

DJELOVANJE KRIŠKE NAFTE NA STANICE U KULTURI

MAJA OSMAK, ANA FERLE-VIDOVIĆ I D. PETROVIĆ

Institut »Ruđer Bošković«, Zagreb

(Primljeno 11. VI 1979)

Ispitivanjem raznih svojstava stanica nakon tretmana rafinatom nafte nisu nađene jednoznačne promjene, koje bi upućivale na to da su tretirane stanice poprimile nove elemente malignog ponašanja. Tretirane stanice nisu pokazivale smanjenu kontaktnu inhibiciju, niti im se signifikantno povećala sposobnost stvaranja tumora nakon injiciranja u ozračene miševe. Brzina rasta i trajanje rasta stanica u jednoslojnim kulturama ostali su također nepromijenjeni. Pozitivni nalazi odnosili su se na uočljive morfološke promjene svih tretiranih stanica, te na stečenu sposobnost C₃Hf stanica da nakon tretmana rastu u mekom agaru i stvaraju tumore u miševima.

Budući da je radiosenzitivnost stanica znatnim dijelom određena genetski kontroliranim reparacijskim procesima, to su također tražene i promjene u radiosenzitivnosti onih stanica koje su proistekle iz kultura ranije izlaganih navedenom naftnom derivatu. Uočene su promjene oblika krivulja preživljenja stanica tretiranih kultura, što se pripisuje djelovanju rafinirane nafte na reparacijske procese.

U ovom radu upotrijebljene su stanice u kulturi kao test sistem za ispitivanje biološkog djelovanja vretenskog rafinirane nafte. Navedena nafta koja se crpi u Križu kraj Ivanić-Grada odgovara po sastavu nafti iz Naftalana u Azerbejdžanskoj SSSR.

Djelotvornost naftalanske nafte u liječenju različitih bolesti spominje se već početkom naše ere u Plinijevu djelu »Naturalis historia«. Kasnije je u više navrata zabilježena njezina ljekovitost. Prvi stručan prikaz o tom djelovanju objavili su 1896. *Rosenbaum* i *Mališev*, a intenzivnije naučno proučavanje datira od 1928. godine (vidi u referenci 1).

Prikazani rezultati dio su magistarskog rada Maje Osmak, koji je dobio I nagradu Krke za 1979. godinu.

Kao farmakološko sredstvo naftalanska se nafta pojavila u Evropi krajem prošlog stoljeća u nativnom i prerađenom obliku. Djelovanje joj je antialergijsko, antiinflamatorno i sedativno. Indikacije za njezinu primjenu su bolesti i oštećenja lokomotornog aparata, degenerativne bolesti (spondiloze, artroze), bolesti perifernih živaca, kožne bolesti (psorijaza, ekcem), ginekološke bolesti (kronične upale) i slično (vidi u referenci 1).

Zbog tako raznolike upotrebe u humanoj medicini trebalo je ispitati da li se uz poznato i korisno djelovanje ove tvari javljaju i nepoželjne posljedice. Naime, suvremeni čovjek izložen je sve većem broju raznovrsnih kemikalija među kojima se mogu naći i karcinogene supstancije. Danas se već pouzdano zna ili se opravdano sumnja da se među karcinogene mogu ubrojiti i neki lijekovi, konzervansi u hrani, pesticidi, pa i kozmetički preparati (2-6).

Prema tome, kad se ispituje djelovanje neke nepoznate supstancije na ljudsko zdravlje, treba uzeti u obzir i njezinu eventualnu karcinogenost.

U traganju za eventualnim karcinogenim učinkom kriške nafte upotrijebljene su kao test sistem stanice u kulturi. Traženi su znakovi oštećenja staničnih struktura i funkcija nakon djelovanja rafinata nafte na stanice, koji bi upućivali na malignu transformaciju stanica.

