

Antoni GAWRON, Maria SŁOTWIŃSKA

Wpływ imperatoryny na fibroblasty mysie TCTC

Влияние императорина на фибропласты мышей TCTC

The Effect of Imperatorine on Mouse TCTC Fibroblasts

Imperatoryna jest związkami z grupy psoralenów, stosowanym w leczeniu bielactwa, łuszczycy oraz innych chorób skóry związanych z nadmierną proliferacją naskórka (4, 12). Mechanizm działania psoralenów polega na tworzeniu krzyżowych połączeń pomiędzy niemi DNA po fotoaktywacji tych związków promieniowaniem ultrafioletowym (UVA) o długości 320—400 nm (10). Wytworzenie połączeń pomiędzy zasadami pirymidynowymi zmienia strukturę podwójnej heliksy i zaburza procesy komórkowe (9, 10). Chociaż psoraleny bez fotoaktywacji nie tworzą połączeń z kwasami nukleinowymi ani nie zmieniają ich struktury, to jednak ich obecność nie jest obojętna dla komórki. Jak wykazały badania, wywierają one widoczny wpływ na proliferację hodowanych w ciemności limfocytów (1, 6).

W przedstawionych badaniach dokonano oceny wpływu niefotoaktywowanej imperatoryny na namnażanie się *in vitro* mysich fibroblastów.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na hodowlach fibroblastów mysich szczepu TCTC. Komórki hodowano w pożywce Eagle'a (MEM 1959) z 5% dodatkiem inaktywowanej surowicy cielęcej oraz 20 µg gentamycyny na 1 ml pożywki. Do naczyń Leightona wysiewano po 2 ml zawiesiny zawierającej 2×10^5 komórek. Hodowlę inkubowano przez 24 godz. w temp. 37°C. Następnie zmieniano pożywkę na podłoże zawierające 0, 5, 10 i 20 µg/ml imperatoryny. Analitycznie czystą, w postaci krystalicznej, imperatorynę otrzymano z Zakładu Farmakognozji Akademii Medycznej w Lublinie. Substancję rozpuszczano w spektralnie czystym dwumetylosulfotlenku — DMSO (Merck). Stężenie DMSO w pożywce nie przekraczało 0,2%. Pożywka w hodowlach kontrolnych zawierała 0,2% DMSO. Zmianę pożywki wykonywano przy rozproszonym świetle żarówki. Inkubacja odbywała się w zupełnej ciemności. Po 24 i 48 godz. inkubacji pobierano po 3 hodowle z każdej grupy doświadczalnej i kontrolnej. Komórki utrwalano w alkoholu metylowym i barwiono hematoksyliną Harrisa i eozyną.

Zdolność do tworzenia kolonii oceniano wysiewając po ok. 1000 komórek do płytek Petriego o średnicy 10 cm. Po 24 godz. zmieniano podłoże na zawierające imperatorynę, a następnie inkubowano w ciemności przez 7 dni w temp. 37°C, w atmosferze zawierającej 5% CO₂. Podbarwione hematoksyliną Harrisa kolonie liczono pod mikroskopem. Do szczegółowej oceny kolonie barwiono hematoksyliną i eozyną.

Otrzymane wyniki weryfikowano statystycznie przy pomocy testu χ^2 , przyjmując jako kryterium znamienności $p < 0,05$.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Imperatoryna w stężeniach 10 i 20 $\mu\text{g/ml}$ pożywki powodowała obniżenie liczby dzielących się komórek (tab. 1). Wskaźnik mitotyczny w hodowli zawierającej imperatorynę w stężeniu 20 $\mu\text{g/ml}$ był ponad 6-krotnie niższy od hodowli kontrolnej. Natomiast imperatoryna w stężeniu 5 $\mu\text{g/ml}$ powodowała niewielki wzrost wskaźnika mitotycznego. Różnica ta jednak nie była znamienna statystycznie.

