

Katedra i Zakład Epidemiologii. Akademia Medyczna w Lublinie  
Kierownik: prof. zw. dr hab. n. med. Leon Jabłoński

Bassam Ahmed Shukri MOHAMED

**Badanie zmian w ciągłej hodowli komórek GMK pod wpływem  
*Hydrocortisonum hemisuccinatum*, propranololu i diazepamu**

Examining of Changes in Continuous Breeding of GMK (Green Monkey Kidney) Cells Treated  
with *Hydrocortisonum hemisuccinatum*, Propranolol and Diazepam

Hodowla komórek ssaków w warunkach doświadczalnych *in vitro* stanowi obecnie podstawową metodę wielokierunkowych badań w naukach medycznych i przyrodniczych, szczególnie w badaniu działania leków, w badaniach immunologicznych (9, 10, 14), genetycznych (12, 15) oraz w badaniu mechanizmu powstawania nowotworów (1, 2, 7, 14).

Hodowle komórek *in vitro*, a szczególnie hodowle komórek ludzkich i małpich są przydatne do badania wpływu związków chemicznych, w tym leków, na wzrost, morfologię i niektóre etapy przemiany materii. Cechą charakterystyczną takiego układu doświadczalnego w porównaniu z organizmem zwierzęcia doświadczalnego jest to, że eliminuje się metabolizujące działanie poszczególnych narządów organizmu: wątroby, płuc, mięśni (3, 4, 7). Działanie związku chemicznego lub leku wpływa bezpośrednio na kolejność przemian wewnątrz komórki. Umożliwia to głębszą analizę oddziaływania leku na funkcję komórki. Pośrednio pozwala na wnioskowanie o działaniu leku, a szczególnie jego wpływie na wzrost i funkcje pojedynczej komórki. Metoda ta może być przydatna w badaniu właściwości leków znanych i nowo syntetyzowanych (5, 6, 11, 13).

Opierając się na powyższych założeniach, postanowiono badać wpływ *Hydrocortisonum hemisuccinatum*, propranololu i diazepamu na jednowarstwową hodowlę komórek stałej linii małpiej GMK (*green monkey kidney*).

MATERIAŁ BADAŃ

Do badań używano typowej hodowli komórek. Była to linia stała (pasażowana) hodowli pochodzącej z nerki małpy zielonej (*Cercopithecus aethiops*) nazywana linią GMK (*green monkey*

*kidney*). Otrzymano ją z Wytwórni Surowic i Szczepionek w Lublinie. Badano wpływ niżej wymienionych leków na wzrost i morfologię komórek.

A. *Hydrocortisonum hemisuccinatum*. *Hydrocortisonum sodium succinate*, sól sodowa bursztynianu hydrokortyzonu. Jako lek ma szerokie zastosowanie wielokierunkowe, głównie w chorobach tkanki łącznej, we wstrząsach, napadach ciężkiej dychawicy oskrzelowej i innych.

B. *Propranolol hydrochloride*, *Proprasylytum*, chlorowodorek 1-izopropylamino-3-(1-naftyloksy)-2-propranolu. Działa on na receptory adrenergiczne  $\beta$  w mięśniu sercowym. Efekty działania są wielokierunkowe.

C. Diazepam, pochodna benzodiazepiny, metylodiazepinon, 7-chloro-1,3-dihydro-1-metylo-5-fenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on. Jest to lek uspokajający, przeciwlękowy i przeciwdrgawkowy.

## METODY BADAŃ

Ogólnie stosowane metody można podzielić na:

- a) metody hodowli komórek *in vitro*;
- b) metody rozcieńczania badanych leków;
- c) metody oglądania hodowli komórek kontrolnych i doświadczalnych w mikroskopach;
- d) ustalenie cytotoksycznej dawki leku;
- e) metody podstawowego barwienia hodowli komórek na szkiełkach nakrywkowych (13);
- f) metody specjalnych barwień komórek na szkiełkach nakrywkowych;
- g) oglądanie zabarwionych preparatów w mikroskopach;
- h) fotografowanie zabarwionych preparatów;
- i) analiza obrazów komórek widocznych w mikroskopach i na fotografiach (4, 11).

Hodowlę komórek prowadzono zgodnie z klasycznymi przepisami, stosując metody i płyny dogodne do hodowli komórek GMK.

