

GRAŻYNA KOSTKA¹⁾, JOANNA KOPEĆ-SZŁĘZAK²⁾, DANUTA PALUT¹⁾

WPLYW WYBRANYCH PESTYCYDÓW Z GRUPY POLICHLOROWANYCH
WĘGLOWODORÓW NA PROLIFERACJĘ KOMÓRKOWĄ W WĄTROBIE
SZCZURÓW (DOŚWIADCZENIE 14 DNIOWE)

EFFECT OF SOME POLYCHLORINATED HYDROCARBONS ON CELL
PROLIFERATION IN RAT LIVER (14 DAY EXPERIMENT)

- 1) Zakład Toksykologii Środowiskowej, Państwowy Zakład Higieny,
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24
Kierownik: prof. dr. hab. J. K. Ludwicki
- 2) Zakład Fizjopatologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii,
00-957 Warszawa, ul. Chocimska 5
Kierownik: doc. dr hab. J. Kopeć-Szłęzak

Zbadano wpływ pestycydów chloroorganicznych: naurimolu i DDT na proliferację hepatocytów, powiększenie wątroby z uwzględnieniem zmian histologicznych w organizmie szczura. Badane parametry rozpatrywane są w piśmiennictwie jako potencjalne wskaźniki rakotwórczego oddziaływania niegenotoksycznych hepatokancerogenów.

Wieloletnie badania procesu nowotworowego wskazują na genetyczne podłoże choroby nowotworowej, przynajmniej na etapie inicjacji i progresji [11, 13]. Wzrasta jednak liczba substancji chemicznych, które nie tworzą adduktów z materiałem genetycznym, nie stymulują syntezy naprawczej DNA i w testach na mutagenność dają wynik negatywny, natomiast w długookresowych badaniach żywieniowych wywołują nowotwory u zwierząt laboratoryjnych [4, 9, 10]. Mechanizm(y) tego oddziaływania nie zostały wyjaśnione, co stwarza szereg problemów związanych zarówno z wczesnym wykrywaniem, jak i oceną ryzyka wynikającego z oddziaływania związków rozpatrywanych jako niegenotoksyczne substancje rakotwórcze. Wspólną cechą wszystkich niegenotoksycznych kancerogenów jest zdolność stymulowania w docelowych tkankach proliferacji komórkowej [1, 5, 6], której przypisuje się szczególną rolę we wszystkich etapach chemicznej kancerogenezy. Sugeruje się ponadto, że charakter proliferacji, typu regeneracyjnego lub bezpośredniego efektu mitogennego decyduje o rozwoju wczesnych etapów procesu nowotworowego [8]. Do niegenotoksycznych hepatokancerogenów zakwalifikowano szereg substancji chemicznych z grupy polichlorowanych węglowodorów, w tym środki aktualnie stosowane w ochronie roślin [9, 18, 20].

Wydało się zatem celowe zbadanie wpływu nuarimolu (alfa-/2-chlorofenylo/-alfa-/4-fluorofenylo/-5-pyrimidynometanol) na proliferację hepatocytów oraz powiększenie wątroby, z uwzględnieniem oceny histologicznej tego narządu. Jako kontrolę pozytywną

zastosowano DDT (1,1- bis- p-chlorofenilo/-2,2,2-trichloroetan), niegenotoksyczny związek o udowodnionym działaniu rakotwórczym dla zwierząt [12].

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Odczynniki:

1) Nuarimol (98.8%) – firmy Elanco Company, 2) DDT (100%) – produkcji Instytutu Przemysłu Organicznego, 6-(³H), 3) tymidyna o aktywności właściwej 1020 MBq / mol⁻¹ produkcji Instytutu Badań, Produkcji i Stosowania Radioizotopów, Praga, Czechy.

Materiał biologiczny i schemat doświadczenia

Badania przeprowadzono na samcach, szczurów rasy *Wistar* (Pzh:WIS).

