

Zakład Embriologii, Instytut Biologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej  
Kierownik: doc. dr hab. Michał Górski

Michał GÓRSKI

**Cytotoksyczne działanie estru dwuizopropylowego kwasu fluorofosforowego (DFP) oraz dwuchlorowodorku eteru bis-4-hydroksyiminometylo-pirydino-1-metylowego (toksogoniny) na hodowle nerki małpy (*Cercopithecus aethiops*)**

Цитотоксическое действие диизопропилового эфира флюорофосфорной кислоты (ДФП) и хлористоводородного эфира БИС-4-оксииминометило-пиридино-1-метильного (токсогонин) на культуру почки обезьяны (*Cercopithecus aethiops*)

Cytotoxic Action of Diisopropyl Fluorophosphate (DFP) and Bis-4-Hydroximino-Methyl-Pyridine-1-Methyl-(Toxogonin) on Kidney Cultures of a Monkey (*Cercopithecus aethiops*)

Podstawowy patomechanizm toksycznego działania związków fosforoorganicznych (ZF) na organizm zwierzęcy polega na blokowaniu esteraz a przede wszystkim acetylocholinesterazy. Na skutek zablokowania acetylocholinesterazy dochodzi do nagromadzenia endogennej acetylocholinyl, co daje zespół objawów nikotynowych, muskarynowych oraz objawów ze strony ośrodkowego układu nerwowego.

Stosując nowoczesne metody leczenia przy pomocy reaktywatorów acetylocholinesterazy, związków cholinolitycznych oraz osłaniających ośrodkowy układ nerwowy możemy zwiększyć LD<sub>50</sub> niektórych ZF ponad 50 razy. Powstaje więc zagadnienie, czy uboczne działanie ZF nie stanie się problemem podstawowym w dalszym postępowaniu z zatrutymi, po zwalczeniu ostrej fazy wywołanej zatruciem endogenną acetylocholiną. Przy użyciu hodowli komórkowej jako modelu doświadczalnego możemy nie brać pod uwagę działania nagromadzonej acetylocholinyl na układ cholinergiczny, lecz możemy badać bezpośrednio cytotoksyczne działanie ZF oraz działanie reaktywatorów acetylocholinesterazy na metabolizm komórki. Postanowiono zatem zbadać, jaki wpływ wywiera DFP oraz toksogonina na hodowle komórkowe.

## MATERIAŁ I METODY

Do doświadczeń użyto komórkowej hodowli nerki małpy (*Cercopithecus aethiops*). Hodowle prowadzono na szkiełkach podstawowych w naczyniach Legroux. Jako medium hodowlane stosowano płyn Parkera z 2% dodatkiem inaktywowanej surowicy cielęcej. Przeprowadzono 6 serii doświadczeń na 144 hodowlach, stosując różne dawki DFP i toksogoniny. Zastosowane dawki DFP i toksogoniny w poszczególnych seriach doświadczeń zestawiono w tab. 1. Po zatruciu hodowli obserwowano dalszy ich rozwój porównując z rozwojem hodowli kontrolnych. Równocześnie wykonano:

- 1) barwienie przyżyciowe przy pomocy czerwieni obojętnej oraz błękitu trypanu;
  - 2) barwienie przy pomocy hematoksyliny oraz eozyny (H+E);
  - 3) odczyn na esterazę nieswoistą (octanu naftolu AS);
  - 4) odczyn na fosfatazę kwaśną wg metody precypitacyjnej Gomoriego.
- W 5 dniu po zatruciu zmieniono płyn hodowlany.

Tab. 1. Cytotoksyczne działanie DFP oraz toksogoniny na komórkową hodowlę nerki małpy

