

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXXI, 45

SECTIO D

1976

Zakład Embriologii. Instytut Biologii. UMCS w Lublinie
Kierownik: doc. dr hab. Michał Górski
Wytwórnia Surowic i Szczepionek w Lublinie
Dyrektor: dr med. Marian Biernacki

Michał GÓRSKI, Danuta GRZYBEK

**Wpływ trypsynowania oraz zmiany płynu hodowlanego
na przeżycie hodowli tkankowych
zatrutych związkami fosforoorganicznymi**

Влияние трипсинирования и изменения культурной среды на выживание
тканевых культур, отравленных фосфоорганическими соединениями

The Effect of Trypsination and the Exchange of Nutrition Medium on the Survival
of Tissue Cultures Intoxicated with Phosphoroorganic Compounds

Związki fosforoorganiczne (ZFO) oraz produkty ich hydrolizy w środowisku hodowlanym wywierają cytotoksyczne działanie na hodowle tkankowe. Związki te w większych stężeniach znacznie uszkadzają hodowle, a działając przez dłuższy czas powodują zniszczenie hodowli. Pewna ilość komórek przeżywa jednak zatrucie nawet wysokimi dawkami ZFO (1, 2, 5). Postanowiono zbadać, jaki wpływ wywiera na zatrute hodowle trypsynowanie oraz zmiana płynu odżywczego.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenie przeprowadzono na hodowlach nerki małpy (*Cercopithecus aethiops*) oraz hodowlach HeLa. Hodowle nerki małpy prowadzono na szkiełkach w naczyniach Legroux i jako płyn utrzymujący stosowano podłoże Parkera z 2% dodatkiem inaktywowanej surowicy cielęcej. Hodowle HeLa — w naczyniach Leighton (szkiełkowa hodowla) i jako płyn utrzymujący stosowano podłoże Parkera z 10% dodatkiem inaktywowanej surowicy cielęcej. Doświadczenie przeprowadzono w 4 seriach, łącznie na 400 hodowlach, dodając do płynu hodowlanego w 2 seriach doświadczenia 0,0-dwumetylo-2,2-trójchloro-1-hydroksyetylo-fosfonian (foschlor), w 2 pozostałych ester dwuizopropylowy kwasu fluorofosfonowego (DFP). Oba typy hodowli podzielono na 4 grupy i założono po 100 hodowli w każdej serii doświadczenia. Grupa I (10 hodowli) — była kontrolną. Grupa II (30 hodowli) — do płynu hodowlanego dodano DFP lub foschlor w dawce 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Grupa III (30 hodowli) — do płynu hodowlanego dodano DFP lub foschlor w dawce 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Grupa IV (30 hodowli) — do płynu hodowlanego dodano DFP lub foschlor w dawce 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$. We wszystkich grupach doświadczalnych 10 hodowli pozostawiano bez zmiany płynu

Tab. 1. Cytotoksyczne działanie foschloru na hodowlę HeLa
Cytotoxic effect on HeLa culture

Nr hodowli	Foschlor $\mu\text{g/ml}$	Po 24 godz.		Dni po zatruciu							Uwagi
		zmiana plynu	trypsynowanie	1	2	3	4	5	6	7	
1—10	—	—	—	O	O	O	O	±	±	±	
11—20	30	—	—	O	O	±	±	±	±	W	
21—30	30	+	—	O	O	O	O	±	±	±	
31—40	30	+	+	O	O	O	O	O	±	±	
41—50	60	—	—	O	+	+	W	W	W	ZH	X
51—60	60	+	—	O	O	O	O	±	±	±	
61—70	60	+	+		SW	SW	O	O	±	±	
71—80	120	—	—	W	ZH						
81—90	120	+	—	W	W	W	W	W	ZH		X
91—100	120	+	+		SW	SW	SW	SW	W	W	X

Objaśnienie znaków: O — wzrost prawidłowy hodowli, SW — słaby wzrost hodowli, ± — nieznaczne zmiany degeneracyjne, W — wyraźne zmiany degeneracyjne, ZH — zniszczenie hodowli, X — żyją tylko pojedyncze komórki lub pojedyncze grupy komórek.

hodowlanego, w 10 hodowlach po 24 godzinach działania ZFO zmieniono płyn hodowlany, 10 pozostałych hodowli poddawano trypsynowaniu i przenoszono do nowego środowiska hodowlanego.