Młode szczury o masie 50–60g umieszczano w klatkach (po 5 sztuk), w pomieszczeniu o temperaturze 22 ± 1°C z 12-godzinnym rytmem świetlnym i względnej wilgotności powietrza 50 ± 10%. Wodę oraz paszę zwierzęta otrzymywało *ad libitum*. Badania prowadzono na dojrzałych osobnikach, o masie ciała 200 ± 10g.

Nuarimol i DDT podawano szczurom doustnie, w oliwie jadalnej (między 8⁰⁰ – 9⁰⁰) w odstępach dobowych wg. następującego schematu: jednorazowo, 5 – krotnie oraz 14 – krotnie w dawkach wynoszących 125 mg/kg m.c. × dzień⁻¹ (nuarimol) i 12 mg/kg m.c. × dzień⁻¹ (DDT). Dawki te odpowiadały 1/10 wartości LD₅₀ wyznaczonych dla badanych związków. Grupy kontrolne zwierząt otrzymywały równoważną ilość oliwy jadalnej.

Pomiar proliferacji komórkowej

Proliferację komórkową mierzono wbudowywaniem się 6(³H) tymidyny do jądrowego DNA (synteza DNA) oraz wyznaczeniem indeksu mitotycznego.

24 godziny po jednorazowym, 5 – krotnym i 14 – krotnym podawaniu nuarimolu i DDT, grupy szczurów badanych i kontrolnych otrzymywały dootrzewnowo (między godziną między 8⁰⁰–9⁰⁰) 6(³H) tymidynę (1,2 MBq / szczura). Po upływie 1 godz. zwierzęta dekapitowano, wypreparowane wątroby dokładnie przemywano i ważono. Wszystkie czynności wykonywano w temperaturze 4°C. Prawy płąt wątroby stanowił materiał do oznaczeń biochemicznych, radiometrycznych oraz badań histologicznych.

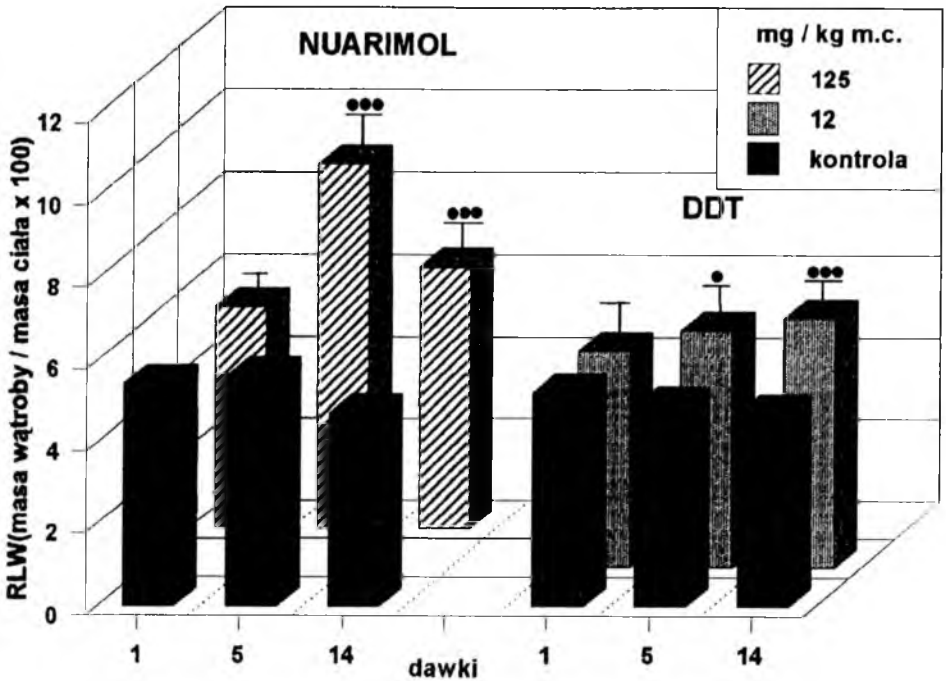
Ig tkanki zamrażano w ciekłym azocie i homogenizowano w 0,25M roztworze sacharozy w homogenizatorze typu *Pottera*. Frakcję jądrową odwirowywano przy 900 g (3400 obr/min). DNA wyodrębniano i hydrolizowano wg. metody opisanej we wcześniejszej pracy [14]. Zawartość DNA w hydrolizatach oznaczano metodą kolorymetryczną *Burtona* [3]; pomiary radiometryczne wykonywano metodą płynnej scyntytacji stosując scyntylator dla układów niejednorodnych. Syntezę DNA wyrażano w dpm/mg DNA.

