

EFEKAT SELENA NA HEMATOPOEZU PACOVA U SUBAKUTNOJ INTOKSIKACIJI BENZENOM

Živojin STANKOVIĆ, Dragan MIHAILOVIĆ,
Pavle RANDELOVČIĆ i Jelena ŽIVANOV-ČURLIS

*Institut za biologiju i humanu genetiku Medicinskog fakulteta i Klinika za
patologiju Kliničkog centra u Nišu*

Antioksidanti (selen, vitamini C i E) stabilizuju ćelijsku membranu i štite ćelije od delovanja slobodnih radikala. S druge strane, antioksidanti umanjuju efekte hemijskih i fizičkih agenasa. Pored ovoga, selen ima značajnu ulogu u transportu elektrona u mitohondrijama i neophodan je za funkciju glutation peroksidaze u zaštiti od apoptoze. Benzen je univerzalni rastvarač i ima široku primenu u hemijskoj industriji. Njegova toksičnost se ogleda kroz oštećenja centralnog nervnog sistema, jetre, bubrega i hematopoeznog sistema. U ovom eksperimentu korišćeni su pacovi Wistar soja koji su svrstani u tri eksperimentalne grupe u odnosu na količinu primljenog selena. Svaku grupu su činile po deset životinja oba pola i nakon dvonedeljnog predtretmana selenom od 4,8 i 16 mcg, životinjama je intraperitonealno administrirali benzen u dozi od 1,2 ml/kg telesne mase. Brojanje uobličjenih elemenata krvi je vršeno posle pretretmana selenom i nakon intoksikacije benzenom. Dobijeni rezultati ukazuju na uvećani broj svih krvnih loza nakon pretretmana selenom, dok posle davanja benzena dolazi do drastičnog pada broja eritrocita i leukocita uz umerenu trombocitopeniju. Nakon žrtvovanja, uzimani su hematopoezni organi. Histološki nalazi kostne srži pokazuju pojavu poremećaja, naročito ćelija crvene loze i uočljivu masnu degeneraciju stoje posebno uočljivo kod druge i treće grupe životinja. Takođe je došlo i do oštećenja slezine, naročito njene crvene pulpe s prisustvom većeg broja svežih eritrocita u drugoj i trećoj grupi s tim što su te promene drastičnije u trećoj grupi. Dobijeni rezultati ukazuju da selen u većim koncentracijama povećava broj eritrocita i leukocita što ukazuje na njegovu stimulaciju visokoproliferativnih ćelija kostne srži. Međutim, nakon intoksikacije subletalnom dozom benzena došlo je do pada broja ćelija crvene i bele loze, ali su te vrednosti u granicama normale. Ovo ukazuje da pojava uginuća nije u direktnoj sprezi s poremećajima u hematopoezi, već je do smrti došlo zbog oštećenja nekih drugih vitalnih organa. Uprkos činjenici da selen sprečava oštećenja ćelija, u ovom slučaju njegov protektivni efekat se ispoljio samo kada je davan u malim dozama jer u toj grupi životinja nije bilo uginuća.

Ključne reči: selen, benzen, hematopoeza

Uvod

Antioksidanti kao što su selen, vitamini C i E imaju važnu ulogu u stabilizovanju ćelijskih membrana i zaštiti tkiva od delovanja slobodnih radikala (*Myers* i sar., 1982). Selen je naročito važan i pri transportu elektrona u mitohondrijama te u slučaju njegovog nedostatka dolazi do poremećaja njihovih funkcija (*Rani* i *Lalitha*, 1996). Takođe je ustanovljena i negativna korelacija koncentracije selena i maligno transformisanih ćelija kao i uloga ovog antioksidanta u zaštiti od apoptoze (*Kayanoki* i sar., 1996).

Slobodni radikali posledica su ne samo delovanja hemijskih agenasa nego i zračenja. Bez obzira što se ovi reaktivni molekuli mogu proizvoditi i u normalnim fiziološkim procesima, što je slučaj s fagocitozom i tokom ćelijske proliferacije (*Afanasjev* i *Boronihina*, 1987), ipak njihova pojačana koncentracija se reguliše učestvom peroksizoma i agranulisiranog endoplazmatskog retikuluma. Ove organele vrše detoksikaciju, odnosno eliminisanje efekata različitih agenasa i svode koncentraciju slobodnih radikala na, za organizam, tolerantan nivo. Za ovu regulaciju je između ostalih odgovorna i selen-zavisna glutation peroksidaza (*Kajanoki* i sar., 1996).

