

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXXIII, 10

SECTIO C

1978

Institut Biologii UMCS
Zakład Embriologii

Antoni GAWRON, Andrzej PERZYŃSKI

Badania nad wpływem molibdenianu sodu na komórki L *in vitro*

Влияние молибдата натрия на клетки L *in vitro*

Studies on the Influence of Sodium Molybdate on L Cells *in vitro*

Molibden należy do pierwiastków śladowych występujących w organizmach roślinnych i zwierzęcych. U zwierząt największą jego ilość zawiera wątroba oraz kośćiec, któremu przypisuje się funkcję magazynowania molibdenu (5, 9).

Biopierwiastek ten wchodzi w skład takich enzymów, jak: oksydaza ksantynowa, oksydaza aldehydowa, oksydaza siarczynowa i reduktaza azotanowa. Molibden bierze udział w formowaniu się i rozwoju kośćca, zapobiega również próchnicy zębów (1, 2, 3).

Nie znane są choroby zwierząt i ludzi wywołane brakiem molibdenu. Spotykane są natomiast zatrucia związkami molibdenu. Spowodowane są one spożywaniem przez zwierzęta roślin z dużą zawartością tego pierwiastka. U ludzi zatrucia mogą być wywołane wchłanianiem pyłów rud metali, zawierających domieszkę molibdenu, np. przez pracowników przemysłu hutniczego (4).

Dotychczasowe badania nad skutkami nadmiaru tego mikroelementu przeprowadzane były głównie na organizmach zwierzęcych oraz na roślinach wyższych i bakteriach (1, 3, 5, 7, 11). Natrafiono także na jedyną pozycję piśmiennictwa omawiającą wpływ molibdenu na rozwój zawiązków zębów szczura w hodowli tkankowej (8). Nie znaleziono natomiast w dostępnym piśmiennictwie prac nad działaniem molibdenu na hodowlę komórkowe.

Jako cel pracy postawiono sobie zatem przebadanie wpływu molibdenu na hodowlę komórek L.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiły komórki L. Hodowle prowadzono w naczyniach Leightona, w pożywce Eagle'a (MEM 1959) z dodatkiem 5% surowicy cielęcej oraz 50 µg/ml siarczanu neomycyny i 1 µg/ml Fungizonu. Wysiewano po 2 ml zawiesiny zawierającej 10⁵ komórek i po 24 godz. inkubacji w 37°C zmieniano pożywkę na nową, zawierającą molibdenian sodu (MS).

W doświadczeniu 24-godzinnym stosowano dawki: 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0 mg MS/ml. W doświadczeniu 10-dniowym zastosowano dawki: 0,1, 0,5, 1,0, 2,0 mg MS/ml. W zatruciu 28-dniowym stosowano dawki: 0,1, 0,5, 1,0 mg MS/ml. Pożywkę zmieniano 2 razy tygodniowo. W zatruciu długotrwałym łączono to z trypsynowaniem i przenoszeniem do nowych naczyń.

Po zakończeniu doświadczenia część hodowli utrwalano w absolutnym alkoholu metylowym oraz barwiono hematoksyliną Harrisa i eozyną. Z pozostałych hodowli pobierano losowo po 4 próby z każdego stężenia MS i określano żywotność oraz liczbę komórek.

Liczbę komórek obliczano w 90 kwadratach komory Bürkera. Żywotność zaś badano przy pomocy 0,5% wodnego roztworu błękitu trypanu. Wzrost hodowli obliczano wg wzoru:

$$\frac{S-W}{W} \cdot 100\%$$

(S — liczba komórek w hodowli, W — liczba wysianych komórek). Aktywność mitotyczną oceniano przez określenie indeksu mitotycznego (liczba komórek dzielących się na 1000). W celu porównania wyników zastosowano test Chi², przyjmując jako kryterium znamienności $p < 0,05$.