W hodowlach z imperatoryną stwierdzono także różnice w liczbie komórek w poszczególnych stadiach mitozy (tab. 2). Imperatoryna w stężeniu 5 $\mu\text{g/ml}$ powodowała zwiększenie liczby komórek w stadium profazy, a zmniejszenie w stadium telofazy. Natomiast w stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$ zanotowano zmniejszenie liczby profaz i zwiększenie się liczby komórek

Tab. 1. Wpływ imperatoryny na wskaźnik mitotyczny oraz występowanie komórek olbrzymich i wielojądrazystych
The effect of imperatorine (8-isoamlynoxypsoralen) on mitotic index and occurrence of polynuclear and giant cells

Czas inkubacji godz. Incubation time hrs.	Stężenie imperatoryny Imperatorine concentration $\mu\text{g/ml}$	Wskaźnik mitotyczny Mitotic index ‰	Komórki olbrzymie Giant cells %	Komórki z 2 jądrami Cells with two nuclei	Komórki zawierające 3 jądra i więcej Cells with three or more nuclei %
24	kontrola control	26,4	1,5	0,3	0,3
	5	30,1	1,5	0,6*	0,4
	10	18,4*	1,8	0,7*	0,5*
	20	3,9*	2,4*	1,0*	0,8*
48	kontrola control	28,8	1,8	0,4	0,4
	5	31,5	1,8	0,4	0,4
	10	19,2*	2,0*	0,8*	0,6*
	20	4,0*	2,6*	1,2*	0,8*

W każdej grupie doświadczalnej oceniano 10 000 komórek.

* $p < 0,05$.

After each experimental group 10,000 cells were estimated.

* $p < 0,05$.

Tab. 2. Wpływ imperatoryny na fazy mitozy oraz występowanie zaburzeń podziałów komórek
The effect of imperatorine on phases of mitosis and occurrence of disturbances of cell division

Czas inkubacji godz. Incubation time hrs.	Stężenie imperatoryny Imperatorine concentration $\mu\text{g/ml}$	Liczba mitoz Number of mitoses	Stadia mitozy Phases of mitosis %				Nieprawidłowe mitozy Irregular mitoses %				Ogółem mitozy Total of irregular mitoses %		
			P	M	A	T	P	M	A	T			
24	kontrola control	880	36,7	33,0	4,4	25,8	—	—	—	—	—	—	4,5
	5	900	41,4	34,5	4,3	19,7*	0,3	1,1	1,1	0,9	1,1	10,0*	10,0*
	10	910	31,2*	29,6	3,4	35,8*	0,4	6,6	0,4	0,8	0,4	8,2*	8,2*
	20	50	26,0	42,0	6,0	26,0	6,0	20,0	—	8,0	—	34,0	34,0
48	kontrola control	1000	37,4	29,4	4,5	28,7	0,3	4,2	0,1	0,1	0,1	5,5	5,5
	5	920	44,3*	31,7	3,9	20,0*	0,4	7,5	0,1	0,8	0,1	8,8*	8,8*
	10	900	29,7*	26,0	4,4	29,7*	0,1	7,2	0,2	0,9	0,2	8,4*	8,4*
	20	17	5,9	64,7	—	29,4	—	23,5	—	5,9	—	29,4	29,4

* $p < 0,05$. P — profaza, M — metafaza, A — anafaza, T — telofaza.

* $p < 0,05$. P — profase, M — metaphase, A — anaphase, T — teloptase.

Tab. 3. Wpływ imperatoryny na tworzenie kolonii przez komórki
The effect of imperatorine on the formation of cell colonies

Stężenie imperatoryny Imperatorine concentration $\mu\text{g/ml}$	Pojedyncze komórki Single cells	Liczba kolonii w zależności od liczby tworzących je komórek Number of colonies depending on cell numbers					Średnia liczba komórek w koloniach Average number of cells in colonies
		2-10	11-20	21-30	31-40	41-50	
kontrola control	43	54	30	34	42	66	675
5	65	38	26	37	48	56	616
10	79	117	148	84	75	43	482
20	198	236	30	5	—	—	271
							84,3
							105,2
							39,1
							5,6

Przedstawione wyniki stanowią średnią z 3 hodowli. Średnią liczbę komórek obliczono w 50 losowo wybranych koloniach.
The presented results are an average of 3 cultures. The average cell number was calculated in 50 randomly chosen colonies.

w stadium telofazy. Wśród nielicznych komórek mitotycznych w hodowlach z 20 $\mu\text{g/ml}$ imperatoryny większość komórek była w stadium metafazy.