Benzen je lako isparljivi rastvarač i ima široku primenu u industriji gume, boja, lakova itd. Toksičnost benzena je vezana za njegovu biotransformaciju koja, osim što stvara slobodne radikale, stvara i nusproizvode kao što su: fenol, katehol i hidrohionin (*Sandniyer*, 1981; *Andrews* i *Snydei*, 1985). Podaci iz literature ukazuju da akutno izlaganje visokim dozama benzena dovodi do oštećenja centralnog nervnog sistema, težih srčanih aritmija, oštećenja jetre i bubrega a kao krajnji ishod je koma, odnosno smrt organizma (*Snyder* i *Koscis*, 1975). S druge strane, hronično izlaganje benzenom dovodi do pojave encefalopatije, kao i do difuzne atrofije mozga i poremećaja u hematopoeznom sistemu što je praćeno pancitopenijom (*Vigliani* i *Saita*, 1964).

Poznato je da antioksidanti sprečavaju ili umanjuju efekat hemijskih i fizičkih agenasa pa je cilj ovog rada bio utvrđivanje "eventualnog" protektivnog efekta selena u uslovima subakutne intoksikacije benzenom.

Materijal i metode

U eksperimentu su korišćeni pacovi Wistar soja, starosti 10 do 11 nedelja, oba pola, telesne mase 230 ± 15 g. Sve životinje, njih 30 (15 ženki i 15 mužjaka), svrstane su u tri grupe (po pet ženki i pet mužjaka).

Prva grupa (I. a ženke i I. b mužjaci) dobijala je po 4 mcg selena dnevno preko vode. Druga grupa (2.a i 2.b) dobijala je po 8 mcg selena, a treća grupa (3.a i 3.b) dobijala je 16 mcg selena.

Pretretman selenom je trajao 14 dana, posle čega su životinje bile tretirane benzenom u dozi od 1,2 ml/kg telesne mase, stoje subletalna doza. Administriranje benzena vršeno je intraperitonealno i to u dve doze u razmaku od tri dana.

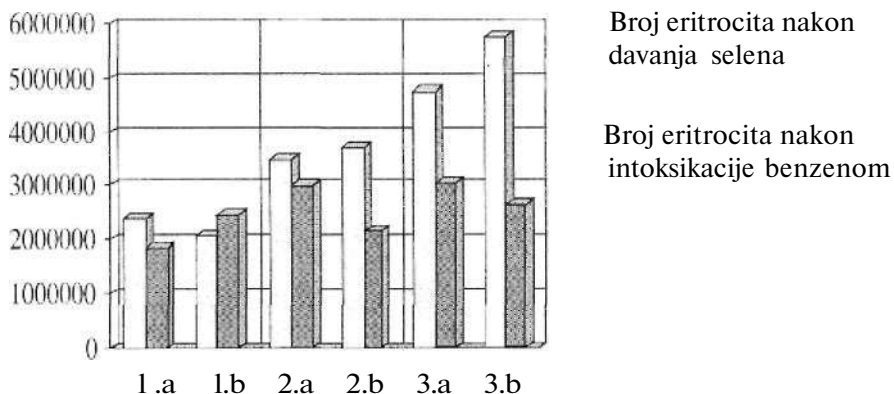
Za analizu broja krvnih ćelija korišćena je krv iz repa. Uobličeni elementi krvi su brojani u Malassez komori. Po žrtvovanju uzimani su hematopoezni organi. Kostna srž je istiskivana iz femura punim špricom fiziološkim rastvorom tako daje praktično bez oštećenja, u celosti prebačena u fiksativ od 6% formalina, a deo slezine je fiksiran u 10% formalinu. Dobijeni isečci kostne srži i slezine debljine 6 μ m su bojeni standardnom HE metodom.