Preparaty do badań histologicznych wykonywano metodą rutynową, barwiąc skrawki wątroby (6–7µm) hemotoksyliną i eożyną. Ilość figur mitotycznych liczono w 3000 – 4000 komórkach. Aktywność mitotyczną wyrażano ilością figur mitotycznych / 1000 hepatocytów. Dla oceny wyników stosowano test *t-Studenta*, przyjmując jako kryterium znamienności p < 0,05.

WYNIKI

Wpływ nuarimolu i DDT na masę wątroby wyrażoną jako RLW (relative liver weight-masa wątroby/masę ciała × 100) przedstawiono na ryc. 1.

Jednorazowe podawanie szczurom zarówno nuarimolu jak i DDT nie wywołało zmian w RLW. Względna masa wątroby wzrastała po wielokrotnym narażeniu zwierząt na badane związki. Pięciokrotne doustne podawanie nuarimolu w dawce 125 mg/kg m.c. × dzień⁻¹ stymulowało wzrost masy wątroby o 70% (p < 0,001) w stosunku do grupy kontrolnej. Po 14 dawkach nuarimolu nie wykazano dodatkowych



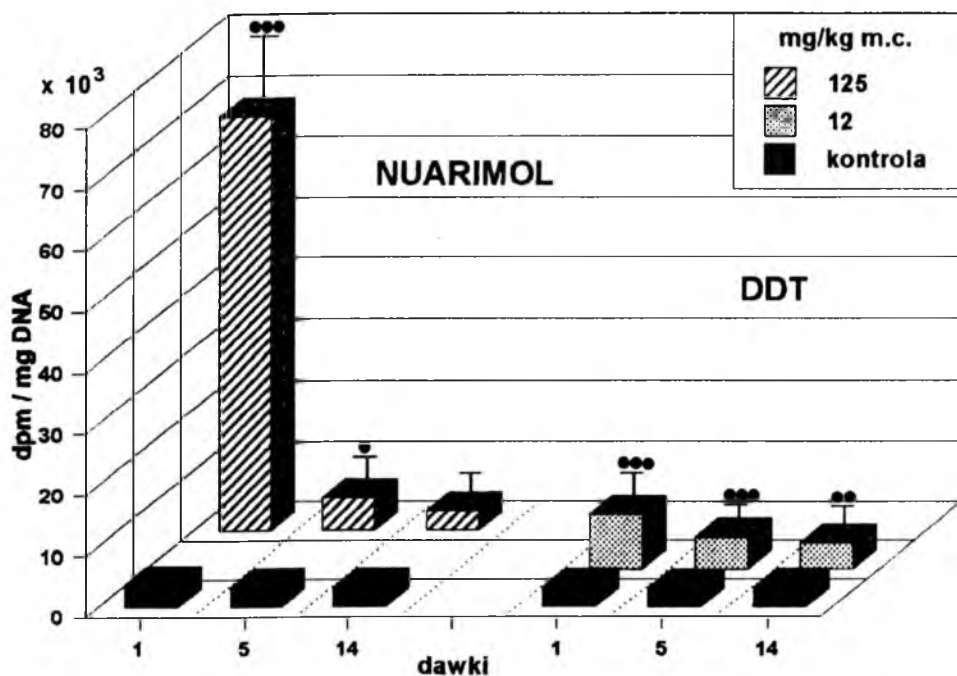
Ryc. 1 Wpływ nuarimolu i DDT na względną masę wątroby (RLW). Wartości średnie z 5 zwierząt \pm SEM; różnice statystycznie istotne w stosunku do poziomu kontrolnego – (*) $p < 0,05$; (***) $p < 0,001$.

