

Antoni GAWRON

**Zmiany morfologiczne komórek L inkubowanych z molibdenianem sodu**

Морфологические изменения клеток L инкубированных с молибдатом натрия

Morphological Changes of Cells L Incubated with Sodium Molybdate

Opisywane w literaturze, przypadki zatruc zwierząt molibdenem spowodowane były głównie spożywaniem roślin o dużej zawartości tego mikroelementu. Stosunkowo niewiele jest gleb naturalnie bogatych w ten pierwiastek. Występują one w takich krajach, jak: Anglia, Holandia, Irlandia, Kanada, ZSRR. Gwałtowny rozwój przemysłu, a szczególnie przemysłu elektrotechnicznego, spowodował wzrost zawartości molibdenu w otoczeniu, stwarzając potencjalne zagrożenie dla środowiska (4, 5, 6, 7).

Przewlekła intoksykacja zwierząt osłabia ich wzrost, wywołuje niedokrwiłość, bezpłodność, osteoporozę i anomalie kostno-stawowe. Zmniejsza się także aktywność ceruloplazminy oraz enzymów, takich jak: oksydaza cytochromowa, esteraza cholinowa, oksydaza siarczynowa (2, 3, 7). Nadmierne dostarczanie molibdenu do organizmu ludzkiego przyczynia się do podwyższenia aktywności oksydazy ksantynowej, co doprowadza do wzrostu zawartości kwasu moczowego we krwi, który sprzyja rozwojowi endemicznej podagry (5). W badaniach epidemiologicznych, dotyczących zależności chorób układu krążenia od poziomu pierwiastków śladowych, wykazano różnice w zawartości Mo w sercu, wątrobie i nerkach ludzi zmarłych na chorobę wieńcową serca w porównaniu z grupą kontrolną (4).

W opublikowanych uprzednio badaniach nad wpływem molibdenu na hodowle komórek *in vitro*, stwierdzono hamujące działanie tego pierwiastka na proliferację komórek L (1). W niniejszej pracy dokonano oceny morfologii komórek inkubowanych w pożywce z dodatkiem molibdenianu sodu.

## MATERIAŁ I METODY

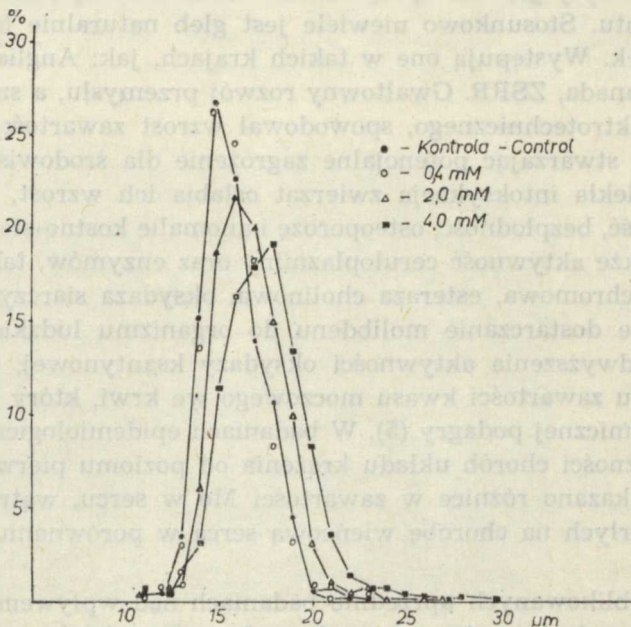
Badania przeprowadzono używając komórek L hodowanych w pożywce Eagle'a (MEM 1959) z 5% dodatkiem inaktywowanej surowicy cielęcej oraz 100 j penicyliny i 50  $\mu\text{g}$  streptomycyny na 1 ml pożywki. Do naczyń Leightona wysiewano po 2 ml zawiesiny zawierającej około  $2 \times 10^5$  komórek i inkubowano przez 24 godz. w temp.  $37^\circ\text{C}$ . Po upływie tego czasu zmieniano w hodowlach pożywkę na nową: bez molibdenianu sodu (MS) — hodowle kontrolne oraz zawierające 0,4, 2,0 i 4,0 mM molibdenianu sodu i inkubowano przez dalsze 24 godz. Po zakończeniu doświadczenia hodowle utrwalano w alkoholu metylowym i barwiono hematoksyliną Harrisa i eozyną.