Rezultati ispitivanja

Po završenom eksperimentu ukupno je uginulo sedam životinja s tim što ih je tri uginulo nakon prve, a četiri nakon druge doze benzena i to tri iz druge, a četiri iz treće eksperimentalne grupe.

Rezultati su sagledani kroz nivo uobličениh elemenata krvi i kroz histopatološke nalaze kostne srži i slezine.

Dobijeni rezultati broja eritrocita prikazani su grafikonom 1. Iz ovog grafikona se vidi da je broj eritrocita srazmerno rastao s povećanjem koncentracije selena, tako da je u trećoj grupi taj broj skoro tri puta veći u odnosu na prvu grupu. Međutim, nakon intoksikacije benzenom upravo je u trećoj grupi došlo do drastičnog pada broja eritrocita ($P < 0.001$).

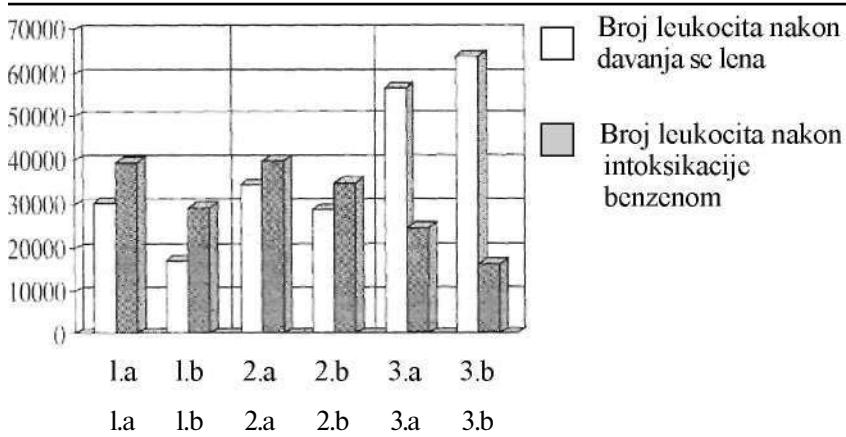


Grafikon 1. Broj eritrocita pre i posle intoksikacije benzenom

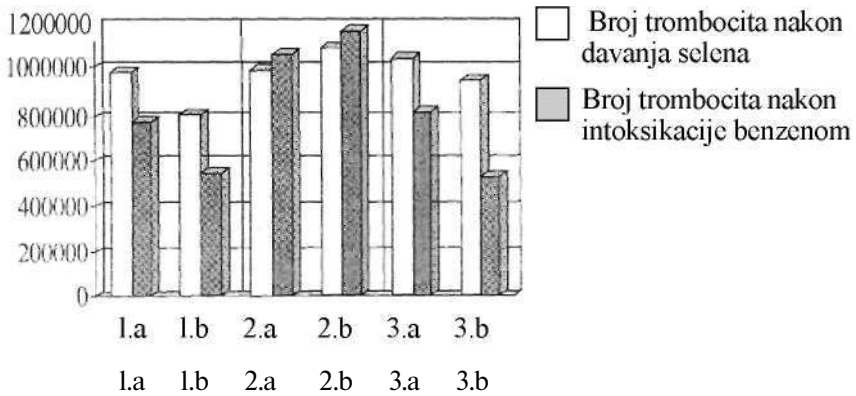
Broj leukocita po grupama je predstavljen grafikonom 2, iz kojeg se vidi da je takođe došlo do izrazitog pada broja ovih ćelija u trećoj grupi životinja nakon intoksikacije benzenom ($P < 0.001$).

Broj trombocita je predstavljen grafikonom 3, odakle se vidi da postoji umerena trombocitopenija samo u trećoj grupi dok u ostale dve grupe taj broj je u granicama normalnih vrednosti kako pre, tako i posle tretmana benzenom.

