

Zakład Embriologii. Instytut Biologii. UMCS w Lublinie
Kierownik: doc. dr hab. med. Michał Górski

Michał GÓRSKI, Anna PIOTROWSKA

**Wpływ 0,0-dwumetylo-2,2,2-trójchloro-1-hydroksyetylo-fosfonianu
(foschloru) na aktywność mitotyczną komórek L *in vitro***

Влияние диптерекса на митотическую активность клеток L *in vitro*

The Effect of the 0,0-Dimethyl-2,2,2-Trichloro-1-Hydroxyethyl-Phosphate (Dipterex)
on the Mitotic Activity of L-cells Culture

Badania nad cytotoksycznym działaniem związków fosforoorganicznych (ZFO) na hodowlę komórkową wykazują, że związki te uszkadzają hodowane komórki, a w większych stężeniach powodują zniszczenie hodowli (4, 5, 12). Jak wykazały doświadczenia ostatnich lat, działanie toksyczne na hodowle wywierają nie tylko ZFO, lecz również produkty ich rozpadu (6, 10, 11). Wyniki prac nad działaniem tych samych stężeń ZFO na hodowlę komórkową różnią się między sobą. Podczas gdy jedni autorzy obserwowali przeżycie hodowli po 24-godzinnym działaniu ZFO w dawce przewyższającej 100,00 µg/ml (9, 12), według innych dawki te niszczą hodowle prawie całkowicie i tylko pojedyncze komórki przeżywają zatrucie (3, 4).

W celu zbadania toksycznego działania foschloru oraz produktów jego rozpadu na hodowlę komórkową postanowiono prześledzić wpływ tego związku na aktywność mitotyczną, średni czas generacji oraz czas trwania mitozy komórek L *in vitro*.

MATERIAŁ I METODY

Modelem doświadczalnym były 24-godzinne hodowle komórek L (szczep 929). Jako środowisko odżywcze zastosowano płyn Parkera z dodatkiem 5% inaktywowanej surowicy cielęcej. Do płynu hodowlanego dodawano 100 jednostek penicyliny krystalicznej oraz 60,00 µg streptomycyny/ml. Zawiesinę o gęstości 10⁵ komórek/ml pożywki oraz o żywotności 80,9% wysiewano do naczyń Leightona. Doświadczenie przeprowadzono równolegle w dwóch seriach. W serii pierwszej do 210 hodowli dodano świeżo przygotowaną pożywkę z dodatkiem foschloru w stężeniu: 0,03; 0,30; 3,00; 10,00; 30,00; 100,00 µg/ml. Kontrolę stanowiło 30 hodowli. W drugiej serii doświadczalnej w 140 hodowlach zmieniono płyn odżywczy na pożywkę z foschlorem przetrzymywaną przez okres 24 godz. w temp. 37°C. Jako kontrolę pozostawiono 20 hodowli. W celu obliczenia indeksu stathmokinetycznego w obu seriach doświadczalnych do 200 hodowli dodano kolchicynę w stężeniu 1 µg/ml pożywki na okres

2 godzin. Pozostałe 200 hodowli posłużyło do określenia indeksu mitotycznego. W grupie kontrolnej serii pierwszej indeks mitotyczny i stathmokinetyczny określono oceniając 30 000 komórek, zaś w każdej z grup z foschlorem na podstawie oceny 15 000 komórek. W drugiej serii w grupie kontrolnej oceniono 20 000 komórek i po 10 000 komórek w grupach hodowli z dodatkiem foschloru inkubowanego. Po 24 godz. kontaktu komórek L z foschlorem hodowle utrwalono przez 10 min. w metanolu absolutnym i barwiono według metody May Grunwalda Giemsy oraz hematoksyliną Harrisa i eoźną. Na podstawie wykonanych preparatów obliczono indeks mitotyczny (IM) licząc ilość podziałów mitotycznych na 1000 komórek oraz indeks stathmokinetyczny (IS) licząc ilość prometafaz na 1000 komórek w hodowlach, do których dodano kolchicynę w stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$ pożywki na okres 2 godzin (1). Długość trwania średniego czasu mitoz (M) określano metodą kolchicynową według

