

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XXIX, 28

SECTIO D

1974

Zakład Histologii i Embriologii. Pracownia Cytologii Doświadczalnej. Instytut Biologiczno-
-Morfologiczny. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Stanisław Grzycki

Józef STASZYC, Ewa KIFER

**Badania nad wpływem preparatu fosforoorganicznego na organizm
ciężarnych szczurów i płodów oraz na komórki w hodowli tkankowej**

Изучение влияния фосфоорганического препарата на организм беременных крыс,
плодов и клетки тканевой культуры

Studies on the Effect of the Phosphororganic Preparation
on Organism of Pregnant Rats, Foetuses and the Cells in Tissue Culture

Aktywność biologiczna chemicznych związków ochrony roślin zależy od ich struktury chemicznej, dawki, dróg przenikania do organizmu, a także od temperatury otoczenia. Interesujące wydaje się zagadnienie cytotoksycznego działania Foschloru zarówno na metabolizm komórek ciężarnej matki, jak i zdolność przecho-
dzenia przez barierę krew-łożysko i wpływ na ustrój płodu.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenie przeprowadzono na dojrzałych płciowo samicach szczurów białych, ciężaru ciała ca 17—18 dkg, wybranych losowo. Pochodziły one z hodowli wsobnej i nie rodziły. Po umieszczeniu z samcami robiono wymazy pochwowe. Obecność czopa pochwowego przyjmowano za pierwszy dzień ciąży. Zwierzętom doświadczalnym od drugiego dnia ciąży podawano sondą roztwór wodny Foschloru (F-my Azoty w Jaworznie), w ilości 50 mg czystego związku na 1 kg ciężaru ciała, co stanowi 10-krotnie mniejszą dawkę od letalnej. Grupą kontrolną była podobna liczba ciężarnych samic, jednakowo żywionych i przebywających w tych samych warunkach. W 14 i 21 dniach ciąży pobierano z samic skrawki tkanki podskórnej i umieszczano je w pożywce w butlach Legroux. Dekapitowano również płody 21-dniowe, a hodowle z ich skóry zakładano metodami trypsynizacji i skrawkową. Podobnie prowadzono hodowle z 14-dniowych całych płodów. Równolegle z materiałem doświadczalnym obserwowano równocześnie hodowle ze zwierząt kontrolnych. Komórki hodowano w płynie Parkera (pożywka 199) z dodatkiem 10% surowicy cielęcej. Wszystkie płyny w hodowli pochodziły z Wytwórni Surowic i Szczepionek w Lublinie. W drugim i trzecim dniu po 1 i 2 pasażu, na komórkach przy-

klejonych do szkiełek, wykonywano odczyny histochemiczne, przepłukując je przedtem płynem Hanksa, a następnie utrwalając w Bakerze przy temperaturze 4°C. Fosfatazę kwaśną wykrywano wg m. Gomoriego, a dehydrogenazę bursztynianową zgodnie z m. Nachlasy. Reakcje na aktywność dehydrogenazy mleczanowej prowadzono również na komórkach żywych, utrwalając po inkubacji w płynie Bakera.

BADANIA WŁASNE

I Wzrost hodowli

Hodowle wyprowadzone z tkanki podskórnej samic ciężarnych. W porównaniu z materiałem kontrolnym zarówno po 14 (ca 110 mg cz. Foschloru), jak i 21 dniach (170 mg cz. Foschloru) nie znaleziono różnic ani w obrazach morfologicznych komórek ani w szybkości wzrostu hodowli.

Hodowle wyprowadzone z płodów 14 dniowych (ca 110 mg Foschloru). Hodowle przytwierdzały się do podłoża, ale rosły wolniej niż z odpowiednio czasowej grupy kontrolnej. Monolajer otrzymano około 10—13 dnia.

Hodowle wyprowadzone z tkanki podskórnej płodów 21 dniowych (ca 170 mg Foschloru). Hodowle z tego okresu rozwijały się jeszcze wolniej, ponieważ monolajer uzyskiwano dopiero po 15—18 dniach. Komórki fibroblastopodobne nie różniły się budową od otrzymanych z płodów 14 dniowych.

II Aktywność enzymatyczna komórek hodowli

Fosfataza kwaśna. Samice: 14 dzień ciąży (ca 110 mg Foschloru). Hodowle, podobnie jak w grupach kontrolnych, przytwierdzały się do podłoża. Aktywność na fosfatazę kwaśną w komórkach fibroblastopodobnych była mniejsza, Rozmieszczenie ziarenek fosfatazo dodatnich nie wykazywało większych zmian.