Fig. 1 Effect of nuarimol and DDT on relative liver weight (RLW). Means for five animals \pm SEM; significantly different from control – (*) $p < 0,005$; (***) $p < 0,001$.

zmian w masie badanego narządu; średnie wartości RLW przewyższały nadal istotnie ($p < 0,001$) wartości kontrolne. Pięciokrotne podawanie DDT w dawce 12 mg/kg m.c. \times dzień⁻¹ znacznie słabiej stymulowało przyrost masy wątroby w porównaniu do nuarimolu. Narażenie zwierząt na ten związek przez 14 dni wywoływało dalszy, nieznaczny wzrost względnej masy wątroby; średnie wartości RLW przekraczały o 30% ($p < 0,05$) wartości uzyskiwane w grupie zwierząt kontrolnych. Na ryc. 2 przedstawiono wpływ badanych związków na syntezę DNA, mierzoną ilością wbudowanej 6 (³H) tymidyny do jądrowego DNA.

Maksymalny wzrost syntezy DNA wykazano po jednorazowym podawaniu zarówno nuarimolu jak i DDT. W przypadku nuarimolu, stwierdzono 18 – krotny ($p < 0,001$) wzrost syntezy DNA w porównaniu z kontrolą; w analogicznych warunkach DDT stymulował odpowiednio 3 – krotny ($p < 0,001$) wzrost syntezy DNA. Po 5 kolejnych dawkach nuarimolu, obserwowano gwałtowny spadek syntezy DNA; jednak poziom syntezy DNA nadal przekraczał wartości kontrolne ($p < 0,05$). Podczas dalszego narażenia zwierząt na nuarimol (14 dni) nie obserwowano już statystycznie istotnych zmian w syntezie DNA w porównaniu z kontrolą.

W odróżnieniu od nuarimolu, podczas kontynuowania narażenia zwierząt na DDT, synteza DNA utrzymywała się na podwyższonym poziomie i po 14 dniach różnica



Ryc. 2 Wpływ nuarimolu i DDT na ilość wbudowanej [³H] tymidyny do jądrowego DNA (synteza DNA).

Wartości średnie z 5 zwierząt ± SEM; różnice statystycznie istotne w stosunku do poziomu kontrolnego – (*)p<0,05; (**)p<0,01; (***)p<0,001

Fig. 2 Effect of nuarimol and DDT on the rate of [³H] thymidine utilization for DNA synthesis.

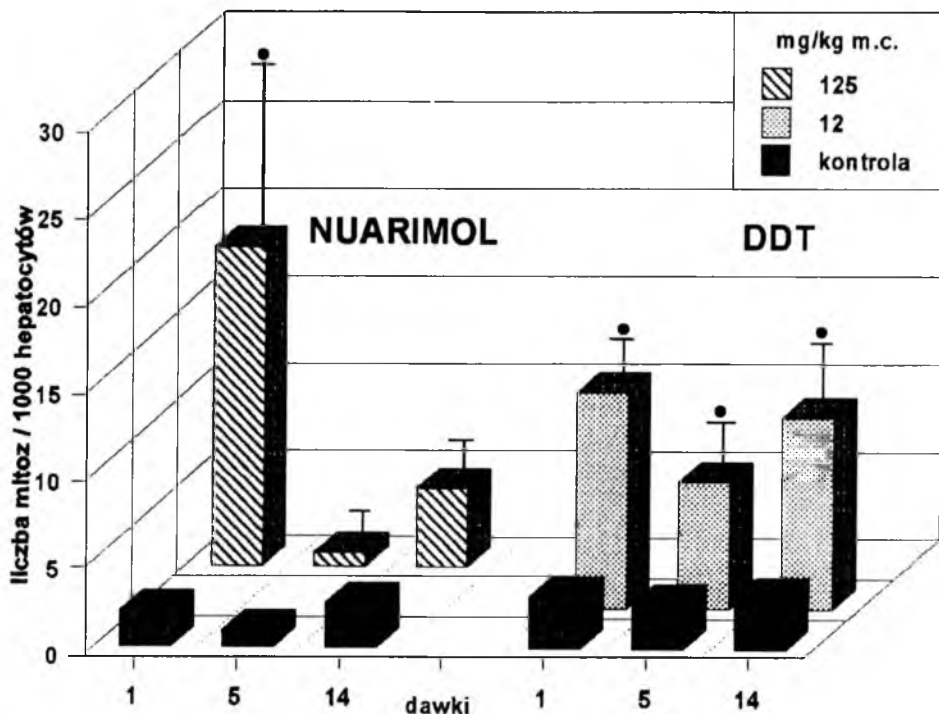
Means for five animals ± SEM; Significantly different from control – (*)p<0,05; (**)p<0,01; (***)p<0,001

