

Marian Zakrzewski

Zmiany w budowie histologicznej rdzenia kręgowego i struny grzbietowej u larw salamandry plamistej *Salamandra salamandra* (L.) pod wpływem działania wybranych herbicydów

Streszczenie

Material do analizy zmian w rdzeniu kręgowym i strunie grzbietowej stanowiły larwy salamandry plamistej *Salamandra salamandra* (L.), na których wcześniej w warunkach laboratoryjnych przeprowadzono eksperymenty nad wpływem herbicydu Alipuru o stężeniu 2×10^{-2} ml/dm³ i Aminopieliku o stężeniu 4×10^{-2} ml/dm³ na ich przeżywalność i zmiany w morfologii zewnętrznej. Larwy te były w II stadium rozwojowym i miały średnio 38 mm długości. Dokonano porównań w budowie histologicznej tworzącego się pierwszego kręgu. Stwierdzono, że herbicyd Alipur blokuje powstawanie na zewnątrz struny grzbietowej warstwy łącznotkankowej, a Aminopielik wpływa na nierównomierne jej rozmieszczenie. Herbicyd Alipur powoduje przesunięcie rdzenia kręgowego w kierunku struny grzbietowej i jest przyczyną pewnej jego deformacji. Zarówno Alipur, jak i Aminopielik przyspieszają tworzenie się warstwy chrzęstnej wokół rdzenia. Grubość tej warstwy wskazywała na przyspieszenie tempa w tworzeniu się kręgu.

Wstęp

Struna grzbietowa jest pierwszą konstrukcją pełniącą rolę „szkieletu” u embriónów kręgowców, stanowi element podstawowy dla utworzenia się kręgosłupa, jest także siłą napędową aktywnie uczestniczącą w wydłużaniu się osi embrionalnej. Komórki struny grzbietowej wydzielają pozakomórkowe składniki, które gromadzą się i tworzą osłonki. Ich wewnętrzna granica stanowi membranę bazową składającą się głównie z kolagenu. Osłonki te są odporne na deformację fizyczną. Równocześnie z tworzeniem się osłonki struna grzbietowa ulega wakualizacji. Proces ten rozpo-

czyzna się w części przedniej, a później przemieszcza się do części czaszkowej i ogonowej (Mookerjee, Deuchar, Waddington 1953, Nieuwkoop i Faber 1967). W rozwoju kręgosłupa płazów ogoniastych struna grzbietowa odgrywa dużą rolę, gdyż część masy trzonu powstaje w jej wnętrzu i jest integralną składową osi ciała tych płazów. Stanowi ona zasadniczą, ciągłą, sprężystą oś szkieletu larw *Urodela*, a u takich rodzin jak *Ambystomidae* występuje przez całe życie. Struna grzbietowa wewnątrz trzonu produkuje chrząstkę, która u przeobrażających się osobników często ulega zwapnieniu (szczególnie sporo jest jej u *Salamandridae*), a wokół struny perichordalnie powstaje stosunkowo cienki mankiet kostny, dający zasadniczą część trzonu (Orska 1978). Trzon kręgu przeobrażonego płaza ogoniastego jest długi, klepsydrowaty, stanowi wraz z łukiem nerwowym jedno skostnienie. U *Urodela* z reguły silniej rozwinięte są *diapophyses*, co stanowi cechę swoistą ich kręgu. Stwierdzono, że w środowiskach wodnych, w których okresowo występują znaczne stężenia powszechnie stosowanych herbicydów, rozwijające stadia embrionalne i larwalne są narażone na istotne zmiany w organizmie oraz deformacje tworzącego się szkieletu. Wśród wielu znanych czynników wywołujących deformację struny grzbietowej i kanału neuralnego w rozwoju embrionalnym u płazów (Kitchin 1949, Muchmore 1951, Holtzer 1952, Malaciński, Youn 1981, Yuge i Yamana 1989) dominują związki chemiczne, które wchodziły w skład pestycydów. Interesujące zatem byłoby eksperymentalne stwierdzenie wpływu stężenia herbicydów, które występują w środowisku rozwoju larw płazów posiadających już strunę grzbietową i trzon kręgu, na zmiany w tworzącym się szkielecie osiowym tych larw.

