

ACȚIUNEA ACIDULUI DEZOXIRIBONUCLEIC (ADN) ASUPRA CULTURILOR CELULARE UMANE CANCEROASE ȘI ASUPRA CELULELOR NORMALE (CORION UMAN)*

O. Udriște, I. Pop D. Popa, E. Truța, A. Abrahám

Potrivit datelor actuale, adaptarea stabilă a celulelor explantate se face prin trecerea de la linia celulară la tulpina celulară.

Față de cultura celulară primară normală, celulele tulpinii se caracterizează atât prin pierderea funcției specifice și creșterea glicolizei aerobe și anaerobe, cât și prin creșterea vitalității, a intensității multiplicării și prin fenomenul de poliploidie (1, 2). Heteroploidia a fost constatată și la tulpinile celulare umane (3), precum și fenomenul de „dediferențiere” și simplificarea celulară (27).

Această restructurare esențială, legată de adaptarea celulelor la condiții de existență în afara organismului, se traduce printr-o flagrantă asemănare între tulpinile celulare provenite din țesuturi normale (adulte și embrionare) și cele provenite din țesuturi canceroase, culminând cu constatarea că și celulele tulpinii morfologic normale și neinfectate produc la animale cancer la locul de inoculare (4, 5).

Izolarea celulară provocată prin tripsinizare (cea ce suprimă și legăturile reziduale interorganice și intertisulare) și condițiile de cultivare a celulelor în afara orga-

* Lucrare prezentată la ședința extraordinară a Bazei de cercetări a Academiei R.P.R., a I.M.F. și a U.S.S.M., Filiala Tg.-Mureș, la 6. II. 1965.

nismului, duc treptat la scăderea gradului de ordonare a celulelor și la pierderea funcționalității specifice.

De altfel, numeroși autori au constatat cancerizarea celulelor normale in vitro, prin cultivări îndelungate (6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13), ca și prin provocarea hipoxiei intermitente în culturile de țesături (14, 15).

Studii recente asupra celulelor embrionare umane normale (fibroblaste și celule renale) cultivate îndelung în vitro, au permis obținerea acelorași rezultate. Inocularea la șobolanj provoacă formațiuni nodulare cu anumite reacții histochemice similare tumorilor maligne umane (fibrosarcom, osteocondrosarcom, carcinom) (16).

Cancerizarea celulelor în culturile îndelungate este favorizată de izolarea celulelor de legăturile cu sistemele de control, datorită prelucrării prealabile a țesuturilor cu tripsină (17).

Date experimentale demonstrează că malignizarea celulelor (fibroblaști normali) în culturile monostratificate este precedată de modificări ale cariotipului (18, 19, 20).

Numărul de cromozomi aneuploizi ar avea rolul primar în cancerogeneză (Le-tan și Hsu, 1961, citați de 21).

Se consideră că indicii malignizării celulelor din culturi constă în defecte cromozomice, similare celor observate în mieloleucoza cronică la om.

S-a constatat experimental pe o cultură celulară „veche”, provenită din mucoasa bucală de la om adult, că 50—80% din celulele pe cale de diviziune se caracterizează prin absența unui cromozom al grupeii 21—22 (22), ceea ce demonstrează o pierdere materială purtătoare de informație genetică.

Pentru verificarea experimentală a ipotezei cibernetice genetice (23), potrivit căreia celula canceroasă nu conține matricele genetice care determină specificitatea structurală și funcțională, ne-am propus să cercetăm acțiunea ADN uman înalt polimerizat, biologic activ, asupra culturilor de celule canceroase umane, și paralel asupra culturilor de celule normale umane.

Potrivit informațiilor culese de noi din literatura de specialitate, aceste cercetări nu s-au mai efectuat de alți autori.

Material și metodă

1. — *Acidul dezoxiribonucleic (ADN) uman înalt polimerizat* folosit, a fost extras de noi la stația experimentală a I.M.F. Tg.-Mureș.

Materialul s-a utilizat ca atare, conținând 1 mg ADN pe ml de soluție, sau diluat 1/5. Am adăugat culturilor de celule cantitatea de 0.2 ml respectiv 0.5 ml ADN uman plus mediul de menținere.

2. — *Tulpinile celulare:*

a) Detroit₆ (Berman) de origine umană neoplazică, obținută din măduva sternală (carcinom pulmonar cu caracter epitelial). Aceste culturi sînt menținute în laboratorul nostru de inframicrobiologie în culturi staționare.

b) Corion uman, obținut prin transformarea spontană la pasajul 8, de la un embrion cu învelișuri embrionare, în vîrstă de 3 luni, de dr. Aderca, în Institutul de inframicrobiologie al Academiei R.P.R. din București. Această cultură se menține în pasaje succesive în institutul nostru.

c) KB (Eagle) de origine umană neoplazică, obținută din carcinom nazo-faringian (palatin) cu caracter epitelial, menținut în laboratorul nostru prin pasaje succesive.

d) CM (SCH, Salk) din cord normal de maimuță (*Macacus Cynomolgus*) cu caracter epitelial, menținută în institutul nostru prin treceri succesive.