Mikroskopiranje histoloških preparata je vršeno pod uvećanjem od 10x20 i 10x40. Gledanjem više isečaka kostne srži iz sve tri eksperimentalne



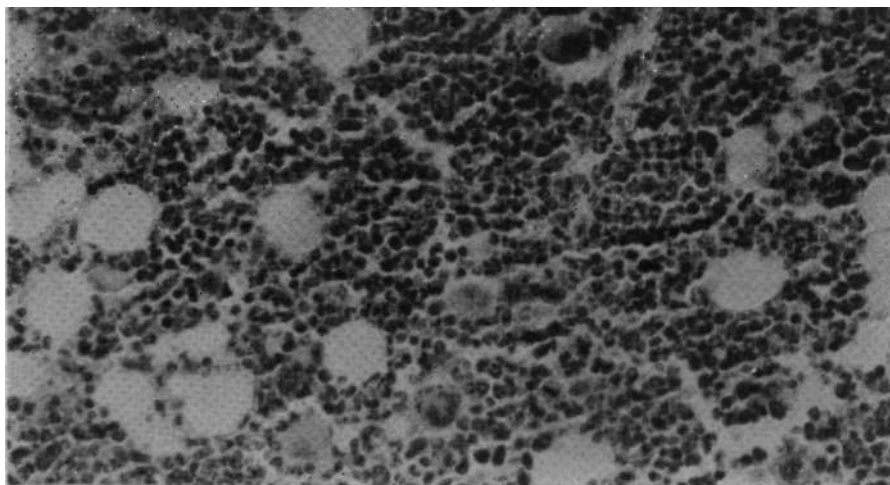
Grafion 2. Broj leukocita pre 5 posle intoksikacije benzenom



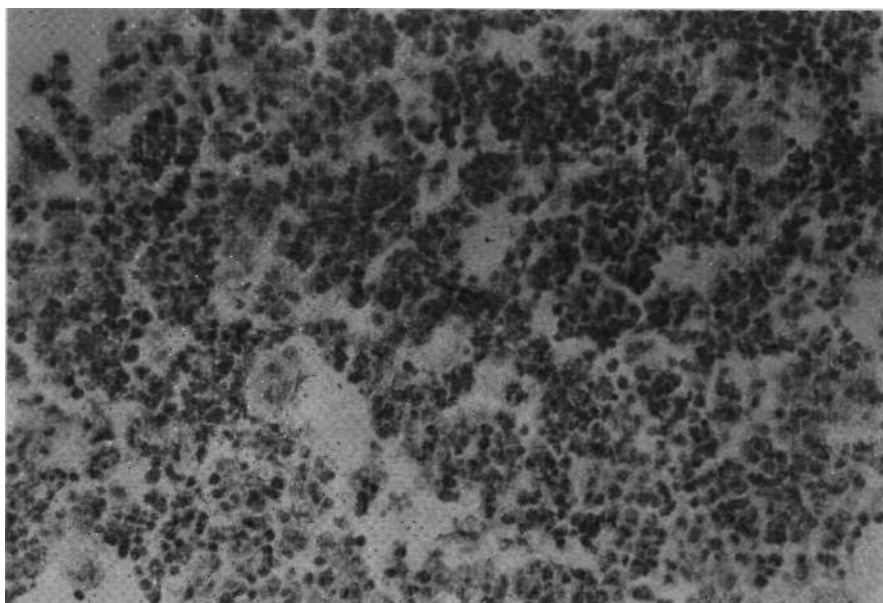
Grafikon 3. Broj trombocita pre i posle intoksikacije benzenom

grupe su ustanovljene različite promene. Najblaže su u prvoj grupi, nešto veće (masna degeneracija) su u drugoj (slika 1) a izrazite promene su primećene u trećoj grupi (slika 2). Na slici se uočava krvarenje, koncentrisani svezi eritrociti, apopleksija kostne srži, hipocelularni mononuklearni elementi, mali broj megakariocita, a za razliku od ostalih grupa je povećan broj granulocita.

Kod životinja sve tri grupe primećena je splenomegalija. Histološki nalazi slezina pokazuju blage promene u prvoj grupi što nije slučaj sa drugom i trećom grupom. Na slici 3 su prikazane promene kod druge grupe životinja, među kojima dominira hiperemija crvene pulpe. Takođe se uočava pojava ranog tromba, a eritrociti su koncentrisani blizu kapsule. Limfni folikuli su manje izraženi nego kod prve grupe. Na slici 4 prikazan je presek slezine treće