Hodowle HeLa obserwowano przez okres 7 dni, hodowle nerki małpy przez 10 dni. Co 24 godz. pobierano po jednym szkiełku z hodowlą z każdej grupy, utrwalano w 96% alkoholu etylowym i barwiono wg metody May Grunwalda—Giemsa. Wyniki badań przedstawiono na tabelach 1 i 2.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Tab. 1 przedstawia zachowanie się hodowli HeLa po zatruciu foschlorom, tab. 2 — hodowle nerki małpy zatrutej DFP. Ze względu na to, że zmiany cytotoksyczne zarówno w hodowlach HeLa, jak również w hodowlach nerki małpy pod wpływem obu ZFO były prawie identyczne, przedstawiono jedynie po jednej tabeli dla foschloru i dla DFP. Zmiany zwyrodnieniowe w hodowlach *in vitro* należą do obrazu „starzenia się” hodowli i zależą przede wszystkim od szybkości namnażania się komórek. Zmiany te pojawiają się w 5 i 6 dniu w hodowlach HeLa oraz w 9 i 10 dniu w hodowlach nerki małpy. DFP oraz foschlor w dawce 30 $\mu\text{g/ml}$ powoduje szybsze pojawienie się oraz większe nasilenie tych zmian. Dawki większe, tj. 60 $\mu\text{g/ml}$, wyraźnie i szybko rozwijają występujące zmiany zwyrodnieniowe oraz częściowe zniszczenie hodowli. Dawka 120 $\mu\text{g/ml}$ powoduje całkowite zniszczenie hodowli już w 2 dobie.

Hodowle po zatruciu dawką 30 $\mu\text{g/ml}$, które po 24 godzinach trypsyno-

Tab. 2. Cytotoksyczne działanie DFP na hodowlę nerki małpy
Cytotoxic effect on monkey kidney culture

Nr hodowli	Po 24 godz.			Dni po zatruciu										Uwagi	
	DFP $\mu\text{g/ml}$	zmiana płynu	trypsynowanie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1—10	—	—	—	O	O	O	O	O	O	O	O	O	±	±	
11—20	30	—	—	O	O	O	±	±	±	±	±	±	±	W	
21—30	30	+	—	O	O	O	O	O	O	O	O	O	±	±	
31—40	30	+	+		O	O	O	O	O	O	O	O	±	±	
41—50	60	—	—		O	±	±	W	W	W	W	W	W	ZH	X
51—60	60	+	—	O	O	O	O	O	O	O	O	±	±	±	
61—70	60	+	+		SW	SW	SW	O	O	O	O	O	±	±	
71—80	120	—	—	W	ZH										
81—90	120	+	—	W	W	W	W	W	W	W	ZH				X
91—100	120	+	+		SW	SW	SW	SW	W	W	W	W	W	W	X

Objaśnienia znaków: patrz tab. 1.

nowano lub w których zmieniano płyn inkubacyjny, rozwijały się prawidłowo, podobnie jak hodowle kontrolne. Również po zatruciu hodowli dawką 60 $\mu\text{g/ml}$ trypsynowanie i zmiana płynu powodowały znaczne opóźnienie wystąpienia zmian zwyrodnieniowych. Przy dawce 120 $\mu\text{g/ml}$ trypsynowanie oraz zmiana płynu odżywczego nie wywierały wyraźniejszego działania ochronnego. Opóźniały jedynie występowanie całkowitego zniszczenia hodowli oraz pozwalały na przeżycie nielicznych komórek, które następnie odzyskiwały zdolność do dalszego namnażania się.