Imperatoryna we wszystkich badanych stężeniach zwiększała częstość występowania nieprawidłowych mitoz (tab. 2). Obserwowano skupianie się kondensującej chromatyny w kilku centrach jądra lub w pobliżu błony jądrowej. Komórki często zawierały zniekształcone płytki metafazalne, niekiedy wyglądem przypominające literę Y. Poza obrębem płytki metafazalnej pozostawały pojedyncze chromosomy. Obserwowano także nierównomierne rozchodzenie się chromosomów do biegunów. W stadium telofazy występowały asymetryczne podziały cytoplazmy, dzielące niekiedy komórkę na więcej niż 2 części.

Imperatoryna w stężeniu 10 i 20 $\mu\text{g/ml}$ powodowała zwiększenie w hodowli liczby komórek olbrzymich oraz komórek wielojądrowych (tab. 1). Obniżała także zdolność komórek do tworzenia kolonii (tab. 3). Komórki tworzyły nie tylko mniej kolonii, ale również kolonie te składały się z mniejszej liczby komórek. Podczas gdy przeciętna liczba komórek w kolonii kontrolnej wynosiła 84,3 komórek, to w obecności imperatoryny w stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$ — 39,1, a w stężeniu 20 $\mu\text{g/ml}$ — tylko 5,6. W nielicznych i małych koloniach, powstających w środowisku zawierającym 20 $\mu\text{g/ml}$ imperatoryny, po 7 dniach inkubacji nie obserwowano w ogóle komórek mitotycznych (tab. 3). Mniej było także mitoz w koloniach w obecności imperatoryny w stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$. Natomiast więcej komórek mitotycznych niż w kontroli zawierały kolonie w pożywce z 5 $\mu\text{g/ml}$ imperatoryny. Wśród komórek mitotycznych w koloniach zaobserwowano

Tab. 4. Wpływ imperatoryny na wskaźnik mitotyczny oraz występowanie komórek olbrzymich i wielojądrowych w koloniach

The effect of imperatorine on mitotic index and occurrence of polynuclear and giant cells in colonies

Stężenie imperatoryny Imperatorine concentration $\mu\text{g/ml}$	Liczba ocenianych komórek Number of estimated cells	Wskaźnik mitotyczny Mitotic index ‰	Komórki olbrzymie Giant cells %	Komórki z 2 jądrami Cells with two nuclei %	Komórki zawierające 3 jądra i więcej Cells with three or more nuclei %
kontrola control	4216	19,2	2,6	0,5	0,3
5	4213	22,5	1,5	0,7	0,5
10	1958	11,0*	5,4*	1,5*	7,1*
20	950	0	—	—	—

* $p < 0,05$.

* $p < 0,05$.

więcej niż w kontroli nieprawidłowych podziałów. Podczas gdy w kontroli nieprawidłowe mitozy stanowiły 6%, to imperatoryna w stężeniu 5 $\mu\text{g/ml}$ zwiększała liczbę nieprawidłowych mitoz do 7,5%, a w stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$ do 17%.

W koloniach powstających w obecności imperatoryny w stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$ stwierdzono także większą liczbę komórek olbrzymich i wielojądrzastych (tab. 4). Liczba komórek olbrzymich była 2-krotnie większa niż w analogicznych koloniach kontrolnych. Natomiast liczba komórek zawierających więcej niż 2 jądra była ponad 20-krotnie większa od kontroli; 3-krotnie więcej było komórek z 2 jądrami.