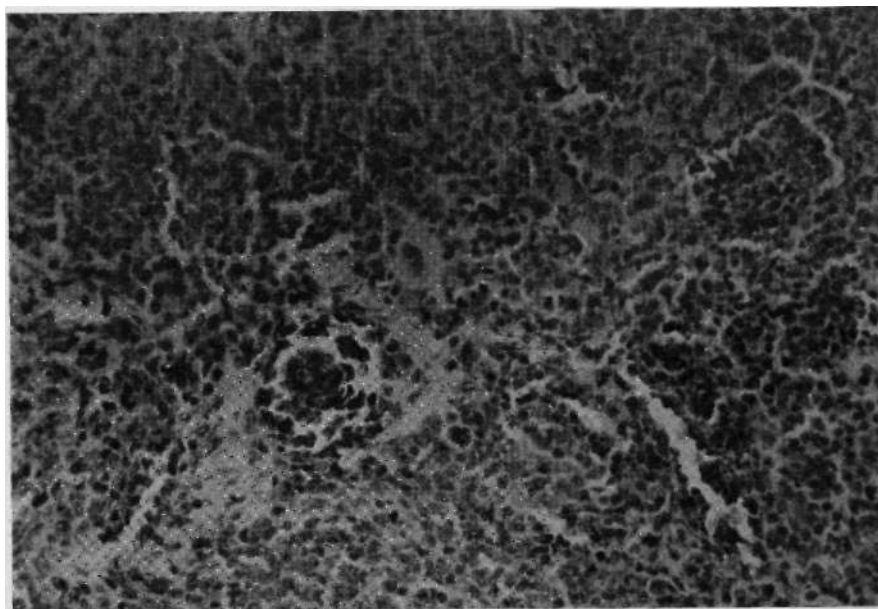
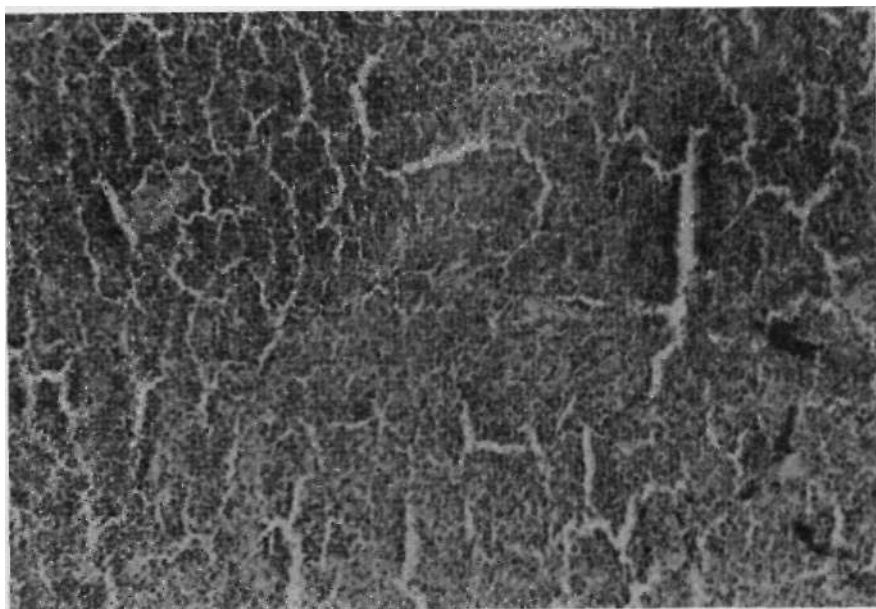


Slika 1. Kostna srž druge eksperimentalne grupe (x40)



Slika 2. Kostna srž treće eksperimentalne grupe (x40)

Slika 3. Slezina drage eksperimentalne grupe (20)



Slika 4. Slezina treće eksperimentalne grupe (x40)

grupe. Zapaža se prepunjenost krvnim elementima, hemoragični infarkti u subkapsularnom regionu, sekundarno se natapaju svežim eritrocitima. Crvena pulpa daje utisak kolapsa. Limfni folikuli su najvećim delom iščezli, ponegde minijaturni. Uočavaju se kolonije megakariocita oko krvnog suda.