wzoru: $M = \frac{A \cdot IM}{IS}$ (A — czas działania kolchicyny). Średni czas generacji (G) obli-

czano według wzoru: $G = \frac{M \cdot N}{IM}$ (7) (N — ogólna liczba komórek). W celu porówna-

nia indeksu mitotycznego oraz stathmokinetycznego hodowli zatrutych z wartościami uzyskanymi w hodowlach kontrolnych zastosowano test χ^2 dla tablicy czteropolowej. Wartość krytyczną przyjęto na poziomie 5% ryzyka błędu, tj. 3,84.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Przedstawione w tabelach (1 i 2) wyniki doświadczenia świadczą o bardzo wyraźnym wpływie foschloru na hodowlę komórek L. Przy stężeniu 100,00 μg foschloru na 1 ml po 24-godz. ekspozycji zahamowany jest całkowicie rozwój hodowli. W hodowlach tej grupy nie znaleziono ani jednej figury podziału. Również bardzo wysoko statystycznie znamienne jest zahamowanie podziałów w grupach hodowli, na które działał foschlor w stężeniu 30,00; 10,00 oraz 3,00 $\mu\text{g/ml}$. We wszystkich tych hodowlach

tTab. 1. Wpływ foschloru świeżego na indeks mitotyczny, stathmokinetyczny oraz na średni czas mitozy i czas generacji komórek L.

The effect of fresh dipterex on the mitotic and stathmokinetic index, the average generation time and the mean duration of the cell cycle

| Kontrola | | Stężenie foschloru w $\mu\text{g/ml}$ | | | | |
|-----------|------|---------------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| | | 0,03 | 0,30 | 3,00 | 10,00 | 30,00 |
| IM w ‰ | 57,3 | 59,0 | 54,6 | 46,5 | 37,3 | 28,9 |
| p | | >0,05 | >0,05 | <0,01 | ≪0,001 | ≪0,001 |
| IS w ‰ | 87,9 | 81,3 | 72,2 | 48,6 | 39,0 | 27,8 |
| p | | <0,05 | <0,001 | ≪0,001 | ≪0,001 | ≪0,001 |
| M w min. | 78,0 | 87,0 | 90,6 | 114,6 | 114,6 | 124,2 |
| G w godz. | 22,7 | 24,6 | 27,6 | 41,0 | 51,2 | 71,6 |

Tab. 2. Wpływ foschloru inkubowanego na indeks mitotyczny, statmokinetyczny oraz na średni czas mitozy i czas generacji komórek L.
The effect of incubated dipterex on the mitotic and statmokinetic index, the average generation time and the mean duration of the cell cycle

| | Kontrola | Stężenie foschloru w $\mu\text{g/ml}$ | | | | |
|--------------|----------|---------------------------------------|-------|--------|--------|--------|
| | | 0,03 | 0,30 | 3,00 | 10,00 | 30,00 |
| IM w ‰ | 51,3 | 50,2 | 47,3 | 39,3 | 27,7 | 18,6 |
| p | | >0,05 | >0,05 | <0,01 | ≪0,001 | ≪0,001 |
| IS w ‰ | 83,0 | 76,8 | 66,6 | 44,7 | 33,0 | 22,0 |
| p | | >0,05 | <0,01 | ≪0,001 | ≪0,001 | ≪0,001 |
| M w min. | 73,8 | 78,0 | 85,2 | 105,0 | 100,2 | 101,4 |
| G w godz. | 24,0 | 25,9 | 30,0 | 44,5 | 60,2 | 90,9 |