MATERIJALI I METODE

Stanice u kulturi. U toku rada upotrebljavani su mišji fibroblasti i to L_{929} i $C_3H_10T_1/2$ stanice. Te stanice izolirane su primarno iz mišjih embrija C_3H linije, ali su bile različito dugo uzgajane in vitro prije ovih ispitivanja: L_{929} stanice rasle su in vitro više od trideset godina, dok su $C_3H_10T_1/2$ stanice prije pokusa izolirane iz mišjeg embrija. Ispitivanja njihovih karakteristika započeta su na četvrtoj generaciji stanica, a posljednji eksperimenti rađeni su na četrdeset petoj generaciji stanica. Upravo da bi se uočilo jesu li opažene promjene doista posljedica tretmana rafinatom nafte, istovremeno su ispitivane karakteristike netretiranih stanica i stanica koje su bile tretirane rafinatom nafte. Stanice su inkubirane u Eagelovu hranjivom mediju obogaćenom s 10% telećeg seruma (7). Uzgajane su u plastičnim Petrijevim zdjelicama na $37^{\circ}C$ u vlagom zasićenom zraku sa 5% CO_2 .

Rafinat nafte. Prema izvornoj nafti, vretenski rafinat se razlikovao po tome što su iz njega bile uklonjene smole, aromati i lake frakcije nafte, a preostali su policiklički ugljikovodici. Budući da je rafinat bio u obliku viskozne uljate tekućine, a raspoloživa otapala i emulgatori su se pokazali toksičnim za stanice, to ga nije bilo moguće miješati s tekućim medijem za rast stanica. Problem tretmana stanica riješen je tako da se nakon odstranjivanja medija u Petrijevu zdjelicu dodao sterilizirani rafinat, koji je pokrivši dno posude bio u direktnom dodiru s konfluentnim

slojem kulture stanica. Stanice su inkubirane u rafinatu nafte po 1 sat na 37° C, što odgovara uvjetima primjene ove tvari u humanoj terapiji. Pri toj temperaturi viskoznost rafinata nafte je povećana u odnosu prema onoj koju ima kod sobne temperature. Kod svakog tretmana najprije je odsisan rafinat nafte, a zatim je na stanice dodan hranjivi medij. Zbog manje specifične težine rafinat nafte plivao je na mediju. Pažljivim odsisavanjem uklonjen je veći dio rafinata nafte. Ovaj postupak, to jest dodavanje svježeg medija i odsisavanja, ponavljan je pri svakom tretmanu 3—4 puta dok se rafinat nafte nije uklonio sa stanica. Stanice koje su preživjele tretman inkubirane su dalje do uspostavljanja jednoslojnih kultura. Tretman rafinatom nafte ponovljen je tri puta. Takve kulture, dakle stanice-potomci tretiranih kultura, ispitivane su dalje u svrhu utvrđivanja eventualne pojave novih svojstava kojima bi se tretirane stanice razlikovale od netretiranih.

Rast stanica. Svakodnevno je praćen rast populacije stanica: polovici uzoraka nije se mijenjao hranjivi medij do kraja ispitivanja, a preostalim uzorcima, počevši od trećeg dana nasađivanja krivulje rasta, svakodnevno se mijenjao medij. Iz krivulje rasta određeno je vrijeme duplikacije stanica, odnosno vrijeme potrebno da se broj stanica udvostruči. Određena je gustoća zasićenja stanica, izražena kao maksimalno izrasli broj stanica po cm² površine, kada prestaje daljnji rast stanica.

Morfološke promjene u kulturi živih stanica praćene su pod mikroskopom.

