawartość komórek w śledzionie, oceniano strukturę tkankową wątroby, nerek, śledziony i grasicy. Zastosowano grupę kontrolną myszy, które otrzymywały tylko roztwór DMSO. Wszystkie myszy (w liczbie 30) przebywały w takich samych warunkach. Zawartość komórek w grasicy i śledzionie była obliczana w sposób rutynowy. Względną masę narządów obliczano jako stosunek masy narządu (w g) do 10 g masy ciała. Preparaty mikroskopowe do analizy histologicznej wykonano po utrwaleniu fragmentów wątroby, nerki, śledziony i grasicy w acetonie w 4°C i po zatopieniu w parafinie. Skrawki narządów o grubości 7  $\mu\text{m}$  barwiono rutynowo hematoksyliną i eozyną. Analizę rozmieszczenia interfazalnych organizatorów jąderkowych (AgNOR) w jądrach komórek wątroby wykonano po zastosowaniu metody srebrzenia wg *Howella i Blacka* [6]. Zdjęcia wykonano przy powiększeniu mikroskopowym 400 x.\*

Uzyskane dane liczbowe wyrażono jako średnią  $\bar{x} \pm \text{SD}$ . Ponadto zastosowano test *Kruskal-Wallis* i analizę wariancji (ANOVA) do ustalenia znaczących różnic między danymi z kontroli i z grup doświadczalnych dla  $p < 0,05$ .

## WYNIKI

## W z g l ę d n a m a s a n a r z ą d ó w

Nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian wartości względnej masy grasicy, wątroby i nerek myszy po podaniu badanych związków, z wyjątkiem śledziony.

## Z m i a n y w ś l e d z i o n i e

DMBA powoduje obniżenie wagi śledziony z 0,121 do 0,042 g, a tym samym względnej masy (z 0,51 do 0,21). Jednocześnie dochodzi do zmniejszenia liczby komórek w śledzionie z 4,7 do 0,7. B(a)P powoduje również obniżenie wagi śledziony z 0,121 do 0,047 g i względnej masy z 0,51 do 0,34. Nie zaobserwowano jednak zmiany liczby komórek w tym narządzie. Jak wynika z przedstawionych danych skutek działania DMBA na śledzionę badanych myszy jest silniejszy niż B(a)P. (Ryc. 1)

## Z m i a n y h i s t o l o g i c z n e

## a) Narządy limfatyczne

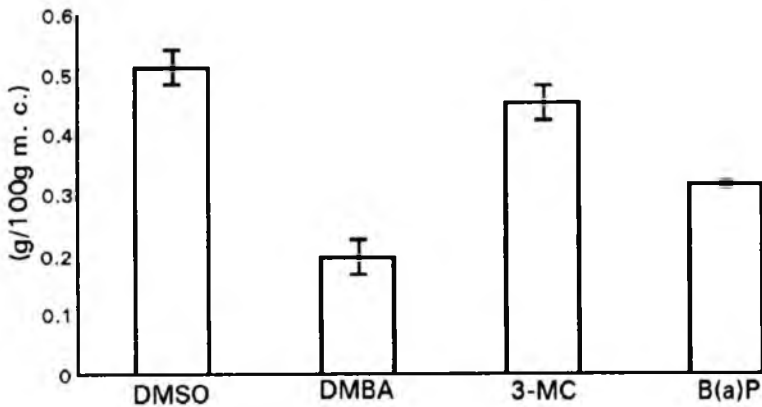
W grasicy po zastosowaniu DMBA obserwowano bardziej luźny układ komórek kory (w porównaniu do kontroli), i wyraźniej zaznaczony aniżeli po 3-MC i B(a)P.

W śledzionie po 3-MC i B(a)P zanotowano jedynie niewielką przewagę miążgi czerwonej nad białą, która była wyraźnie oddzielona od miążgi czerwonej.

## b) Wątroba i nerka.

---

\*Autorki dziękują p. *Krystynie Ozimek* z Zakładu Fizjopatologii Instytutu Hematologii i Transfuzjologii za pomoc techniczną w sporządzeniu preparatów mikroskopowych.



