

**Vplyv bendiokarbamátu na histologickú stavbu týmusu.  
Influence of bendiocarbamat to the histological structure of thymus.**

*Lukáč, N.,<sup>1</sup>Flešárová, S., Massányi, P.,<sup>1</sup>Danko, J.,*

Slovenská poľnohospodárska univerzita Nitra

<sup>1</sup>Univerzita veterinárneho lekárstva Košice

**Abstract**

Bendiocarbamat (BDC) use than effective insecticide in household, food store and agriculture. Mechanisms his effect fall in inhibition of acetylcholinesteras (AChE) join to the carbonyl group initiation enzymes. Finally it is cumulating acetylcholine and next expensive stimulation of the nervous systems and evokes insect kill. Thymus it is central lymphoid organs in the mediastine. It is know influence to the thymus by AChE or butyrylcholinesteras (BuChE). In this study we are analyzed histological changes to the rabbit thymus after BDC application in variance interval (3, 10, 20, 30, 60, 90 days).

Quantitative evaluation demonstrated in control group (without BDC) that thymus cortex form  $57.94 \pm 7.10\%$ . In the all groups after BDC administration we are found higher relative volume of cortex ( $61.4 - 78.2 \%$ ). This parameter it is significance in all interval ( $p < .05$ ) but (excepting) after 30 days BDC application. Medulla represent ante  $35.94 \pm 7.38\%$  relative volume thymus tissues in the control group. Dynamics of alternation relative volume of the experiment group has been analogical how cortex. Detailed morphometric assay demonstrate drop of the thymocyte number to the constant area after BDC application ( $29.53-38.50$ ) but this difference not significance in compare with control group ( $40,3 \pm 25,0$ ). In general maybe state, do you BDC to affect formation inherent lattice thymus. In the results be like to observe that BDC to influence to the formation of basic thymus structure.

**Key words: bendiocarbamat, thymus, histology, rabbit**

**Úvod**

Bendiokarbamát (bendiocarb, BDC, 2, 3,-izopropylidén-dioxyfenyl-metyl-karbamát), insekticíd, málo rozpustný vo vode, ale dobre rozpustný v metanole, etanole a acetóne, do organizmu zvierat sa dostáva najčastejšie perorálne. Može sa však vstrebať cez kožu a sliznicami, prípadne inhalačne. BDC ovplyvňuje nervové funkcie hmyzu, pre ktorý sa stáva toxický. Mechanizmus účinku BDC je naviazaním sa prostredníctvom karbomylovej skupiny na acetylcholín esterázu (AChE). Výsledkom je kumulácia acetylcholínu (ACh) a následná nadmerná stimulácia nervového systému. Intoxikácia zvierat BDC sa prejavuje zmenou správania sa, hypersaliváciou, tremorom svalstva, vomitom a diarhoe. Z doterajších prác vyplýva, že za určitých okolností zvyšuje incidenciu lymforetikulárnych nádorov samcov potkanov a že iniciácia a promócia každej karcinogenézy je spojená s kumulovanou mutáciou (Lešník et al., 2004)

Týmus má dôležitú úlohu v produkcii lymfocytov, čím ovplyvňuje ich bunkovú populáciu nielen v krvi, ale aj v ostatných lymfatických orgánoch. Ďalej vplýva na normálny vývoj a diferenciaciu lymfatických uzlín. Okrem toho sa zatiaľ podrobnejšie neobjasneným spôsobom zúčastňuje na tvorbe osobitného humorálneho faktora, ktorý sa uplatňuje v imunologických procesoch (Belák, M. et al., 1990).