3. — *Medii de cultură:* pentru menținerea culturilor D₆, am folosit mediul de cultură Hanks+Eagle aa+hidrolizat de lactalbumină (20%) +ser de vițel 10% +1 glutamină 1%+antibiotice și vitamine (2 părți) și mediul sintetic M₁₈₈ (1 parte).

Pentru menținerea celorlalte tulpini de celule am folosit mediul Hanks + Eagle fără mediu sintetic.



Fig. nr. 1.: Cultură de celule canceroase umane (tulpina D₆), martore (Ob. 10 , Oc. 20).



Fig. nr. 2.: Cultură de celule canceroase umane (tulpina D₆) după tratarea culturii cu ADN (Ob. 10 , Oc. 20).

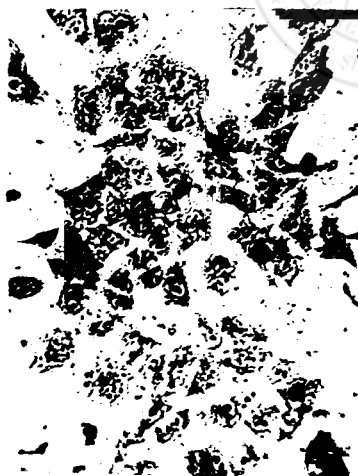


Fig. nr. 3.: Cultură de celule umane normale (corion) martore (Ob. 10 , Oc. 20).



Fig. nr. 4.: Cultură de celule umane normale (corion) după tratarea culturii cu ADN (Ob. 10 , Oc. 20).



Fig. nr. 5.: Cultură de celule de cord de maimuță (Macacus Cynomolgus) martore (Ob. 10 \times , Oc. 20).



Fig. nr. 6.: Cultură de celule de cord de maimuță (Macacus Cynomolgus) după tratarea culturii cu ADN (Ob. 10 \times , Oc. 20).



Fig. nr. 7.: Cultură de celule canceroase umane (tulpina KB) martore (Ob. 10 \times , Oc. 20).



Fig. nr. 8.: Cultură de celule canceroase umane (tulpina KB) după tratarea culturii cu ADN (Ob. 10 \times , Oc. 20).

În toate cazurile, înainte de însămînțarea culturilor cu ADN uman, ele au fost spălate abundant cu lichidul SST (soluție salină tamponată), iar pentru menținere am alcătuit următorul mediu:

Soluție Hanks + Autolyzed Yeast Bacto (Difco) 1%₁₀₀ + lactoalbumină hidrolizată 5%₁₀₀, fără antibiotice și fâiă 1-glutamină.

În general, culturile le-am însămînțat la 2—3 zile după versenizarea lor. La 6,2 ml ADN uman am adăugat 1,8 ml de mediu sau la 1,5 ml ADN uman nediluat am adăugat 1,5 ml mediu. Culturile le-am menținut la termostat la 37°C zilnic observate și în a 6-a zi, după spălarea mediului, le-am colorat după metoda Giemza.

În alte cazuri am schimbat zilnic mediul de menținere, administrînd zilnic timp de 4 zile ADN uman în cantitatea mai sus menționată. Celulele au fost colorate și fotografiate la 6—7 zile de la însămînțare.

Rezultate

Pentru controlul sterilității, materialul a fost inoculat pe următoarele medii: Sabouraud (pentru ciuperci), bulion, geloză simpia pentru microbi aerobi și mediul Hollman (carne) pentru microbi anaerobi. Mediile au stat sub observațiile noastre timp de 7 zile și am constatat că nu a crescut nici o colonie de microbi, respectiv nu s-au dezvoltat gaze.

În prima serie a cercetărilor efectuate pe culturi Detroit, însămînțate cu 6 micrograme de ADN uman și mediu de menținere, la 72 de ore aspectul celulelor s-a schimbat. Celulele de la marginea pinzei celulare au luat forme stelate, s-au mărit considerabil față de martori; nucleii au devenit mai mari, bine delimitați de citoplasmă care pare mai granulat. În interiorul pinzei celulare nu se evidențiază același aspect celular, celulele fiind îngrămădite (negăsind loc de creștere pentru prelungiri). Și în aceste condiții nucleul este mai voluminos și citoplasma mai granulat. La martori (același mediu de menținere, însă fără adăugare de ADN uman), la marginea pinzei celulare, se disting celule de formă și aspect pavimentos, dar cu granulații puține și nucleu greu de distins. În pinză continuă, celulele nu-și pierd acest aspect și se observă pe alocuri formele lor intacte, dar mai mici (fig. nr. 1, 2).