Ryc. 1. Względna masa śledziony myszy w 7 dni po podaniu 100 mg/kg masy ciała badanych związków: DMBA, 3-MC i B(a)P

Relative spleen weight of mice treated with PAHs: DMBA, 3-MC and B(a)P

Najważniejsze zmiany w strukturze tkankowej wątroby i nerek zaobserwowano po narażeniu myszy na 3-MC. W zrazikach wątrobowych stwierdzono ogniskową destrukcję hepatocytów i skupienia napływowych leukocytów pomiędzy komórkami, co wskazywało na powstanie ognisk zapalnych. Obserwowano także figury mitotyczne w hepatocytach, niekiedy nieprawidłowe, świadczące o zaburzeniach w przebiegu podziału komórkowego (Ryc. 2). W nerkach zanotowano miejscami zniszczoną cytoplazmę komórek kanalików oraz nieprawidłową strukturę pojedynczych kłębuszków nerkowych w korze nerkowej (Ryc. 3). Zastosowanie B(a)P wywołało w wątrobie zmiany o charakterze destrukcji hepatocytów i kłębuszków nerkowych w nerce, choć w mniejszym stopniu, aniżeli po 3-MC, natomiast po DMBA zmiany struktury tkankowej wątroby i nerek były niewielkie.

#### Interfazalny organizator jąderkowy (AgNOR) w hepatocytach

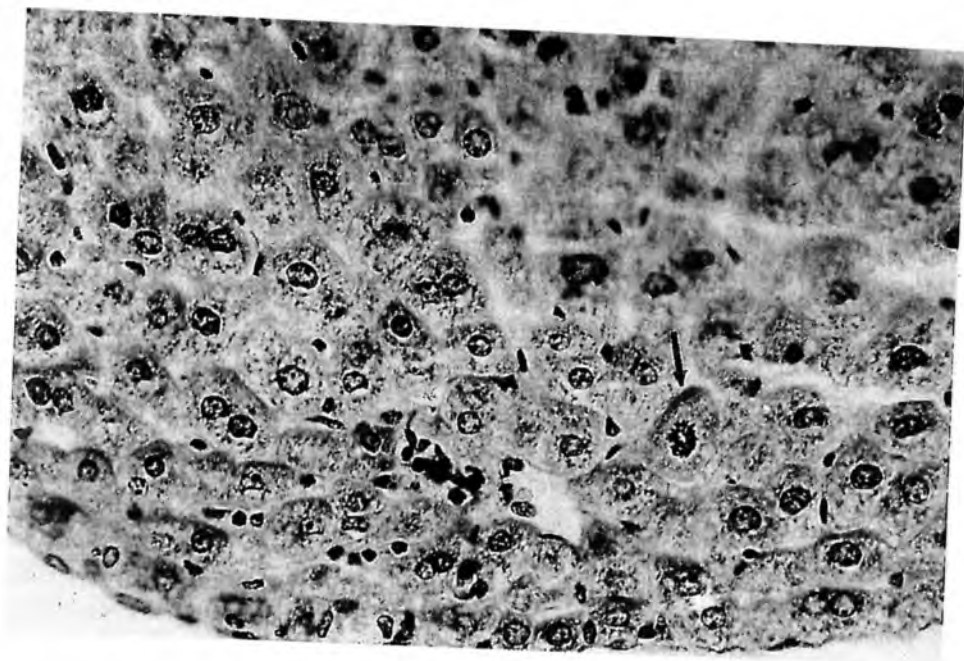
Zastosowanie metody srebrzenia interfazalnego organizatora jąderkowego wykazało jego obecność w jądrach komórek zrazików wątroby po intoksykacji wszystkimi badanymi WWA (Ryc. 4), choć wystąpiły różnice w wartościach odsetka hepatocytów z odpowiednią liczbą AgNOR (Tab. I)

Zwłaszcza podanie B(a)P wywołało w wątrobie wystąpienie najwyraźniejszych zmian w wartościach odsetka hepatocytów z jednym, czterema oraz sześcioma i więcej interfazalnymi organizatorami jąderkowymi (AgNOR) w porównaniu do grupy kontrolnej ( $p < 0,01$ ). Po podaniu 3-MC tylko odsetek hepatocytów z jednym organizatorem jąderkowym (AgNOR) okazał się istotnie podwyższony w porównaniu do kontroli ( $p < 0,01$ ), natomiast wahania wartości odsetka po DMBA były nieistotne.