Diskusija

Benzen je lako isparljivi otrov a oko 60% se u organizmu metaboliše u jetri. Smatra se da ja toksičnost benzena bazirana na jednom ili na više njegovih metabolita koji su praktično toksičniji od samog benzena (*Snyder i sar.*, 1981). Kod čoveka benzen se unosi inhalacijom u uslovima radne sredine dok se u eksperimentalnim uslovima kod životinja njegova administracija vrši ili supakutno ili intraperitonealno. Do sada nisu utvrđene kvantitativne razlike u toksičnosti benzena u odnosu na način njegovog administriranja (*Andrews i Snyder*, 1986). S druge strane, antioksidanti u manjoj ili većoj meri ublažavaju efekte benzena.

Broj eritrocita posle dvonedelnog pretretmana selenom raste a svoj maksimum postiže u grupi životinja sa najvećom dobijenom količinom selena. Međutim, nakon davanja dveju subletalnih doza benzena dolazi do izrazitog njihovog pada i do pojave prvih znakova anemije, mada zbog prethodno velikog broja ovih ćelija, njihova količina je još uvek n granicama normale. Ovaj pad se objašnjava efektom benzena na sniženje ugrađivanja gvozda u hemoglobin (*Andrews i Snyder*, 1985). Sličan efekat je primećen i kod leukocita čiji broj posle pretretmana selenom izrazito raste da bi nakon intoksikacije benzenom drastično pao što je i uzrokovalo početnu leukopeniju. Leukopenija je jedan od ranih hematoloških parametara intoksikacije benzenom (*Duprat i Gradiški*, 1978; *Najman i sar.*, 1989) a uvećani broj leukocita pre davanja benzena se može objasniti stimulacijom proliferacije mijeloidne loze preko selena. Nagli pad broja eritrocita i leukocita može se objasniti preko postojanja mladih formi ovih ćelija koje pošto su u deobi osetl jive su na efekat benzena. Sto se tiče efekta samog selena na trombocitnu lozu može se reći da nezavisno od njegove količine ne dolazi do uvećanog broja trombocita. Takođe je primećeno da bez obzira što u trećoj grupi životinja postoji umerena trombocitopenija ipak u odnosu na druge dve loze benzen ima slabiji efekat. Mada se ova pojava može objasniti i činjenicom da zbog kratkoće života trombocita (do deset dana) došlo je do stimulacije megakariocitopoeze i povećane produkcije trombocita u perifernoj krvi (*Stanković*, 1998), ili zbog kratke ekspozicije benzenom.

Osim promena u broju uobličjenih elemenata krvi, postoje i izrazite promene kako u kostnoj srži tako i u slezini. Ono što je karakteristično u nalazu kostne srži jeste postupno opadanje broja megakariocita od prve do treće grupe, s tim što se u prvoj grupi javlja hipocelularnost crvene loze. U odnosu na prvu grupu, kostna srž u drugoj grupi je u lošijem stanju jer se

javlja masni elementi, dok je kostna srž treće grupe najviše oštećena jer se javlja krvarenje i veliki broj svežih eritrocita. Sve ovo ukazuje da benzen osim što direktno deluje na ćelije periferne krvi, na indirektan način dovodi do težih oštećenja ovog hematopoeznog tkiva.

U slezinama svih grupa nalaze se krvni elementi što ukazuje na njihova oštećenja i degradaciju. Međutim, izraženije promene se primećuju u drugoj i trećoj grupi tako što u slezini druge grupe dolazi do postupnog smanjenja limfnih folikula, sreću se svezi eritrociti i crvena pulpa je u kolapsu. Kod slezine treće grupe limfni folikuli su iščezli, a javljanje kolonija megakariocita ukazuje na početnu ekstramedularnu hematopoezu kako bi se kompenzovao broj izgubljenih ćelija u perifernoj krvi.

Pretretman selenom u različitim koncentracijama pokazao je da samo u malim dozama selen ima protektivni efekat u odnosu na benzen što se vidi preko bolje krvne slike i manjih oštećenja kostne srži i slezine.

Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti više zaključaka i to:

—da selen utiče na pojačanu proliferaciju eritrocita i leukocita, s tim što je uvećanje broja ovih ćelija proporcionalno količini unetog selena;

—da benzen uprkos pretretmanu selenom, za kratko vreme dovodi do smanjenja broja uobličjenih elemenata krvi, naročito eritrocita i leukocita;

—da se efekat benzena odražava i na hematopoezna tkiva tako što u kostnoj srži izaziva pojavu njene masne degeneracije i oštećenje ćelija crvene loze;

—da benzen oštećuje i slezinu u smislu povećanog broja eritrocita i teških oštećenja crvene pulpe;

- da selen pokazuje izvesni protektivni efekat samo u malim dozama.

Literatura

Afansjev, f. i Boronihina, V. (1987). Vitamin E: značenje i roli v organizme. Usp. Sovren. Biol, 104, 400-411.

Andrews, L. and Snyder, R. (1986). Toxic effects of solvents and vapors, in Klassen, C., Amdur, M. and Doull, J.: Toxicology, Macmillan Publishing Company. New York - Toronto - London, 640-644.

Duprat, P. et Gradiski, D. (1978). Intoxication benzenique chez le rat. Arch. Mal. Prof., 59,445-458.

Kayanoki, Y., Fujii, I., Islam, KN., Suzuki, K., Kawata, S., Matsuzawa, Y. and Taniguchi, N. (1996). The protective role of glutathione peroxidase in apoptosis induced by reactive oxygen species. J. Biochem. Tokyo, 119, 817-822.

Najman, S., Stankovic, Ž., i Kamenov, B. (1989). Efekat E vitamina na brojnost uobličjenih elemenata krvi kod pacova tretiranih benzenom. Acta Facultatis medicae Naissensis, 9, 64-68.

Rani, P. and V. Lalitha, K. (1996). Evidence for altered structure and impaired mitochondrial electron transport function in selenium deficiency. Biol. Trace Elem. Res., 57, 225-234.

Sandmeyer, E. (1981). Aromatic hydrocarbons, in: Clayton, G. and Clayton, F.: Patty's industrial hygien and toxicology. John Willey and Sons. New York - Chichester — Brisbane — Toronto — Singapore, 3253-3282.

Snyder, R. and Koxcis, J. (1975). Current concepts of chronic benzenetoxicity. CRC Crit. Rev. Toxicol., 3, 265-288.

Stanković, Z. (1998). Krvne pločice (produkcija, građa, funkcija). Monografija. Medicinski fakultet. Niš.

Vigliani, E. C. and Saita, G. (1964). Benzene and leukemia. N. Eng. J. Med., 270, 872-876.

EFFET DE SELENIUM SUR LA HEMATOPIESE DES RATS CHEZ L'INTOXICATION AVEC BENZEN

Živojin STANKOVIĆ, Dragan MIHAILOVIĆ,
Pavle RANĐELOVĆ et Jelena ŽIVANOV-ČURLTS

*Institut pour la hiologie et la genetique humain d? la Faculte de Medecine et
Clinic/ue pour la pathologie du Centre clinic/ue de Niš*

Les antioxydantes (selenium, vitamines C et E) stabilisent la membrane et prolegent les cellules de l'activite des radicales libres. De l'autre cote les antioxydantes diminuent les effets des agents chimiques et physiques. Outre cela le selenium a une role importante dans le transport des electrones dans les mitochondriomes et il est indispensable pour la fonction glutatione de la peroxydase dans la protection de l'apoptose. Benzen est le dissolvant universel et il a une large application dans l'industrie chimique. Sa toxicite se reflete dans les dedommagerments du systeme nerveux central, du foie, des reins et, du systeme hematopiese. Dans cette experience on a utilise les rats du genre Wistar qui sont classes en trois groupes experimentals par rapport a la quantite du selenium obtenu. Chaque groupe formaient dix animaux de deux sexes et apres le pretraitement de deux semaines avec selenium de 4,8 et 16 mcg on a administre aux animaux intraperitonealement benzen dans le dose de 1,2 ml/kg de la masse corporelle. Le denombrement des elements formes du sang est fait apres le pretraitement avec selenium et apres l'intoxication avec benzen. Les resultats obtenus montrent le nombre agrandi de tous les vignes sanguines apres le pretraitement avec selenium, tandis que apres la donation de benzen i l arrive a la chute drastique des nombres de erythrocytes et leucocytes conti-e la trombocytopenie modere. Apres avoir fait la sacrifice des animaux on a pris les organes hematopiese. Les trouvaillles histologiques de la moelle osseuse montrent l'apparition des perturbations, surtout des cellules de la vigne rouge et tres visible la dčgeneration