Leki rozcieńczano w warunkach jałowych — od stężeń zawartych w ampułkach, kolejno o połowę, aż do rozcieńczeń końcowych. Badane rozcieńczenia końcowe w płynie odżywczym dodawane do hodowli komórek wynosiły:

*Hydrocortisonum hemisuccinatum* badano w następujących stężeniach: 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,62, 7,81 i 3,905  $\mu\text{g/ml}$ . Dawka cytotoksyczna wynosiła 500  $\mu\text{g/ml}$ .

Propranolol badano w następujących stężeniach: 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,62, 7,81 i 3,905  $\mu\text{g/mol}$ . Dawka cytotoksyczna wynosiła 500  $\mu\text{g/ml}$ .

Diazepam badano w następujących stężeniach: 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,62, 7,81, 3,905, 1,195, 0,976, 0,488, 0,244, 0,122, 0,061, 0,030, 0,015, 0,007, 0,003, 0,001 i 0,0009  $\mu\text{g/ml}$ . Dawka cytotoksyczna wynosiła 500  $\mu\text{g/ml}$ .

Hodowle badanych komórek inkubowano przez 12, 24 i 36 godz. Cytotoksyczną dawkę leku ustalono po 12 godz. inkubacji, zwracając uwagę na zniszczenie warstwy komórkowej, komórki martwe i brak wzrostu w określonym stężeniu leku.

Stałą linię komórek GMK utrzymywano w butelce „matce” metodą kolejnego pasażowania. W butelkach tych komórki trypsynizowano, uzyskiwano zawiesinę ok. 150 tys. komórek w 1 ml i rozsiewano do probówek lub butelek ze szkiełkami nakrywkowymi.

Gdy podczas inkubacji w probówkach komórki pokrywały 85 i 90% powierzchni, wymieniano płyn odżywczy na płyn zawierający określone stężenie badanego leku.

Po odpowiednim czasie inkubowania (12, 24, 36 i 48 godz.) komórki oglądano w mikroskopie świetlnym, oceniając ich morfologię. Część doświadczenia, tj. komórki na szkiełkach nakrywkowych, barwiono zmodyfikowaną metodą Giemsa. Preparaty utrwalano, oglądano w mikroskopie i fotografowano.

Barwienie zmodyfikowaną metodą Giemsa:

- 1) wyjąć szkiełka z hodowlą komórek z probówek lub z butli;

- 2) przemyć PBS (zbuforowanym fizjologicznym roztworem soli);
- 3) wysuszyć na powietrzu;
- 4) utwalić metanolem ok. 20 min.;
- 5) przemyć wodą destylowaną;
- 6) wysuszyć na powietrzu;
- 7) barwić barwnikiem Giemsy ok. 1 godz. (przygotowanie barwnika: na 10 ml wody destylowanej dodać 50 kropli przesączonego barwnika);
- 8) przemyć wodą z kranu;
- 9) wysuszyć na powietrzu, przykleić szkiełko balsamem kanadyjskim do szkiełka podstawowego i oglądać pod mikroskopem.

## WYNIKI BADAŃ

### *Hydrocortisonum hemisuccinatum*

W pierwszej grupie doświadczeń ustalono dawkę cytotoksyczną *Hydrocortisonum hemisuccinatum* dla jednowarstwowej ciągłej hodowli komórek nerki małpy na podstawie mikroskopowej oceny morfologii i wzrostu komórek pod wpływem różnych stężeń leku w płynie odżywczym. Zmiany porównywano z kontrolną hodowlą komórek (ryc. 1).

Ustalono dawkę cytotoksyczną *Hydrocortisonum hemisuccinatum* w porównaniu z hodowlą kontrolną. Dawka ta wynosiła 62,5 µg/ml.

W drugiej grupie doświadczeń badano wpływ *Hydrocortisonum hemisuccinatum* na zmiany wewnątrzkomórkowe, stosując specjalną hodowlę na szkiełkach nakrywkowych. Wykonano to następująco:

Do 4-dniowej hodowli komórek dodano kolejne rozcieńczenia leku i inkubowano w cieplarni w temp. 37°C. Szkiełka wyjmowano po upływie określonego czasu, tj. 12, 24, 36 i 48 godz. Utrwalano metanolem i barwiono według zmodyfikowanej metody Giemsy. Przyklejono szkiełka balsamem kanadyjskim do szkiełka podstawowego. Następnie oglądano je pod mikroskopem. Zaobserwowane zmiany porównano z odpowiednimi preparatami kontrolnymi.