Material i metodyka badań

Material do badań stanowiły larwy salamandry plamistej *Salamandra salamandra* (L.), na których wcześniej, w warunkach laboratoryjnych, przeprowadzono eksperymenty wpływu herbicydów Alipuru i Aminopieliku na ich przeżywalność i zmiany morfometryczne. Wykorzystano również larwy z próby kontrolnej. Larwy te hodowane były od urodzenia aż do osiągnięcia II stadium rozwojowego w roztworach obu herbicydów, sporządzonych z gotowych preparatów płynnych, ogólnie dostępnych w handlu, w stężeniach: 2×10^{-2} ml/dm³ w przypadku Alipuru i 4×10^{-2} ml/dm³ w przypadku Aminopieliku. Takie stężenia spotyka się okresowo w zamkniętych zbiornikach wodnych. Larwy osiągnęły (według klasyfikacji Juszczyka i Zakrzewskiego 1981) II stadium rozwojowe przy długości ciała średnio około 38 mm i zostały utrwalone w płynie Bouina. Stosując rutynowe metody histologiczne, zatopiono je w parafinie o topliwości 56°C. Następnie sporzą-

dzono na mikrotomie skrawki histologiczne z okolic pierwszego kręgu (przedtułowiowego) o grubości 7 μm . Preparaty wybarwiono metodą Azan według Heidenhaina, a część z nich eozyną i hematoksyliną Delafielda. Wybarwione preparaty zamknięto w balsamie kanadyjskim. W celu ustalenia ewentualnych zmian, jakie zaszły w obrębie tworzącego się kręgu (w rdzeniu kręgowym i strunie grzbietowej) pod wpływem użytych herbicydów, przeanalizowano pod mikroskopem wszystkie preparaty uzyskane z 10 osobników prób eksperymentalnych i 10 z próby kontrolnej oraz sporządzono dokumentację w postaci mikrofotografii.

Wyniki badań

1. Zmiany pod wpływem herbicydu Alipuru

Analizując budowę struny grzbietowej (*chorda dorsalis*), nie stwierdzono zmian w jej kształcie. W przypadku larw z próby kontrolnej – komórki wewnętrzne były owalnego kształtu o dużych rozmiarach, nieliczne, natomiast u larw eksperymentalnych liczebność ich wzrosła, lecz nie zmieniły one zasadniczo swojego kształtu. Na zewnątrz struny grzbietowej występowały w obu przypadkach dwie warstwy błon włóknistych o podobnej grubości. Zasadniczą i istotną zmianą w budowie histologicznej elementów była warstwa łącznotkankowa, która występowała u larw z próby kontrolnej, natomiast brak jej było u larw eksperymentalnych.

W rdzeniu kręgowym pod wpływem działania Alipuru nastąpiła niewielka deformacja i przesunięcie kanału centralnego jak i całego rdzenia w kierunku struny grzbietowej. W istocie szarej, zarówno w próbie kontrolnej, jak i eksperymentalnej, wystąpiła duża liczba komórek asocjacyjnych, w większości przypadków o lokalizacji centralnej. W preparatach sporządzonych z larw eksperymentalnych występowała znacznie większa liczba tych komórek. Skupione centralnie, połączone gałęzisto, ściśle do siebie przylegały (Fot. 1B). Nie stwierdzono zmian w istocie białej. Warstwa chrzęstna – międzykręgowa – u larw eksperymentalnych otaczała w całości rdzeń kręgowy. Grubość tej warstwy wskazywała na tworzenie się kręgu. U larw z próby kontrolnej stwierdzono tworzenie się warstwy chrzęstnej od strony grzbietowej (Fot. 1A).