Samice: 21 dzień ciąży (ca 170 mg Foschloru). Zauważono silniejszą reakcję na fosfatazę kwaśną niż w hodowlach z samic kontrolnych. W trzecim dniu po pasażu odczyn na tę hydrolazę był mocniejszy niż w dniu drugim.

Płody: 14 dniowe (ca 110 mg Foschloru). W zestawieniu z hodowlami płodów kontrolnych równoczesowych odczyn na fosfatazę kwaśną był niższy (ryc. 1). Również i w hodowlach trypsynizowanych wybarwiono małą ilość specyficznych ziarnistości (ryc. 2).

Płody: 21 dniowe (ca 170 mg Foschloru). Zarówno w komórkach hodowli ze skrawków skóry, jak i zakładanych metodą trypsynizacji odczyn na fosfatazę lizosomalną był obniżony.

Dehydrogenaza bursztynianowa. Samice: 14 dzień ciąży (ca 110 mg Foschloru). W hodowlach obserwowano komórki fibroblastopodobne o różnej aktywności na dehydrogenazę bursztynianową. Były takie, które przypominały materiał kontrolny, jak również i o słabszej aktywności.

Samice: 21 dzień ciąży (ca 170 mg Foschloru). Odczyny na dehydrogenazę bursztynianową były mniejsze niż w grupie 14 dniowej.

Płody: 14 i 21 dniowe (ca 110 i 170 mg Foschloru). Reakcje barwne ujawniające aktywność dehydrogenazy bursztynianowej nie były tak intensywne, jak w preparatach porównawczych (ryc. 3). Lokalizacja ziaren dwuformazanu bez większych odchyień.

Dehydrogenaza mleczanowa. Samice: 14 i 21 dzień ciąży (ca 110 i 170 mg Foschloru). Stopień wybarwienia komórek fibroblastopodobnych przypominał obrazy obserwowane w koloniach kontrolnych. Po drugim pasażu nastąpił spadek aktywności dehydrogenazy mleczanowej.

Płody: 14 dniowe (ca 110 mg Foschloru). W zestawieniu z grupą kontrolną lokalizacja i aktywność dehydrogenazy mleczanowej nie uległa zmianie. Natomiast komórki pochodzące z hodowli otrzymanej metodą trypsynizacji dawały odczyny wyraźnie silniejsze.

Płody: 21 dniowe (ca 170 mg Foschloru). W hodowlach wszystkie komórki fibroblastopodobne wykazywały wzmoczenie odczynów barwnych na dehydrogenazę mleczanową. Rozmieszczenie enzymu w cytoplazmie nie wykazywało jednak zasadniczych różnic, w porównaniu z lokalizacją DM w komórkach kontrolnych (ryc. 4).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Po 110 mg Foschloru (14 dzień ciąży) stwierdzało się osłabiony wzrost hodowli z całych płodów, a po 170 mg z tkanki podskórnej płodów. Wyhodowane komórki fibroblastopodobne nie wykazywały zmienionych cech morfologicznych. W obydwu grupach doświadczalnych obniżyły się natomiast odczyny na fosfatazę kwaśną i dehydrogenazę bursztynianową. Dawka 170 mg Foschloru wywołała wzrost aktywności dehydrogenazy mleczanowej.

Badania Heath a (1961), Życińskiego (1971) i innych wykazały, że związki fosforoorganiczne działają na organizm żywy bezpośrednio, ale nie kumulują się. Być więc może, że dawki Foschloru stosowane przez nas były wystarczająco duże, by spowodować tylko zmiany enzymatyczne, mające czas i zdolność do regeneracji (Goszczyńska i współ., 1971; Staszyc i Kifer, 1972). Biorąc pod uwagę obniżenie szybkości wzrostu komórek w hodowlach z płodów oraz zmiany enzymatyczne, można sądzić, że Foschlor, podobnie jak preparaty z grupy pestycydów, ma zdolność przechodzenia przez barierę krew-łożysko (Esbach i Rose, 1966) i może spowodować efekt cytotoksyczny.

Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej jest wykładnikiem nasilenia metabolizmu tkankowego i wiąże się ze strukturą mitochondriów. Można sądzić, że po Foschlorze zaistniał w komórkach deficyt energie-

tyczny, który doprowadził do przemiany beztlenowej (Rauch, 1964; Aisenberg, 1966). Potwierdzeniem tych sugestii jest reakcja na dehydrogenazę mleczanową, która bierze udział w przemianach beztlenowych glikogenu (Boczyński i Zyss, 1972), co łączy się również z aktywnością układu cholinergicznego.

