

*Magdalena Wyszynska¹, Jerzy Stojko², Dorota Romaniuk³, Marcin Kasprzak³, Piotr Brukiewicz³, Mirosław Partyka³, Ewa Szaflarska-Stojko³, Agata Kabała-Dzik¹, Robert Kubina¹, Barbara Stawiarska-Pięta¹

Obserwacje nad osłonowym wpływem DNA czerwiu pszczelego na obraz morfologiczny płodu szczura po narażeniu matek na tetrachlorek węgla

¹Katedra i Zakład Patologii, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
Kierownik Katedry i Zakładu: dr hab. n. med. Barbara Stawiarska-Pięta

²Zakład Higieny, Bioanalizy i Badania Środowiska, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
Kierownik Zakładu: dr hab. n. med. Jerzy Stojko

³Polska Fundacja Apiterapii, Katowice
Prezes Fundacji: prof. dr hab. n. farm. Artur Stojko

OBSERVATION OF A PROTECTIVE EFFECT
OF BEE LARVAE DNA BASED
ON THE MORPHOLOGICAL PRESENTATION
OF A RAT FOETUS AFTER MATERNAL EXPOSURE
TO CARBON TETRACHLORIDE

SUMMARY

The aim of this work was to analyse the protective influence of the DNA from bee larvae towards rat foetus exposed to toxic actions of carbon tetrachloride.

Foetuses originating from rat females, receiving intraperitoneally carbon tetrachloride, showed massive intraperitoneal hemorrhages, characteristics of venostasis and focal necrosis of liver parenchyma. Hemodynamic disturbances were visibly decreased upon the influence of the DNA extract from bee larvae.

DNA extract from bee larvae shows protective action towards rat foetus exposed to carbon tetrachloride, causing significant weakening of the embryotoxic action. Additionally, the tested extract does not cause any changes in the physiological outcome of the pregnancy.

KEY WORDS: BEE LARVAE – PROTECTIVE EFFECT – RAT
FOETUS – EXPOSURE TO CARBON TETRACHLORIDE
– EMBRYOTOXICITY

Wstęp

Produkty pszczele dzięki zawartości związków pochodzenia roślinnego i zwierzęcego wykazują dużą aktywność biologiczną w stosunku do organizmu człowieka. Mają m.in. udokumentowane działanie przeciwdrobnoustrojowe, odnawiające, znieczulające oraz detoksykacyjne. Wykazują także zdolność stymulowania metabolizmu komórkowego i układowego oraz układu immunologicznego. Oprócz wartości odżywczych wykazują działanie biotyczne w stosunku do organizmu człowieka. Powyższe właściwości wy-

kają ze składu chemicznego tych związków. Zawierają one szereg aminokwasów, biopierwiastków, kwasów nukleinowych, węglowodanów, enzymów i kwasów organicznych (1-4).

Jednym z głównych kierunków obecnie prowadzonych badań naukowych jest szeroko pojęta ochrona rozwijającego się w łonie matki płodu narażonego na związki toksyczne.

Duży postęp cywilizacji niesie ze sobą narastające niebezpieczeństwo niekorzystnego wpływu środowiska na organizm człowieka. Dotyczy to w równym stopniu czynników fizycznych, zanieczyszczeń środowiskowych oraz powszechnego stosowania różnorodnych związków chemicznych, w tym preparatów leczniczych, których liczba i dostępność stale wzrasta. Podejście do ich stosowania jest szczególnie istotne dla kobiet w wieku rozrodczym, bowiem każdy lek lub narażenie na toksyny środowiskowe niesie za sobą potencjalne zagrożenie dla zdolności rozrodczych, przebiegu ciąży oraz zdrowia rozwijającego się płodu. Materiał genetyczny zarodka i płodu na skutek działania ksenobiotyków może ulec uszkodzeniu pod postacią różnorodnych mutacji, czego następstwem jest wystąpienie aberracji chromosomalnych i wad rozwojowych. Z kolei matka w okresie ciąży wykazuje zmniejszoną aktywność enzymów mikrosomalnych wątroby, przez co jest bardziej podatna na zatrucia (5).