Radiosenzitivnost. Osjetljivost stanica na gama zračenje prije i nakon tretmana rafinatom nafte određena je pomoću metode klonalnog rasta (8). Budući da svaka stanica u toku inkubacije stvara koloniju svojih potomaka, moguće je kvantitativno odrediti efekt ionizirajućeg zračenja na stanice u kulturi. Nakon perioda inkubacije utvrdi se broj izraslih kolonija. Ako je primljena doza zračenja veća, broj preživjelih stanica je manji, pa je prema tome i broj izraslih kolonija smanjen. Preživjelom stanicom smatra se ona koja je zadržala svojstvo neograničene diobe, odnosno, koja se podijelila u toku inkubacije barem 6 puta (9). Broj preživjelih stanica izražen kao postotak broja nasađenih stanica naziva se preživljenjem, a određuje se za pojedine doze zračenja. U ovom radu stanice su zraćene gama-zrakama u rasponu doza od 200 do 1 000 rada.

Rast tumora in vivo (TD₅₀). Za svaku vrstu stanica upotrijebljeno je 30—60 miševa C₃Hf linije. Dan prije pokusa miševi su bili ozraćeni dozom od 500 rada, da bi se suprimirao imunološki aparat domaćina. Svakoj skupini miševa injicirane su stanice u rasponu koncentracija 10³—10⁵ stanica po mišu. Nakon 3 tjedna, to jest 21. dan utvrdio se broj miševa kod kojih su se pojavili tumori na mjestu injiciranja stanica. Ona koncentracija stanica koja kod 50% životinja uzrokuje nastanak tumora, naziva se TD₅₀, a određena je za L₉₂₉ i C₃Hf stanice prije i nakon tretmana stanica rafinatom nafte.

Rast stanica u mekom agaru. Za ispitivanje rasta stanica u mekom agaru upotrijebljena je metoda po *Macpherson-Montagnieru* (10). Na čvršću agarsku podlogu nasaduju se stanice prethodno tretirane rafinatom nafte u 0,3%-tnoj otopini agara u hranjivom mediju. Po Petrijevoj zdjelici nasaduje se između 10^3 i 10^5 stanica. Nakon 12 dana inkubacije stanica broje se izrasle kolonije u mekom agaru. Ako takvih kolonija ima više od 10 po Petrijevoj zdjelici, a u koloniji više od 4 stanice, test je pozitivan (11).

Obrada podataka. Svaki pokus ponovljen je barem 3 puta. Svi podaci obrađeni su statistički primjenom t-testa, te izračunane p-vrijednosti. Podaci za preživljenje stanica prije i nakon tretmana rafinatom nafte, nakon djelovanja gama zraka obrađeni su na elektronskom računaru Sveučilišnog računskog centra (Terminal UNIVAC DCT 2000) u Institutu »Ruđer Bošković«.