The cytotoxic action of DFP and toxogonin on the cellular culture of a monkey kidney

| Nr hodowli | DFP µg/ml | Tokso-gonina µg/ml | Doba od momentu zatrucia |    |    |   |   |   |   |   |   |    | Uwagi |   |
|------------|-----------|--------------------|--------------------------|----|----|---|---|---|---|---|---|----|-------|---|
|            |           |                    | 1                        | 2  | 3  | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |       |   |
| 1—36       | —         | —                  | O                        | O  | O  | O | O | O | O | O | O | O  | ±     |   |
| 37—40      | 0,3       | —                  | O                        | O  | O  | O | O | O | O | O | O | O  | ±     |   |
| 47—44      | 3,0       | —                  | O                        | O  | O  | O | O | O | O | O | O | O  | ±     |   |
| 45—48      | 10,0      | —                  | O                        | O  | O  | O | O | ± | ± | ± | ± | ±  | ±     |   |
| 49—56      | 30,0      | —                  | O                        | O  | O  | ± | ± | ± | + | + | + | +  | +     |   |
| 57—60      | 100,0     | —                  | ±                        | ±  | zz |   |   |   |   |   |   |    |       | X |
| 61—64      | 300,0     | —                  | ±                        | zz |    |   |   |   |   |   |   |    |       |   |
| 65—68      | —         | 3,0                | O                        | O  | O  | O | O | O | O | O | ± | ±  |       |   |
| 69—72      | —         | 10,0               | O                        | O  | O  | O | O | ± | ± | ± | ± | ±  |       |   |
| 73—76      | —         | 30,0               | O                        | O  | ±  | ± | ± | + | + | + | + | +  |       | X |
| 77—80      | —         | 100,0              | ±                        | zz |    |   |   |   |   |   |   |    |       |   |
| 81—84      | —         | 300,0              | ±                        | zz |    |   |   |   |   |   |   |    |       |   |
| 85—88      | 0,3       | 3,0                | O                        | O  | O  | O | O | O | O | O | ± | ±  |       |   |
| 89—92      | 3,0       | 3,0                | O                        | O  | O  | O | O | O | O | O | ± | ±  |       |   |
| 93—96      | 10,0      | 3,0                | O                        | O  | O  | O | O | ± | ± | ± | ± | ±  |       |   |
| 97—104     | 30,0      | 3,0                | O                        | O  | O  | ± | ± | + | + | + | + | +  |       | X |
| 105—112    | 0,3       | 30,0               | O                        | O  | ±  | ± | + | + | + | + | + | +  |       | X |
| 113—120    | 3,0       | 30,0               | O                        | O  | ±  | ± | + | + | + | + | + | +  |       | X |
| 121—128    | 10,0      | 30,0               | O                        | ±  | ±  | + | + | + | + | + | + | +  |       | X |
| 129—136    | 30,0      | 30,0               | ±                        | ±  | +  | + | + | + | + | + | + | +  |       | X |
| 137—144    | 100,0     | 30,0               | ±                        | zz |    |   |   |   |   |   |   |    |       |   |

Objaśnienie znaków: O — wzrost prawidłowy, ± — nieznaczne zmiany degeneracyjne, + — wyraźne zmiany degeneracyjne, zz — zupełne zniszczenie hodowli, X — tylko nieliczne komórki w hodowli są żywe.

Oznaczono średni czas pojawienia się zmian w poszczególnych grupach hodowli.

Explanation to symbols: O — normal development, ± — slight degenerative changes, + — distinct degenerative changes, zz — complete destruction of culture, x — only a few cells in the culture are alive.

The mean time of the appearance of changes in the individual culture groups has been denoted.

## WYNIKI BADAŃ

Do doświadczeń używano 5-dniowych komórkowych hodowli nerki małpy. Hodowle takie tworzyły na szkiełkach podstawowych bardzo delikatny biały nalot. W 6 i 7 dniu prawie cała powierzchnia szkiełek podstawowych była pokryta przez komórki.

W obrazie mikroskopowym widoczne były liczne komórki o wrzecionowatych kształtach (fibroblastopodobne) oraz komórki nabłonkowe, wśród których występowały pojedyncze komórki olbrzymie o dwu lub kilku jądrach. Pomiedzy tymi komórkami widoczne były nieliczne, małe komórki o ciemnym, pyknotycznym jądrze i ziarnistej, kwasochłonnej cytoplazmie (ryc. 1 i 2). Dawały one silne odczyny na fosfatazę kwaśną, zwłaszcza gdy skupiały się w większe konglomeraty. Były to obumierające komórki, niezdolne do dalszego mnożenia się.

Z biegiem dni malała liczba mnożących się komórek, a przybywało komórek obumierających. Widać było również coraz wyraźniejsze zmiany degeneracyjne w komórkach związanych z podłożem.

