



AKADEMIJA NAUKA I UMJETNOSTI
BOSNE I HERCEGOVINE

RADOVI

KNJIGA LXXXVIII

Odjeljenje medicinskih nauka
Knjiga 25

Redakcioni odbor
Jela Grujić-Vasić, Džemal Rezaković,
Dragomir Stanković

Urednik
Džemal Rezaković,
redovni član Akademije nauka i umjetnosti
Bosne i Hercegovine

UDC 615/.617:502(082)

YU ISSN 0350-0071

SARAJEVO 1991

PROCJENA RIZIKA EKSPOZICIJE METALIMA NA TKIVIMA EMBRIONA KOKOŠIJEG JAJETA I KULTURI ČELIJA U EKOTOKSIKOLOGIJI

MARIJA KESER-STANKOVIĆ, DANICA HLAČA, DRAGAN STANKOVIĆ
Institut za patofiziologiju Medicinskog fakulteta, Sarajevo

UDC 615.556 : 591.3

Apstrakt. Istraživani su i komparirani efekti iona srebra, željeza i kalaja na razvijajuća tkiva kokošijeg embriona i na kulture ćelija u finalnim koncentracijama od 10^{-1} — 10^{-5} M. Svaka od ovih koncentracija u količinama od 0,2 ml inokulirana je u razvijajuća tkiva kokošijeg embriona, i to u amnion i žumanjčanu vrećicu i u kulture ćelija in vitro tipa HeLa i GMK. Željezo, esencijalni element u organizmu čovjeka i životinja, i srebro i kalaj, koji se normalno ne nalaze kao esencijalni biološki sastojci, pokazuju očite razlike u toksičnim efektima na razvijajuća tkiva kokošijeg embriona i kontinuirane ćelijske linije HeLa i GMK. Zapažen je snažniji i brži toksični efekat iona srebra i kalaja u odnosu na ione željeza, koji se ispoljava već prvog dana poslije aplikacije, bez obzira na način inokulacije metala. Evidentno je brže uginuće embriona i pri uvođenju u amnion i u žumanjčanu kesu. U odnosu na ione željeza toksični efekat iona srebra i kalaja brže su se ispoljili i na kulturama ćelija, pri čemu su ioni srebra i kalaja izazvali potpuno propadanje ćelija u razređenjima 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} M, a ioni željeza samo u razređenju 10^{-1} M. Zapaženo je da inokulacija ispitivanih metala u amnion kokošijeg jajeta, uzrokuje brže uginuće embriona nego inokulacija metala u žumanjčanu kesu.

Ključne riječi: metali, razvijajuća tkiva kokošijeg embriona, kultura ćelija.

U V O D

Željezo je esencijalni elemenat u organizmu čovjeka i životinja. Akutna intoksikacija željezom kod eksperimentalnih životinja uslovlila je produženje vremena koagulacije, promjenu u stvaranju fibrina i oštećenje jetre (Bothwell et al., 1962), dok je dugotrajno davanje željeza uzrokovalo hemosiderozu u mnogim tkivima i organima. Eksperimentalna istraživanja (Moeschlin, 1962) ukazuju da simptomi trovanja željezom protiču u dvije faze. U prvoj fazi dominiraju paralitičke pojave na donjim ekstremitetima, a u drugoj fazi krvavi prolivi. Životinje obično uginu u toku 24 sata nakon davanja željeza. Povećana resorpcija srebra dovodi do lokalne ili generalizovane impregnacije tkiva (argirija) sa oštećenjem tkiva i organa i povećanim aterosklerotičnim

procesima. Veće doze date eksperimentalnim životinjama uzrokovale su plućni edem, hemolizu i hipoplaziju koštane srži (Brown i ng, 1969). Kalaj je metal koji se upotrebljava u industriji boja i parfema. Dodaje se i pastama za zube jer sprječava razvoj karijesa. Zapaženo je i njegovo iritativno lokalno dejstvo. Dat peroralno uzrokuje povraćanje, proliv, grčeve i glavobolju (Grot et al., 1973). Radovi Conine i sar. (1975) ukazuju na njegova depresivna dejstva na CNS, na mišićnu slabost koja progredira do paralize.