Stosunkowo nowym kierunkiem farmakoterapii, z racji rozwoju technik biologii molekularnej, jest terapia genowa i możliwość wykorzystania czystego DNA. Całkowita eliminacja defektu genetycznego może nastąpić w wyniku korekty błędu w łańcuchu DNA w komórkach rozrodczych lub najpóźniej we wczesnym okresie zarodkowym. Znaczący rozwój

technik biotechnologii daje możliwości poszukiwania nowych surowców pochodzenia biogenego działających na poziomie molekularnym, bez wywoływania efektów ubocznych. Duże zainteresowanie dotyczy materiału genetycznego czerwiu pszczelego (DNA młodych postaci pszczół robotnic i trutni). Analiza właściwości ekstraktów z czerwiu pszczelego wskazuje na nowe możliwości badań ze względu na możliwość zastosowania DNA w nowoczesnej terapii. Szczególnie ze względu na rosnące w ostatnich latach zainteresowanie niekonwencjonalnymi metodami leczenia, zwłaszcza opartymi na związkach pochodzenia roślinnego oraz produktach pszczelich (1-4, 6).

Tetrachlorek węgla jest silną toksyną o znanym i udokumentowanym działaniu. Od lat stosowany jest przez badaczy wielu dziedzin w badaniach eksperymentalnych jako modelowy związek hepatotoksyczny i embriotoksyczny. Działanie to wynika z biotransformacji tego związku, która zachodzi głównie w wątrobie oraz ściśle wiąże się z toksycznym działaniem jego metabolitów, którymi są wolne rodniki trichlorometyloxy i trichlorometyloperoxyloxy. Tworzą one wiązania kowalencyjne z funkcjonalnie istotnymi komórkowymi makrocząsteczkami, takimi jak kwasy nukleinowe, białka, lipidy, osłabiając decydujące procesy ich metabolizmu (5, 7-9).

Niebezpieczne jest też narażenie na tetrachlorek węgla w aspekcie rozrodu. U samców wywołuje on trwałą niepłodność, na skutek dużej kumulacji toksycznych metabolitów w jądrach, a u ciężarnych samic łatwo przechodzi barierę łożyskową i powoduje liczne wady rozwojowe płodu, dotyczące szczególnie układu naczyniowego, a także zaburzenia organogenezy (8-12).

Materiał i metody

Materiał doświadczalny stanowiło 50 ciężarnych samic szczurów szczepu Wistar. Dobór zwierząt determinowany był ich dojrzałością płciową i fizyczną oraz przydatnością do rozrodu hodowlanego. Szczury o wadze 170 ± 20 g osiągały wiek około 80-100 dni.

Przedmiotem badań było DNA z czerwiu pszczelego, otrzymane w wyniku izolacji opartej na ekstrakcji fenolowo-chloroformowej. Badany apiterapeutyk podawany był dootrzewnowo w 3 dniu trwania ciąży. Celem sprawdzenia jego osłonowych właściwości wykorzystano związek o sprawdzonym działaniu embriotoksycznym – tetrachlorek węgla, który podawano samicom dootrzewnowo w 4, 10 i 14 dniu trwania ciąży.

Ciężarne samice podzielono na trzy podstawowe grupy – kontrolną K oraz dwie grupy doświadczalne: D1 i D2.

W grupie kontrolnej K, składającej się z 30 samic, wydzielono 3 podgrupy po 10 samic:

- K1 – ciężarne samice, u których przebieg ciąży nie był zakłócany;
- K2 – ciężarne samice, którym podano dootrzewnowo 50 μ g DNA z czerwiu pszczelego jednorazowo w 3 dniu trwania ciąży;
- K3 – ciężarne samice otrzymujące sól fizjologiczną w iniekcji dootrzewnowej w 4, 10 i 14 dniu trwania ciąży, aby ocenić wpływ tej ingerencji na przebieg ciąży.