Patologiczne zmiany w warstwie komórek widoczne były już po 12 godz. inkubacji. Tam, gdzie zastosowano największe stężenia leku, zahamowany został wzrost i podział komórek. Widoczne były zmiany dotyczące ułożenia komórek, kształtu, a także zmiany fizjologiczne i morfologiczne w cytoplazmie. Występowały one w czasie 12, 24, 36 i 48 godz. Były to zmiany obrysu jądra, obserwowano rozpad jądra, powstanie wakuoli, odkurczenie i lekkie poszarpanie cytoplazmy a także rozpad komórek (ryc. 2).

### Propranolol

Ustalono dawkę cytotoksyczną propranololu dla jednowarstwowej ciągłej hodowli komórek nerki małpy na podstawie mikroskopowej oceny morfologii

i wzrostu komórek. W wyniku obserwacji w mikroskopie ustalono dawkę cytotoksyczną równą 62,5 µg/ml.

W drugiej grupie doświadczeń metodologicznie postępowano tak jak w badaniu *Hydrocortisonum hemisuccinatum*.

### Diazepam

W pierwszej grupie doświadczeń ustalono dawkę cytotoksyczną diazepamowi dla jednowarstwowej ciągłej hodowli komórek nerki małpy na podstawie mikroskopowej oceny morfologii i wzrostu komórek. W wyniku obserwacji w mikroskopie ustalono dawkę cytotoksyczną równą 3,905 µg/ml.

Przegląd hodowli pod mikroskopem wykazał, że po wszystkich użytych stężeniach widoczne były patologiczne zmiany w warstwie komórek, wzrost komórek i podziały były zahamowane po 12 godz. we wszystkich próbkach. Zmiany dotyczyły ułożenia komórek, ich kształtu, zmian w cytoplazmie. Po wszystkich stężeniach leku obserwowano zmianę obrysu jądra, rozpad jądra, powstanie wakuoli, odkurczenie i lekkie poszarpanie cytoplazmy oraz rozpad komórek.

Druga grupa doświadczeń polegała na określeniu wpływu diazepamowi na zmiany wewnątrzkomórkowe przy zastosowaniu specjalnej hodowli ze szkiełkami nakrywkowymi. Zaletą tej metody jest to, że komórki przyczepiają się, rozmnażają zarówno na szkiełkach próbki, jak i na szkiełku, które można wyjąć w dowolnym czasie, utrwalić, wybarwić i przygotować preparat. Komórki używane do doświadczenia powinny tworzyć jednolitą, równomierną warstwę, tzn. *monolayer*.

### OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

#### *Hydrocortisonum hemisuccinatum*

Ustalono, że *Hydrocortisonum hemisuccinatum* w stężeniu wyższym od 62,5 µg/ml po 12 godz. wykazywał działanie cytotoksyczne. W największej mierze dotyczyło to cytoplazmy, następnie jądra i błony komórkowej. Zmiany degeneracyjne pogłębiały się w miarę upływu czasu wprost proporcjonalnie do stężenia leku.

Obserwowano zmiany w cytoplazmie. Była ona porozrywana, nitkowata, siateczkowata, koronkowa i porozciągana. Pojawiły się wakuole. Jądra były nieregularne, z ziarnistościami, odkurzone, z wakuolami, bardziej wybarwione niż w kontroli.

### Propranolol

W pierwszej grupie doświadczeń ustalono, iż dawki wyższe niż 62,5 µg/ml po 12 godz. działały cytotoksycznie. W największej mierze dotyczyło to cytoplazmy,

następnie jądra i błony komórkowej. Zmiany degeneracyjne pogłębiały się w miarę upływu czasu wprost proporcjonalnie do stężenia leku.

Wpływ propranololu na komórki nerki małpy był znaczny, szczególnie duże zmiany zauważono w cytoplazmie. Duże zmiany degeneracyjne występowały przy większych stężeniach leku. Teoretyczne przeliczenia wykazały, że lek podawany według zaleceń nie powinien działać szkodliwie na komórki organizmu ssaka (ryc. 3).

### Diazepam

Obserwacje wykazały, że pierwsze objawy patologiczne, zaburzenia ciągłości warstwy komórkowej pojawiły się po 12 godz. przy stężeniu 3,905  $\mu\text{g/ml}$ .

Po zastosowaniu stężenia 3,905  $\mu\text{g/ml}$  po 24 i 36 godz. obserwowano odkurczenie się cytoplazmy i pojedyncze komórki atypowe. Po 48 godz. przy opisywanym stężeniu zmiany były już bardzo wyraźne i dotyczyły przeważającej większości komórek.