wyraźnemu obniżeniu uległ wskaźnik mitotyczny. Jednocześnie należy podkreślić znaczne przedłużenie średniego czasu generacji oraz przedłużenie średniego czasu mitozy. Dawki foschloru 0,30 oraz 0,03 $\mu\text{g/ml}$ pożywki nie powodują statystycznie znamiennego obniżenia wskaźnika mitotycznego. Należy zwrócić uwagę na wyniki drugiej części doświadczenia, w którym na hodowlę działało foschlorem uprzednio inkubowanym przez 24 godz. w 37°C w płynie hodowlanym. Wyniki te świadczą, że również produkty rozpadu foschloru działają toksycznie na hodowlę komórek L. Wyrazem tego jest całkowite zahamowanie aktywności mitotycznej hodowli przy stężeniu wyjściowym foschloru 100,00 $\mu\text{g/ml}$ oraz wyraźne obniżenie wskaźnika mitotycznego, przedłużenie średniego czasu generacji oraz mitozy przy stężeniach foschloru 30,00; 10,00; 3,00 $\mu\text{g/ml}$. Obserwacje nasze pokrywają się prawie zupełnie z wynikami wcześniejszych prac autora prowadzonych na fibroblastach mysich oraz ludzkich (4, 5). Natomiast w doświadczeniach Truchlińskiego fibroblasty ludzkie cechowały się większą odpornością wobec foschloru i przeżywały stężenie rzędu 100,00 $\mu\text{g/ml}$ pożywki (12). Jednocześnie prace Piekarskiego i wsp. (9) wskazują na różną wrażliwość hodowli komórek kręgowców. I tak na przykład fibroblasty zarodków myszy wykazują trzykrotnie większą wrażliwość na foschlor niż fibroblasty z zarodków kurzych. Według Gabliksa komórki wątroby ludzkiej szczepu Chang są nieznacznie bardziej wrażliwe od komórek HeLa, natomiast zahamowanie wzrostu obu szczepów pod wpływem tego związku jest identyczne (3). Jednak, jak podaje Piekarski (9), ze względu na różne warunki hodowli trudno jest porównywać wyniki uzyskane w różnych laboratoriach.

Wyniki naszej pracy dotyczące średniego czasu trwania mitozy i gene-

racji uzyskane w seriach kontrolnych są prawie identyczne z wynikami cytowanymi w literaturze (8). Biorąc pod uwagę znaczne przedłużenie średniego czasu generacji i przedłużenie średniego czasu mitozy pod wpływem kontaktu hodowli z foschlorem należy przypuszczać, że patomechanizm toksycznego działania foschloru polega na zaburzeniu całego szeregu procesów metabolicznych komórki, a nie tylko na zablokowaniu cholinesteraz. Działanie tego związku być może ma wpływ na metabolizm głównie cytoplazmy, a nie jądra, na co wskazywać by mogła większa liczba komórek wielojądrzastych w zatrutych hodowlach powstałych w wyniku zahamowania cytokinezy. Również prace B. J. Deana i E. Thorpe'a (2) wskazują na brak działania uszkadzającego chromosomy innego związku fosforoorganicznego, jakim jest dichlorvos. Jednak zagadnienie to jak również różnice w działaniu foschloru na indeks mitotyczny i stathmokinetyczny wymaga dodatkowych badań i będzie przedmiotem dalszych prac autorów.

Jak wykazują prace Sawickiego (10, 11), foschlor w czasie inkubacji w płynie hodowlanym w temp. 38°C rozpada się w ciągu 24 godz. prawie w 100%. Należy jednak zaznaczyć, że po 4 godz. w płynie z nad hodowli znajduje się 50% nie rozłożonego foschloru, natomiast po 12 godzinach już tylko 11% (10). Jednak, jak wynika z doświadczeń Kugaczewskiej i wsp., foschlor oraz DDVP inkubowane w płynie hodowlanym wykazywały działanie znacznie mniej toksyczne aniżeli roztwory świeże. Jednocześnie zarówno foschlor świeży, jak i inkubowany hamuje wbudowywanie się H³ tymidyny do DNA. Jak wynika z naszych badań, działanie na hodowle komórek L produktów rozpadu foschloru jest równie silnie toksyczne lub nawet bardziej zaznaczone niż działanie świeżego foschloru. Rozważając więc działanie „świeżego” foschloru na hodowle musimy równocześnie brać pod uwagę działanie produktów jego rozpadu, takich między innymi jak: DDVP, metanolu i kwasu 2,2,2-trójchloro-1-hydroksyetylofosfonowego, z których DDVP jest bardziej toksyczny niż związek wyjściowy (12).