Tulpina Corion-1 se aseamănă foarte mult cu cele de mai înainte și pare că prin adăugarea de ADN uman la cultură, celulele se dezvoltă foarte bine (atît nucleul cît și citoplasma) (fig. nr. 3, 4).

În cazul culturilor CM rezultatele sînt contrare. La 72 de ore celulele încep să se rotunjească, protoplasma se fragmentează, iar în ziua a 5-a nu se distinge nucleul de citoplasmă, pierzîndu-și complet forma inițială (poligonală). În ziua a 6—7-a se găsec numai resturi ale celulelor distruse. Martorii în această perioadă se mențin neschimbați ca aspect și formă, ceea ce arată că suportă bine mediul de menținere (fig. nr. 5, 6).

În cazul culturilor KB am efectuat experiențele prin două metode. În prima tranșă am inoculat culturile cu aceeași cantitate de ADN uman ca mai sus, iar în a doua am administrat 0,5 mg ADN uman nediluat, 4 zile consecutiv, mediul de menținere fiind schimbat zilnic. În acest ultim caz am obținut rezultate și mai nete față de cele constatate prin aplicare de ADN uman pe culturile D₆. Celulele din culturile tratate s-au dezvoltat mai bine, luînd în general forme poligonale, și se observă puține celule distruse. Citoplasma se colorează, după metoda Giemza, în albastru deschis, iar nucleul în albastru violaceu închis. Nucleul este mare, net evidențiat de citoplasmă. Marginile insulelor devin netede, fără a manifesta vreo tendință de alungire. Această structură se evidențiază atît la marginea pinzei celulare, cît și la marginile insulelor din interiorul pinzei. Martorii prezintă o alungire a celulelor pe locurile libere (marginile), luînd aspectul unor celule mai primitive; celula este mai mică, nucleul mai restrîns, mai ovalar și mai variat (fig. nr. 7, 8).

Prin adăugarea ADN uman la celule, imediat după versenizare, nu am obținut diferențe în creștere și aspect, dacă se administrează și ser de vițel. Aplicând metoda imediat după versenizare cu mediu de menținere, celulele nu mai cresc, ele se distrug.

Discuții

Este bine cunoscut faptul că celulele adaptate la un mediu de cultură cresc din abundență și după depășirea termenului respectiv ele se rotunjesc, își pierd aspectul normal, eventual pavimentos-polygonal sau alungit, în sfârșit se distrug și cad în mediul de creștere.

În cazul schimbării mediului de creștere cu cel de menținere, cultura se menține în stadiul respectiv, timp mai scurt sau mai lung, după care se distruge.

Adăugând culturii ADN uman, înalt polimerizat, celulele epiteliale umane canceroase își schimbă caracterele morfologice ale citoplasmei și nucleului. Celulele devin mai mari, mai voluminoase, asemănându-se din ce în ce mai mult cu celulele primare (linia celulară). Același lucru se constată și în cazul tulpinilor umane normale de Corion. Este interesant să menționăm că acțiunea acceleratoare asupra creșterii celulare exercitată de acizii nucleici omologi de specie s-a constatat și în experiențe efectuate cu fracțiune nucleoproteică extrasă din embrionii de găină pe culturi de fibroblaști de pui de găină (24).

Culturile de altă specie decît cea umană (specia maimuței *Cynomolgus*) se comportă ca și în cazul infecției cu un virus citopatogen, arătînd toate aspectele de citopatogenitate, ca atare nu suportă ADN de altă specie (umană).

Notăm că o acțiune similară, exercitată de extractul embrionar heterospecific, s-a constatat la celulele de pui de găină (fibroblaste și mioblaste) cultivate în prezența extractului embrionar de soarece și la celulele umane cultivate în extract embrionar de pui, dovedindu-se că suferă alterări remarcabile ale cariotipului (25).

Este interesant să subliniem că la celulele D_6 tratate cu ADN uman se constată, atît în pinza celulară cît și la marginea ei, că celulele devin poligonale sau stelate (cum le-am denumit noi), iar celulele martore își mențin formele lor mai pușine stelate, cu nucleul mai transparent și citoplasmă fină, eventual fin granulată, în timp ce la culturile KB tratate cu ADN uman este mai pronunțat și se distinge mai bine diferența spre maturizare. Aceste diferențe mai nete, obținute pe culturile KB, le atribuim administrării zilnice de ADN uman și schimbării zilnice a mediului respectiv.

Credem că dacă mediul de creștere al culturilor de celule umane pe care am efectuat aceste cercetări, ar fi fost specific uman, s-ar fi obținut rezultate și mai evidente.