Grupa doświadczalna D1 składała się z 10 samic otrzymujących dootrzewnowo tetrachlorek węgla w dawce 5 mg/kg m.c. w 4, 10 i 14 dniu trwania ciąży.

Grupę doświadczalną D2 stanowiło 10 samic otrzymujących dootrzewnowo tetrachlorek węgla w dawce 5 mg/kg m.c. w 4, 10 i 14 dniu trwania ciąży oraz DNA czerwiu pszczelego w ilości 50 μ g jednorazowo w trzecim dniu trwania ciąży.

W 21 dniu ciąży, dzień przed planowanym rozwiązaniem, zwierzęta usypiano. Do oceny histopatologicznej pobierano płody, które utrwalono w płynie Bouina; następnie zatapiano w parafinie, a z otrzymanych bloczków parafinowych wykonano preparaty histopatologiczne, które były barwione rutynowo hematoksyliną i eozyną.

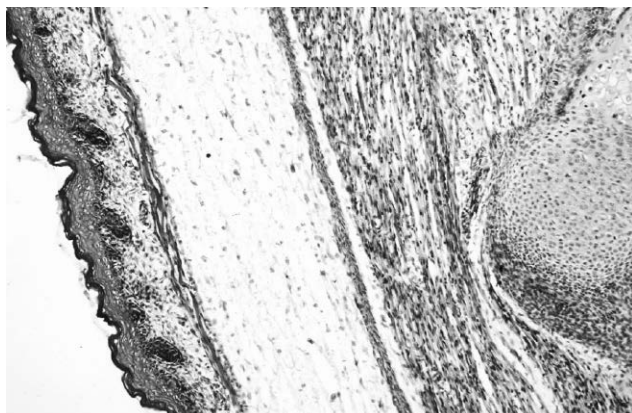
Wyniki

W obrazie mikroskopowym płodów pochodzących od samic, którym nie zakłócano przebiegu ciąży, nie stwierdzono zmian patologicznych. U jednego płodu zaobserwowano ogniskowe wylewy krwawe w jamie otrzewnej. W grupie kontrolnej K2 u badanych płodów stwierdzono prawidłową morfologię narządów wewnętrznych. W dwóch przypadkach odnotowano obecność płynu przesiękowego w jamie otrzewnej, natomiast u jednego z płodów ogniska przekrwienia mięszu wątroby. Z kolei w podgrupie kontrolnej K3 u dwóch płodów zaobserwowano rozluźnienie histostruktury mięszu wątroby, natomiast u jednego płodu widoczne były cechy zaburzeń w krążeniu pod postacią przekrwienia wątroby oraz rozluźnienie struktury przyczepów sieciowych i krezkowych.

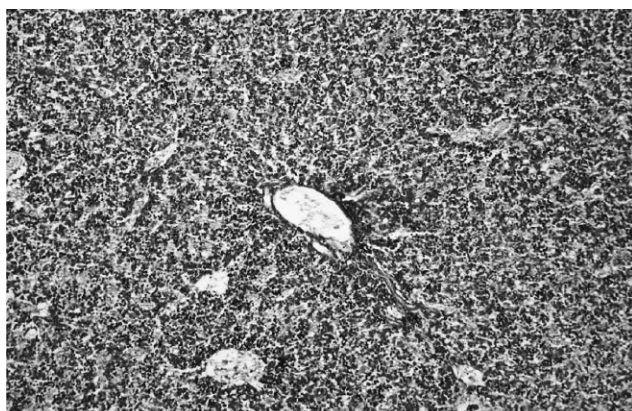
W podgrupie kontrolnej, w której zastosowano ekstrakt DNA czerwiu pszczelego, nie stwierdzono u płodów zmian patologicznych. Pojedyncze przypadki rozpoznania płynu przesiękowego w jamie otrzewnej oraz ogniskowe przekrwienie mięszu wątroby, nie wpłynęły na interpretację uzyskanych wyników badań histopatologicznych. Wyniki uzyskane w pozostałych podgrupach kontrolnych wskazują, że warunki hodowlane, w jakich został przeprowadzony eksperyment, nie wpływają na przebieg fizjologicznej ciąży oraz nie wywierają negatywnego działania na wewnątrzmaciczny rozwój płodu.