gracieuse surtout chez le deuxième et troisième groupe des animaux. Il est arrivé aussi le dédommagement de la rate, surtout de sa pulpe rouge avec la présence de plus grand nombre des érythrocytes frais dans le deuxième et le troisième groupe et ces changements sont plus drastiques dans le troisième groupe. Les résultats obtenus indiquent que le sélénium dans les plus grandes concentrations agrandit le nombre des érythrocytes et des leucocytes ce que indique à sa stimulation des cellules hautement prolifératives de la moelle osseuse. Pourtant après l'intoxication avec la dose subléthale du benzène il est arrivé la chute du nombre des cellules de la vigne rouge et blanche, mais les valeurs sont dans les limites normales. Cela montre que l'apparition de la mori n'est pas directement liée avec les perturbations dans l'hématopoïèse; elle est arrivée à cause des dédommagements des autres organes vitaux. Malgré le fait que le sélénium empêche le dédommagement des cellules, dans ce cas-la son effet de protecteur s'est manifestait seulement quand il est donné dans les petites doses car dans ce groupe d'animaux il n'y avait pas de mort.

Les mots des: Sélénium, benzène, hématopoïèse

SELENIUM EFFECT UPON THE RATS¹ HEMATOPOIESIS IN THE SUBACUTE BENZENE INTOXICATION

Živojin STANKOVIĆ, Dragan MIHAILOVIĆ, Pavle
RANĐELOVIĆ and Jelena ŽTVANOV-ČURLIS

*Institute for Biology and Human Genetics and Clinic for Pathology of the Clinic
Center of the Faculty of Medicine, Niš*

The antioxidants (selenium, vitamins C and E) stabilize the cell membrane and protect the cells from the action of free radicals. On the other hand, the antioxidants reduce the effects of chemical and physical agents. Besides, selenium has an important role in transporting electrons in the mitochondria and it is necessary for the glutathione peroxidase function in the protection from apoptosis. Benzene is a universal solvent and has a wide application in chemical industry. Its toxicity is manifested in the damages done to the central nervous system, liver, kidneys and hematopoiesis system. In this experiment the Wistar rats were used that were classified in three experimental groups regarding the quantity of the received selenium. Each group comprised ten animals of both sexes and after two weeks' treatment by selenium of 4,8 and 16 mcg, the animals had received benzene by intraperitoneal administration in the dose of 1,2 ml/kg of the body weight. The counting of the shaped blood elements was done after the selenium pre-treatment and after the benzene intoxication. The obtained results point to increased number of all the blood elements after the selenium pretreatment while after benzene administration there was a drastic drop of the number of erythrocytes and leukocytes along with moderate thrombocytopenia. After the sacrifice, the hematopoiesis organs were taken. The histological findings of the bone marrow show the emergence of disturbances, especially of the red sort cells as well as an obvious fat degeneration

which is particularly conspicuous in the second and third groups of animals. There was also some damage done to the spleen, especially of its red pulp along with the presence of a greater number of fresh erythrocytes in the second and third groups. Only the changes were more drastic in the third group. The obtained results show that selenium in higher concentrations increases the number of erythrocytes and leukocytes which proves that it stimulates highly-proliferating cells of the bone marrow. However, after the intoxication by a sublethal benzene dose there was a drop of the cells of red and white color but these values are within the normal limits. This points to the fact that the emergence of death is not in any direct correlation with the disturbances in the hematopoiesis, but death was caused by the damage done to some other vital organs. Despite the fact that selenium prevents the cells' damage, in this case its protective effect manifested itself only when it was given in small doses since there was no death in this group of animals.

Key words: Selenium, benzene, hematopoiesis

Autor: Dr sci Živojin Stanković, biolog, Institut za biologiju i humanu genetiku Medicinskog fakulteta u Nišu; kućna adresa: Niš, Triglavska 5/11.

(Rad je Uredništvo primilo 5. marta 2001. godine).