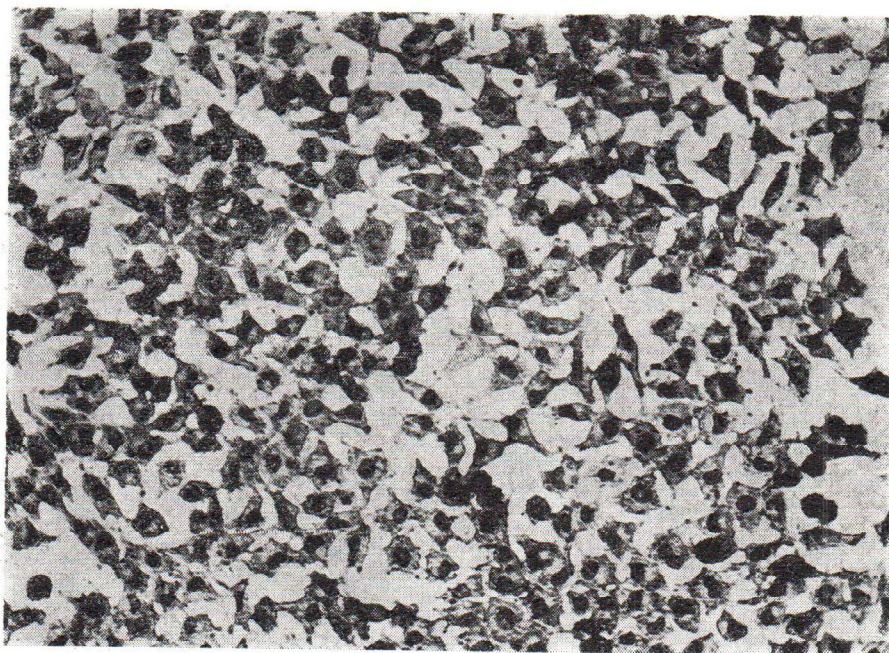
REZULTATI

Rast stanica. Nakon djelovanja rafinata nafte na stanice zapažene su kod L_{929} i C_3Hf stanica ove morfološke promjene: uniformnost u izgledu stanica se gubila, povećao se broj velikih stanica različitih oblika, često čak s više jezgara. Uz ovakve povećane stanice s velikim jezgrama u kojima su se mogle opaziti i vakuole, s dobro raširenom citoplazmom po čvrstoj podlozi, opažene su i manje ali znatno izduženije stanice sa povećanim omjerom jezgre u odnosu na citoplazmu. Ove promjene bile su brojnije kod C_3Hf stanica nakon tretmana rafinatom nafte nego kod L_{929} stanica. Na slikama 1. i 2. prikazane su C_3Hf stanice prije i nakon tretmana rafinatom nafte.

Brzina rasta L_{929} , C_3Hf i stanica dobivenih njihovim tretiranjem rafinatom nafte prikazana je na tablici 1. Iz tablice se vidi da se vrijeme udvostručenja ovih stanica nakon djelovanja rafinata nafte nije promijenilo.

Gustoća zasićenja stanica prije i nakon tretmana rafinatom nafte prikazana je također na tablici 1. Usporede li se tretirane i netretirane stanice, vidi se da nema značajnih promjena u gustoći zasićenja stanica.

Radiosenzitivnost. Preživljenje tretiranih i netretiranih stanica nakon djelovanja gama-zraka prikazano je na slikama 3. i 4. Nakon tretmana rafinatom nafte L_{929} stanice pokazuju promijenjenu radiosenzitivnost; u odnosu prema netretiranim stanicama one imaju znatno snižen ekstrapolacijski broj uz smanjenu širinu »koljena«. Određujući osnovne parametre krivulje preživljenja, vidi se da se srednja letalna doza (D_0) L_{929} stanica, to jest doza potrebna da se broj preživjelih stanica svede na 37%, poveća sa 155 na 172 rada, a ekstrapolacijski broj pao je sa 10,2 na 4,5. C_3Hf stanice nakon tretmana rafinatom nafte postaju radiosenzitivnije u području viših doza. Srednja letalna doza smanjuje se nakon tretmana sa 181 na 140 rada. Ekstrapolacijski broj porastao je sa 5,5 na 12,8. Za obje vrste stanica ove promjene bile su statistički značajne.



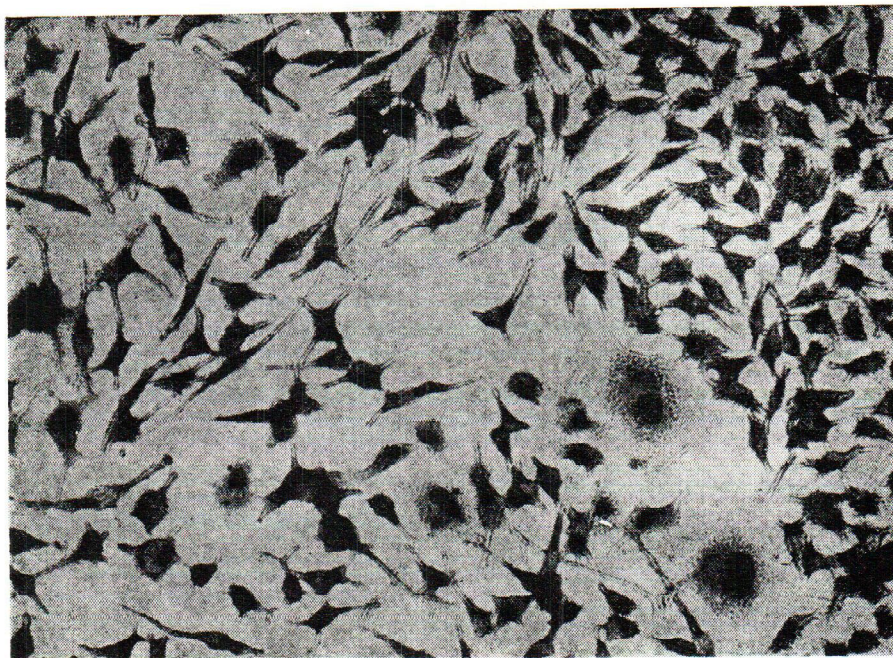
Sl. 1. Ishodišne C_3H_f stanice: stanice su vretenaste, uniformnog oblika (po-
 većanje 100 x)

