

PRIMJENA HISTOKEMIJSKE METODE
ZA PRIKAZIVANJE OLOVA POMOCU
SREBRNOG SULFIDA U HELA
STANICAMA U KULTURI

YVETTE SKREB

*Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada
Zagreb, Jugoslavija*

(Primljeno 10. VII 1975)

Ako se u hranjivu podlogu gdje rastu HeLa stanice u asinkronoj kulturi doda olovni klorid u koncentraciji $2,5 \times 10^{-4}M$, te pošto se primijeni histokemijska metoda po Brunku i Brunu, može se pratiti nakupljanje olova u stanicama u funkciji vremena. Nakon određenog postupka, olovo se u pojedinim stanicama može vidjeti u obliku zrnaca pod mikroskopom. U ovom se radu iznosi detaljan postupak same metode kao i primjena na HeLa stanice u kulturi. Mogli smo dokazati da olovo vrlo brzo prodire u citoplazmu i do jezgre, ali ne jednolično i da je akumulacija unutar stanica ograničena. Nadalje smo pokazali da zrnca olova nestaju kada se HeLa stanice ponovo stave u normalnu hranjivu podlogu.

Činjenica da olovo zauzima sve važnije mjesto među štetnim faktorima okoline uzrokovala je pojavu mnogih radova o patološkim utjecajima olova na ljude i potakla mnogobrojne pokuse na životinjama kao i biološka i biokemijska istraživanja (1, 2). Vrlo je malo istraživača posvetilo pažnju djelovanju teških metala na animalne stanice u kulturi. Među nekoliko radova u kojima su se kao eksperimentalni materijal upotrijebile animalne stanice u kulturi treba svakako citirati *Fischerovu* (3) koja je radila s L-stanicama, tj. fibroblastima u kulturi.

U ovom smo laboratoriju uspjeti pokazati da olovni klorid u koncentraciji $2,5 \times 10^{-4}M$, dodan hranjivoj podlozi sa HeLa stanicama inhibira sintezu osnovnih staničnih makromolekula već nakon 6 sati. Kad su se te stanice ponovo stavile u normalnu hranjivu podlogu bez olova, sve su se sinteze vrlo brzo uspostavile (4).

Ako se sada hoće pokazati da ta inhibicija nije uzrokovana samo prisutnošću olova u podlozi, već u samim stanicama, potrebno je primijeniti histokemijsku tehniku lokalizacije olova kako bi se spomenuti rezultati mogli bolje rastumačiti.

Od svih poznatih histokemijskih metoda za lokalizaciju teških metala u stanicama, metoda po *Timmu* (5) pokazala se najjednostavnijom i najosjetljivijom. Stanice odnosno histološki preparati za koje se pretpostavlja da sadržavaju teške metale tretiraju se amonijevim sulfidom, koji pretvara teške metale u metalni sulfid. U prisutnosti srebrne soli kao što je njegov nitrat, svi metalni sulfidi pretvaraju se u srebrni sulfid.

Preparat se razvija na taj način da se iskoristi katalitičko svojstvo srebrnoga sulfida koji svojom prisutnošću ubrzava redukciju srebrnog nitrata u metalno srebro uz reduktor kao što je hidrokinon. Na mjestima gdje se nalazi srebrni sulfid zacrnjenje je zbog metalnoga srebra znatno brže negoli u ostatku stanice. Prisutnost gume arabike i limunske kiseline omogućuje maksimalno katalitičko djelovanje sulfida i usporava zacrnjenje ostatka preparata. Proces je sličan razvijanju eksponiranih fotografskih filmova. Tok se reakcije može sažeti u dvije faze:

1. vezanje teških metala sa sulfidom
2. povećanje čestica sa srebrom i dokaz prisutnosti metala razvijanjem.

Budući da se ovom tehnikom dobiva slika raspodjele metala u stanici bez obzira na to da li je metal normalan sadržaj stanice ili patološki, uključujući ovamo i razne intoksikacije, *Brunk* i *Brun* (6) su metodu posebno prilagodili za identifikaciju olova u stanici.

Svrha je ovoga rada da istakne promjene u *Brunkovoj* i *Brunovoj* metodi i opiše postupak što smo ga primijenili na HeLa stanice u kulturi. Ujedno smo željeli istaknuti kako je ova metoda pomogla u interpretaciji rezultata kojima smo pokazali da olovni klorid može inhibirati makromolekularne sinteze u animalnim stanicama u kulturi.