Podobnie przedstawiał się wzrost i wygląd hodowli zatrutych, do których dodano 0,3 i 3,0  $\mu\text{g}$  DFP/ml oraz 3,0  $\mu\text{g}$  toks./ml. W preparatach barwionych H+E nie widać było uchwytnych różnic w stosunku do hodowli kontrolnych. Również nie było różnic w intensywności odczynów na fosfatazę kwaśną. Natomiast odczyny na esterazę nieswoistą były zahamowane nawet przy dawce 0,3  $\mu\text{g}$  DFP/ml. W hodowlach, do których dodawano 10,0  $\mu\text{g}$  DFP/ml lub 10,0  $\mu\text{g}$  toks./ml, zmiany degeneracyjne pojawiały się nieco wcześniej niż w hodowlach kontrolnych, to jest między 5 a 7 dniem po zatruciu. W hodowlach z dodatkiem 30,0  $\mu\text{g}$  DFP/ml nieznaczne zmiany widoczne były już w czasie 4 doby, a wyraźne zmiany pojawiły się w czasie 6 doby po zatruciu. W hodowlach z dodatkiem 30,0  $\mu\text{g}$  toks./ml oraz w hodowlach z dodatkiem 10,0  $\mu\text{g}$  DFP/ml + 30  $\mu\text{g}$  toks./ml nieznaczne zmiany wystąpiły w czasie 3, a wyraźne w czasie 4 i 5 doby po zatruciu (ryc. 3 i 4). W hodowlach z dodatkiem 30,0  $\mu\text{g}$  DFP/ml + 30,0  $\mu\text{g}$  toks./ml nieznaczne zmiany pojawiły się w czasie 1, a wyraźne w czasie 3 doby po zatruciu.

We wszystkich pozostałych hodowlach, do których podano większe dawki badanych związków (100,0 i 300,0  $\mu\text{g}$  DFP lub toks./ml) wyraźne uszkodzenie komórek widoczne było w obrazie mikroskopowym już w czasie 1 doby (ryc. 5), a bardzo znaczne uszkodzenie lub całkowite zniszczenie — odklejenie hodowli od podłoża w czasie 2 doby po zatruciu (ryc. 6). Zmiany degeneracyjne polegały na pojawianiu się w cytoplazmie znacznej ilości wodniczek, występowaniu w cytoplazmie komórek silnie kwasochłonnych ziarnistości oraz rozpadzie tych komórek. Spostrzegano zmiany pyknotycz-

ne lub też kariorektyczny rozpad jąder. W końcu dochodziło do odklejania się martwych komórek od podłoża.

Odczyny na fosfatazę kwaśną nasilały się w uszkodzonych komórkach. W niektórych komórkach widoczne były duże cytolisomy obejmujące znaczne pola cytoplazmy. Przy badaniu przyżyciowym przy pomocy czerwieni obojętnej i błękitu trypanu znajdowano w hodowlach kontrolnych ok. 60% komórek, w których były widoczne czerwone ziarnistości, a które nie barwiły się błękitem trypanu. Około 20% komórek zawierało czerwone ziarnistości i równocześnie barwiło się błękitem trypanu oraz ponad 20% komórek barwiło się intensywnie błękitem trypanu i nie zawierało czerwonych ziarnistości. Po małych dawkach DFP oraz toksogoniny nie było uchwytnych zmian ilościowych w występowaniu poszczególnych rodzajów komórek. Po 10,0  $\mu\text{g}$  DFP/ml oraz takiej samej dawce toksogoniny zwiększyła się nieco ilość komórek barwiących się błękitem trypanu i zawierających czerwone ziarnistości. Po 30,0  $\mu\text{g}$  DFP/ml oraz toksogoniny po 1 dobie zwiększyła się ilość komórek barwiących się oboma barwnikami, w następnych dobach zaś prawie wszystkie komórki barwiły się błękitem trypanu, a po 10 dobach tylko pojedyncze komórki zawierały zabarwione na czerwono ziarnistości (komórki, które przeżyły zatrucie). Po zatruciu dużymi dawkami DFP lub toksogoniny, tj. 100,0 i 300,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  już w czasie 1 doby prawie wszystkie komórki barwiły się błękitem trypanu, a w czasie następnej doby nie znaleziono komórek (żywych) zawierających czerwone ziarnistości.