2. Zmiany pod wpływem herbicydu Aminopieliku

W strunie grzbietowej larw hodowanych w roztworze Aminopieliku nie stwierdzono istotnych zmian w kształcie i wielkości. Komórki zlokalizowane wewnątrz struny grzbietowej miały duże rozmiary i przybrały kształt spłaszczonych

krażków. Nieliczne mniejsze komórki zostały zepchnięte na brzegi. Na powierzchni nabłonka struny grzbietowej pojawiły się otaczające ją dwie błony włókniste, zarówno w próbie kontrolnej, jak i eksperymentalnej. Błony te były bezkomórkowe, obie tej samej grubości. U larw eksperymentalnych stwierdzono natomiast pewne ubytki w wytwarzającej się warstwie łącznotkankowej, której nie zauważa się u larw z próby kontrolnej.

Analizując rdzeń kręgowy, nie stwierdzono istotnych zmian w liczbie komórek istoty szarej, a komórki asocjacyjne, tzw. Golgiego II, występowały w dużej liczbie, były zlokalizowane centralnie oraz bardziej skupione w przypadku larw eksperymentalnych (Fot. 1C). Warstwa chrzęstna z widocznymi chondrocytami występowała zarówno w próbie kontrolnej, jak i eksperymentalnej, przy czym w przypadku larw eksperymentalnych otaczała ona prawie w całości rdzeń (Fot. 1C), a w przypadku larw z próby kontrolnej zaczynała się tworzyć od strony grzbietowej. Grubość tej warstwy wskazywała na zaawansowany etap w tworzeniu się kręgu.

Omówienie wyników i dyskusja

Z analizy histologicznej preparatów z okolic tworzącego się pierwszego kręgu, tzw. przedtułowiowego, larw salamandry plamistej hodowanych w roztworach herbicydów Alipuru i Aminopieliku wynika, że deformacje w przypadku rdzenia kręgowego dotyczyły głównie położenia (lokalizacji) kanału neuralnego oraz występowania wokół istoty białej warstwy chrzęstnej. W strunie grzbietowej natomiast stwierdzono zmiany w wielkości i liczbie komórek wewnętrznych oraz w występowaniu warstwy łącznotkankowej. Dowodzi to, że obecność herbicydów w środowisku rozwoju larw salamandry wpływa na zniekształcenie i przesunięcie kanału neuralnego i całego rdzenia w przypadku Alipuru oraz powoduje zmiany w liczebności komórek asocjacyjnych wewnętrznych. Herbicydy te są również powodem zmiany liczebności i kształtu komórek w strunie grzbietowej, a w warstwie łącznotkankowej deformacji tworzącego się kręgu, co w dalszych stadiach może rzutować na rozwój całego szkieletu osiowego. Jest prawdopodobne, że herbicydy przyspieszają tempo wzrostu liniowego w początkowych stadiach rozwoju larw salamandry plamistej w roztworach Alipuru (Zakrzewski 1990). Alipur działa przede wszystkim na strunę grzbietową, powodując blokadę w tworzeniu się warstw osłonek łącznotkankowych, czego nie stwierdzono w przypadku Aminopieliku. Osłonki te biorą udział w wydłużaniu się struny grzbietowej. U larw salamandry hodowanych w roztworze Alipuru tych osłonek nie stwierdzono. Zachodzi zatem podejrzenie, że herbicyd ten może wpływać na ich powstawanie tylko w niektórych,

określonych i nielicznych odcinkach szkieletu osiowego, na co wskazywał wzrost liniowy larw. Warto dodać, że kręgi u płazów ogoniastych również mogą się tworzyć bez udziału struny grzbietowej, lecz musi być określona ilość tkanki nerwowej. Natomiast ilość wytwarzanej tkanki chrzęstnej zależy głównie od reakcji tkanki mezodermalnej na indukujące działanie tkanki nerwowej, co potwierdzili Holtzer i in. (1955). Autorzy ci wykazali równocześnie niezdolność do regeneracji struny grzbietowej u larw płazów ogoniastych w części ogonowej.