MATERIJAL I METODA

Kulture HeLa stanica: HeLa stanice su supkultivirane u »Leighton« bočicama u kojima se na dnu nalazilo pokrovno staklo. One rastu u standardnoj podlozi po *Eaglu* (MEM) obogaćenoj s 10% telećeg seruma i antibioticima. Sadilo se po prilici 10^5 stanica po bočici tako da je već nakon 24 sata na staklu nastao jednoličan bogat sloj stanica u logaritamskoj fazi rasta.

Tretiranje stanica s olovnim kloridom: Količinu od 139 mg $PbCl_2$ (p. a. Kemika, Zagreb) rastopili smo u 50 ml sterilne redestilirane vode i tu smo otopinu čuvali u plastičnoj bočici u hladnjaku na 4°C. Kada je bilo potrebno, otopinu smo razrijedili tako da smo 1 ml $PbCl_2$ dodali na 39 ml podloge. Konačna koncentracija olova bila je $2,5 \times 10^{-4}M$ ($\sim 70 \mu g/ml$). To je najveća koncentracija koja ne izaziva nikakvih promjena u podlozi i naknadno nema taloženja niti promjene pH.

Normalnu smo podlogu MEM odlili i zamijenili podlogom koja je sadržavala olovo. Nakon različite vremenske inkubacije stanice pričvršćene na pokrovnim staklima pažljivo su isprane i podvrgnute svim etapama srebrnosulfidne metode.

Vežanje teških metala sa sulfidom: Svaki uzorak je fiksiran u 96% -tnom etanolu na 4°C, 2 min. Zatim je svako pokrovno staklo inkubirano u otopini amonijeva sulfida u 70% -tnom etanolu s pH 9,5, jedan sat na sobnoj temperaturi. Stakla su dva puta isprana 96% -tnim etanolom i nakon nekoliko ispiranja destiliranom vodom, preparati su bili spremni za razvijanje.

Razvijanje: Usporedo sa spremljenim preparatima imali smo jednak broj preparata koji nisu bili inkubirani u olovnoj otopini i koji su služili kao kontrola. Za razvijач smo upotrijebili ovu mješavinu:

- 20% -tnu gumu arabiku (100 ml)
- 10% -tni srebrni nitrat (1 ml)
- 2 g hidrokinaona i 5 g limunske kiseline u 100 ml (10 ml); pH otopine kreće se između 3,8 i 4.

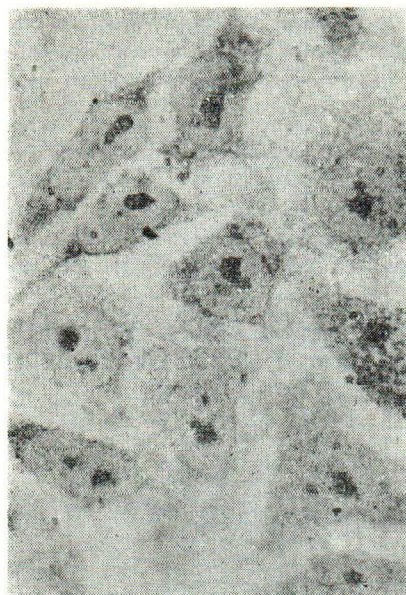
Sve kemikalije su p. a. Kemika, Zagreb. Otopina gume arabike mora biti stara najmanje 15 dana, ali ne više od dva mjeseca. Kristali timola dodaju se za sprečavanje bakterijske kontaminacije. Sve ostale otopine moraju biti svježije, iako smo primijetili da srebrni nitrat bolje djeluje ako je stajao nekoliko dana.

Razvija se u mraku dva i pol sata pri sobnoj temperaturi. Poslije razvijanja prema Brunkovoj adaptaciji, preparati su isprani destiliranom vodom i izloženi 10 minuta 0,2 N trikloroctene kiseline. Svrha je ovoga postupka da se otope svi ostali metali u stanici osim olova. Poslije trikloroctene kiseline opet se pažljivo isperu preparati destiliranom vodom i oboje se 0,5% -tnim toluidinskim plavilom, 5 min. Nakon dehidratacije alkoholom (70%, 96%, 100%) i toluolom preparati se pokriju kanadskim balzomom i okrenu se na predmetnom staklu. U ovom obliku se izvrsno čuvaju za mikroskopsku analizu.