WYNIKI BADAŃ

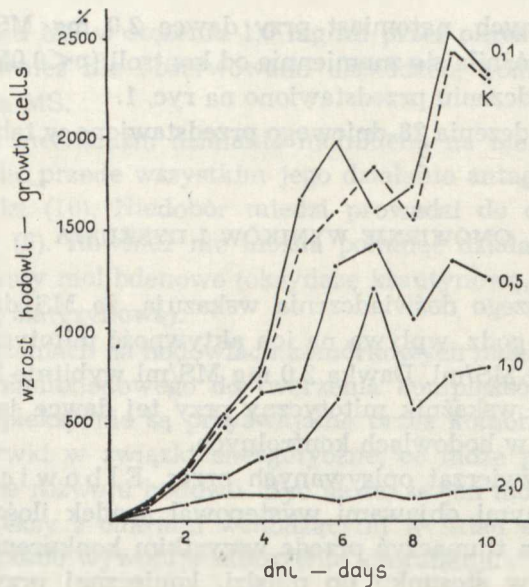
Wyniki doświadczenia trwającego 24 godz. zestawiono w tab. 1.

W doświadczeniu 10-dniowym żywotność komórek badana od pierwszego do ostatniego dnia doświadczenia wynosiła średnio dla kontroli 81,8%. Przy dawkach 0,1, 0,5 oraz 1,0 mg/ml nie znaleziono różnic staty-

Tab. 1. Wpływ molibdenianu sodu na indeks mitotyczny komórek po 24 godz. działania

Influence of sodium molybdate on the mitotic index of cells after 24 hrs of action

| MS mg/ml | Komórki Cells | | Indeks mitotyczny Mitotic index | p w stosunku do kontroli p in relation to control |
|-------------|---------------------------------|--------------------------|--|--|
| | nie dzielące się nondividing | dzielące się dividing | | |
| — | 14 272 | 728 | 48,5 | — |
| 0,1 | 14 289 | 711 | 47,4 | $p > 0,05$ |
| 0,2 | 14 357 | 643 | 42,9 | $p < 0,05$ |
| 0,5 | 14 562 | 538 | 35,9 | $p < 0,001$ |
| 1,0 | 14 608 | 393 | 26,1 | $p < 0,001$ |
| 2,0 | 14 683 | 317 | 21,1 | $p < 0,001$ |



Ryc. 1. Wpływ molibdenianu sodu na wzrost hodowli komórek L; liczby 0,1, 0,5, 1,0, 2,0 oznaczają koncentrację molibdenianu sodu w mg/ml pożywki, K — kontrola
Influence of sodium molybdate on the growth of L cells; numbers 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 denote sodium molybdate concentration in mg/ml of the medium, K — control

Tab. 2. Wpływ molibdenianu sodu na indeks mitotyczny komórek w czasie długotrwałego zatrucia
Influence of sodium molybdate on the mitotic index of cells during long-lasting treatment

| Liczba dni Number of days | MS mg/ml | Komórki Cells | | Indeks mitotyczny Mitotic index | p w stosunku do kontroli p in relation to control |
|------------------------------|-------------|---------------------------------|--------------------------|--|--|
| | | nie dzielące się nondividing | dzielące się dividing | | |
| 7 | — | 14 450 | 540 | 36,0 | — |
| | 0,1 | 14 517 | 483 | 32,2 | $p > 0,05$ |
| | 0,5 | 14 550 | 450 | 30,0 | $p < 0,01$ |
| | 1,0 | 9 766 | 234 | 23,4 | $p < 0,001$ |
| 14 | — | 14 451 | 549 | 36,6 | — |
| | 0,1 | 14 964 | 536 | 35,7 | $p > 0,05$ |
| | 0,5 | 9 694 | 306 | 30,6 | $p < 0,01$ |
| | 1,0 | 14 631 | 369 | 24,6 | $p < 0,001$ |
| 21 | — | 14 529 | 471 | 31,4 | — |
| | 0,1 | 14 566 | 434 | 28,9 | $p > 0,05$ |
| | 0,5 | 14 565 | 435 | 29,0 | $p > 0,05$ |
| | 1,0 | 14 670 | 330 | 22,0 | $p < 0,001$ |
| 28 | — | 14 532 | 468 | 31,2 | — |
| | 0,1 | 14 543 | 457 | 30,5 | $p > 0,05$ |
| | 0,5 | 14 626 | 374 | 24,9 | $p < 0,01$ |
| | 1,0 | 14 669 | 331 | 22,1 | $p < 0,001$ |

stycznie znamienych, natomiast przy dawce 2,0 mg MS/ml żywotność wynosiła 76,1% i różniła się znamienne od kontroli ($p < 0,05$). Wzrost hodowli w tym doświadczeniu przedstawiono na ryc. 1.