#### DYSKUSJA

Dawki DFP, które były użyte w doświadczeniu, z wyjątkiem dawki 0,3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  po przeliczeniu na 1 kg c.c. przekraczają nieraz wielokrotnie dawki śmiertelne dla ludzi i zwierząt. Jak wynika z obserwacji całego szeregu zatrutych hodowli nerki mały, objawy uszkodzenia komórek pojawiły się przy stężeniu DFP powyżej 30,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , a zawsze dochodziło do zniszczenia hodowli przy stężeniu DFP większym niż 100,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Należałoby zastanowić się, czy jest celowe przeprowadzanie doświadczeń, w których używa się dawek zawsze doprowadzających do śmierci organizmu i to tak szybko, że nie zdążą wytworzyć się zmiany w narządach przed śmiercią organizmu, a tym samym nie może być mowy o cytotoksycznym działaniu badanej trucizny. Nowoczesne metody leczenia za pomocą związków cholinolitycznych oraz bardzo skutecznych reaktywatorów estera cholinowych, a także leków działających na ośrodkowy układ nerwowy pozwalają jednak na utrzymanie przy życiu zatrutych dawkami przekraczającymi wielokrotnie dawki śmiertelne. Badania więc

prowadzone nad działaniem tak wysokich dawek związków ZF są uzasadnione. W tej sytuacji należy postawić pytania: jakie działanie cytotoksyczne wywierają na organizm ZF w tak wysokim stężeniu oraz czy środki używane przy leczeniu zatruc nie wykażą również działania cytotoksycznego.

Wyniki przeprowadzonych badań w znacznym stopniu odpowiadają na te pytania. Z tym jednak zastrzeżeniem, że nie wszystkie zjawiska obserwowane *in vitro* można przenieść do patologii zatrutego zwierzęcia. Badania wielu autorów nad cytotoksycznym działaniem ZF wykazały, że związki te powodują uszkodzenie mięśnia sercowego oraz ośrodkowego układu nerwowego, przy czym reaktywatory acetylocholinesterazy zwiększają stopień uszkodzenia tych narządów (2). Obserwowano również zmiany ilościowe elementów morfotycznych krwi u psów po ostrym zatruciu ZF (8). Poprzez blokowanie wielu enzymów poza esterazami cholinowymi (między innymi enzymów oddechowych, lipazy trójglicerydowej, aldolazy i innych) uszkadzają metabolizm komórkowy (1, 3, 7, 6, 9, 10). ZF wpływają także na zużycie tlenu przez tkanki szczura *in vitro* (11), a także uszkadzają hodowle embrionu ludzkiego (4). Opisano immunogenne oraz teratogenne działanie ZF (12).

Jeżeli pominiemy działanie DFP jako inhibitora acetylocholinesterazy, to działanie cytotoksyczne tego związku, zresztą jak i cytotoksyczne działanie toksogoniny, jest tylko nieznacznie większe od cytotoksycznego działania np. siarczanu miedzi ( $\text{CuSO}_4$ ), którego dawka śmiertelna dla człowieka wynosi ok. 10,0 g, jest więc wielokrotnie większa od dawki śmiertelnej DFP. A jak wykazały badania Mauersberger i Zorna, dawka  $\text{CuSO}_4$ , która powoduje zupełne zniszczenie hodowli komórkowej embrionalnego płuca ludzkiego lub wątroby przy działaniu przez 24 godz., wynosi 100,0—140,0  $\mu\text{g/ml}$  (5). Należałoby więc w stosunku do toksycznego działania DFP i całego szeregu innych związków ZF stosować dwa kryteria. Jedno kryterium — odnoszące się do działania poprzez blokowanie acetylocholinesterazy i zatrucie organizmu acetylocholiną. Drugie kryterium — odnoszące się do działania cytotoksycznego ZF (po zwalczeniu zatrucia acetylocholiną). W miarę udoskonalania metod leczenia ten drugi aspekt zagadnienia może stać się podstawowym.