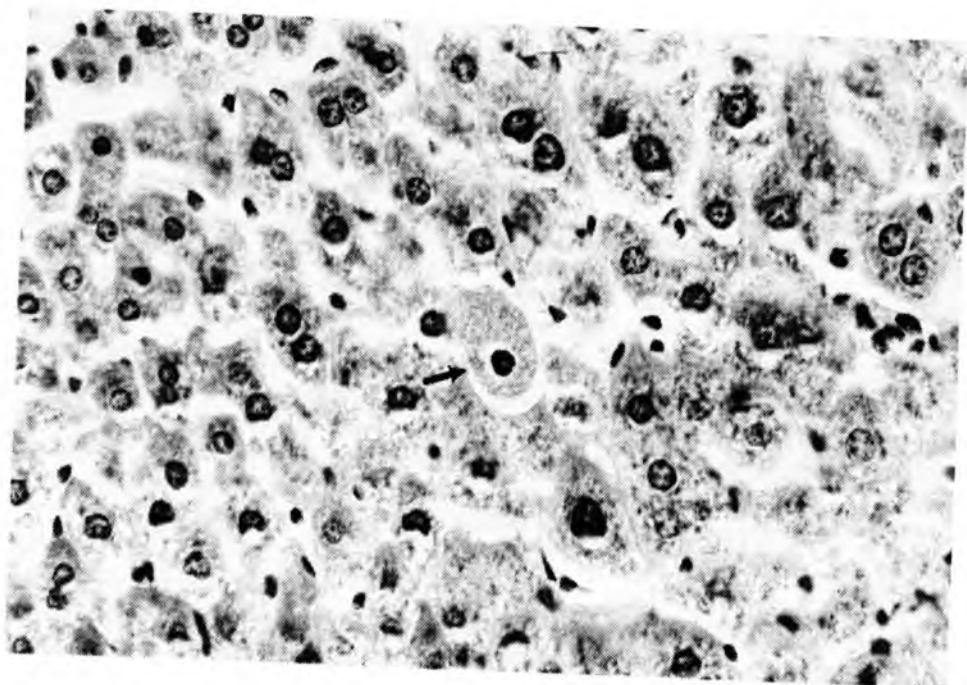
#### DYSKUSJA

Efekt toksyczny badanych związków zależy od drogi podania, czasu ekspozycji myszy i wielkości zastosowanej dawki. W niniejszych badaniach wybrano do analizy spośród