Przy wyższych stężeniach zmiany się nasilały, w jądrze pojawiały się ziarnistości i wtręty. Można przypuszczać, że lek może działać szkodliwie na komórki organizmu ssaka. Z przeprowadzonych badań i teoretycznych wyliczeń wynika, że istnieje konieczność podawania tego leku w niskich dawkach (ryc. 4).

### Wnioski

Przeprowadzone badania nad toksycznością trzech leków: *Hydrocortisonum hemisuccinatum*, propranololu i diazepamu wykazały, że:

1. *Hydrocortisonum hemisuccinatum* miał działanie toksyczne w dawce 62,5  $\mu\text{g/ml}$  po 12 godz. od podania do hodowli komórek. Dawka ta pośrednio świadczy, że lek jest bezpieczny i nie powinien działać szkodliwie na komórki organizmu ssaka.

2. Propranolol miał działanie toksyczne w dawce 62,5  $\mu\text{g/ml}$  po 12 godz. od podania do hodowli komórek. Tak wysoka dawka pośrednio świadczy, że lek ten nie powinien działać szkodliwie na komórki organizmu ssaka.

3. Diazepam miał działanie toksyczne w dawce 3,905  $\mu\text{g/ml}$  po 12 godz. od podania do hodowli komórek. Tak niska dawka pośrednio świadczy, że lek ten powinien być podawany w niskich dawkach, by nie działał szkodliwie na komórki organizmu ssaka.

4. Podczas badania działania wyżej wymienionych trzech leków zauważono, że efekt cytotoksyczny rozpoczynał się w cytoplazmie wytwarzaniem wodniczek i niszczeniem cytoplazmy, natomiast jądra komórek ulegały zmianom morfologicznym w późniejszym czasie doświadczenia.

5. Hodowla komórek ssaków w warunkach doświadczalnych *in vitro* stanowi obecnie podstawową metodę wielokierunkowych badań w naukach

medycznych i przyrodniczych, szczególnie w badaniu wirusów, w badaniach działania leków, w badaniach immunologicznych i genetycznych oraz w badaniu mechanizmów powstawania nowotworów.