Mikrofotografie zamieszczone na rycinach 1-3 przedstawiają obrazy mikroskopowe płodów grup kontrolnych.

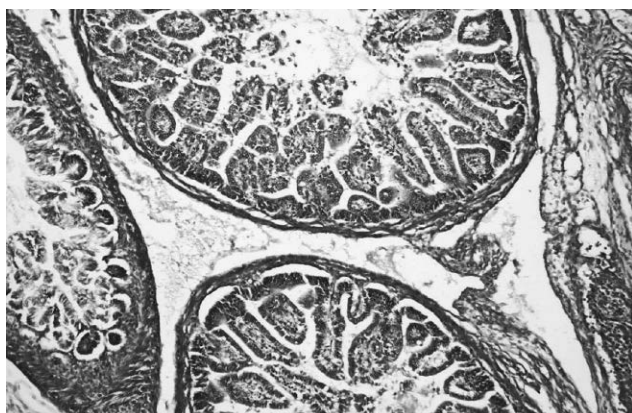
Zastosowanie tetrachlorku węgla w grupie doświadczalnej D1 spowodowało rozwój szeregu zaburzeń



Ryc. 1. Grupa kontrolna K. Prawidłowy obraz histologiczny skóry płodu. Barwienie H-E. Pow. mikr. 100 x.



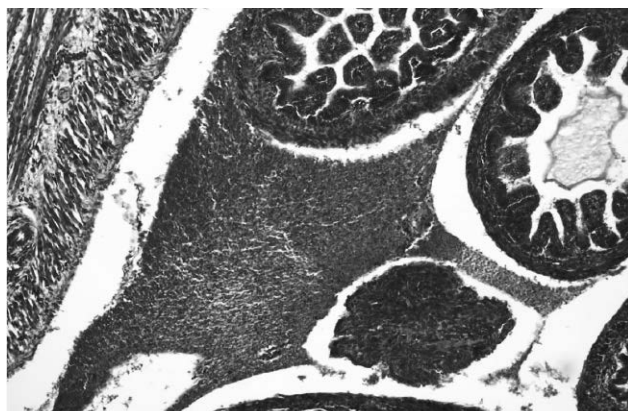
Ryc. 2. Grupa kontrolna K. Wątroba płodu. Obraz prawidłowy. Barwienie H-E. Pow. mikr. 100 x.



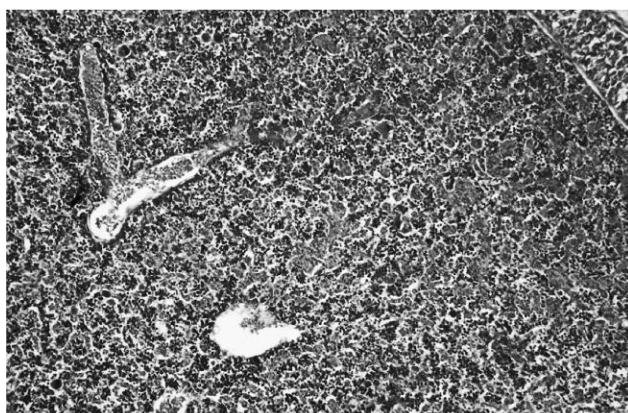
Ryc. 3. Grupa kontrolna K. Prawidłowy obraz mikroskopowy jamy otrzewnej. Widoczne przekroje przez jelita oraz naczynia przyczepów kręzkowych. Niewielka ilość płynu surowiczego. Barwienie H-E. Pow. mikr. 100 x.