ZFO w płynie inkubacyjnym w warunkach hodowli ulegają szybko hydrolizie i po 24 godz. udaje się wykazać jedynie ich obecność śladową (3, 4, 6). Korzystny wpływ, jaki wywiera na hodowlę zmiana płynu odżywczego oraz trypsynowanie, można tłumaczyć usunięciem produktów rozpadu ZFO z medium hodowlanego oraz pobudzającym działaniem świeżego płynu odżywczego na mnożenie się komórek. Wyniki doświadczenia wskazują zatem na cytotoksyczne działanie również metabolitów ZFO.

Wnioski

1. DFP oraz foschlor w dawkach 30 i 60 $\mu\text{g/ml}$ po 24 godz. działania powodują uszkodzenie, a w dawce 120 $\mu\text{g/ml}$ niszczą hodowlę HeLa oraz hodowlę nerki małpy.

2. Zmiana płynu hodowlanego oraz trypsynowanie po 24 godz. działania tych związków na hodowlę w dawce 30 i 60 $\mu\text{g/ml}$ przywraca zdolność

do dalszego prawidłowego wzrostu hodowli, natomiast po zatruciu dawką 120 $\mu\text{g/ml}$ umożliwia przeżycie tylko pojedynczych komórek.

3. Stopień działania cytotoksycznego DFP oraz foschloru na hodowlę *in vitro* jest podobny, pomimo że toksyczność DFP jako inhibitora acetylocholinesterazy jest w stosunku do foschloru ponad 100-krotnie większa *in vivo*.

PIŚMIENNICTWO

1. Gabliks J., Friedman L.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **120**, 163—168, 1965.
 2. Górski M.: Arch. Med. Sąd. i Krym. **25**, 45—54, 1975.
 3. Kugaczewska M., Piekarski L., Szutkowski M., Trzaskowski J., Ziemiński R.: Bromat. Chem. Toks. **5**, 473—479, 1972.
 4. Piekarski L., Fitak B., Kartliński J., Sawicki J.: Bromat. Chem. Toks. **4**, 307—314, 1971.
 5. Sawicki J.: Bromat. Chem. Toks. **6**, 197—205, 1973.
 6. Truchliński J.: Badania nad wpływem wybranych pestycydów fosforoorganicznych na hodowlę komórek fibroblastów ludzkich. Praca doktorska, AM Lublin 1974.
- Otrzymano 10 XII 1975.

РЕЗЮМЕ

Наблюдались цитотоксические изменения, происходящие в 360 культурах HeLa и в почке обезьяны под влиянием действия ДФП и диптерекса. 40 культур были оставлены в качестве контрольных.

Изменение питательной среды и трипсинирование после 24 часов инкубации с фосфоорганическими соединениями обнижает степень повреждения культуры при дозах 30 и 60 мг/мл , но при дозе 120 мг/мл пережили отравление только некоторые клетки.

Эти результаты свидетельствуют о цитотоксическом действии также и метаболитов фосфоорганических соединений.

Несмотря на 100-кратно большую *in vivo* токсичность ДФП по сравнению с диптерексом цитотоксическое действие *in vitro* обоих соединений аналогично.

SUMMARY

Cytotoxic changes, as the effect of intoxication of DFP and dipterex, have been observed in 360 HeLa cultures and in monkey kidney cultures. 40 cultures were left as control.

The change of the culture medium and trypsination after 24 hrs incubation with phosphoroorganic compounds diminished the degree of culture damage at doses of 30 and 60 $\mu\text{g/ml}$, whereas at the 120 $\mu\text{g/ml}$ dose only single cells survived.

These results prove that metabolites of phosphoroorganic compounds are also cytotoxic.

Despite a 100 times higher *in vivo* toxicity of DFP in comparison to dipterex, the cytotoxic effects of both compounds *in vitro* are the same.