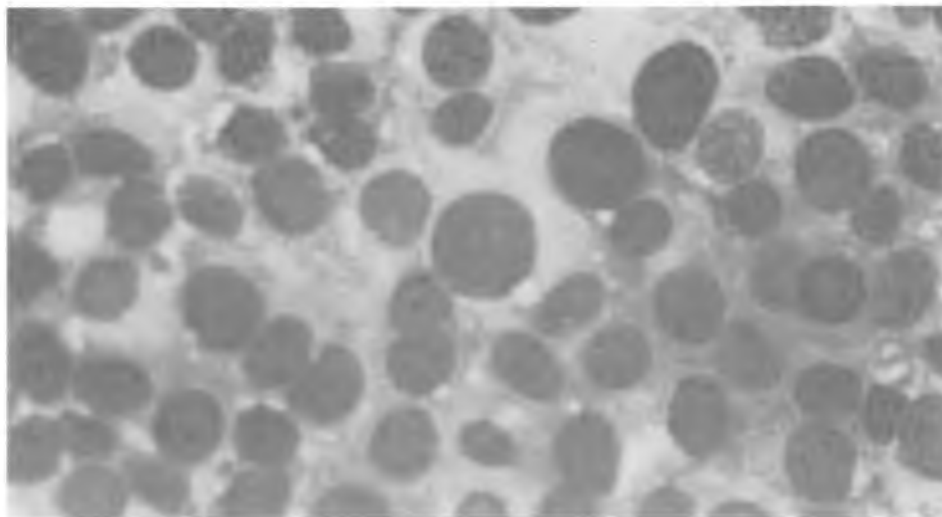
## PIŚMIENNICTWO

1. Baten A. i wsp.: Long-term culture of normal human colonic epithelial cells *in vitro*. *FASEB J.* **6** (9), 2726, 1992.
2. Biocca S. i wsp.: Expression and targeting of intracellular antibodies in mammalian cells. *EMBO-J* **9** (1), 101, 1990.
3. Challacombe D.N., Wheeler E. E.: Trophic action of epidermal growth factor on human duodenal mucosa cultured *in vitro*. *Gut.* **32** (9), 991, 1991.
4. Devalia J. L. i wsp.: Culture and comparison of human bronchial and nasal epithelial cells *in vitro*. *Respir. Med.* **84** (4), 303, 1990.
5. Dong Z. Y. i wsp.: *In vitro* model for intrinsic drug resistance: effects of protein kinase C activators on the chemosensitivity of cultured human colon cancer cells. *Mol. Pharmacol.* **39** (4), 563, 1991.
6. Giese A. C.: *Fizjologia komórki*. PWN, Warszawa 1985.
7. Jorissen M. i wsp.: Contribution of *in vitro* culture methods for respiratory epithelial cells to the study of the physiology of the respiratory tract. *Eur. Respir. J.* **4** (2), 210, 1991.
8. Kantoch M.: Efekt cytopatogeniczny jako wykładnik zakażenia wirusowego *in vitro*. *Postępy Hig. Med. Dośw.* **19**, 635, 1965.
9. Klerx J. P. i wsp.: *In vitro* production of monoclonal antibodies under serum-free conditions using a compact and inexpensive hollow fibre cell culture unit. *J. Immunol. Method.* **22**, 179, 1988.
10. Lasky L. A.: From virus to vaccine: recombinant mammalian cell lines as substrates for the production of herpes simplex virus vaccines. *J. Med. Virol.* **31** (1), 59, 1990.
11. Pinelli A. i wsp.: Comparison of two methods to evaluate drug-cytotoxicity on tumor cell lines cultured *in vitro*. *Pharmacol. Res. Commun.* **19** (12), 913, 1987.
12. Ramirez-Solis R. i wsp.: New vectors for the efficient expression of mammalian genes in cultured cells. *Gene.* **2**, 15, 87, 291, 1990.
13. Truchliński J., Jabłoński L.: Określanie dawek toksycznych związków chemicznych w hodowlach komórkowych. *Post. Hig. i Med. Dośw.* **31** (5), 241, 1977.
14. Umetsu D. T., Geha R. S.: *In vitro* production of antibody in cultures of human peripheral blood lymphocytes. *Methods Enzymol.* **150**, 309, 1987.
15. Yang N. S.: Gene transfer into mammalian somatic cells *in vivo*. *Crit. Rev. Biotechnol.* **12** (4), 335, 1992.

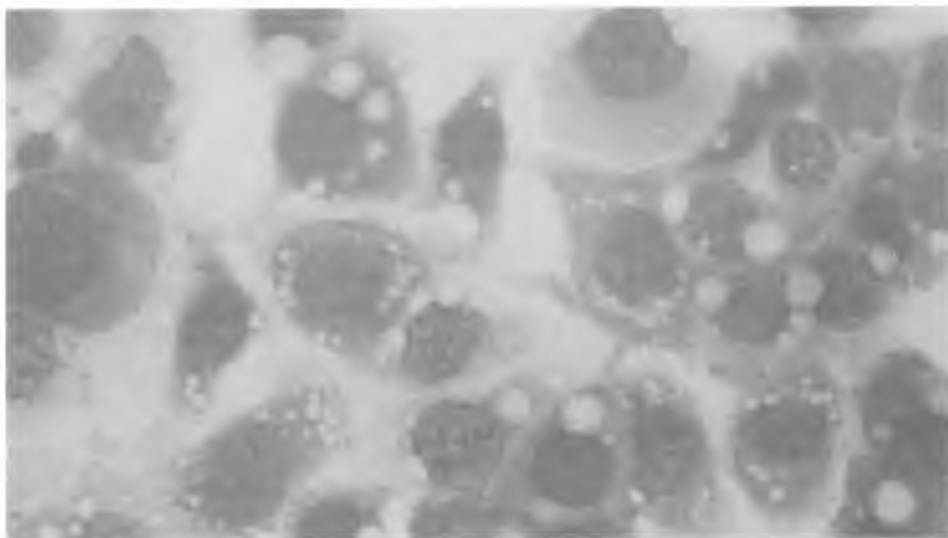
Otrzymano 1995.12.30.