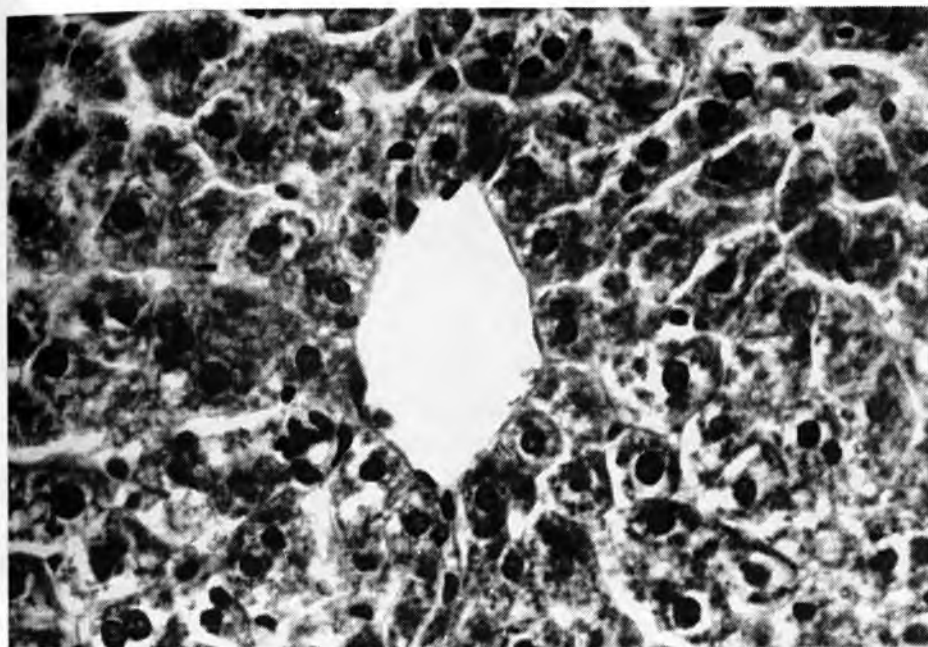
A



B



C



Ryc. 2. Fragmenty zrazika wątroby myszy po narażeniu 3-MC w porównaniu z grupą kontrolną:

- A – mitoza prawidłowa w stadium metafazy (strzałka)
- B – mitoza nieprawidłowa, tzw. C-mitotyzacja (strzałka)
- C – kontrola (HE, pow. mikr. 400x)

Liver of mice following administration of 3-MC:

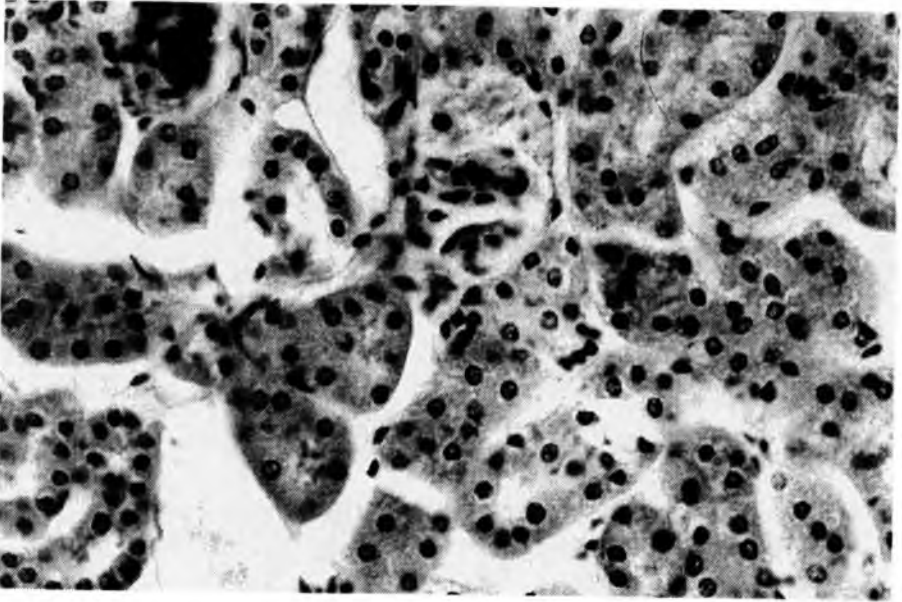
- A – normal metaphase – arrow,
- B – irregular mitotic figure: c – mitose – arrow,
- C – control mice (HE, 400x)

trzech dawek (25, 50 i 100 mg/kg masy ciała) dawkę najwyższą i dootrzewnową drogę podania badanych związków. Droga oddechowa może być mniej efektywna w wywoływaniu toksycznych skutków, ponieważ makrofagi płucne wychwytyują wdychane cząsteczki substancji chemicznych [4].