Ispoljavanje različitih toksičnih efekata ovih metala podstiče na dalja istraživanja, pa smo u našem eksperimentu postavili cilj da ispitamo toksične efekte iona željeza, srebra i kalaja na razvijajuća tkiva kokošijeg embriona i kulturama ćelija in vitro.

MATERIJAL I METODE

U eksperimentu su korišteni ioni željeza, srebra i kalaja u finalnim koncentracijama od 10^{-1} — 10^{-5} M. Svaki od ovih metala u ovim razređenjima inokuliran je u razvijajuća tkiva kokošijeg embriona, i to u amnion i žumanjčanu vrećicu i kulture ćelija HeLa i GMK. Inokulacija u amnion vršena je u po pet fertilnih jaja pripremljenih za inokulaciju u amnionsku vrećicu 10—11 dana starog kokošijeg embriona, na način koji se koristi za inokulaciju virusa influence (Hawkes, 1979). Nakon inokulacije jaja su inkubirana u termostatu na temperaturi 37° C i svakog dana su ovoskopom evidentirana uginula jaja.

Inokulacija metala u žumanjak vršena je sedmog dana inkubacije u termostatu (tehnika za inokulaciju virusa u žumanjčanu vrećicu — Palmer, 1975), i to svako razređenje takođe u po pet jaja. Uginuće embriona je praćeno svakodnevno na isti način kao pri inokulaciji u amnion.

Inokulacija metala u kulture kontinuiranih ćelija HeLa i GMK vršena je na način koji se koristi u virusološkim laboratorijama pri pokušaju izdvajanja virusa (Schmidt, 1969). Jednom sedmično kontinuirane ćelijske linije se tripsiniraju, izaperu, a inokulum ćelija resuspendira u odgovarajućoj hranljivoj podlozi i prenosi u epruvete tako da u svakoj epruveti bude po prilici 200—300 hiljada ćelija. Ćelije se vlastitom aktivnošću priljube uz zid epruvete, razmnožavaju i nakon 2—3 dana takva je kultura ćelija spremna za inokulaciju.

Svako razređenje pojedinog metala inokulirano je u po dvije »porasle« kulture ćelija HeLa i GMK tipa.

Kontrolne kulture ćelija su održavane pod identičnim uslovima kao i one u koje je inokuliran pojedini metal. Efekti metala praćeni su svakodnevnom mikroskopiranjem inokuliranih ćelija i kontrola. Efekat metala na razvijajućim tkivima kokošijeg embriona kao i na kulturama ćelija praćen je tokom 10 dana od dana inokulacije.

REZULTATI

Na tabeli 1 prikazani su efekti Ag^+ pri inokulaciji u amnion i žumanjčanu vrećicu (Tabela 1).

Već u prvom danu nakon inokulacija Ag^+ u amnion uginulo je po 4 od 5 embriona (80%) u razređenju 10^{-1} M i 10^{-2} M. Pri koncentraciji Ag^+ do 10^{-3} M uginuo je prvog dana poslije inokulacije jedan, a drugog dana 3 embriona, odnosno 80%. Koncentracija Ag^+ 10^{-4} M inokulirana u amnion uzrokovala je smrt dva (40%), a u razređenju 10^{-5} M jednog embriona (20%) prvog dana po inokulaciji.

Zapaženo je da su pri razređenju 10^{-1} M uginula 2 embriona prvog dana po inokulaciji u žumanjčanu vrećicu i 3 embriona šestog dana nakon inokulacije, odnosno u ovom razređenju (10^{-1} M) uginuli su svi inokulirani embrioni do šestog dana eksperimenta. Finalna koncentracija 10^{-2} Ag^+ izazvala je smrt 4 inokulirana jajeta u žumance šestog dana i jednog embriona osmog dana inkubacije, odnosno do osmog dana eksperimenta uginuli su svi embrioni inokuliranih jaja.

Iz tabele 2 se vide efekti Ag^+ na kulturama ćelija HeLa i GMK tipa (Tabela 2).