Jak podają Wittenbach i Hwang (1984), którzy badali wpływ insektycydów na zmiany w kręgach szyjnych u piskląt ptaków, przyczyną fizycznych niezgodności pomiędzy struną grzbietową a kanałem neuralnym jest nieprawidłowość – odkształcanie – w rozwoju wyłącznie struny grzbietowej. W badaniu pod mikroskopem elektronowym Jurand (1962), Bancroft i Bellairs (1976) stwierdzili, że najpierw następuje formowanie się osłonek. Osłonka, łykowata i mało elastyczna (Mookerjee 1953), przyczynia się znacznie do sztywności struny. Ponieważ herbicyd Alipur przeszkadzał w formowaniu się wspomnianych osłonek, opór sąsiednich tkanek na rozprężanie prawdopodobnie spowodował, że osłabiona struna grzbietowa mogła ulec zniekształceniu. To przypuszczenie, że wadliwe osłonki lub ich brak stanowią podstawę pofaldowań struny grzbietowej a zarazem wpływają na zmianę w budowie tworzącego się kręgu, potwierdzają obserwacje poczynione na embrionach *Ambystoma* przez Kitchina (1949) i Muchmore (1951), ostatnio zweryfikowane przez Malacińskiego i Youna (1981) na *Xenopus laevis*. Meiniel (1981) stwierdził, że zarówno skrzywienie osiowe, jak i fuzja wertebralna pod wpływem działania pestycydów wiąże się ściśle z dysfunkcją układu nerwowo-mięśniowego i ma również aspekt biochemiczny.

Literatura

- Bancroft M., Bellairs R., 1976, *The Development of the Notochord in the Chick Embryo, Studied by Scanning and transmission Electron Microscopy*, J. Embryol. Exp. Morphol. 35, 383–401
- Holtzer H., 1952, *An Experimental Analysis of the Development of the Spinal Column II. The Dispensability of the Notochord*, J. Exp. Zool. 121, 573–591
- Holtzer H., Holtzer S., Avery G., 1955, *An Experimental Analysis of the Development of the Spinal Column. IV. Morphogenesis of Tail Vertebrate during Regeneration*, J. of Morphol. 96, 145
- Jurand, 1962, *The Development of the Notochord in Chick Embryos*, J. Embryol. Exp. Morphol. 10, 602–621
- Juszczak Wł., Zakrzewski M., 1981, *External Morphology of Larval Stages of the Spotted Salamander, Salamandra salamandra (L.)*, Acta Biol. Crac., Zool. 23, 127–135

- Kitchin L.C., 1949, *The Effects of Notochordectomy in Ambystoma mexicanum*, J. Exp. Zool. 112, 393–415
- Malaciński G.M., Youn B.W., 1981, *Neural Plate Morphogenesis and Axial Stretching in „Notochord-defective” Xenopus Laevis Embryos*, Dev. Biol. 88, 352–357
- Meinzel R., 1981, *Neuromuscular Blocking Agents and Axial Morphogenetic Disorders be Explained by Pharmacological Action upon Muscle Tissue?*, Teratology 23, 259–271
- Mookerjee S., 1953, *An Experimental Study of the Development of the Notochordal Sheath*, J. Embryol. Exp. Morphol. 1, 411–416
- Mookerjee S., Deuchar E.M., Waddington C.H., 1953, *The Morphogenesis of the Notochord in Amphibia*, J. Embryol. Exp. Morphol. 1, 399–409
- Muchmore W.B., 1951, *Differentiation of the Trunk Mesoderm in Ambystoma maculatum*, J. Exp. Zool. 118, 137–185
- Nieuwkoop P.D., Faber J., 1967, *Normal Table of Xenopus laevis (Daudin)*, North-Holland, Amsterdam
- Orska J., 1978, *Szkielet. Anatomia porównawcza kręgowców*, red. H. Szarski, PWN, Warszawa 1991, 280
- Wittenbach Ch.R., Hwang J.D., 1984, *Relationship between Insecticide-induced Short and Wry Neck and Cervical Defects Visible Histologically Shortly after Treatment of Chick Embryos*, J. of Exp. Zool. 229, 437–446
- Yuge M., Yamana K., 1989, *Regulation of the Dorsal Axial Structures in Cell-deficient Embryos of Xenopus laevis*, Develop. Growth. Differ. 31. 4, 315–324
- Zakrzewski M., 1990, *Rozwój larw salamandry plamistej – Salamandra salamandra (L.) oraz wpływ różnych czynników na jego przebieg. II. Wpływ wybranych herbicydów na rozwój*. Prace Monograficzne 114, Wyd. Nauk. WSP, Kraków, 29–52