În acest sens trebuie să menționăm că mediul heterolog influențează capacitatea antigenică a celulelor umane. Astfel s-a constatat că celulele HeLa cultivate într-un mediu care conține ser de cal și apoi scoase din acest mediu heterolog înainte de 48 ore și transferate într-un mediu conținînd ser uman vor conține proteine de cal. Dacă acest transfer se face după 48 de ore, nu se mai constată reacții serologice pozitive (26).

Concluzii

1. — ADN uman înalt polimerizat, introdus în culturile celulare tumorale umane (tulpina Detroit și tulpina KB) determină modificări morfologice atît în ce privește nucleul și citoplasma, cît și forma celulelor.

2. — Ținînd seamă că ADN uman înalt polimerizat a fost singura substanță activă introdusă în mediul de menținere al tulpinilor tratate, și întrucît acest preparat constituie baza materială a informației genetice umane, credem că modificările constatate la celulele tumorale umane D_6 și KB ar indica un proces de diferențiere datorită refacerii genotipului și cariotipului.

3. -- ADN uman înalt polimerizat favorizează creșterea celulelor normale rămâne de Corion, ele devenind mai voluminoase, ceea ce dovedește completa lipsă de toxicitate și citopatogenitate a acestei substanțe.

4. -- ADN uman înalt polimerizat inhibă creșterea tulpinilor celulare CM (cord de maimuță), acestea prezentând un aspect asemănător cu efectul citopatic produs în cazul infectării cu unele virusuri.

Sosit la redacție: 6 aprilie 1965.

Bibliografie

1. ZALKIND S. L., ZASLAVSKI V. G.: An. Rom. Sov. Med. (1963), 4, 38; 2. PANCENKO O. N.: Usp. sovrem. biol. (1962), 2, 169; 3. HSU T. C., POMERAT C. M., MOORHEAD P. S.: J. nat. Cancer inst. (1957), 19, 5, 867; 4. DEFENDI V., LEHMAN J., KRAEMER P.: Virology (1963), 19, 592; 5. RUZICKSA P.: Acta morphol. Hung. (1964), 12, 4, 429; 6. EARLE W. R., NETTLESHIP A. J.: Nat. Cancer. Inst. (1943), 4, 213; 7. GEY G. O., GEY M. K., FIROR W. M., SELF W. O.: Acta internat. contra cancer. (1949); 8. MOORE A. E., SOUTHAM C. M., STERNBERG S. S.: Science (1956), 124, 127; 9. SANDFORD K. S., HOBBS S. L., EARLE W. E.: Cancer Res. (1956), 16, 162; 10. FRIEDMAN M., FOGH K. J.: Cancer Res. (1958), 18, 692; 11. FOGH J., HOK K.: Cancer Res. (1958), 18, 692; 12. SANDFORD K. S.: Cancer Res. (1958), 18, 747; 13. BENEVOLENSKAIA S. V., STAROVEROVA N. S. citate în Vopr. Onkol. articolul „Cancerogeneza”, (1963), 6; 14. GOLDBLAT H., CAMERON G.: J. Exper. Med. (1953), 97, 525; 15. WINDISCH F.: Naturwiss. (1947), 34, 190; 16. PAN JOHN-CHEN. HO SHEN, CHEN CHUAN-KWANG, BAY YUEN-CHIN: VIII. intern. cancer congress: Abstracts of papers, Medghiz, Moscova, (1962), 135; 17. STUDITSKI A. N.: Journ. obșcei biol. (1962), 3; 18. POGOSIANT E. E.: Jurnal vsesoiuznovo himiceskovo obșcestva (1963), 4; 19. STAROVEROVA N. S.: Vopr. onkol. (1961), 7, 9, 3—8; 20. LEVAN A., BIESELE J.: J. Am. N. Y. Ac. Sc. (1958), 71, 6, 1022; 21. LEVAN și HSU (1961), citați de: RIGOMAR, RIEGER von: Die Genomutationen (Ploidiemutationen). Jena, Gustav Fischer Verlag, 1963, 175; 22. MOORHEAD P., SAKSELA E.: J. Cell comp. Physiol. (1963), 62, 57; 23. UDRIȘTE O.: Virusul endogen anaerob și geneza cancerului, Comunicare la U.S.S.M. Soc. de oncologie, București, 14. I. 1963; 24. KUTSKI R.: Prbc. Șoc. Exp. Biol. Med. (1953), 83, 90; 25. FREDERIC J., JANINE CORIN: Comptes rendus, (1962), 254, 2, 357; 26. SWAEN G.J.V.: Experientia (1963), XIX, 12, 628; 27. BERCEANU ȘT., MARIANA GOCIU și IOANA RAILEANU: Studii și cercet. de med. internă (1965), 6, 1, 25.