Može se uočiti da ubrzo nakon inokulacije Ag^+ , prvog dana eksperimenta, u kulture ćelija u razređenju 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} M dolazi do propadanja svih ćelija u kulturi i HeLa i GMK tipa. Oba tipa kulture ćelija u koja su inokulirana razređenja srebra u koncentraciji 10^{-4} i 10^{-5} M nisu pokazala osjetljivost na aplikaciju srebra i u odnosu na kontrolne kulture nije bilo vidljivih promjena.

Tabela 3 predstavlja rezultate inokulacije Fe^{++} u amnion i žumanjčanu vrećicu (Tabela 3).

Registrovano je da je koncentracija 10^{-1} M već u prvom danu uzrokovala uginuće dva, a u drugom danu inkubacije još dva embriona. U koncentraciji Fe^{++} 10^{-2} M prvog dana uginuo je jedan, drugog dana dva, a četvrtog dana još jedan embrion. U razređenju 10^{-3} M Fe^{++} izazvalo je uginuće 3 embriona, a koncentracija 10^{-5} Fe^{++} jednog embriona prvog dana po inokulaciji u amnion.

Koncentracija 10^{-1} M izazvala je uginuće jednog embriona drugog dana inkubacije u žumanjčanu vrećicu, dok su pri koncentraciji 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} M svi embrioni ostali živi do kraja eksperimenta.

Ioni željeza primijenjeni u koncentraciji 10^{-1} M izazvali su u ćeliji tipa HeLa propadanje kulture prvog dana inokulacije, a GMK tipa drugog dana poslije inokulacije.

U razređenju 10^{-2} M kulture ćelija tipa HeLa ostale su nepromijenjene, a tipa GMK jedna kultura je propala, dok je druga ostala nepromijenjena u odnosu na kontrolu.

Bez znatnih promjena ostale su sve preostale kulture u koje je aplicirano željezo u koncentracijama 10^{-3} , 10^{-4} i 10^{-5} M.

Inokulacija iona kalaja u amnion u koncentraciji od 10^{-1} M izazvala je prvog dana inokulacije uginuće četiri embriona. Drugog dana inokulacije uginuo je jedan embrion, što znači da je ova koncentracija uzrokovala uginuće svih embriona. Koncentracija od 10^{-2} , 10^{-3} i 10^{-4} M

Tabela 2. EFEKTI SREBRA NA KONTINUIRANE KULTURE CELIJA He La i GMK

Koncentracija metala		D a n i										Propale ćelije kulture prom. %	Kulture bez prom.	Propale kulture %
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
10 ⁻¹ M	HeLa	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	100
	GMK	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	100
10 ⁻² M	HeLa	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	100
	GMK	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	100
10 ⁻³ M	HeLa	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	100
	GMK	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	100
10 ⁻⁴ M	HeLa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	GMK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁵ M	HeLa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	GMK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



Tabela 4. EFEKTI ŽELJEZA NA KONTINUIRANE ĆELIJE HeLa i GMK

Koncentracija metala	Tip kulture ćelija	D a n i										Propale ćelije kulture	Kulture bez prom.	Propale kulture %
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
10 ⁻¹ M	HeLa	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	100
	GMK	0	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	100
10 ⁻² M	HeLa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	GMK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻³ M	HeLa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	GMK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁴ M	HeLa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	GMK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁵ M	HeLa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	GMK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



Tabela 5. EFEKTI RAZLIČITIH KONCENTRACIJA IONA KALAJA NA RAZVIJAJUĆA TKIVA KOKOŠIJEG EMBRIONA INOKULACIJA U AMNION

Broj dana nakon inokulacije	KONCENTRACIJA IONA KALAJA OD 10 ⁻¹ — 10 ⁻⁵ M				
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
1	4/5 x	2/5	2/5	2/5	1/5
2	1/1	1/3	1/3	0/3	0/4
3	0	0/2	0/2	0/3	0/4
4	0	0/2	0/2	0/3	0/4
5	0	0/2	0/2	0/3	0/4
6	0	0/2	0/2	0/3	0/4
7	0	0/2	0/2	0/3	0/4
8	0	0/2	1/2	0/3	0/4
Broj uginulih do kraja eksperimenta	5	3	3	2	1
Broj živih do kraja eksperimenta	0	2	2	3	4
Procenat uginulih (%)	100	60	60	40	20