Wiadomo, że zaburzenia oddychania w komórce zachodzą dopiero w późnym okresie zmian cytopatogennych i degeneracyjnych, choć nie zauważa się jeszcze zmian mikroskopowych (Denys i współ., 1971), co również miało miejsce i w naszym eksperymencie. Sądzimy więc, że pod wpływem Foschloru w komórkach płodów nastąpiło przejście z oddychania typu glikozy tlenowej do beztlenowej, który jest mniej korzystny dla tkanek (Slatter, 1961; Warburg i współ., 1965). Wyniki uzyskane przez nas na zwierzętach oraz obserwacje w hodowlach tkanek nie dają się przenieść w całości do kliniki, ponieważ organizm ludzki reaguje wielokierunkowo, ale w całokształcie doświadczenia wskazują na ujemny wpływ Foschloru na ustrój, a w szczególności na tkanki rozwijającego się płodu.

PIŚMIENNICTWO

1. Aisenberg A. C.: Acad. Press. 71, 163—172, 1966.
2. Boczyński E., Zyss R.: Otolaryng. Pol. 26, 407—413, 1972.
3. Denys A., Tchórzewski H.: Biul. Wojsk. Akad. Med. 14, 65—70, 1971.
4. Esbach H., Rose J.: Symp. am Institut für Pat. der Med. Akad., Magdeburg, Jena 1966.
5. Goszczyńska K., Styczyńska B.: Roczniki P.Z.H. 22, 375—380, 1971.
6. Heath D. F.: Perg. Press. 67, 196—203, 1961.
7. Rauch S.: Biochemie des Hörorgans, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1964.
8. Slatter E.: Proc. VI. Int. Congress Biochem. Moskwa, Perg. Press 1961.
9. Staszyc J., Kifer E.: Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Sec. D, Lublin 1972 (w druku).
10. Warburg O., Gawehn K., Geissler A. W., Kayse D., Lorenz S.: Klin. Wschr. 43, 289—301, 1965.
11. Życiński D.: Roczniki P.Z.H. 22, 189—194, 1971.

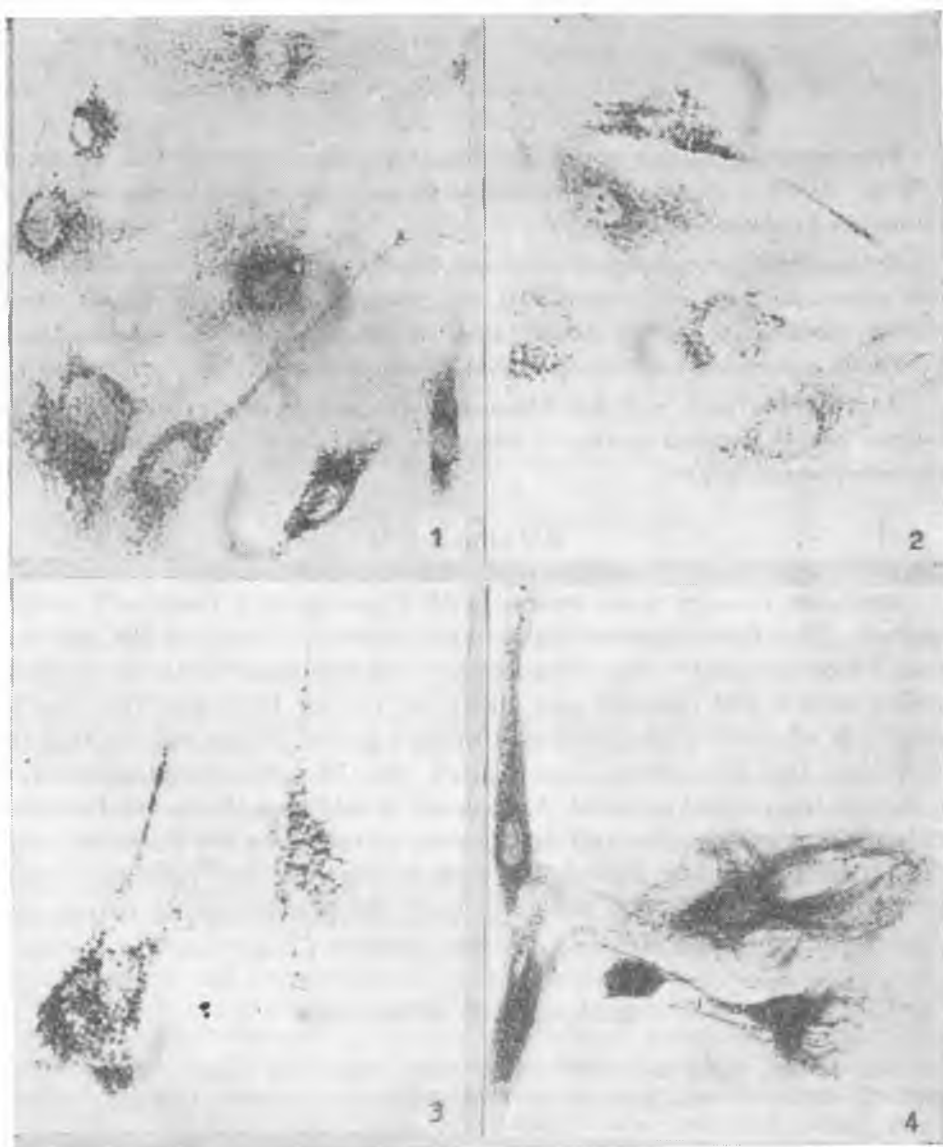
Otrzymano 5 IX 1973.