Powierzchnię komórek oceniano przy użyciu mikroskopu z ciemnym polem widzenia po uprzednim utrwaleniu hodowli w 5% roztworze aldehydu glutarowego przez 15 min.

Pomiaru średnicy trypsynowanych komórek dokonywano w komorze Bürkera przy pomocy mikroskopu z okulem mikrometrycznym.

## OMÓWIENIE WYNIKÓW

**Kształt komórek.** Hodowle kontrolne oraz wzrastające w pożywce z dodatkiem 0,4 mM MS zawierały typowe komórki fibroblastopodobne o wydłużonym kształcie z wypustkami cytoplazmatycznymi (ryc. 2).



Ryc. 1. Wpływ molibdenianu sodu na wielkość komórek L. Na osi odciętej podano wielkości średnicy komórek w  $\mu\text{m}$ , na rzędnej — procent komórek w hodowli  
Effect of sodium molybdate on the size of cells L. On the abscissa — cell diameter in  $\mu\text{m}$ . On the ordinates — percentage number of the cells in one culture

Molibdenian sodu o stężeniu 2,0 mM powodował zmianę kształtu i wielkości komórek. Komórki stały się większe, wielokątne i traciły wypustki. Wraz z powiększeniem się powierzchni komórki zwiększała się również objętość jądra. Zmiany te były jeszcze bardziej zaznaczone przy stężeniu 4,0 mM MS (ryc. 3).

Wielkość komórek. Pomiary średnicy komórek w zawieszynie wykazały wzrost objętości komórek inkubowanych w pożywce zawierającej 2,0 i 4,0 mM MS (ryc. 1). Przeciętna średnica komórki hodowli kontrolnej wynosiła 15,5  $\mu\text{m}$  w hodowli inkubowanej z 2,0 mM MS — 16,4  $\mu\text{m}$ , zaś dla komórek hodowanych z 4,0 mM MS — 17,2  $\mu\text{m}$ . Przeniesienie powiększonych komórek do pożywki nie zawierającej MS powodowało powrót komórek do normalnej wielkości. Proces normalizacji objętości zachodził także wówczas, gdy płyn hodowlany zawierał 1,0 mM cyjanku sodu.

Występowanie komórek olbrzymich. Hodowle kontrolne zawierały 3,2‰ komórek olbrzymich oraz 3,8‰ komórek dwujądraztych. Podobne wartości otrzymano dla hodowli zawierających 0,4 mM MS. Natomiast MS w stężeniu 2,0 mM powodował wyraźny wzrost liczby komórek olbrzymich i dwujądraztych. W hodowli z dodatkiem 4,0 mM MS stwierdzono dwukrotnie więcej komórek olbrzymich i blisko trzykrotnie więcej komórek dwujądraztych niż w kontroli (tab. 1).

Tab. 1. Występowanie komórek olbrzymich oraz dwujądraztych w populacji komórek L po 24-godzinnej inkubacji z molibdenianem sodu

Distribution of giant and binuclear cells in the culture after incubation (24 hrs.) with sodium molybdate

Stężenie molibdenianu sodu Sodium molybdate concentration mM	Komórki olbrzymie Giant cells ‰	Komórki dwujądrazte Binuclear cells ‰
Kontrola Control	3,2	3,8
0,4	3,6	3,4
2,0	4,6	5,6
4,0	5,4	9,8

Mikrokosmki. Obserwacja komórek w ciemnym polu widzenia umożliwiła dostrzeżenie na powierzchni komórek delikatnych wypustek zwanych mikrokosmkami. Komórki w hodowlach kontrolnych posiadały bardzo nieliczne i krótkie mikrokosmki (ryc. 4). Wyjątek stanowiły komórki dzielące się, u których te zewnątrzkomórkowe struktury występowały bardzo obficie. Molibdenian sodu we wszystkich analizowanych stężeniach powodował tworzenie licznych mikrokosmków (ryc. 5). W hodowli

zawierającej 4,0 mM MS wytworzone mikrokosmki były najdłuższe i najgrubsze.