Tablica 1

Vrijeme udvostručenja broja stanica i gustoća zasićenja stanica

Vrsta stanica	Vrijeme udvostručenja stanica (sati)	Gustoća zasićenja stanica (broj stanica/cm ²)	
		medij nije mijenjan	medij mijenjan
L_{929}	16	2.51×10^5	3.88×10^5
L_{929} tretirane	16	2.45×10^5	4.18×10^5
C_3H_f	16	2.39×10^5	3.99×10^5
C_3H_f tretirane	16	2.67×10^5	3.40×10^5

Rast tumora *in vivo* (TD_{50}). Na tablici 2. prikazani su rezultati određivanja rasta tumora u životinji u ovisnosti o broju injiciranih stanica. Vidi se da rafinat nafte ne mijenja TD_{50} . Bez obzira na tretman potreban je isti broj stanica da u 50% injiciranih miševa izazovu tumore. C_3H_f



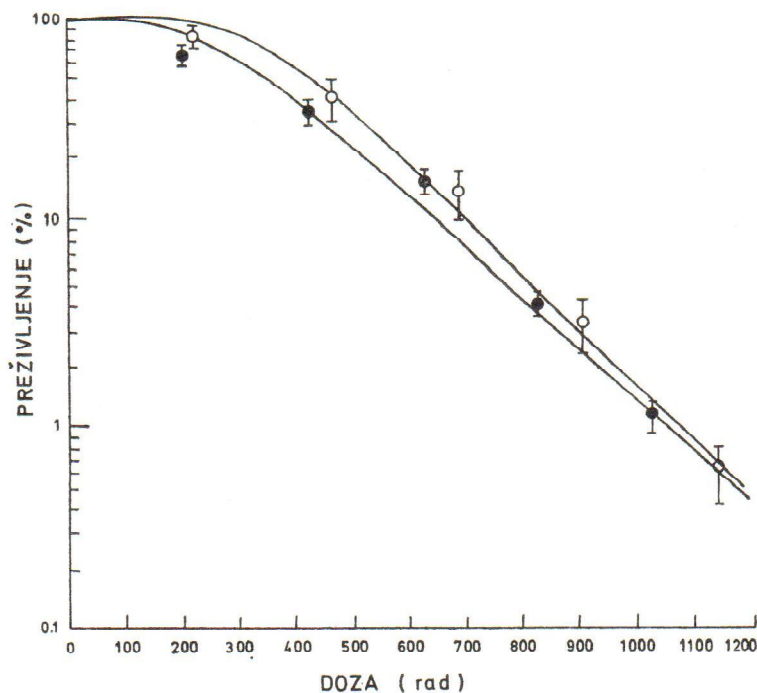
Sl. 2. C_3Hf stanica nakon tretmana rafinatom nafte. Uniformnost izgleda se gubi. Uz izvorne vretenaste stanice vide se orijaške te izdužene bipolarne stanice (povećanje 100 x)

stanice injicirane u životinja nisu davale tumore. Ove stanice nakon tretmana rafinatom nafte uzrokovale su nastanak tumora u životinji, i to s istim brojem injiciranih stanica kao i L_{929} stanice.