Týmus dosahuje vrchol svojho vývoja vzhľadom k telesnej hmotnosti bezprostredne po narodení. Po pubertálnom období dochádza k jeho involúcii. Bunečná populácia týmusu je neustále dopĺňovaná bunkami, ktoré vznikajú v kostnej dreni. Tieto elementy sa začínajú

diferencovať na T-lymfocyty, no opúšťajú týmus (cestou krvných ciev) ako nezrelé T-bunky. Tieto bunky cestujú, umiestňujú sa a zrejú v týmus -dependentných oblastiach lymfoidných orgánov (Jungueira, L. C. et al., 1997). Týmus produkuje niekoľko rastových faktorov, ktoré stimulujú proliferáciu a diferenciáciu T-lymfocytov. Známe sú tymozín alfa, tymopoetín, tymolín a týmusový humorálny faktor (Olsen, N. J., et al., 2001).

### Materiál a metodika

Ako experimentálne zvieratá sme použili králiku domáceho (*Oryctolagus cuniculus*), hybridu Hyla-27 v počte 50 kusov, v rovnakom zastúpení oboch pohlaví, vrátane kontrolných zvierat, vo veku 54 dní s priemernou hmotnosťou 1250g.

Zvieratá boli počas trvania pokusu chované vo zverinci za štandardných podmienok (teplota 16 – 18 °C), pri prirodzenom svetelnom režime a kŕmené granulovanou zmesou pre králiky, napájané pitnou vodou *ad libitum*.

Králiky boli umiestnené v priestranných klietkach bez podstielky po 5 kusoch.

Králikom bol podávaný bendiokarbamát (96%Bendiocarb, Bayer) v tobolkách per os v dávke 5 mg/kg ž.h. denne po dobu 13 dní. Nakoľko reakcia organizmu zvierat na danú dávku bola silná (u niektorých zvierat sme pozorovali hnačku, dehydratáciu a alopeciu), po 13. dni sme dávku obmedzili na 48 hodinové časové intervaly. Kontrolná skupina bola počas trvania pokusu kŕmená štandardnou granulovanou kŕmnom zmesou pre králiky. Pokusné zvieratá boli usmrčované bezbolestne v éterovej narkóze v skupinách po 6 kusoch postupne na 3., 10., 20., 30., 60. a 90. deň pokusu, kontrolná skupina bola usmrtená spolu s poslednou pokusnou skupinou zvierat.

Po usmrtení a patologicko-anatomickej pitve sme okamžite odobrali vzorky týmusu. Excízie sme fixovali 10% formole a následne dehydratovali vo vzostupnom rade etanolov (70, 80, 90, a 100%), presycovali benzénom a benzén-parafínom a zaliali do parafínu. Bločky vzoriek sme rezali na mikrotóme o hrúbke 7-12  $\mu\text{m}$  a rezy sme ofarbili hematoxilín-eozínom (Vacek et al., 1974). Každú vzorku týmusu sme subjektívne kvalitatívne a následne kvantitatívne zhodnotili na optickom mikroskope. Na optickom mikroskope s fotozariadením (Olympus Provis AX) sme zhotovili digitálne mikrofotografie na ktorých sme pomocou programu na kvantitatívnu analýzu obrazu Image ProPlus (Media Cybernetica, NY, USA) priamo vyhodnotili sledované štruktúry. Kvantitatívne sme hodnotili relatívny objem (%) kôry, drene, interlobulárneho priestoru a ciev; početnosť tymocytov (na 1000  $\mu\text{m}^2$ ), priemer tymocytov ( $\mu\text{m}$ ), početnosť retikulárnych buniek (na 1000  $\mu\text{m}^2$ ) a priemer retikulárnych buniek ( $\mu\text{m}$ ).

Vypočítali sme údaje základnej popisnej štatistiky ako aj rozdiely sme testovali Studentovým *t*-testom. Tieto výpočty sme zrealizovali pomocou softvéru SPSS 11.0.1 (ID 11-2502-02348).

### Výsledky a diskusia

Kvalitatívnym sledovaním sme pozorovali v týmuse periférne uloženú kôru a centrálnu formovanú dreň. Medzi jednotlivými lalôčkami sa nachádza interlobulárny priestor s krvnými cievami.