Cykl mitotyczny. Molibdenian sodu o stężeniach 2,0 i 4,0 mM obniżał zdolność proliferacyjną komórek. Podczas gdy wskaźnik mitotyczny w hodowli kontrolnej wynosił 48,5, to w hodowli zawierającej 2,0 mM MS 33,9, a w hodowli z 4,0 mM MS — 26,1 (tab. 2). Jednocześnie ocena procentowej zawartości poszczególnych faz mitozy wykazała, że hodowle z 2,0 i 4,0 mM MS zawierają wśród dzielących się komórek więcej komórek w późniejszych stadiach mitozy: anafazie i telofazie niż we wczesnych stadiach, tj. profazie i metafazie.

Tab. 2. Rozdział faz mitozy w populacji komórek L po 24-godzinnej inkubacji z molibdenianem sodu

Mitotic division of cells L after incubation (24 hrs.) with sodium molybdate

Stężenie molibdenianu sodu Sodium molybdate concentration mM	Wskaźnik mitotyczny Mitotic index ‰	Fazy mitozy — Mitosis %			
		profaza prophase	metafaza metaphase	anafaza anaphase	telofaza telophase
Kontrola Control	48,5	48,5	15,4	1,2	35,0
0,4	47,4	44,4	14,8	0,8	39,9
2,0	33,9	38,9	14,7	2,9	43,4
4,0	26,1	36,6	13,8	2,8	46,8

#### DYSKUSJA

Przeprowadzone badania wykazały, że molibdenian sodu w stężeniu 2,0—4,0 mM powoduje zmianę kształtu komórek L. Rozpłaszczają się one, zajmując większą niż normalnie powierzchnię, a także tracą swe wrzecionowate kształty. Pomiary średnicy trypsynowanych komórek świadczą o zwiększeniu się ich objętości. Występujące zmiany ustępowały jednakże po przeniesieniu komórek do pożywki nie zawierającej molibdenu, co wskazuje na odwracalny charakter zjawiska.

Komórka utrzymuje swoją stałą objętość przez zachowanie równowagi osmotycznej, co wymaga wkładu energii. Hamowanie przez molibden aktywności oksydazy cytochromowej (2, 5) sugeruje, że przyczyną zachwiania równowagi jonowej i w konsekwencji spęcznienia komórek może być deficyt energetyczny. Jednakże powrót komórek do normalnych rozmiarów wówczas, gdy po inkubacji z molibdenem zmieniona pożywka zawierała cyjanek sodu (będący inhibitorem oksydacyjnej fosforylacji) wykazuje, że niedobór związków wysokoenergetycznych nie może być tylko wynikiem hamowania tlenowego metabolizmu. Świadczy o tym także fakt

pojawiania się licznych mikroosmków na powierzchni komórek po inkubacji z MS. Vloda vsky i Sachs stwierdzili bowiem, że inkubowanie fibroblastów chomika z inhibitorem oksydacyjnej fosforylacji w obecności glukozy nie prowadziło do tworzenia się mikroosmków ani do utraty ATP. Pojawienie się licznych mikroosmków związane było z obniżaniem się poziomu ATP w komórce (8).

Zaobserwowane zmiany morfologiczne mogą świadczyć więc o występowaniu głodu energetycznego w komórce, spowodowanego przez molibden w metabolizmie komórkowym. Następstwem tego stanu było obniżenie tempa proliferacji komórek i zmiana czasu trwania poszczególnych etapów mitozy.