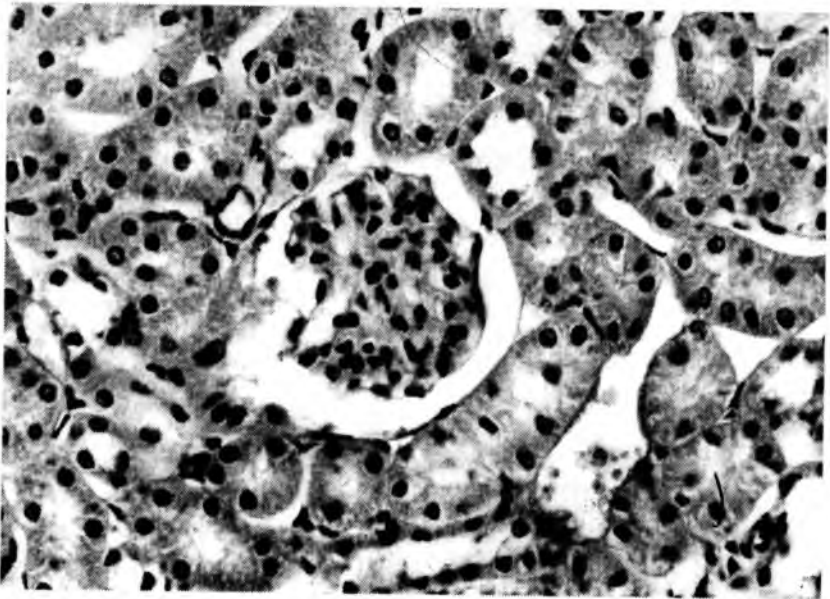
W naszych badaniach dotyczących toksycznego działania pyłów śląskich u myszy [8] zaobserwowano zmniejszenie masy grasicy i zawartości w niej komórek a także wyraźne zmiany strukturalne tego narządu. Natomiast w śledzeniu zmiany w badanych parametrach były mniej wyraźne. Na podstawie wyników uzyskanych w niniejszej pracy można wnioskować, że śledziona myszy jest narządem bardziej wrażliwym na działanie WWA aniżeli grasicą.

Wszystkie badane WWA powodowały obniżenie liczby splenocytów posiadających antygeny MHC II, co może być przyczyną zahamowania odpowiedzi immunologicznej w jej fazie indukcyjnej. Jedynie DMBA wywołał zwiększenie liczby splenocytów w fenotypie CD4+ i fenotypie CD8+. Natomiast 3-MS i B(a)P zwiększały liczbę splenocytów o fenotypie IgM+.

A



B



Ryc. 3. Fragment kory nerkowej po narażeniu myszy 3-MC w porównaniu z grupą kontrolną:

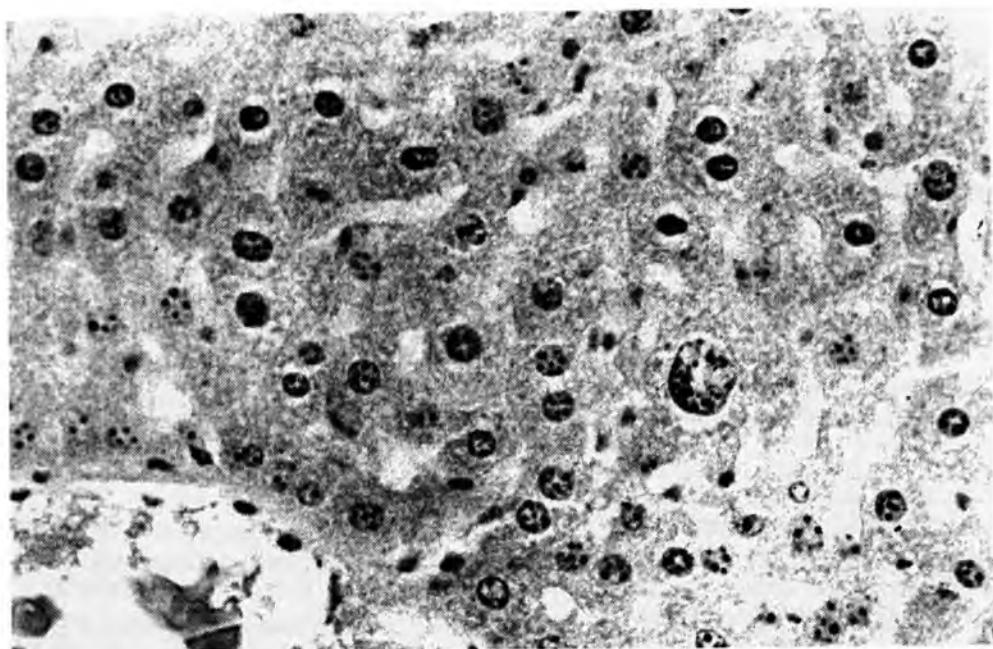
A – nieprawidłowe kłębuszki i kanaliki nerkowe