Kvantitatívne hodnotenie preukázalo, že v kontrolnej skupine kôra formuje 57,94 $\pm$ 7,10%. Vo všetkých skupinách po podaní BDC sme zistili vyšší relatívny objem tohto ukazovateľa (61,40-78,20%). Tento nárast bol preukazný vo všetkých odberoch ( $P < 0,05$ ), okrem IV odberu (po 30dňovej inokulácii). Dreň formuje 35,94 $\pm$ 7,38% relatívneho objemu týmusu v kontrolnej skupine. Vo všetkých pokusných skupinách bol relatívny objem drene preukazne nižší ( $P < 0,05$ ), okrem IV odberu, s tým že najnižšiu hodnotu sme zistili v VI. odbere

14,97±4,03%. Relatívny objem interlobulárneho priestoru bol pomerne konštantný a pohyboval sa od 3,30 do 5,46% a preukazný rozdiel sme zistili len v V. odbere (3,30±1,14%) v porovnaní s kontrolnou skupinou (5,17±2,30%). Relatívny objem krvných ciev sa pohyboval od 0,56 (IV.odber) do 3,14 (II. odber), s tým že v kontrolnej skupine to bolo 1,23±0,73%, jednalo sa o pomerne nestálu štruktúru, ktorá štatisticky nevykazovala signifikantnosť (tabuľka 1).

Štatistické ukazovatele hlavných štruktúr týmusu králikov.

Tabuľka č. 1

	Skupiny	Priemer	Medián	SD	v%	min	max
Kôra	Kontrola	57,935	59,357	7,1010	12,257	46,536	68,148
	I odber	72,908	74,461	8,8552	12,145	54,017	86,505
	II odber	68,384	69,780	9,4145	13,767	46,044	80,914
	III odber	66,595	66,932	3,1069	4,665	60,694	70,626
	IV odber	61,404	61,871	6,1419	10,002	51,338	73,605
	V odber	68,886	70,557	5,2188	7,576	59,281	74,875
	VI odber	78,199	78,886	2,4968	3,193	74,090	81,359
Dreň	Kontrola	35,944	35,240	7,3752	20,518	26,063	45,922
	I odber	21,308	18,439	8,904	41,785	8,122	37,875
	II odber	26,212	26,230	11,382	43,422	8,889	51,337
	III odber	27,259	27,957	4,2767	15,689	20,714	35,903
	IV odber	33,793	32,406	7,1795	21,245	23,972	45,961
	V odber	27,077	24,729	5,7288	21,157	21,599	38,331
	VI odber	14,967	13,180	4,0325	26,942	11,155	22,858
Interlobulárny priestor	Kontrola	5,1670	4,9212	2,3033	44,577	1,5214	8,6483
	I odber	5,4567	4,6447	3,0245	55,427	0,6340	11,4193
	II odber	4,5294	3,2591	2,8239	62,344	1,8527	11,2519
	III odber	4,9618	4,7882	2,0858	42,036	2,2965	9,7484
	IV odber	4,3204	3,7430	2,4019	55,595	1,9356	9,3697
	V odber	3,3016	3,1147	1,1418	34,584	1,3302	5,2552
	VI odber	5,0420	5,2324	2,0138	39,940	2,0045	8,4636
Cievy	Kontrola	1,2263	1,2351	0,7336	59,820	0,2782	2,6044
	I odber	0,9807	0,7900	0,7359	75,041	0,2176	1,9454
	II odber	3,1449	4,3722	2,2340	71,034	0,6582	5,0944
	III odber	1,1836	1,3339	0,8566	72,372	0,2649	2,5947
	IV odber	0,5567	0,4301	0,3276	58,848	0,0927	1,1128
	V odber	1,1018	1,1331	0,2911	26,419	0,6884	1,5933
	VI odber	2,3886	2,5362	0,8366	35,026	0,8725	3,2621

Detailná morfometrická analýza preukázala pokles počtu tymocytov na konštantnú plochu v skupinách po podaní BDC (29,53-38,50) v porovnaní s kontrolnou skupinou (40,30±25,00) ale tento rozdiel nebol signifikantný. Podobný obraz sme zistili aj pri hodnotení priemeru tymocytov. V porovnaní s kontrolnou skupinou (6,21±4,89 μm) je vo všetkých pokusných skupinách tendencia nepreukazného poklesu tohto parametra.