### W n i o s k i

1. DFP w stężeniu 30,0  $\mu\text{g/ml}$  powoduje uszkodzenie hodowli nerki małpy, a w stężeniu 100,0  $\mu\text{g/ml}$  zawsze jej zniszczenie.
2. Toksogonina nie działa ochronnie na hodowlę nerki małpy, przy zatruciu DFP.

3. Działanie cytotoksyczne toksogoniny na hodowlę nerki mały jest podobne, a nawet silniejsze od cytotoksycznego działania DFP.

4. Długość okresu od chwili zatrucia do momentu wystąpienia zmian w komórkach hodowli zależy od wielkości zastosowanej dawki i jest w stosunku do niej odwrotnie proporcjonalna.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Beskid M., Kłós H., Suwała Z., Szyszkowska A., Wójcik J.: Rocznik PZH 24, 741—747, 1973.
2. Biernat S., Giermaziak H.: Med. Pracy 27, 241—251, 1976.
3. Dinnendahl V., Peters H., Helm U.: Arch. Toxicol. 30, 175—182, 1973.
4. Górski M.: Arch. Med. Sąd. i Krym. 25, 45—54, 1975.
5. Mauersberger B.: Aktuelle Probleme der Zellzuchtung. Veb. Gustav Fischer Verlag, Jena 1971.
6. Owen Ch., Wilson D.: Arch. Biochem. Biophys. 161, 581—591, 1975.
7. Pachecka J., Biczowa B., Suliński A., Bicz W.: Rocznik PZH 26, 347—356, 1975.
8. Patyra S., Kurek A., Kossakowski S.: Med. Wet. 30, 478—481, 1974.
9. Peters H., Selhorst P., Dinnendahl V.: Arch. Toxicol. 30, 139—145, 1973.
10. Sitkiewicz D., Konecka A., Chojnacka-Baldys K., Czerska-Trzcińska H.: Rocznik PZH 27, 277—286, 1976.
11. Strobel-Kamińska T.: Bromat. Chem. Toksykol. 8, 53—59, 1975.
12. Szymański A.: Lek. Wojsk. 53, 172—175, 1977.

Otrzymano 16 VII 1977.

#### OBJAŚNIENIA RYCIŃ

Ryc. 1. Hodowla kontrolna nr 1. Barwienie H+E, powiększenie ok. 200×. Gęsto ułożone komórki wrzecionowate (fibroblastopodobne) oraz komórki nabłonkowe, pojedyncze małe komórki o pyknotycznych jądrach.

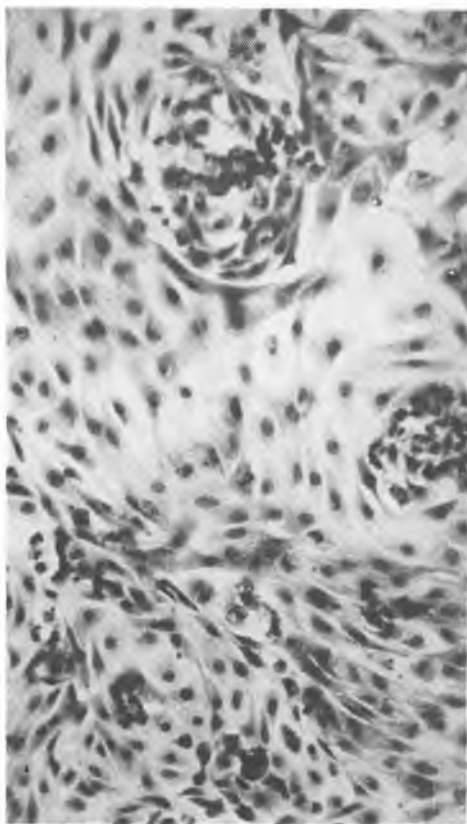
Ryc. 2. Hodowla kontrolna nr 1. Barwienie H+E, powiększenie ok. 400×. Większość komórek o wyraźnie zarysowanych granicach, owalnych, dużych jądrach, pojedyncze komórki małe o pyknotycznych, ciemnych jądrach.

Ryc. 3. Hodowla nr 73. Barwienie H+E, powiększenie ok. 400×. W cytoplazmie pojawiają się wodniczki, niektóre jądra ulegają kariolizie.