B – grupa kontrolna zwierząt (HE, pow. mikr. 400x)

Kidney of mice following administration of 3-MC:

A – damaged glomeruli and cortical tubules,

B – control mice (HE, 400x)



Ryc. 4. Interfazalne organizatory jąderkowe (AgNOR) w hepatocytach myszy po narażeniu B(a)P, (pow.mikr. 400x)  
Interphasal NOR in liver cells of mice after B(a)P administration, (AgNOR, 400x)

Tabela I. Interfazalny organizator jąderkowy (AgNOR) w hepatocytach myszy po podaniu WWA  
Interphasal nucleolar region (AgNOR) in hepatocytes of mice after PAHs administration

GRUPY n=6 (GROUPS)		NOR 1	NOR 2	NOR 3	NOR 4-5	NOR 6 i >
DMSO	$\bar{x}$	11,83	19,07	19,67	32,03	16,07
	SD	2,27	6,18	4,03	4,06	6,87
DMBA	$\bar{x}$	11,03	19,87	23,43	31,77	13,43
	SD	2,33	3,95	2,92	3,26	5,33
3MC	$\bar{x}$	15	20,2	19,97	30,63	14,2
	SD	1,95	3,33	1,1	3,51	2,96
B(a)P	$\bar{x}$	17,63	21,83	20,9	27,13	11,87
	SD	3,01	2,83	3,38	1,48	2,87

1. B(a)P-DMSO (NOR 1)  $p < 0,001$
2. 3-MC-DMSO (NOR 1)  $p < 0,003$
3. B(a)P-DMSO (NOR4-5)  $p < 0,001$
4. B(a)P-DMSO (NOR 6)  $p < 0,01$

Na podstawie analizy histologicznej można wnioskować, że wśród zastosowanych WWA największe zmiany hepatotoksyczne i nefrotoksyczne wywoływał 3-MC i nieco słabsze B(a)P. Zmianom tym towarzyszyło w grupie myszy po 3-MC pojawienie się podziałów komórkowych, co może sugerować procesy odnowy równoważące ubytek zniszczonych komórek. Występowanie nieprawidłowych figur mitotycznych wynika prawdopodobnie z wysokiej toksyczności 3-MC [7].

Według piśmiennictwa specyficzne srebrzenie interfazalnego organizatora jąderkowego (AgNOR), określające aktywność genów rybosomalnych, jest uważane za przydatne w określeniu aktywności komórek [2, 3]. Zatem – stwierdzone po podaniu B(a)P podwyższenie wartości odsetka hepatocytów tylko z 1 AgNOR może być związane z występowaniem komórek o zmniejszonej aktywności (a nawet o cechach destrukcji), zaś z 6-ma i więcej AgNOR – może wskazywać na obecność hepatocytów o zwiększonej aktywności syntetycznej.

### WNIOSKI

1. Spośród zastosowanych WWA najsilniejsze działanie cytotoksyczne w śledzionie wywołał DMBA, co wyraziło się obniżeniem masy śledziony i zawartości w niej komórek.

2. Najwyraźniejsze zmiany struktury tkankowej i komórkowej w wątrobie i nerce wystąpiły po podaniu 3-MC i B(a)P. W grupie myszy otrzymujących 3-MC ogniskowemu zniszczeniu hepatocytów towarzyszyło pojawienie się figur mitotycznych w wątrobie, a w grupie myszy po podaniu B(a)P – występowały zmiany odsetka hepatocytów z najwyższą i najniższą liczbą AgNOR.