Molibden, który jest zaliczany do mikroelementów koniecznych do wzrostu komórek *in vitro* (9), dostarczony w ilości znacznie przekraczającej jego zapotrzebowanie, doprowadza do zmian morfologicznych, takich jak zwiększenie objętości komórki, zwiększenie ilości komórek olbrzymich i wielojądrzastych oraz występowanie licznych mikroosmków na powierzchni komórki.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Gawron A., Perzyński A.: Badania nad wpływem molibdenianu sodu na hodowle komórek L *in vitro*. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio C **33**, (1978).
2. Luckey T. D., Venugopal B.: Metal Toxicity in Mammals. Plenum Press. New York—London 1977.
3. Mkhelian E. E., Mosinian A. H.: Action of Molybdenum and Copper on the Process of Respiration and Oxidative Phosphorylation in the Liver Mitochondria of White Rats. Z. Eksp. Klin. Med. **12**, 29—34, (1972).
4. Nikonorow M.: Szkodliwe oddziaływanie pierwiastków śladowych na ludzi. Materiały I Krajowej Konferencji nt. Wpływ zanieczyszczenia pierwiastkami śladowymi na przyrodnicze warunki rolnictwa. Puławy 4—6 maja 1978.
5. Nozdriuhina Ł. R.: Biologiczeskaja rol' mikroelementow w organizmie żywotnych i czelowieka. Izdatielstwo „Nauka”, Moskwa 1977.
6. Stocks P.: On the Relations between Atmospheric Pollution in Urban and Rural Localities and Mortality from Cancer, Bronchitis and Pneumonia, with Particular Reference to 3 : 4 Benzopyrene, Beryllium, Molybdenum, Vanadium and Arsenic. Brit. J. Cancer **14**, 397—418 (1960).
7. Underwood E. J.: Trace Elements in Human and Animal Nutrition. Acad. Press, New York 1962.
8. Vloda vsky I., Sachs L.: Difference in the Calcium Regulation of Concanavalin an Agglutinability and Surface Microvilli in Normal and Transformed Cells. Exptl. Cell. Res. **105**, 179—189 (1977).
9. Willmer E. N.: Cells and Tissues in Culture. Acad. Pess, New York—London 1965.

## РЕЗЮМЕ

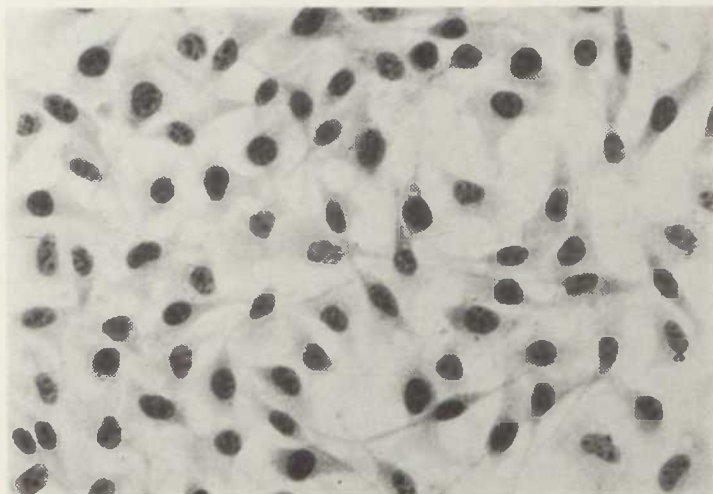
Произведена морфологическая оценка и оценка митотической активности клеток L в течение 24 часов инкубированных с молибдатом натрия (MS). Установлено, что в концентрации 2,0 и 4,0 mM вызывал расплющивание клеток, потерю отростков и веретообразной формы. Измерение диаметра трипсинированных клеток показало увеличение диаметра клеток в культуре, инкубированной с 2,0 mM MS, на 5,8%, а в культуре с 4,0 mM на 11%. В то же время в этих культурах значительно возросло число гигантских и двуядерных клеток. Кроме того, молибден вызывал образование на поверхности клеток, наблюдаемых под микроскопом с темным полем зрения, многочисленных микроскопков.

Молибдат натрия концентрации 2,0 и 4,0 mM снижал митотический показатель культуры. Одновременно отмечено, высшее процентное участие клеток делящихся, в позднейших стадиях митоза, т.е. в анафазе и телофазе.