Rast stanica u mekom agaru. Rast stanica u mekom agaru ispitivan je za tretirane i netretirane L_{929} i C_3Hf stanice. Navedene stanice, osim ishodišnih C_3Hf stanica, dale su nakon 12 dana inkubacije kolonije u

Tablica 2
Rast tumora in vivo (TD_{50})

Vrsta stanica	TD_{50}
L_{929}	1.9×10^4
L_{929} tretirane	1.9×10^4
C_3Hf	nema tumora
C_3Hf tretirane	1.9×10^4



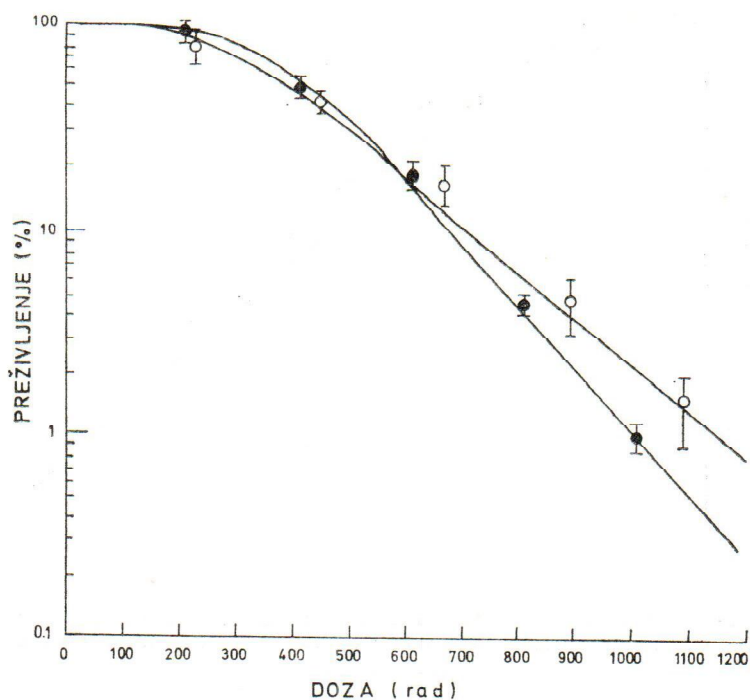
Sl. 3. Krivulja preživljenja L_{929} stanica zračenih gama (^{60}Co) zrakama u rasponu doza od 200 do 1000 rada.

Legenda: ○ = L_{929} stanice; $D_0 = 155$ rada, $n = 10,2$. ● = L_{929} stanice nakon tretmana rafinatom nafte; $D_0 = 172$ rada, $n = 4,5$.
Vertikalnim linijama označene su standardne devijacije preživljenja stanica

mekom agaru. Broj stanica u takvim kolonijama bio je velik (znatno iznad 4), a po Petrijevoj zdjelici takvih kolonija bilo je mnogo (znatno više od 10). Prema tome, rezultati ovog testa su, prema kriterijima navedenim u literaturi (11), bili pozitivni za netretirane L_{929} , tretirane L_{929} i tretirane $C_3\text{Hf}$ stanice, a negativni za ishodišne $C_3\text{Hf}$ stanice.

RASPRAVA

Iz navedenih rezultata se vidi da rafinat nafte djeluje na različite karakteristike stanica. Zapravo je zanimljiva već sama činjenica da stanice prežive tretman rafinatom nafte. Budući da je rafinat nafte dodan direktno na stanice, one su, s jedne strane, bile izložene samom rafinatu,



Sl. 4. Krivulja preživljenja C_3Hf stanica zračenih gama (^{60}Co) zrakama u rasponu doza od 200 do 1000 rada.