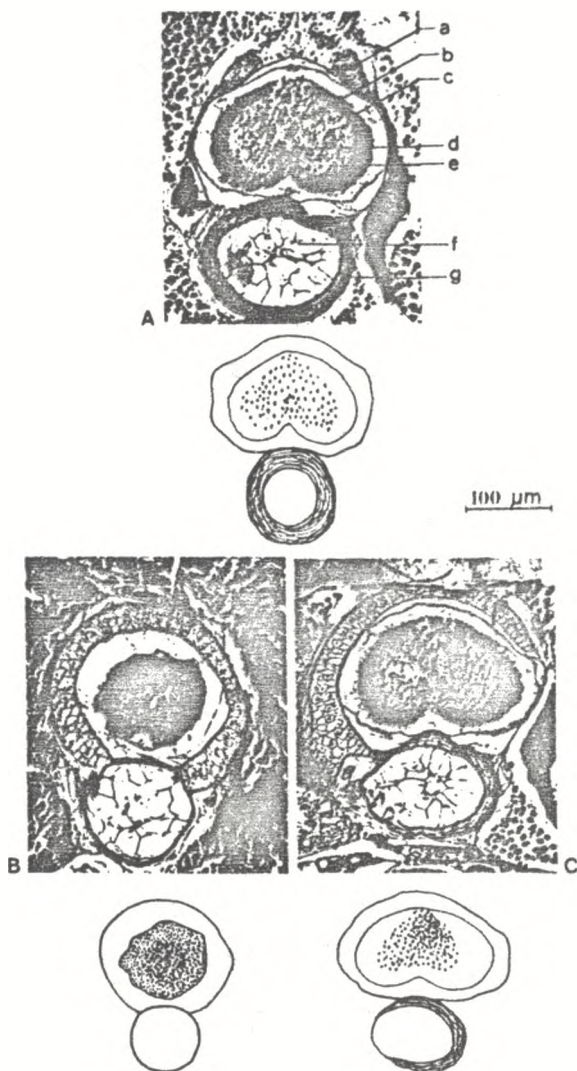
Marian Zakrzewski

The effect of some herbicides on the histological structure of spinal cord and notochord in the larvae of the spotted salamander *Salamandra salamandra* (L.)

Summary

Changes in the spinal cord and in the notochord were analysed in the larvae of the spotted salamander *Salamandra salamandra* (L.), which were previously exposed to the action of the herbicides Alipur (concentration – 2×10^{-2} ml/dm³) and Aminopielik (4×10^{-2} ml/dm³) to examine their effect on the survival and external morphology of these larvae. The larvae, 38 mm long on the average, were at the 2nd

developmental stage. The changes of histological structure were investigated in the region of the first vertebra which was just forming. It has been found that the herbicide Alipur stops the formation of connective tissue layer outside the notochord, while Aminopielik causes its uneven distribution. Alipur induces the shift of the spinal cord towards the notochord, which results in certain deformation. Both Alipur and Aminopielik accelerate the formation of the cartilaginous coat around the spinal cord. The thickness of this coat indicates the increased rate of vertebra formation.



Fot. 1. Obraz histologiczny rdzenia kręgowego i struny grzbietowej z okolic pierwszego kręgu u larw salamandry plamistej – *Salamandra salamandra* (L.)

A – z próby kontrolnej, B – z roztworu Alipuru, C – z roztworu Aminopieliku,
 a – warstwa chrzęstna, b – istota biała, c – istota szara, d – kanał środkowy,
 e – komórki asocjacyjne, – komórki struny grzbietowej, g – warstwa łącznotkankowa