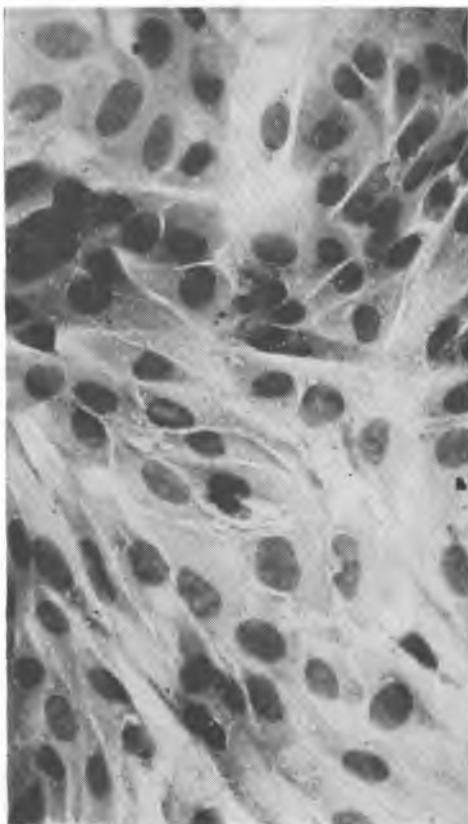
Ryc. 4. Hodowla nr 121. Barwienie H+E, powiększenie ok. 400×. Część komórek o zachowanych kształtach, grupa komórek w stanie martwicy częściowo odklejonych od podłoża.

Ryc. 5. Hodowla nr 60. Barwienie H+E, powiększenie ok. 400×. W cytoplazmie komórek bardzo liczne wodniczki, wiele jąder pyknotycznych, niektóre komórki odklejają się od podłoża.

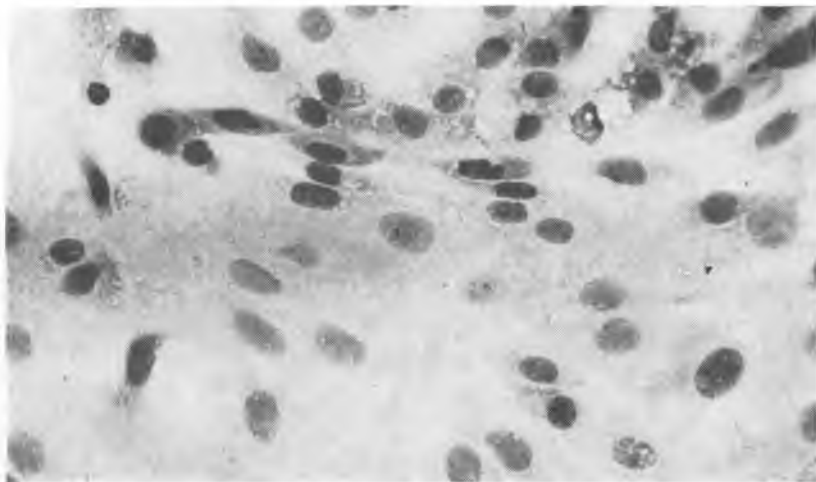
Ryc. 6. Hodowla nr 140. Barwienie H+E, powiększenie ok. 400×. Hodowla prawie całkowicie zniszczona, większość komórek martwych, odklejonych od podłoża.