OBJAŚNIENIA DO RYCIN

Ryc. 1. Szczur, płód 14-dniowy, kontrolny. Pasaż II, dzień 3. Komórki fibroblastopodobne. Odczyn na fosfatazę kwaśną wg m. Gomoriego. Pow. ca 150 X.

Ryc. 2. Szczur, płód 14-dniowy. Obniżone odczyny na fosfatazę kwaśną w komórkach fibroblastopodobnych. Barwienie wg m. Gomoriego. Pow. ca 150 X.

Ryc. 3. Szczur, płód 21-dniowy, po 170 mg Foschloru. Pasaż I, dzień 3. W komórkach fibroblastopodobnych wykazano dehydrogenazę bursztynianową wg m. Nachlasa. Pow. ca 180 X.



Ryc. 1—4

Рис. 4. Щукур, плѳд 21-дний, по 170 мг Foschloru. Пасаж I, дзѳен 3. Оdczyn barwny na dehydrogenazę mleczanową w komѳrkach fibroblastopodobnych. Barwienie wg m. Pearse'a. Pow. ca 180 X.

РЕЗЮМЕ

Беременным самкам подавался посхлор: одной группе 110, а другой 170 мг. На 14 и 21 дни беременности брали подкожную ткань матери и плодов и основывали культуру.

Установлено, что фибробластоподобные клетки растут медленнее после посхлора, чем в контрольном материале. Обнаружено также понижение активности кислой фосфатазы, янтарной кислой дегидрогеназы и усиление реакции на молочнокислую дегидрогеназу.

Авторы считают, что фосфорорганический препарат посхлор проникает сквозь барьер кровь — плацента и вызывает в плодах крыс цитотоксический эффект.

SUMMARY

Pregnant females were treated with Phoschlorin („Foschlor”) by the authors. The first experimental group received a dose of 110 mg. and the second group 170 mg. respectively. Subcutaneous tissue of the pregnant female and foetuses was taken out on the 14th. and 21st. day of gestation whereafter the tissue culture was set up. It was noticed that the fibroblast-like cells grew slower after the Phoschlorin administration than in the control material. A decrease of acid phosphatase and succinic dehydrogenase activities and an increase of reactions for lactic dehydrogenase have also been found. The authors consider that phosphororganic preparation, Phoschlorine, passes through the blood-placenta barrier and causes the cytotoxic effect in the rat foetuses.

EXPLANATION OF FIGURES

Fig. 1. Rat, a 14 days old control foetus. The IInd serial passage, the 3rd day. Fibroblast-like cells. Reaction for acid phosphatase according to Gomori method. Magn. 150 X.

Fig. 2. Rat, a 14 days old foetus. A decreased reactions of acid phosphatase in fibroblast-like cells. Staining according to Gomori method. Magn. 150 X.

Fig. 3. Rat, a 21 days old foetus, after administration of 170 mg of Phoschlorine. The Ist serial passage, the 3rd day. Succinic dehydrogenase has been shown in fibroblast-like cells according to Nachlas method. Magn. 180 X.

Fig. 4. Rat, 21 days old foetus, after administration of 170 mg of Phoschlorine. Colour reaction for lactic dehydrogenase in fibroblast-like cells. Staining according to Pearse method. Magn. 180 X.