DYSKUSJA

W przedstawionych badaniach oceniano wpływ imperatoryny (8-izometylenoksypsoralenu) na proliferację mysich fibroblastów. Szczegółowa analiza hodowli komórek inkubowanych z imperatoryną przez 24 i 48 godz. oraz kolonii komórek powstających podczas tygodniowej inkubacji wykazała silne oddziaływanie tego związku na komórki *in vitro*. Wynika z nich jednoznacznie, że imperatoryna bez fotoaktywacji wywiera hamujący wpływ na komórki w stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$. Zmiany wywołane przez imperatorynę nie tylko znacznie ograniczały zdolność komórek do podziałów, ale też zaburzały mitozę, zmieniając czas trwania jej stadiów oraz powodując ich nieprawidłowy przebieg, co prowadziło do tworzenia się komórek olbrzymich i wielojądrzastych. Powstawanie komórek olbrzymich i wielojądrzastych pod wpływem 8-metoksypsoralenu obserwowali także O m a r i wsp. (11). Ich zdaniem, komórki wielojądrzaste były wynikiem podziałów amitotycznych. Jak wynika z naszych badań, są one raczej rezultatem nieprawidłowo przebiegającej mitozy. Być może, jest to wynik dezorganizacji aparatu podziałowego, podobnie jak to ma miejsce u roślin pod wpływem kumaryny (5). Zniekształcone płytki metafazalne oraz wielobiegunowe anafazy, obserwowane przez nas, wskazują na możliwość zmian we wrzecionie podziałowym. Przyczyną tego mogą być interakcje imperatoryny z białkami biorącymi udział w procesie podziału komórkowego. Jak wykazali L a s k i n i wsp. (7), miejscem specyficznego wiązania psoralenów w komórce jest przede wszystkim cytoplazma. Należy wziąć pod uwagę także możliwość oddziaływania imperatoryny na białka enzymatyczne, których inaktywacja może doprowadzić do zmian metabolicznych ograniczających zdolność do podziału komórek. Badania nasze prowadzone były w ciemności i dotyczyły wpływu imperatoryny bez jej fotoaktywacji. Istnieje jednak możliwość aktywowania imperatoryny w komórce bez udziału światła. L e t t e r o n i wsp.

(8) wykazali, że 8-metoksypsoralen jest aktywowany przez cytochrom P-450 do chemicznie reaktywnych metabolitów, które wiążą się kowalencyjnie z mikrosomalnymi białkami. W rozważaniach nad mechanizmem działania imperatoryny należy wziąć pod uwagę zarówno oddziaływanie niekowalencyjne, jak i możliwość tworzenia trwałych połączeń. Rezultaty tych oddziaływań mogą dotyczyć bardzo ważnych regulatorów metabolizmu komórkowego. Albrightson i wsp. (2) wykazali, że 8-metoksypsoralen powoduje bardzo szybki wzrost cAMP w leukocytach, prawdopodobnie w wyniku hamowania fosfodiesterazy. Jak wynika z tych uwag, mechanizm działania psoralenów, a także imperatoryny jest złożony i właściwie mało znany. Lepiej poznane zostało działanie na DNA, które jednak bez fotoaktywacji nie powoduje skutków biologicznych (3).

Wyniki naszych badań wykazują, że imperatoryna, działając nie tylko na DNA, lecz również na inne cytoplazmatyczne składniki komórki, powoduje zahamowanie proliferacji komórek oraz zaburza przebieg mitozy.