morfologicznych w obrębie narządów wewnętrznych płodów, przemawiających za ich dysfunkcją czynnościową. Charakterystyczną zmianą obserwowaną w obrazach histopatologicznych wszystkich płodów, były masywne krwiaki w jamie otrzewnej (ryc. 4). Ponadto u jednego płodu tej podgrupy stwierdzono masywne przesięki w jamie otrzewnej i opłucnej. W wątrobach badanych zwierząt ujawniono także przekrwienie z cechami zastojów żylnego (ryc. 5) oraz ogniskową martwicę hepatocytów.

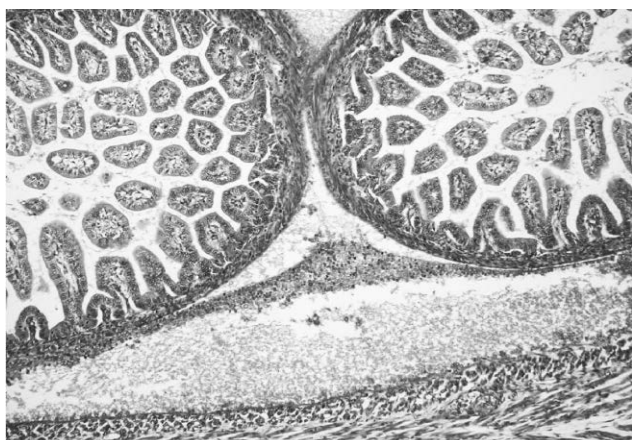
U płodów wywodzących się z grupy doświadczalnej D2, w której ciężarnym samicom podawano tetrachlorek węgla oraz ekstrakt DNA czerwiu pszczelego, stwierdzono ograniczone wylewy krwawe oraz płyn przesiękowy w jamie otrzewnej (ryc. 6). Struktura przyczepów sieciowych i krezki była prawidłowa, z kolei naczynia krwionośne były poszerzone i przepełnione krwią. W obrębie mięszu wątroby stwierdzono rozluźnienie histostruktury, natomiast u jednego płodu zaobserwowano przekrwienie (ryc. 7).



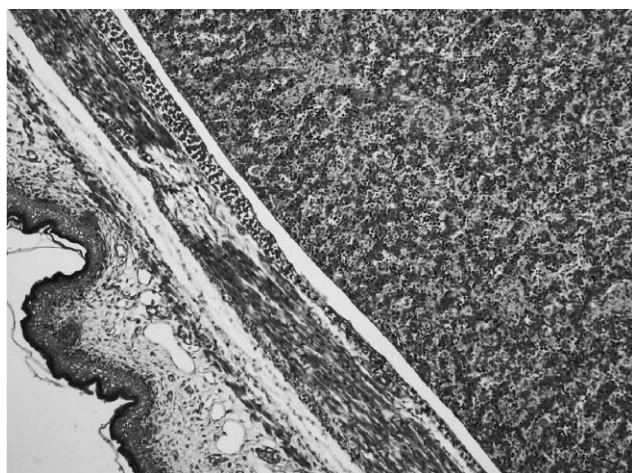
Ryc. 4. Grupa doświadczalna D1. Masywny wylew krwi do jamy otrzewnej. Barwienie H-E. Pow. mikr. 100 x.



Ryc. 5. Grupa doświadczalna D1. Cechy zastojów żylnego w wątrobie płodowej. Barwienie H-E. Pow. mikr. 100 x.



Ryc. 6. Grupa doświadczalna D2. Ograniczony wylew krwawy oraz niewielka ilość płynu przesiąkowego w jamie otrzewnej. Barwienie H-E. Pow. mikr. 100 x.