Legenda: ○ = C_3Hf stanice; $D_0 = 181$ rada; $n = 5,5$; ● = C_3Hf stanice nakon tretmana rafinatom nafte; $D_0 = 140$ rada, $n = 12,8$. Vertikalnim linijama označene su standardne devijacije preživljenja stanica

a, s druge strane, nisu im bile dostupne hranjive tvari i kisik. Ovakvi nepovoljni uvjeti mogli su sami po sebi dovesti do ireverzibilnog oštećenja nekih stanica. To je najvjerojatnije bio uzrok znatnog gubitka stanica pri svakom tretmanu rafinatom nafte. Osim mogućih utjecaja spomenutih nespecifičnih elemenata tretmana i rafinat nafte sam po sebi doveo je do trajnih promjena nekih svojstava stanica koje su preživjele tretman. Ove promjene bile su jače izražene kod C_3Hf negoli kod L_{929} stanica.

Promatraju li se svojstva L_{929} stanica, vidi se da su one u toku višegodišnjeg rasta in vitro pretrpjele značajne promjene. Mada rastu u jednom sloju i uniformnog su oblika poput normalnih stanica, pozitivni testovi rasta stanica u mekom agaru te rasta tumora u singennoj životi-

nji upućuju na to da su se ove stanice tokom dugotrajnog rasta u laboratorijskim uvjetima izmijenile, te pokazuju neke karakteristike malignog rasta. Ovi su podaci u skladu s podacima iz literature. Naime, stanice u kulturi trajnih linija razlikuju se od primarno izoliranih stanica (12—14). Produženi rast *in vitro* dovodi do akumuliranja promjena koje rezultiraju izmijenjenim morfološkim i fiziološkim svojstvima stanica.

S druge strane ispitivanja su provedena na novoizoliranim normalnim C₃Hf stanicama. Prije početka pokusa je ispitano da li injiciranje ovih stanica može uzrokovati rast tumora u singenom domaćinu. Rezultat je bio negativan, kao i test rasta u mekom agaru, što je značilo, da stanice još nisu pretrpjele malignu transformaciju. Tome u prilog govorio je i njihov morfološki izgled, te jednoslojni rast stanica.

Rezultati prikazanih pokusa pokazuju, da su se promjene pretežno zbivale na C₃Hf stanicama, dakle na onima koje se referiraju kao normalni soj stanica, bez vidljivih malignih karakteristika. Nakon tretmana rafinatom nafte one su poprimitle neka nova svojstva, koja inače nalazimo kod stanica malignog porijekla, a to su rast u mekom agaru, te stvaranje tumora u singenom domaćinu (15). S druge strane, mada su se tretirane stanice morfološki izmijenile, nakupine stanica mogle su se opaziti vrlo rijetko, a gustoća zasićenja nije se izmijenila, iako su ta svojstva također karakteristična za maligne stanice (16—18).

Promjena radiosenzitivnosti nakon tretmana rafinatom nafte također je jače izražena kod C₃Hf negoli kod L₉₂₉ stanica. Premda se radiosenzitivnost ne primjenjuje kao pokazatelj maligne transformacije, valja ipak naglasiti da su letalitet, odnosno preživljavanje stanica nakon zračenja uvelike ovisni o reparacijskim procesima. Sposobnost stanica da popravljaju lezije na svojem genetskom materijalu također se često može dovesti u vezu sa njihovom osjetljivošću na karcinogene. Stoga smatramo da naš nalaz, koji pokazuje veći porast radiosenzitivnosti kod C₃Hf negoli kod L₉₂₉ stanica (koje, kao što je spomenuto, pokazuju neke oblike malignog ponašanja), također može poslužiti kao dodatni pokazatelj biološkog djelovanja rafinata nafte.

Opisani rezultati nesumnjivo pokazuju da je navedeni rafinat nafte biološki aktivan i da izaziva određene promjene na stanicama, kada je s njima u neposrednom kontaktu, i bez obzira na njihove moguće mehanizme, dovodi do pojave nekih novih svojstava, koja inače nalazimo kod malignih stanica. No treba imati na umu da se takva tvrdnja odnosi samo na sistem stanica u kulturi, koje su, kao što je opisano, bile u direktnom kontaktu s rafinatom nafte. U medicinskoj praksi taj direktni kontakt ne postoji, jer se naftalan nanosi na kožu.