V hodnotení početnosti retikulárnych buniek na konštantnú plochu sme zistili v kontrolnej skupine 1,89±1,00 retikulárnych buniek na 1000 μm<sup>2</sup>. Veľmi podobné hodnoty (1,70-2,76) sme zistili v pokusných skupinách. Nepreukazné rozdiely sme zistili aj pri hodnotení priemeru retikulárnych buniek, kde v kontrolnej skupine to bolo 10,67±6,23 a vo všetkých pokusných skupinách 10,19-12,15 (tabuľka 2).

Karbamátové pesticídy, ku ktorým patrí aj bendiokarbamát sú schopné deštruktívne pôsobiť na funkcie lymfocytov, čo bolo jednoznačne preukázané **Wilsonom et al.**, (2004) na cytotoxické reakcie NK lymfocytov.. **Mojšišová a Šula** (2005) potvrdzujú supresívny účinok BDC na funkčný stav lymfocytov a fagocytov u králikov v *in vivo* podmienkach.

Štatistické ukazovatele hlavných buniek týmusu králikov.

Tabuľka 2

	Skupiny	Priemer	SD	v%	min	max
Početnosť tymocytov na 1000 $\mu\text{m}^2$	Kontrola	40,3	25	62,03474	25	50
	I odber	30,45	25	82,10181	25	39
	II odber	38,5	30	77,92208	30	47
	III odber	37,925	30	79,10349	30	48
	IV odber	38,2	31	81,15183	31	47
	V odber	29,525	24	81,28704	24	38
	VI odber	30,075	24	79,8005	24	37
Priemer tymocytov	Kontrola	6,21	4,89	78,74396	4,89	7,58
	I odber	5,004	4,15	82,93365	4,15	6,29
	II odber	4,3525	2,15	49,3969	2,15	5,88
	III odber	4,4395	2,69	60,59241	2,69	6,29
	IV odber	4,3475	2,35	54,05405	2,35	6,87
	V odber	5,43075	3,89	71,62915	3,89	7,05
	VI odber	5,592	2,98	53,29041	2,98	7,09
Početnosť ret buniek na 1000 $\mu\text{m}^2$	Kontrola	1,888889	1	52,94118	1	5
	I odber	2,763158	1	36,19048	1	7
	II odber	2	1	50	1	5
	III odber	1,705882	1	58,62069	1	5
	IV odber	1,555556	1	64,28571	1	4
	V odber	2,258065	1	44,28571	1	5
	VI odber	1,911765	1	52,30769	1	4
Priemer ret. buniek	Kontrola	10,67481	6,23	58,36167	6,23	15,12
	I odber	11,05947	5,24	47,38019	5,24	17,26
	II odber	10,77811	6,21	57,61679	6,21	18,24
	III odber	11,06235	6,58	59,48102	6,58	18,21
	IV odber	10,18944	5,24	51,42577	5,24	13,67
	V odber	11,64097	6,57	56,43861	6,57	17,84
	VI odber	12,15265	7,42	61,05666	7,42	16,32

Z našich výsledkov je zrejмый výrazný pokles zastúpenia tymocytov po dvoj mesačnej aplikácii BDC (V. odber) pričom táto hladina sa udržala aj v ďalšom odbere. Obdobný trend sme zaznamenali aj vo zväčšení tymocytov v V a VI odbere. V relatívnom zastúpení hlavných štruktúr týmusu je možné pozorovať výrazné rozdiely oproti kontrole v prvých intervaloch pokusu. Následným podávaním BDC dochádza k stabilizácii zastúpeniu hlavných štruktúr týmusu. Dlhodobé podávanie tohto insekticídu spôsobuje pokles relatívneho zastúpenia drene na úkor kôry, v ktorej pozorujeme hyperplastické retikularne bunky.

Literatúra u autorov