w stosunku do grupy zwierząt kontrolnych była nadal statystycznie istotna (p<0,01). Podobne zależności wykazano przy wyznaczaniu indeksu mitotycznego (ryc. 3).

Nuarimol podawany szczurom jednorazowo, w dawce 125mg/kg m.c. × dzień⁻¹ wywoływał 9 – krotny (p<0,05) wzrost liczby figur mitotycznych w stosunku do kontroli. Wzrost aktywności mitotycznej był przejściowy i po 14 dawkach nuarimolu, obserwowano nieistotny statystycznie wzrost ilości podziałów mitotycznych.

DDT natomiast, analogicznie do syntezy DNA, wywoływał utrzymujący się przez cały okres doświadczalny wzrost aktywności mitotycznej w stosunku do poziomu kontrolnego (p<0,05).

Ocena histologiczna wątroby szczurów otrzymujących nuarimol wykazała zmiany wakuolizacyjne w cytoplazmie hepatocytów (ryc. 4(b)). Zmiany te, zlokalizowane blisko żyły centralnej widoczne były po pojedynczej dawce związku i utrzymywały się w czasie dalszej ekspozycji zwierząt na pojedynczą dawkę



Ryc. 3 Wpływ nuarimolu i DDT na liczbę podziałów mitotycznych w wątrobie szczurów. Wartości średnie z 5 zwierząt \pm SEM; różnice statystyczne istotne w stosunku do poziomu kontrolnego - (*) $p < 0,05$

Fig. 3 Effect of nuarimol and DDT on the numbers of mitoses in the liver of rats
Means for five animals \pm SEM; significantly different from control - (*) $p < 0.05$

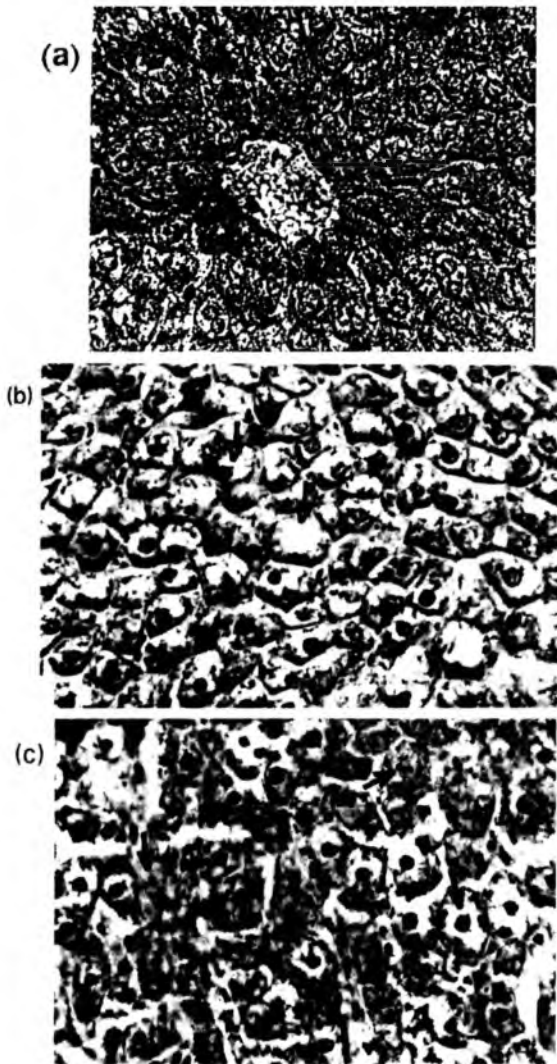
DDT, obserwowano nie tylko wakuolizację cytoplazmy hepatocytów, ale również nacieki zapalne świadczące o zmianach martwiczych w wątrobie.