EFEKTI RAZLIČITIH KONCENTRACIJA IONA KALAJA NA RAZVIJAJUĆA TKIVA KOKOŠIJEG EMBRIONA INOKULACIJA U ŽUMANJČANU VREĆICU

Broj dana nakon inokulacije	KONCENTRACIJA IONA KALAJA OD 10 ⁻¹ — 10 ⁻⁵ M				
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
1	1/5 x	0/5	1/5	0/5	0/5
2	0/4	0/5	0/4	0/5	0/5
3	0/4	0/5	0/4	0/5	0/5
4	0/4	0/5	0/4	0/5	0/5
5	0/4	0/5	0/4	0/5	0/5
6	0/4	0/5	0/4	0/5	0/5
7	0/4	0/5	0/4	0/5	0/5
8	0/4	0/5	0/4	0/5	0/5
Broj uginulih do kraja eksperimenta	1	0	1	0	0
Broj živih do kraja eksperimenta	4	5	4	5	5
Procenat uginulih (%)	20	0	20	0	0

Legenda: x — uginulo; 0 — živo

pri inokulaciji prvog dana uslovile su uginuće po dva embriona, dok je drugog dana uginuo po jedan embrion (60%). Koncentracija 10^{-5} M

Kontinuirane ćelije HeLa i GMK uslovile su izrazitu osjetljivost pri koncentracijama 10^{-1} i 10^{-2} M jer je došlo do potpunog propadanja kulture ćelija HeLa i GMK. Ostale koncentracije nisu ispoljile toksični efekat na kontinuirane ćelije.

Inokulacija iona kalaja u žumanjčanu vrećicu uslovila je uginuće po jednog embriona.

Tabela 6. EFEKTI RAZLIČITIH KONCENTRACIJA IONA KALAJA NA KONTINUIRANE CELIJE HeLa i GMK

Koncentracija iona kalaja u M	Tip kulture ćelija	D A N I								Propale ćelije kulture	Ćelije bez promj.	Propale kulture ćelija (%)
10^{-1}	HeLa	+	—	—	—	—	—	—	—	+	—	100
	GMK	+	—	—	—	—	—	—	—	+	—	100
10^{-2}	HeLa	+	—	—	—	—	—	—	—	+	—	100
	GMK	+	—	—	—	—	—	—	—	+	—	100
10^{-3}	HeLa	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0
	GMK	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0
10^{-4}	HeLa	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0
	GMK	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0
10^{-5}	HeLa	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0
	GMK	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0

DISKUSIJA I ZAKLJUČCI

Analiza rezultata ukazuje da su toksični efekti iona srebra, kalaja i željeza na razvijajućim tkivima kokošijeg embriona i u kulturi ćelija in vitro različiti. Zapaženo je da su toksični efekti iona srebra i kalaja na žive ćelije jače ispoljeni u odnosu na efekte iona željeza. Najjači toksični efekat ispoljili su ioni srebra, kako pri inokulaciji u amnion i u žumanjčanu vrećicu kokošijeg embriona tako i na kulture ćelija in vitro. Drastični efekti ovog metala ispoljeni su već prvog dana eksperimenta pri svim koncentracijama koje su primijenjene u ovom eksperimentu. Ioni kalaja ispoljili su izrazitu toksičnost pri inokulaciji u amnion u koncentracijama od 10^{-1} do 10^{-5} M već prvog dana poslije inokulacije. Toksični efekti kalaja ispoljeni su i na kulturama ćelija, pri čemu su koncentracije od 10^{-1} i 10^{-2} M uzrokovale uginuće obje kulture ćelija već prvog dana inokulacije. Analizirajući efekte iona željeza, zapaženo je da su toksični efekti ovog metala sporiji. Oni nisu izraženi na svim ispitivanim strukturama i ne javljaju se prvog dana inokula-

cije, kakav je slučaj kod ostala dva ispitivana metala. Zapažena je izrazita osjetljivost kokošijeg embriona na inokulaciju iona srebra i kalaja u amnion, gdje su koncentracije od 10^{-1} i 10^{-2} M uzrokovala smrtnost 80% embriona. Smrtnost embriona zapažena je pri inokulaciji i ostalih koncentracija. Upoređivanje toksičnih efekata željeza, srebra i kalaja pri inokulaciji u žumanjčanu vrećicu embriona i u kulture ćelija uočavaju se jači toksični efekti iona srebra i kalaja u odnosu na željezo.