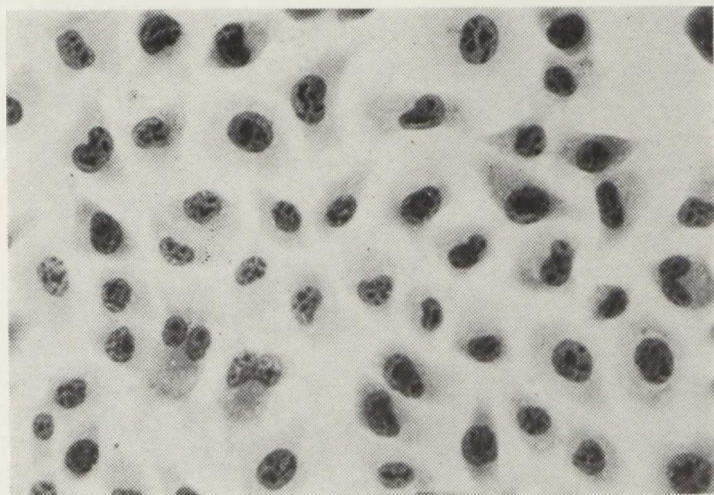
## SUMMARY

A morphological evaluation and assessment of mitotic activity of cells L, incubated for 24 hrs. with sodium molybdate, were made. The results showed that at a concentration of 2.0 and 4.0 mM, sodium molybdate caused flattening of the cells, loss of pseudopodia and of spindle shape. The measurements of the diameter size of the trypsinized cells showed that the diameter sizes increased by 5.8 and 11.0 per cent in the cultures with 2.0 and 4.0 mM of sodium molybdate, respectively. The observations showed also an increase of giant and binuclear cells in the cultures.

Sodium molybdate caused also the formation of microvilli on the surface of the cells. Mitotic index was found to decrease in the cultures with 2.0 and 4.0 mM of sodium molybdate. The results showed a higher percentage of the divided cells in the late stages of mitosis (anaphase and telophase).



Ryc. 2. Hodowla kontrolna komórek L. Pow. ok. 320 $\times$ . Barwienie H+E. Komórki fibroblastopodobne o wrzecionowatych kształtach z wypustkami cytoplazmatycznymi  
Control cells L. Fibroblast-like cells of spindle shape with cytoplasmatic pseudopodia. Hematoxylin and eosin stain. Magn. ca. 320 $\times$

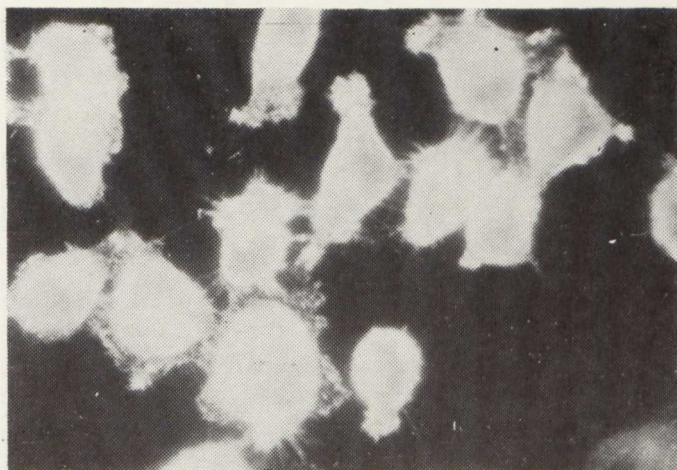


Ryc. 3. Komórki L inkubowane przez 24 godz. w pożywce zawierającej 4,0 mM molibdenianu sodu. Pow. ok. 320 $\times$ . Barwienie H+E. Komórki przypominają komórki nabłonkowe, są większe w porównaniu z kontrolą, posiadają krótkie nieliczne wypustki

Cells L incubated, on the medium with 4.0 mM of sodium molybdate, for 24 hrs. The cells are similar to epithelial cells, are larger than controls, with a few short pseudopodia. Hematoxylin and eosin stain. Magn. ca. 320 $\times$



Ryc. 4. Komórki hodowli kontrolnej w ciemnym polu widzenia. Pow. ok. 640 $\times$ . Komórki posiadają jedynie nieliczne mikrokosmki  
Control cells under the light microscope with dark field. The cells have only a few microvilli. Magn. ca. 640 $\times$



Ryc. 5. Komórki L po 24-godzinnej inkubacji w pożywce z 2,0 mM molibdenianu sodu. Pow. ok. 640 $\times$ . Widoczne są liczne mikrokosmki na powierzchni komórek  
Cells L after 24 hrs. incubation on medium with 2.0 mM of sodium molybdate. Numerous microvilli are visible on the cell surface. Magn. ca. 640 $\times$