Przy kontynuowaniu narażenia zwierząt na DDT, odnotowano już wyraźne oznaki martwicy w centralnej części zrazika oraz występowanie nieprawidłowych podziałów komórkowych (ryc. 4(c)). W grupach zwierząt kontrolnych, odnotowano normalne utkanie wątroby i nie obserwowano nieprawidłowych mitoz (ryc. 4(a)).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Powiększenie wątroby oraz wzrost proliferacji komórkowej rozpatrywane są jako wczesne wskaźniki indukcji nowotworów przez niegenotoksyczne substancje chemiczne [1, 5, 9]. Porównanie oddziaływania nuarimolu i DDT w tym aspekcie, wydaje się szczególnie interesujące, ponieważ w odróżnieniu od DDT [12], w dostępnym piśmiennictwie brak informacji odnośnie rakotwórczego działania nuarimolu.

Otrzymane wyniki wskazują, że zarówno DDT jak i nuarimol wpływały na masę wątroby i stymulowały proces proliferacji hepatocytów, przejawem której był wzrost syntezy DNA i podziałów mitotycznych. Proliferacja hepatocytów i powiększenie wątroby, były efektami zależnymi od związku i wielokrotności zastosowanej dawki.



Ryc. 4 Zmiany patologiczne w wątrobie szczurów wywoływane nuarimolem i DDT (H + E, 400 \times) (a) – kontrola – fragment zrazika wątroby; (b) – nuarimol w dawce 125 mg/kg m.c. \times dzień⁻¹ (14 dni), wakuolizacja cytoplazmy; (c) – DDT w dawce 12 mg/kg m.c. \times dzień⁻¹ (14 dni); wakuolizacja cytoplazmy, zmiany martwicze hepatocytów, nieprawidłowe figury mitotyczne.

Fig. 4 Pathological changes in the liver of rats caused by repeated nuarimol and DDT administration (H + E, 400 \times) (a) – control – fragment of rate liver lobule; (b) – nuarimol – 14 single doses of 125 mg/kg b.w. day⁻¹; cytoplasmic vacuolization; (c) – DDT – 14 single doses of 12 mg/kg b.w. day⁻¹; cytoplasmic vacuolization, sings of patocyte necrosis, abnormal mitotic figures.

Nuarimol stymulował gwałtowny wzrost proliferacji hepatocytów po jednorazowym podawaniu związku. Efekt ten miał charakter przejściowy i pomimo dalszego kontynuowania narażenia zwierząt na nuarimol (przez 14 dni) synteza DNA i aktywność

mitotyczna powracały do wartości kontrolnych. W odróżnieniu od nuarimolu, DDT stymulował utrzymujący się wzrost proliferacji hepatocytów przez cały okres cyklu doświadczalnego. Proliferacji towarzyszyły zmiany martwicze hepatocytów oraz nieprawidłowe podziały komórkowe.