Ryc. 7. Grupa doświadczalna D2. Ogniskowe przekrwienie mięszu wątroby płodu. Barwienie H-E. Pow. mikr. 100 x.

Dyskusja

Materiał genetyczny pszczół oraz ich larw jest wygodnym, łatwym do pozyskania materiałem do badań. Genomowe DNA zostało zsekwencjonowane i dobrze poznane. Interesującym odkryciem było odnalezienie w nim kopii sekwencji DNA mitochondrialnego, kodujących jednostki oksydazy cytochromowej i dehydrogenazy NADH (6, 13). Sugeruje to możliwość oddziaływania na procesy detoksykacyjne ustroju. Stąd celowym stała się próba zastosowania materiału genetycznego larw pszczół, jako czynnika zapobiegającego lub znoszącego niepożądane działanie toksyn, w tym niektórych leków.

W przeprowadzonym doświadczeniu, w podgrupach kontrolnych, w których zastosowano badany biopreparat DNA czerwiu pszczelego, nie stwierdzono znaczących zmian patologicznych u płodów. Pozwala to na stwierdzenie, że badany apiterapeutyk nie wpływa na przebieg fizjologicznej ciąży oraz nie wywiera

negatywnego działania na wewnątrzmaciczny rozwój płodu. Wybrany związek (tetrachlorek węgla) o działaniu embriotoksycznym wywiera na organizm matki i płodu wielokierunkowe działanie (14-15).

Ocena histopatologiczna płodów szczurzych dostarczyła wielu informacji na temat oddziaływania badanych substancji na rozwój płodu oraz obraz morfologiczny jego narządów wewnętrznych. Badania doświadczalne nad osłonowym wpływem wybranych apiterapeutyków w stosunku do płodu narażonego na działanie substancji embriotoksycznych były dokonywane do tej pory w innym aspekcie (10, 16). Analizowano dane pochodzące z oględzin zewnętrznych ciała płodów, mikrosekcji, pomiarów morfometrycznych, z oceny ilości punktów kostnienia oraz parametrów hodowlanych. Uzyskane w przeprowadzonych badaniach wyniki są podobne do uzyskanych przez Rzepecką-Stojko (12), która podjęła się przeprowadzenia oceny bezpośredniego wpływu związków toksycznych na płód za pomocą badań histopatologicznych. Zastosowany przez nią tetrachlorek węgla spowodował rozwój szeregu zaburzeń morfologicznych, przemawiających za ich dysfunkcją czynnościową. Tetrachlorek węgla jest związkiem o silnych właściwościach embriotoksycznych. Brittebo i Brandt (15) udokumentowali fakt deponowania tej toksyny w drogach rodnych gryzoni. Ma to bezpośredni, negatywny wpływ na procesy rozrodcze oraz stopień dojrzałości i rozwój płodu, na skutek obniżenia poziomu tlenu w błonie śluzowej dróg rodnych.

W przeprowadzonym badaniu histopatologicznym płodów stwierdzono masywne wylewy krwawe do jamy otrzewnej, cechy zastojów żylnych oraz ogniskową martwicę mięszu wątroby. Mając na uwadze fakt narażenia ciężarnej samicy na toksyczne działanie tetrachloru węgla, w przypadku uszkodzenia wątroby, dochodzi do upośledzenia jej funkcji detoksykacyjnej, a tym samym do braku właściwej ochrony płodu i nasilenia działania embriotoksycznego tego związku. Fakt obniżenia poziomu tlenu w drogach rodnych samicy pod wpływem tetrachloru węgla powoduje niedotlenienie płodu i potęguje opisywane zaburzenia. Pod wpływem ekstraktu DNA czerwiu pszczelego zaobserwowano wyraźne ograniczenie zaburzeń hemodynamicznych, wskazujące na jego działanie ochronne.

Wnioski

Ekstrakt DNA z czerwiu pszczelego wykazuje działanie osłaniające w stosunku do płodu szczura narażonego na działanie tetrachloru węgla, powodując znaczne osłabienie działania embriotoksyny.