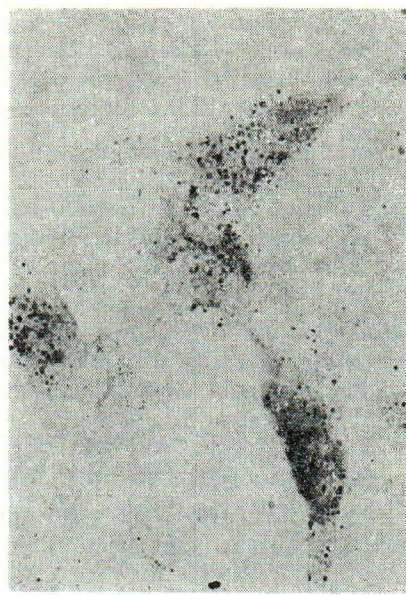
REZULTATI

Izabrali smo seriju od 4 mikrofotografije koje prikazuju tipične rezultate. Na slici 1. prikazane su netretirane stanice koje služe kao kontrola. U citoplazmi se može vidjeti samo nekoliko crnih zrnaca na uobičajenoj pozadini.

Na drugoj slici može se uočiti da se nakon dvosatne inkubacije može sa sigurnošću identificirati olovo u stanici. Već nakon 15 minuta mogli smo vidjeti po nekoliko zrnaca olova u citoplazmi mnogih stanica.



Sl. 1. Normalne stanice koje služe kao kontrolna skupina



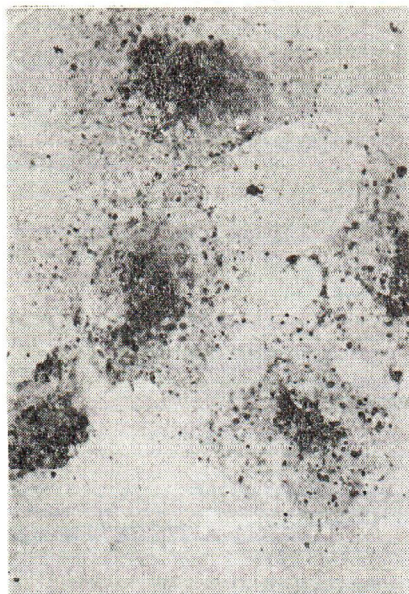
S. 2. Stanice tretirane srebrnosulfidnom metodom nakon dvosatne inkubacije u hranjivoj podlozi s Pb^{++} . U citoplazmi mnogih stanica može se identificirati zrnca olova

Nakon 4 sata (slika 3) inkubacije olovnim kloridom, u citoplazmi se nalazi mnogo zrnaca, ali su ova uglavnom koncentrirana na jednom mjestu.

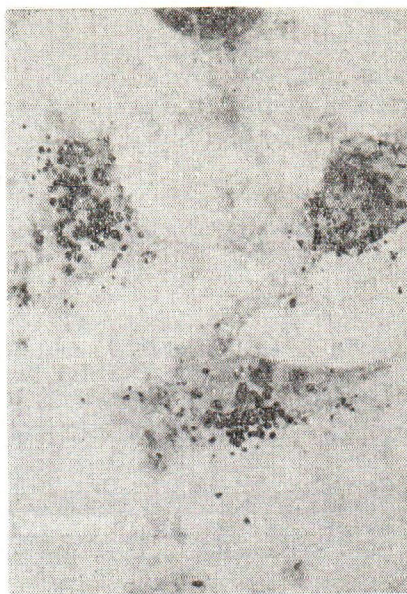
Nakon 6 sati (slika 4) najviše zrnaca ima oko staničnih jezgara a često su po jedno ili dva u jezgri.

Ako su stanice duže vrijeme inkubirane s olovom, broj se zrnaca ne povećava mnogo, već su samo nešto veća. Ako se stanice nakon 24 sata rasta na podlozi s olovom stave u normalnu hranjivu podlogu pa se u pravilnim razmacima stanice uzimaju da bi se na njima izvršila histokemijska detekcija, može se konstatirati da su zrnca već mnogo rjeđa, kao što pokazuje slika 2. Dan kasnije ima ih već vrlo malo.

Ova metoda može pokazati prisutnost olova u HeLa stanicama i kod manje koncentracije od $10^{-5}M$. Zrnaca ima isto toliko kao na slici 2, samo su nešto manja. Ako se stanice drže nekoliko mjeseci na hranjivoj podlozi koja sadržava spomenutu koncentraciju olova, ni onda se ne opaža veća količina zrnaca u stanicama. Nadalje, ako se nakon dužeg vremena u podlozi s olovom stanice vrate u normalnu hranjivu podlogu bez olova, treba računati na oko 8 do 10 dana da se i zadnji trag olova iz stanica odstrani.