PISMIENNICTWO

1. Abel G., Schimmer O.: Effect on Chromosomes by Coumarin Derivatives in the Dark. *Planta Medica* **42**, 333—343 (1981).
2. Albrightson Ch. R., Fertel R. H., Brown B. S., Stephens R.: Psoralens Increase the Concentration of Cyclic AMP in Human Cells *in vitro*. *J. Invest. Derm.* **85**, 264—268 (1985).
3. Dall'Acqua F., Terbojevich M., Marciani S., Vedaldi D., Recher M.: Investigation on the Dark Interaction Between Furocoumarins and DNA. *Chem. Biol. Interact.* **21**, 103—115 (1978).
4. Edelson R., Berger C. L., Gasparro F., Lee K., Taylor J.: Treatment of Leukemic Cutaneous T-Cell Lymphoma with Extracorporeally Photoactivated 8-methoxypsoralen. *Clin. Res.* **31**, 467A (1983).
5. Feuer G.: The Metabolism and Biological Actions of Coumarins. *Prag. Med. Chem.* **10**, 85—158 (1973).
6. Gawron A., Górski G., Głowniak K.: Increased Proliferation of PHA-stimulated Human Leucocytes after 8-methoxypsoralen Treatment. *J. Pharm. Pharmacol.* **42**, 194—195 (1990).
7. Laskin J. D., Lee E., Yourkow E. J., Laskin D. L., Gallo M. A.: A Possible Mechanism of Psoralen Phototoxicity Not Involving Direct Interaction with DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 6158—6162 (1985).
8. Letteron Ph., Descatoire V., Larrey D., Tinel M., Geneve J., Pessayre D.: Inactivation and Induction of Cytochrome P-450 by Various Psoralen Derivatives in Rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **238**, 685—692 (1986).
9. Moreno G.: Photosensitization of Mammalian Cells by Psoralens and Porphyrins. *Biochimie* **68**, 869—873 (1986).
10. Murray R. D. H., Mendez I., Brown S. A.: *The Natural Coumarins*. Ed. John Walley and Sons LTD. New York 1982.
11. Omar A., Wiesmann U. N., Krebs A.: Induction of Multinucleate Cells by 8-MOP and UV Treatment *in vitro* and *in vivo*. *Dermatologica* **155**, 65—75 (1977).

12. Parrish J. A., Fitzpatrick T. B., Tannenbaum L., Pathak M. A.: Photochemotherapy of Psoriasis with Oral Methoxalen and Longwave Ultraviolet Light. *New. Engl. J. Med.* 291, 1207—1211 (1974).

РЕЗЮМЕ

Исследовали влияние императорина (8-изоамыленоксипсорален) на культивируемые в темноте фибропласты мышей ТСТС. Констатировали, что императорин концентрации 5 мг/мл вызывает небольшой стимулирующий эффект, в то время как императорин концентрации 10 и 20 мг/мл снижает митотический индекс и способность клеток к образованию колоний. Кроме того, императорин всех этих концентраций нарушал правильный процесс митоза, индуцировал образование многоядерных и гигантских клеток. Эти наблюдения свидетельствуют о цитотоксическом воздействии императорина на клетки *in vitro* также без ее фотоактивации.

SUMMARY

The effect of imperatorine (8-isoamlylenoxypsoralen) on mouse TCTC fibroblasts cultured in the dark was studied. It was found that imperatorine at a dose of 5 $\mu\text{g/ml}$ had a slight stimulating effect while at 10 and 20 $\mu\text{g/ml}$ it lowered the mitotic index and the ability of cells to form colonies. At all concentrations studied, imperatorine disturbed regular mitosis. It also induced formation of polynuclear and giant cells. These observations demonstrate a cytotoxic action of imperatorine upon cells *in vitro*, also without its photoactivation.

CHARAKTERYSTYKA FLORY MIKROBIAKÓW

Na karce stwierdzono występowanie 61 gatunków mikrobiałów z 3 rzędów: *Peridiales* (20 gat.), *Helotiales* (24 gat.) i *Phacidiiales* (17 gat.). Z *Peridiales* najliczniej reprezentowana była rodzina *Hymenochaetaceae* (9 gat.) a z *Helotiales* — rodziny *Dermatiaceae* i *Hymenochaetaceae* (po 10 gat.).

Flora mikrobiałowa w zbiorowiskach roślin wyższych była dość różnorodna. Najliczniej (27 gat.) grzybowo zasiedlono w borze świerkowym. Znacząco mniej stwierdzono ich w płaszczakach (16 gat.) oraz na *Salix caprea* (14 gat.) i w *Salix caprea* (10 gat.).

Zbiórki grzybowe pochodziły z 3 grup gatunków drzew. Najliczniej