U ovom slučaju ioni srebra inokulirani u žumanjčanu vrećicu ispoljili su jači toksični efekat u odnosu na inokulirane ione željeza i kalaja. Analiza efekata iona željeza za kulture ćelija ukazuje na nejednaku osjetljivost HeLa i GMK ćelija na ione ovog metala. Tip HeLa ćelija pokazuje veću osjetljivost, jer su ove linije ćelija uginule već prvog dana eksperimenta pri razređenju 10^{-1} M, dok je tip GMK pri ovom razređenju propao drugog dana nakon inokulacije. Koncentracije od 10^{-2} M uzrokovala su propadanje ćelijskih linija tipa GMK, što nije bio slučaj kod kulture tipa HeLa ćelija.

THE RISK ASSESSMENT OF EXPOSITION TO HEAVY METALS ON CELLS OF CHICKEN EMBRYO AND TISSUE CULTURES IN ECOTOXICOLOGY

Summary

The effects of metal ions — Ag^+ , Fe^{++} , Sb^{++} on the hen embryo and tissue culture in final concentrations of 10^{-1} — 10^{-5} M was studied. Each concentration, soluted in 0,2 ml, was inoculated in the tissue of hen embryo, in amnion and in yolk sac as well as in tissue culture in vitro cells HeLa and GMK lines. Fe^{++} , the essential element in the animal and in the human body and Ag^+ and Sb^{++} , which normally are not present as essential biological elements, manifested considerable differences in their toxical effects on the cell hen embryo as well as on the continual cell lines HeLa and GMK. It was observed stronger and faster toxicological effects of Ag^+ and Sb^{++} than Fe^{++} , which manifested their toxicological effects already first day after application regardless of the method of metal application. The death of embryo was evident very quickly after inoculation of metal ions into amnion and into the yolk sac. The toxical effects of Ag^+ and Sb^{++} were faster manifested in the cell culture, where Ag^+ and Sb^{++} caused the death of cells in the solution of 10^{-1} — 10^{-2} and 10^{-3} M, but Fe^{++} showed the same effects only in concentration of 10^{-1} M. It was observed that inoculation of those metal ions in amnion of the hen embryo caused a faster death of cells than the inoculation of the same metals in yolk sac.

LITERATURA

- Bothwell, T. H., Finch, C. A.: *Iron Metabolism*, Little Brow. et Co Boston, 1962.
- Browning, E.: *Toxicity of Industrial Metals*, Butterworth, London, 1969.
- Conine, D. L., Yum, M. N., Martz, R. C. et al.: *Toxicity of Sodium Pentafluorostannite, a New Anticarcinogenic Agent. I Comparison of the Acute Toxicity of Sodium pentafluorostannite, Sodium fluoride and Stannous Chloride in Mice and or Rats*. Toxicol. app. Pharmacol. 33, 21—26, 1975.
- De Groot, A. P.: *Subacute Toxicity of Inorganic Tin Influenced by Dietary Levels of Iron and Copper*. Food Cosmet. Toxicol. 11, 955—962, 1973.

- De Groot, A. P., Feron, V. J., Til, H. P.: *Short-Term Toxicity Studies on Some Salts and Oxides of Tin Rats*. Food Cosmet. Toxicol. 11, 19—30, 1973.
- Forschale, I. et al.: Brit. J. Surg. 41, 379, 1954.
- Hawkes, R. A.: *General Principles Underlying Lab. Diagn. of Viral inf.*, ed. Lennette, E. H. and Schmidt, N. J. Diagan, Proc. for Viral, Ricketts, and Clamydial Inf., 1979.
- Moeschlin, S. Schnider, U.: Schweiz, med. Wchr., 92, 1295, 1962.
- Palmer, D. F., Dowdle, W. R., Coleman, M. T. et al.: *Advanced Lab. Techn. for Infl. Diagn.*, U. S. Depart. of Health, Education and Welfare Publi. Health Service 1975.