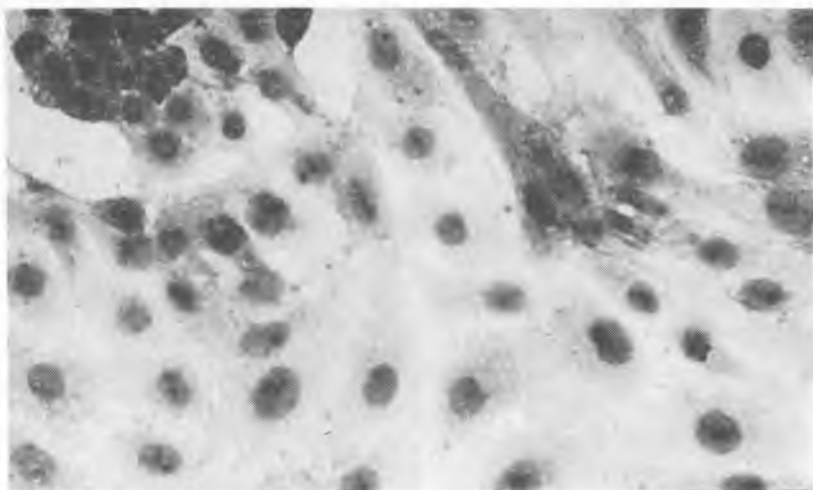
Ryc. 1



Ryc. 2



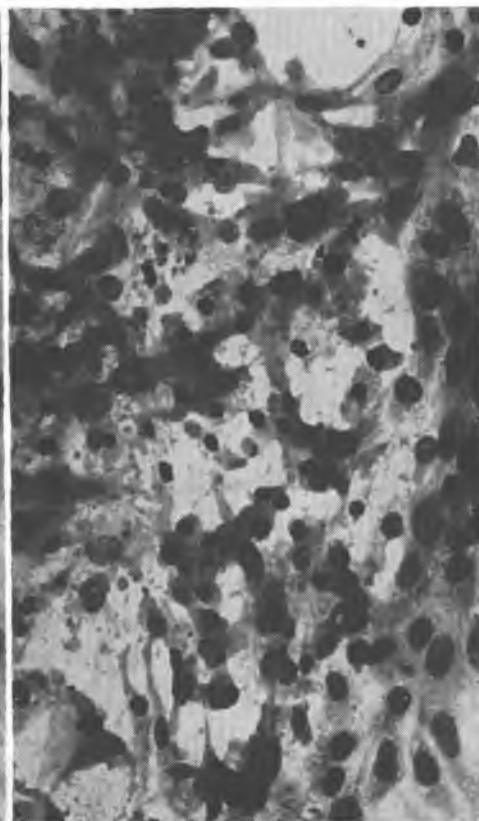
Ryc. 3



Ryc. 4



Ryc. 5



Ryc. 6



## РЕЗЮМЕ

На 144 культурах почки обезьяны исследовано влияние ДФП и токсогонина на клетки *in vitro*. Концентрация ДФП ниже 10,0  $\mu\text{г/мл}$  не проявляла заметного цитотоксического действия, при концентрации 30,0  $\mu\text{г/мл}$  выступает повреждение, а при концентрации 100,0  $\mu\text{г/мл}$  наступало полное уничтожение культуры. Токсогонин не является предохранительным средством для культур отравленных ДФП, а его цитотоксическое действие сильнее цитотоксического действия ДФП.

## SUMMARY

The influence of DFP and toxogonin on 144 kidney cultures of a monkey was examined. The concentrations of DFP below 10,0  $\mu\text{g/ml}$  do not show any marked cytotoxic action; at a concentration of 30,0  $\mu\text{g/ml}$  the culture is partially destroyed, whereas at a concentration of 100,  $\mu\text{g/ml}$  the culture is completely destroyed. Toxogonin does not protect the cultures poisoned by DFP; its cytotoxic action is slightly stronger than the cytotoxic action of DFP.

## EXPLANATION OF FIGURES

Fig. 1. Control culture No. 1. H+E staining, magn. ca 200 $\times$ . Densely placed fusiform cells (fibroblast like) and epithelial cells, single small cells with pyknotic nuclei.

Fig. 2. Control culture No. 1. H+E staining, magn. ca 400 $\times$ . Most of the cells have distinctly outlined borders, oval, large nuclei, single small cells with pyknotic dark nuclei.

Fig. 3. Culture No. 73. H+E staining, magn. ca 400 $\times$ . Vacuoles appear in the cytoplasm some of the nuclei undergo karyolysis.

Fig. 4. Culture No. 121. H+E staining, magn. 400 $\times$ . Part of the cells have preserved shapes, a group of cells in the state of necrosis partly ablated from the base.

Fig. 5. Culture No. 60. H+E staining, magn. 400 $\times$ . In the cytoplasm there are numerous vacuoles, many pyknotic nuclei, some of the cells are becoming ablated from the base.

Fig. 6. Culture No. 140. H+E staining, magn. ca 400 $\times$ . The culture is nearly completely destroyed, most of the dead cells are ablated from the base.