Ipak smo smatrali da ova naša opažanja treba objaviti ne samo zato što su zanimljiva sama po sebi nego i zato što se kriška nafte upotrebljava u humanoj medicini, pa ujedno upozoravaju da se s većom pažnjom razmatraju kriteriji malignosti pri radu s kulturama stanica.

ZAHVALA

Zahvaljujemo M. Fiolić i Lj. Krajcar za odličnu tehničku suradnju.

Literatura

1. Kliničko ispitivanje terapijske vrijednosti kriške nafte — Zavod za fizi-
kalnu medicinu i rehabilitaciju Medicinskog fakulteta u Zagrebu i Institut
»Ruđer Bošković«: Projekt naftalan (1975—1976).
2. Takizawa, H., Hozumi, M., Sugimura, T., Bryan, G. T.: J. Nat. Cancer Inst.,
54 (1975) 487.
3. Doll, R.: Nature, 265 (1977) 589.
4. Bridges, B. A.: Nature, 261 (1976) 195.
5. Ames, B. N.: Science, 191 (1976) 241.
6. Epstein, S. S.: Nature, 228 (1970) 816.
7. Eagle, H.: Science, 130 (1959) 432.
8. Puck, T. T., Marcus, P. J., Cieciora, S. J.: J. Exptl. Med., 103 (1956) 273.
9. Fabrikant, J. I.: Radiobiology, Medical Publishers, Inc. Chicago (1972),
str. 71.
10. Macpherson, I., Montagnier, L.: Virology, 23 (1964) 291.
11. Montesano, R., Drevon, C., Kuroki, T., Saint Vincent, L., Handleman, S.,
Sanford, K. K., De Feo, D., Weinstein, B.: J. Nat. Cancer Inst., 59 (1977)
1651.
12. Todaro, G. J., Green, H.: J. Cell Biol., 17 (1963) 299.
13. Dendy, P. P.: Human Tumors in Short Term Culture, Academic Press,
London—New York—San Francisco, (1976) str. 1.
14. Ferle-Vidović, A., Petrović, D., Petranović, D.: Libri oncol., 4 (1975) 177.
15. Cohen, L. A., Tsuang, J., Chan, P. C.: In vitro, 10 (1974) 51.
16. Barker, B. E., Sanford, K. K.: J. Nat. Cancer Inst., 44 (1970) 39.
17. Sanford, K. K., Barker, B. E., Parshad, R., Westfall, B. B., Woods, M. W.,
Jackson, Y. L., King, D. R., Peppers, E. V.: J. Nat. Cancer Inst., 45 (1970)
1071.
18. Klein, J. C., Harten, E.: Radiobiological Institute, Institute for Experiment-
al Gerontology and Primate Center, Annual Report (1976) 105.

Summary

THE EFFECT OF CRUDE OIL ON CELLS IN CULTURE

In the examination of various cellular properties after the treatment of cells with a crude oil distillate unambiguous changes which would indicate that the treated cells adopted new elements of malignant behaviour were not found. The treated cells demonstrated neither a decreased contact inhibition nor an increased ability to develop tumours after they had been injected to irradiated mice. The rate and duration of cell growth in mono-layer cultures remained unchanged too. Positive findings related to the morphological changes observed in all treated cells, and to the acquired ability of C₃Hf cells after the treatment to grow in soft agar and to develop tumours in mice.

Since cellular radiosensitivity is largely determined by genetically reparative processes we also looked for changes in radiosensitivity of the cells which had been earlier exposed to the crude oil distillate. In the treated cultures changes in the shape of the survival curves were observed, what is attributed to the effect of the crude oil distillate on reparative processes.

»Ruđer Bošković« Institute,
Zagreb

Received for publication
June 11, 1979.