Przedstawione wyniki sugerować mogą, że nuarimol, pomimo obserwowanych zmian typu wakuolizacji hepatocytów, stymulował w wątrobie szczura bezpośredni efekt mitogeny poprzedzający powiększenie wątroby. Powiększenie wątroby (na drodze hyperplazji i hipertrofii) rozpatrywane jest przez wielu autorów jako odpowiedź adaptacyjna narządu na zwiększone obciążenie funkcjonalne związane z metabolizowaniem ksenobiotyków [17]. Należy zaznaczyć, że obserwowane zmiany pod wpływem nuarimolu przypominają oddziaływanie szeregu bezpośrednich mitogenów, między innymi takich jak fenobarbital [15], butoksyhydroksytoluen [2], klofibrat [7, 19] i nafenopin [7, 16] rozpatrywanych jako niegenotoksyczne substancje rakotwórcze.

Utrzymująca się wzmożona proliferacja komórkowa wynikająca z oddziaływania DDT i towarzyszące jej zmiany martwicze hepatocytów sugerują, że związek ten stymulował raczej odnowę regeneracyjną hepatocytów a nie bezpośredni efekt mitogeny postulowany przez autorów niniejszej pracy dla nuarimolu. W odróżnieniu od bezpośredniego efektu mitogeny, regeneracyjna proliferacja komórkowa rozpatrywana jest jako kluczowy czynnik we wczesnych etapach hepatokancerogenezy (inicjacja, promocja) [8].

Na obecnym etapie badań trudno przewidzieć konsekwencje wynikające z nieprawidłowych podziałów mitotycznych, obserwowanych u szczurów otrzymujących DDT; nie można jednak wykluczyć, że nieprawidłowe mitozy prowadzić mogą do liczbowych aberracji chromosomowych.

WNIOSKI

1. Nuarimol i DDT stymulowały w wątrobie szczura odpowiedź komórkową przejawiającą się proliferacją hepatocytów i wzrostem masy wątroby (RLW).

2. Charakter wzrostu proliferacji komórkowej oraz wyniki badań histologicznych sugerują, że nuarimol w wątrobie szczura stymulował proliferację typu bezpośredniego efektu mitogeny.

3. W odróżnieniu od nuarimolu, DDT wywoływał zmiany martwicze w wątrobie, co sugerować może, że związek stymulował proliferację typu regeneracyjnego.

G. Kostka, J. Kopeć-Szlęzak, D. Palut

EFFECT OF SOME POLYCHLORINATED HYDROCARBONS ON CELL PROLIFERATION IN RAT LIVER (14 DAY EXPERIMENT)

Summary

The aim of present studies was to describe the effect of two organochlorine pesticides: nuarimol and DDT on the changes in rat liver, proposed in the literature to be useful endpoints in screening of non - genotoxic hepatocarcinogens and/ or liver tumor promoters.

The effects on the following endpoints: mitogenesis (DNA synthesis and mitotic activity), hepatomegaly as well as histological changes in rat liver have been investigated. Male Wistar rats received nuarimol or DDT in one, five and fourteen daily oral administration of the doses of 125 and 12 mg/kg b.w. day⁻¹ respectively.

In the case of both pesticides the effects observed consisted of hepatomegaly and hepatocyte proliferation (DNA synthesis and mitotic activity), although our studies indicated several distinct differences in the hepatic response between nuarimol, on the one hand and DDT on the other. The differences were reflected in the character and the basal rate of hepatocyte proliferation. Nuarimol elicited rapid but transient wave of hepatocyte proliferation during the first day of exposure. As opposite to nuarimol, DDT induced sustained hepatocyte proliferation during experimental period (14 days). Moreover, DDT induced evident focal necrosis and abnormal mitoses whereas nuarimol caused only slight vacuolated cytoplasm.

Thus it can be concluded that nuarimol induced in rat liver direct mitogenic effect. On the other hand, DDT which is well known hepatocarcinogen, was found to produce mitogenic effect appearing to be related to regenerative response, since histological signs of necrosis were apparent.