K. Izdebska-Szymona, J. Kopeć-Szlęzak,  
E. Kozłowska, N. Dreła, S. Pańczyk

### ORGANIC CYTOTOXICITY OF SOME POLICYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS (PAHs) IN MICE

#### Summary

The cytotoxic effects of some PAHs: DMBA, 3-MC and B(a)P on the lymphatic organs, liver and kidney of mice have been investigated. These PAHs in doses of 100 mg/kg were dissolved in 0,5 ml 20% DMSO and were given intraperitoneally in female mice Balb/c. After 7 days, organs weight, cellularity in lymphoid organs and tissue structure of liver and kidney were analyzed.

The greatest effect of DMBA was observed on cellularity of spleen. 3-MC and B(a)P caused significant hepatotoxic and nephrotoxic changes. 3-MC induced focal destruction of hepatocytes and sometimes – irregular mitotic figures (c-mitosis). After B(a)P administration in liver cells were mainly observed the changes in distribution of interphase nucleolar organizer region (AgNOR). In kidney – irregular glomeruli and tubuli after 3-MC and B(a)P were noted. The above results may indicate that the cytotoxic effects of PAHs depend on the type of compound administered.

### PIŚMIENICTWO

1. Chorąży M., Szeliga J., Stróżyk M., Cimander B.: Ambient air pollutants in Upper Silesia: Partial chemical composition and biological activity. Environ. Health Persp. 102: Supl. 4, 1994,



61. – 2. *Colecchia M., Leopardi O.*: Evaluation of AgNOR count in distinguishing benign from malignant mesothelial cells in pleural fluids. *Patol-Res-Pract.* 1992, 188, 541. – 3. *Derenzini M., Tree D.*, : AgNOR proteins as a parameter of the rapidity of cell proliferation. *Zentralbl-Pathol.*, 1994, 140, 7. – 4. *Foth H.*: Role of the lungin accumulation and metabolism of xenobiotic compounds implications for chemically induced toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.*, 1995, 25, 165. – 5. *Hemminiki K., Grzybowska E., Chorąży M., Twardowska-Sauchka K., Sroczyński J.W., Putman K.L., Randerrath K., Philips D.H., Hewer A., Santella R.M., Perera F.P.*: DNA adducts in humans related to occupational and environmental exposure to aromatic compounds. In: *Complex Mixtures and Cancer Risk*, Eds. *H. Vainio, M. Sorsa, A.J. McMichael*, Lyon Int. Agency for Research and Cancer, 1990, pp 181. – 6. *Howell W.M., Black D.A.*: Controlled silver-staining of nucleolar organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 1990, 36, 1014. – 7. *Kostka G., Kopeć-Szłęczak J., Palut D.*: Early hepatic changes induced in rats by two hepatocarcinogenic organoholagen pesticides: bromopropylate and DDT. *Carcinogenesis*, 1996, 17, 407. – 8. *Kozłowska E., Krzystyniak K., Drela N., Grabarczyk P., Izdebska-Szymona K.*: Thymus-directed immunotoxicity of airborne dust particles from upper-silesia (Poland) under acute extrapulmonary studies in mice *J. Toxicol. Environ. Health.* 1996-(in press). – 9. *Negoro T., Linuma F., Watanabe M.*: Cellular induction of CD8+suppressor T cells by DMBA and TPA formation of CD4+suppressor/inductor T cells. *Cell. Immunol.*, 1996, 167, 216. – 10. *Palut D.*: Wybrane mechanizmy kancerogenezy chemicznej. *Roczn. PZH*, 1986, 37, 89.

11. *Wojtyniak B., Goryński P., Piekarski T.*: Air pollution and population health in Poland – selected issues. *Zbl. Bakt.*, 1994, 81, 317. – 12. *Wong S., Fournier M., Coderre D., Bańska W., Krzystyniak K.*: Environmental immunotoxicology. In: *Animal Biomarkers as Pollution Indicators*, Ed. *David Peakall, Chapman and Hall*, London, 1992, 167.

Otrzymano: 1996.05.20