Wyniki doświadczenia 28-dniowego przedstawiono w tab. 2.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Wyniki pierwszego doświadczenia wskazują, że MS działając na komórki L przez 24 godz. wpływa na ich aktywność mitotyczną, począwszy od stężenia 0,2 mg MS/ml. Dawka 2,0 mg MS/ml wybitnie hamuje mnożenie się komórek i wskaźnik mitotyczny przy tej dawce jest ponad dwukrotnie niższy niż w hodowlach kontrolnych.

W zatruciach zwierząt opisywanych przez Elbowicz-Waniewską (5) poza innymi objawami występował spadek ilości erytrocytów. Zjawisko to można tłumaczyć przede wszystkim konkurencyjnym działaniem molibdenu w stosunku do miedzi, koniecznej przy erytropoezie. Należy jednak brać również pod uwagę bezpośrednio hamujące działanie molibdenu na indeks mitotyczny w szybko dzielących się populacjach komórkowych, na co wskazuje wynik naszego doświadczenia.

Wyniki pozostałych serii doświadczeń wskazują na to, że długotrwałe działanie MS (7, 14, 21, 28 dni) wpływa podobnie na wskaźnik mitotyczny jak krótkotrwałe zatrucie i nie obserwuje się korelacji pomiędzy długością ekspozycji a stopniem obniżenia wskaźnika mitotycznego komórek L (tab. 2).

Bardzo charakterystyczne są krzywe wzrostu komórek L przy różnych stężeniach MS (ryc. 1). I tak przy dawce 2,0 mg/ml zachodzi prawie całkowite zahamowanie rozwoju hodowli. Po 10 dniach obserwowano bardzo mały przyrost ilości komórek. Przy dawce 1,0 mg/ml przyrost po 10 dniach był ośmiokrotny, podczas gdy w hodowli kontrolnej zaobserwowano przyrost blisko 23-krotny. Należy zwrócić uwagę, iż przy stężeniu 0,1 mg/ml rozwój hodowli był bardzo podobny do rozwoju hodowli kontrolnych, a nawet obserwowano pewne stymulujące działanie MS. Podobne działanie stymulujące wzrost hodowli bakterii przy niezbyt wysokim stężeniu molibdenu obserwował Coulter i Russell (3). Szybki wzrost hodowli obserwowany po 4 i 8 dniach należy tłumaczyć zmianą płynu hodowlanego, przy czym najwyższa dawka MS również znosiła działanie pobudzające świeżej pożywki.

Analiza żywotności komórek wykazała nieznaczne działanie cytotoksyczne MS *in vitro*. Jedynie najwyższa dawka MS, to jest 2,0 mg/ml, spowodowała spadek żywotności o 5,7% ($p < 0,05$).

Niezależnie od doświadczeń opisanych wyżej, pojedyncze hodowle pod-

dawano działaniu MS w stężeniu 1,0 mg/ml przez okres 110 dni. W hodowlach tych również nie obserwowano uszkodzeń, pomimo tak długiego okresu działania MS.

Rozpatrując mechanizm działania molibdenu na metabolizm komórki, należy podkreślić przede wszystkim jego działanie antagonistyczne w stosunku do miedzi (10). Niedobór miedzi prowadzi do deficytu oksydazy cytochromowej (6). Również nie można pominąć działania molibdenu na tak zwane enzymy molibdenowe (oksydazę ksantynową, oksydazę aldehydową, oksydazę siarczynową).