PIŚMIENNICTWO

1. *Ames B.N., Gold L.*: Two many rodent carcinogens: mitogenesis increases mutagenesis. *Science*, 1990, 249, 970. -2. *Briggs D., Lok E., Nera E.A., Karpiński K., Clayson D.B.*: Short term effects of butylated hydroxytoluene in Wistar rat liver, urinary bladder and thyroid gland. *Cancer Lett.*, 1988, 46, 31. -3. *Burton K.A.*: A study of the condition and mechanism of the diphenylamine reaction of the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.*, 1954, 62, 315. -4. *Butterworth B.E.*: Non-genotoxic carcinogens in the regulatory. *Environment. Reggul. Toxicol. Pharmacol.*, 1989, 9, 244. -5. *Butterworth B.E., Slaga T.J., McClain M.*: Chemically Induced Cell Proliferation: Implications for Risk Assessment. Wiley-Liss. Inc. N.Y. 1991. -6. *Cohen S.M., Ellwein L.B.*: Cell proliferation in carcinogenesis. *Science*, 1990, 249, 1007. -7. *Eacho P., Lanier T.L., Brodhecker C.A.*: Hepatocellular DNA synthesis in rats given peroxime proliferating agents: comparison of WY - 14,643 to clofibric acid nafenopin and LY 17, 1883. *Carcinogenesis*, 1991, 12, 1557. -8. *Farber E.*: Hepatocyte proliferation in stepwise development of experimental liver cell cancer. *Digest. Dis. and Sciences*, 1991, 36, 7, 973. -9. *Grasso P., Hinton R.H.*: Evidence for and possible mechanism of non-genotoxic carcinogenesis in rodent liver. *Mut. Res.*, 1990, 248, 271. -10. *Hildebrand B., Grasso P., Chamberlain M., Jung R., Kolfscholen A., Loeser E., Smith E., Bontick W.B.*: Validity of considering that early changes may act as indicators for non-genotoxic carcinogenesis. *Mut. Res.*, 1991, 248, 217.

11. *Horst A.*: Geny przeciwnowotworowe jako czynniki regulatorowe wzrostu i różnicowania komórek. *Postępy Biologii Komórki*, 1992, 19, 3. -12. IARC (1991) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, 53: Occupational Exposure in Insecticide application and some pesticides, Lyon, 179. -13. *Jakobisiak M.*: Onkogeny. *Postępy Biologii Komórki*, 1985, 12, 289. -14. *Palut D., Ludwicki J., and Kopeć-Szłęzak J.*: The influence of fenarimol on DNA synthesis and mitotic activity in rat liver. *J. Appl. Toxicol.*, 1992, 12, 275. -15. *Peraino C., Fry R.J.M., Staffeld E., Christopher J.P.*: Comparative enhancing effects of phenobarbital, aminobarbital, diphenylhydantoin and dichlorodiphenyltrichloroethane on 2-acetylaminofluorene - induced hepatic tumorigenesis in the rat. *Cancer Res.*, 1975, 35, 2884. -16. *Price R.J., Evans J.G., Lake B.G., and Gangolli S.D.*: Comparison of the effects of nafenopin, merthylclofenapate, WY - 14,643 and clofibric acid on peroxisome proliferation and replicative DNA synthesis in rat liver. *Toxicologist*, 1991, 11, 127. -17. *Schulte-Hermann R.*: Induction of liver growth by xenobiotic compounds and other stimuli. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 1974, 3, 97. -18. *Schulte-Hermann R.*: Tumor promotion in the liver. *Arch. Toxicol.*, 1985, 57, 147. -19. *Tanaka K., Smith P.F.*: Studies of early hepatocellular proliferation and peroximal proliferation in Sprague-Dawley rats treated with tumorigenesis doses of clofibrate, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1992, 116, 71. -20. *Upton A.C., Clayson D.B., Jensen J.D., Rozenkrantz H.S., Williams G.M.*: Report of ICPEMC Task Groups 5 on the differentiation between genotoxic and non-genotoxic carcinogens. *Mut. Res.*, 1984, 133, 1.