## SUMMARY

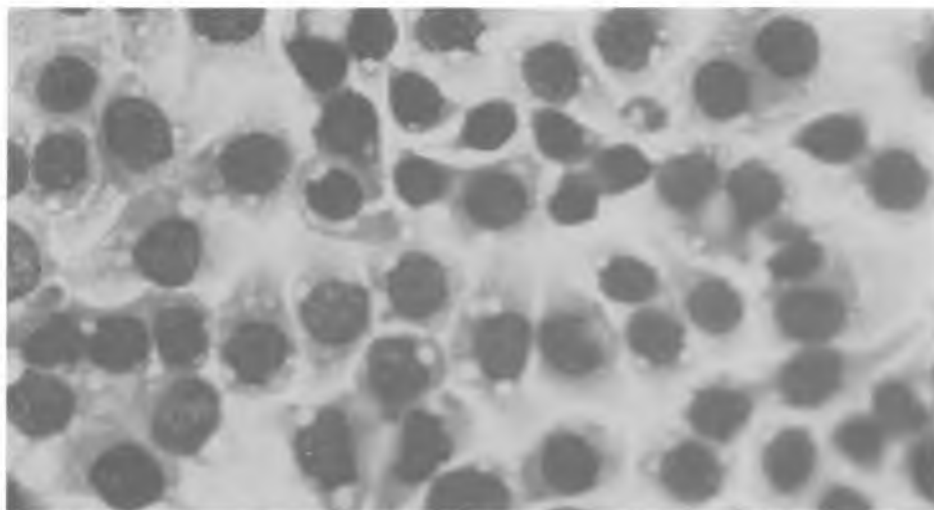
Changes in continuous breeding of GMK (green monkey kidney) cells treated with three selected medicines have been examined. There have been established cytotoxic doses of particular medicines. The changes in the morphological cells structures treated by the medicine have been described and photographed. Breeding of GMK cells *in vitro* has been assessed as useful in the examination of drugs toxicity upon human organism.



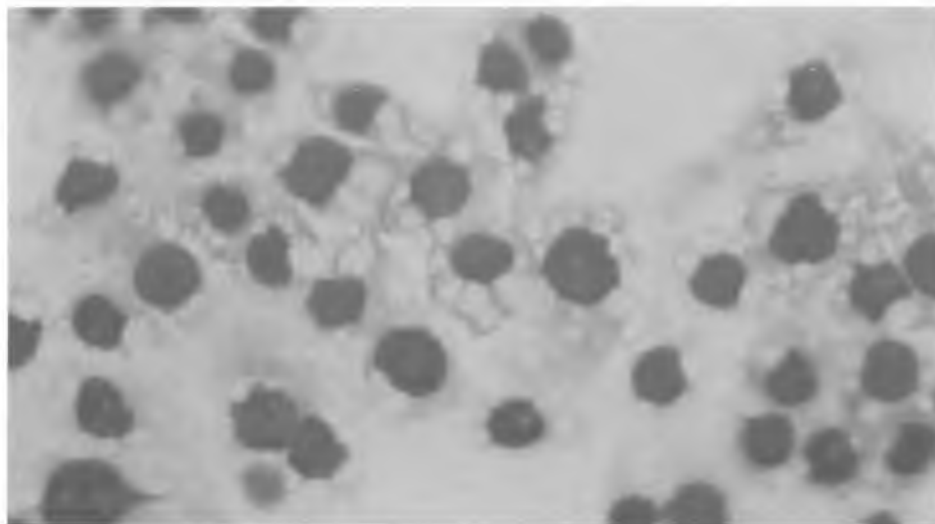
Ryc. 1. Kontrola hodowli komórek nerki małpy GMK (*green monkey kidney*) po 36 godz. hodowli. Pow. 1600 ×  
Breeding control of green monkey kidney cells after 36 hrs of breeding. Magn. 1600 ×



Ryc. 2. Degeneracja komórek GMK po 24 godz. działania *Hydrocortisonum hemisuccinatum* o stężeniu 31.25 µg/ml. Pow. 1600 ×  
Degeneration of green monkey kidney cells after 24 hrs of *Hydrocortisonum hemisuccinatum* treatment (concentration 31.25 µg/ml). Magn. 1600 ×



Ryc. 3. Degeneracja komórek GMK po 24 godz. działania propranololu o stężeniu 3.905  $\mu\text{g/ml}$ .  
Pow. 800  $\times$   
Degeneration of GMK cells after 24 hrs of propranolol treatment (concentration 3.905  $\mu\text{g/ml}$ ).  
Magn. 800  $\times$



Ryc. 4. Degeneracja komórek GMK po 48 godz. działania diazepamu o stężeniu 250  $\mu\text{g/ml}$ .  
Pow. 1600  $\times$   
Degeneration of GMK cells after 48 hrs of diazepam treatment (concentration 250  $\mu\text{g/ml}$ ).  
Magn. 1600  $\times$