Wnioski

1. Foschlor w stężeniu 100,00 µg/ml pożywki hamuje całkowicie aktywność mitotyczną hodowanych komórek L. W dawkach 30,00; 10,00 i 3,00 µg/ml obniża wartość indeksu mitotycznego i stathmokinetycznego, natomiast w dawkach 0,30 i 0,03 µg/ml nie wywiera wyraźnego wpływu na wskaźnik mitotyczny.

2. Toksyczny wpływ foschloru wyraża się przede wszystkim bardzo znacznym przedłużeniem średniego czasu generacji hodowanych komórek L.

3. Działanie foschloru inkubowanego w płynie hodowlanym przez 24 godziny w 37°C na wymienione parametry jest podobne do działania świeżego foschloru.

PIŚMIENNICTWO

1. Aherne W., Camplejohn R. S.: *Exptl. Cell Res.* **74**, 496—502, 1972.
2. Dean B. J., Thorpe E.: *Arch. Toxikol.* **30**, 39—49, 1972.
3. Gabliks J., Friedman L.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **120**, 163—168, 1965.
4. Górski M.: *Arch. Med. Sąd. i Krym.* **25**, 45—54, 1975.
5. Górski M., Gąsiorowski A.: *Lek. Wojsk.* **48**, 884—888, 1972.
6. Kugaczewska M., Piekarski L., Szutkowski M., Trzaskowski J., Ziemski R.: *Bromat. Chem. Toks.* **5**, 473—479, 1972.
7. Lomakina L., Ja., Sholeńskaja I. N.: *Cytologia* **9**, 97—101, 1967.
8. Mauersberger B.: *Aktuelle Probleme der Zellzüchtung*. Veb. Gustav Fischer Verl., 167—170, Jena 1971.
9. Piekarski L., Fitak B., Kartliński J., Sawicki J.: *Bromat. Chem. Toks.* **4**, 307—314, 1971.
10. Sawicki J.: *Bromat. Chem. Toks.* **5**, 33—37, 1972.
11. Sawicki J.: *Bromat. Chem. Toks.* **6**, 197—205, 1973.
12. Truchliński J.: *Badania nad wpływem wybranych pestycydów fosforo-organiczných na hodowlę komórek fibroblastów ludzkich*. Praca dotkorska. AM Lublin 1974.

Otrzymano 10 XII 1975.

РЕЗЮМЕ

Исследовалось влияние диптерекса и продуктов его распада на митотическую активность клеток L. С этой целью определялись митотический и колъхициновый индексы, а также средняя продолжительность митоза и генерации 400 культур.

Как свежий диптерекс, так и инкубированный при температуре 37°C в течение 24 часов, обнижают величину митотического индекса в концентрации 3,00 мг/мл среды, причем даже 10-кратное уменьшение дозы (т.е. 0,30 мг/мл среды) увеличивает среднее время длительности митоза и генерации.

SUMMARY

The aim of the paper was an examination of the effect of fresh and incubated dipterex on the mitotic activity of L-cells. The mitotic and stathmokinetic index, the average generation time and mean duration of mitosis have been examined in 400 cultures.

The fresh and incubated dipterex in a 3,00 µg/ml dose decreased the values of mitotic index. The mean duration of mitosis and the average generation time were prolonged in the culture medium with a 0,30 µg/ml dose of dipterex.