Sl. 3. Stanice tretirane srebrnosulfidnom metodom nakon 4 sata inkubacije u podlozi s Pb^{++} . Zrnca olova su veća i locirana pokraj jezgre



Sl. 4. Stanice tretirane istom metodom nakon 6 sati inkubacije s Pb^{++} . Zrnca su veća i čak unutar jezgre

DISKUSIJA I ZAKLJUČCI

Naši se rezultati uglavnom slažu s rezultatima *Brunka* i *Bruna* (6) koji su istraživali prisutnost olova u embrionalnim fibroblastima štakora. Što se tiče brzine penetracije, rezultati se u potpunosti podudaraju, ali je lokalizacija ponešto različita. Citirani autori su našli zrnca olova samo oko jezgre, dok smo ih mi uočili i u jezgri. Taj je podatak potvrdio rezultate *Castellina* (7) koji je radio s radioaktivnim olovom na drugačijem materijalu i koji je upotrijebio biokemijske tehnike odjeljivanja. Brzina akumulacije se slaže s podacima koje je dao *Pasow* (8).

Ako bismo sada htjeli rastumačiti svoje prijašnje rezultate o inhibiciji sinteza makromolekula u stanicama HeLa poslije primjene olova, onda bismo polaganu reakciju na trovanje olovom mogli tumačiti činjenicom da dolazi do polagane akumulacije zrnaca u stanici (to smo opazili histokemijskom analizom) što ometa razvijanje metaboličke reakcije. Vjerojatno koncentracija olova u stanici mora doseći određenu razinu da bi djelovala inhibitorno.

Prema navedenom može se zaključiti da se radi o brzoj i osjetljivoj metodi koja omogućuje praćenje prisutnosti olova u animalnim stanicama u kulturi. Ovo bi praćenje moglo pripomoći proučavanju citoloških i biokemijskih efekata ovog toksičnog metala.

ZAHVALE

Autor zahvaljuje Nadi Horš i Jadranki Račić na korisnoj tehničkoj suradnji.

Literatura

1. Valle, B. L., Ulmer, D. D.: *Ann. Rev. Biochem.*, 41 (1972) 92.
2. Goyer, R. A., Rhyne, B. C.: *Int. Rev. Exptl. Pathol.*, 12 (1973) 1.
3. Fischer, A. B.: *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig., B.*, 161 (1975) 26.
4. Škreb, Y., Habazin-Novak, V.: *Toxicology*, 5 (1975) 167.
5. Timm, F.: *Histochemie*, 2 (1960) 150.
6. Brunk, U., Brun, A.: *Histochemie*, 29 (1972) 140.
7. Castellino, N., Aloj, S.: *Brit. J. Industr. Med.*, 26 (1969) 139.
8. Passow, H.: *Effects of Metals on Cells, Subcellular Elements and Macromolecules* (ed. J. Maniloff, J. R. Coleman & J. W. Miller) p. 291 Ch. Thomas publ. Springfield, Ill. U. S. A. (1970).

Résumé

APPLICATION D'UNE METHODE AU SULFURE D'ARGENT POUR DÉMONTRER LA PRESENCE DU PLOMB DANS LES CELLULES HeLa EN CULTURE

Des cultures asynchrones de cellules HeLa sont entretenues en couche monocellulaire en présence du milieu essentiel minimal de Eagle (MEAM) additionné de 10% de serum de veau et d'antibiotiques. Si à ce milieu nutritif on ajoute du chlorure de plomb à une concentration de $2.5 \times 10^{-4}M$ qui ne modifie pas le pH du milieu et ne produit pas de précipité, on peut déceler au microscope la présence du plomb dans les cellules grâce à une adaptation de la méthode histochimique de Brunk et Brun. Cette méthode est basée sur le principe que les métaux lourds convertis en sulfures catalysent la réduction des ions Ag^{++} en argent moléculaire. Ce dernier forme une enveloppe autour des particules de sulfure métallique, qui par un processus analogue au développement photographique, peuvent être visualisées sous forme de grains noirs.

On a pu ainsi vérifier que le plomb pénètre rapidement dans les cellules à travers le cytoplasme jusqu'au noyau et même à l'intérieur de ce dernier. Mais la répartition du métal n'est pas homogène et la quantité incorporée limitée. Si les cellules sont alors remises dans le milieu normal sans chlorure de plomb, au bout de peu de temps le métal n'est plus décelable dans les cellules.

La simplicité de cette méthode permet de contrôler rapidement la présence du plomb dans les cellules lorsque des modifications du métabolisme peuvent être imputées à ce métal.

*Institut de Recherches Médicales
et de Médecine du Travail,
Zagreb*

Reçu le 10 juillet 1975.