W doświadczeniach na hodowlach komórkowych należy brać pod uwagę zdolność jonu molibdenowego do tworzenia kompleksów z cukrami, ponieważ te kompleksy nie są przyswajalne przez komórkę. Zachodzi więc zubożenie pożywki w związki energetyczne, co może pośrednio wpłynąć na zahamowanie rozwoju hodowli. Być może, że jon molibdenowy tworzy również kompleksy z cukrami wchodzącymi w skład struktur komórkowych i w ten sposób wywołuje zaburzenia ich funkcji.

WNIOSKI

1. Molibdenian sodu w stężeniu powyżej 0,1 mg/ml zmniejsza indeks mitotyczny komórek L.
2. W dawkach poniżej 2,0 mg/ml molibdenian sodu nie ma wpływu na żywotność komórek L.
3. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy zmianami w indeksie mitotycznym i żywotnością komórek L a czasem działania molibdenianu sodu.

PIŚMIENNICTWO

1. Babylawa W. R.: Wlįjanie inda, gala, molibdena, rubida i cyrkonija w eksperymentalnom kariezie zubow. Stomatologija 5, 19 (1968).
2. Bertrand G.: Results of Clinical Experiments to Prove the Anticariogenic Effect of Molybdenum. Bull. Group. Int. Rech. Stomatol. 16, 119—129 (1973).
3. Coulter W. A., Russel C.: Effect of Molybdenum on the Growth and Metabolism of *Veillonella parvula* and *Streptococcus mutans*. J. Dent. Res. 55, 1445—1449 (1974).
4. Elbowicz - Waniewska Z.: Hyperurykemia u pracowników przemysłu hutniczego związana ze zwiększoną zawartością molibdenu w organizmie. Mat. IX Zjazd. Pol. Tow. Bioch. Katowice 8—11 IX 1971.
5. Elbowicz - Waniewska Z.: Badanie nad rolą molibdenu w metabolizmie zwierząt. Pol. Tyg. Lek. 31, 203—204 (1976).
6. Fell B. F., Williams R. B., Mills C. F.: Cytochrome Oxidase Deficiency in the Motor Neurons of Copper Deficient Lambs: A Histochemical Study. Res. Vet. Sci. 6, 170—177 (1965).

7. Mheian E. E., Maszinian A. H.: Action of Molybdenum and Copper on the Process of Respiration and Oxidative Phosphorylation in the Liver Mitochondria of White Rats. *Z. Exp. Klin. Med.* **12**, 29—34 (1972).
8. Rahkamolt, Hammarstr O. L., Hasselgren G.: Effect of Mo on the Developing Rat Tooth in Tissue Culture. *Proc. Finn. Dent. Soc.* **70**, 141—146 (1974).
9. Schroeder H., Belassa J., Tipton J.: Essential Trace Metals in Man: Molybdenum. *J. Chrom. Dis.* **23**, 481—484 (1970).
10. Suttle N. F.: Recent Studies of the Copper-Molybdenum Antagonism. *Proc. Nutr. Soc.* **33**, 299—305 (1974).
11. Zemek J., Bilik V., Zakutna L.: Effect of Some Aldoses on Growth of *Saccharomyces cerevisiae* Inhibited with Molybdenum. *Folia Microbiol.* **20**, 467—469 (1975).

РЕЗЮМЕ

Исследовалось влияние молибдата натрия на митотическую активность и живучесть клеток L. Применялись дозы от 0,1 до 2,0 mg/ml питательной среды, время их действия — от 24 часов до 28 дней. Молибдат натрия концентрации выше 0,1 mg/ml снижает митотический индекс. Это влияние увеличивается вместе с ростом концентрации. Не наблюдалось связи между временем действия (при применении разных доз молибдата натрия) и степенью снижения митотического индекса.

SUMMARY

The influence of sodium molybdate on the mitotic activity and viability of L cells was studied. The cells were treated with 0.1—2.0 mg sodium molybdate/ml for 1—28 days. The mitotic index was reduced at salt concentrations above 0.1 mg/ml. This effect was more profound at higher concentrations of molybdenum. However, no correlation was observed between the period of action of molybdenum and the rate of decline of the mitotic index.