Badany ekstrakt nie powodował zmian w przebiegu fizjologicznej ciąży.

Piśmiennictwo

1. Kędzia B, Hołderna-Kędzia E. Produkty pszczół w medycynie. Wyd. Apis, Lublin 2007. 2. Stojko A. Leczenie produktami pszczelimi (apiterapia). [W:] Janicki K, Rewerski W. Medycyna naturalna. PZWL Warszawa, 2001; 105-13. 3. Vamanu E, Vamanu A, Popa O i wsp. The antioxidant effect of a functional product based on probiotic biomass, pollen and honey. J Anim Sci Biotechnol 2010; 43(1):331-6. 4. Nakajima Y, Tsuruma K, Shimazawa M i wsp. Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacity. BMC Complement Altern Med 2009; (9):4. 5. Chmielnicka-Kopaczek M. Teratogeny wpływ leków na rozwój zarodka i płodu. [W:] Słomko Z, Brębowicz G, Gadzinowski J. Leki w medycynie perinatalnej. Ośr Wyd Nauk, Poznań 1999; 19-27. 6. Weaver DB, Anzola JM, Evans JD i wsp. Computational and transcriptional evidence for microRNAs in the honey bee genome. Genome Biol 2007; 8(6): R97. 7. Boll M, Weber LW, Becker E i wsp. Mechanism of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. Hepatocellular damage by reactive carbon tetrachloride metabolites. Z Naturforsch (C) 2001; 56:649-59. 8. Liu Y, Bartlett MG, White CA i wsp. Presystemic elimination of trichloroethylene in rats following environmentally relevant oral exposures. Drug Metab Dispos 2009; 37(10):1994-8. 9. Lee KM, Muralidhara S, White CA i wsp.

Mechanisms of the dose-dependent kinetics of trichloroethylene: oral bolus dosing of rats. Toxicol Appl Pharmacol 2000; 164(1):55-64. 10. Góras-Hetmańczyk L, Szaflarska-Stojko E, Stojko R i wsp. Obserwacje doświadczalne nad osłonowym działaniem Sepolu P w stosunku do płodu narażonego na związki embriotoksyczne. Tetrachlorek węgla. Ann Acad Med Siles 2002; (52-53):11-19. 11. Stocker A, Schramel P, Kettrup A i wsp. Trace and mineral elements in royal jelly and homeostatic effect. J Trace Elem Med Biol 2005; 19(2-3):183-9. 12. Rzepecka-Stojko A. Zastosowanie standaryzowanych obnóży pszczelich w działaniu osłonowym w modelowym badaniu embriotoksyczności. Rozprawa doktorska, Śląska Akademia Medyczna, Sosnowiec 1996. 13. Behura SK. Analysis of nuclear copies of mitochondrial sequences in honey bee (*Apis mellifera*) genome. Mol Biol Evol 2007; 24(7):1492-505. 14. Fritz H, Giese K. Eramation of the teratogenic potencial of chemicals in the rat. Pharmacol 1990; 40(1):1-27. 15. Brittebo EB, Brandt I. Metabolic activation of carbon tetrachloride by the cervico-vaginal epithelium in rodents. Pharmacol Toxicol 1998; 65:336-42. 16. Góras-Hetmańczyk L, Szaflarska-Stojko E, Kabała-Dzik A. Obserwacje doświadczalne nad osłonowym działaniem Sepolu P w stosunku do płodu narażonego na związki embriotoksyczne. 38 Nauk Konf Pszczel, Puławy 2001, 113-114.

otrzymano/received: 03.01.2014
zaakceptowano/accepted: 14.01.2014

Adres/address:
*dr n. med. Magdalena Wysznińska
Katedra i Zakład Patologii
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
ul. Ostrogórska 30, 41-200 Sosnowiec
e-mail: mwysznińska@sum.edu.pl