

Badania cytotoksyczności monenzyny i narazyny w hodowli linii ciągłej hepatocytów szczura

LIDIA RADKO, WOJCIECH CYBULSKI, JOANNA WESSELY-SZPONDER*,
WOJCIECH RZESKI**, ***

Zakład Toksykologii i Ochrony Środowiska, *Zakład Patofizjologii Katedry Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 21-033 Lublin

**Zakład Wirusologii i Immunologii Wydziału Biologii i Nauki o Ziemi UMCS, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

***Zakład Toksykologii Instytutu Medycyny Wsi, ul. Jaczewskiego 2, 20-950 Lublin

Radko L., Cybulski W., Wessely-Szponder J., Rzeski W.

Studies on cytotoxicity of monensin and narasin in rat hepatocyte cell line culture

Summary

The aim of the work was to determine monensin, narasin hepatotoxicity and the nature of cell death. Rat hepatocyte model cell line (FAO) was used to investigate two ionophore antibiotic cytotoxic effects estimated by MTT, NRU and KB tests approved by INVITTOX. Additionally, the apoptotic/necrotic nature of cell death was determined by propidium iodide and HO 342 staining of the cultured hepatocytes. IC_{50} indices for monensin and narasin estimated by using the MTT test during a 24 hour incubation period were at a level of $0,027 \pm 0,001 \mu M$ and $0,037 \pm 0,001 \mu M$, respectively. However, an incubation period of 48 hrs yielded an equal value - $0,02 \mu M$ - for both ionophores. Contrary to the MTT test, NRU and KB estimations demonstrated lower IC_{50} values for narasin than for monensin. These results correlated to in-vivo acute toxicity and LD_{50} indices in rats (data from references). The apoptotic nature of hepatocyte death dominated in the cultures. The article also discussed the mechanisms of ionophore induced cytotoxicity.

Keywords: hepatotoxicity, rats, monensin, narasin

Monenzyna i narazyna należą do antybiotyków jonoforowych (polieterowych), otrzymywane są na drodze fermentacji tlenowej ze szczepów *Streptomyces* sp.: monenzyna – *S. cinnamonensis*, narazyna – *S. aureofaciens*. Wykorzystywane są szeroko w profilaktyce kokcydiozy i jako stymulatory wzrostu w hodowli zwierząt. Nieodpowiednie podawanie antybiotyków jonoforowych (przedawkowanie, złe wymieszanie w paszy) prowadzi do śmiertelnych zatrąć (13, 14). Poszczególne substancje charakteryzuje różnicowana toksyczność dla poszczególnych gatunków zwierząt, najbardziej wrażliwe są konie i króliki (8). Cechuje je również wąski margines bezpieczeństwa, czyli mała rozpiętość pomiędzy dawką leczniczą a toksyczną. Mechanizm działania toksycznego wiąże się z zaburzeniami w komórkowym transporcie jonów jednowartościowych: potasu (K), sodu (Na), rubidu (Rb), cezu (Cs) i/lub dwuwartościowych: wapnia (Ca), magnezu (Mg), baru (Ba). Cytotoksyczność tych związków ujawnia się głównie w komórkach wątrobowych i mięśniowych. Dochodzi do zaburzenia funkcjonowania błony komórkowej i aparatu Golgiego oraz uszkodzenia struktur mitochondrialnych i ostatecznie do śmierci komórki (8, 14).

Celem podjętych badań było określenie aktywności hepatotoksycznej monenzyny i narazyny oraz natury wywołanej śmierci komórki.

Materiał i metody

Badanie wykonano na linii ciągłej hepatocytów szczurzych FAO, pochodzących z banku komórek ECACC Salisbury, Wiltshire, UK. Przechowywano je w ciekłym azocie w podłożu hodowlanym z dodatkiem 10% DMSO (Sigma). Przygotowanie hepatocytów do badań opisano we wcześniejszej publikacji (9).

Monenzynę (Sigma) rozpuszczono w stężonym metanolu (POCH Gliwice), a narazynę (Elanco) w DMSO (Sigma). Następnie oba rozpuszczone związki rozcieńczono w płynie hodowlanym Hams F-12 (w modyfikacji Kanigh). Z roztworu podstawowego sporządzono roztwory robocze, wykorzystując podłoże hodowlane jako rozpuszczalnik. Po usunięciu podłoża hodowlanego do studzienek mikropłytek (NUNC 96 well) wprowadzono po 100 μl podłoża z testowaną substancją. Po upływie 24- i 48-godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO_2 , oceniono działanie cytotoksyczne monenzyny i narazyny w oparciu o następujące testy zwalidowane i zalecane przez INVITTOX (4-6):

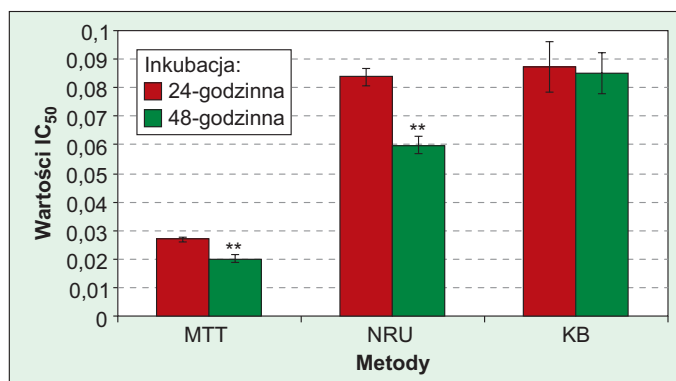
- MTT (Methylthiazolotetrazolium) – aktywności dehydrogenazy bursztynianowej – określający zdolność metaboliczną mitochondriów – INVITTOX 17,
- NRU (Neutral Red Uptake) – wychwyty i gromadzenia czerwieni obojętnej przez lizosomy komórek – oceniający integralność błon komórkowych – INVITTOX 54,
- KB (Kenacid Blue) – określający zdolność syntetyzowania całkowitego białka w komórkach – proliferację komórek – INVITTOX 3b.

Pomiar przeprowadzono w automatycznym czytniku mikropłytek E-max (Molecular Devices, Corporation, Monlo Park, USA) przy długościach fali, odpowiednio, $\lambda = 570, 550, 600$ nm dla wymienionych testów. Na podstawie uzyskanych wyników określono IC_{50} , ilość badanej substancji, która spowodowała spadek o 50% wymienionych aktywności komórek w porównaniu z kontrolą. Wykonano również test umożliwiające rozróżnienie komórek nekrotycznych od apoptycznych. Pod mikroskopem fluorescencyjnym przy długości fali 420 nm (filtr dla UV) komórki nekrotyczne wykazują wobec jodku propidyny (Sigma) bladą różową fluorescencję, natomiast jasnoniebieska pod wpływem barwnika fluorochromowego (Hoechst 33342–HO342) charakteryzowała komórki apoptyczne.

Analizę statystyczną przeprowadzono w oparciu o dwuczynnikową analizę wariancji ANOVA i test Tukeya.

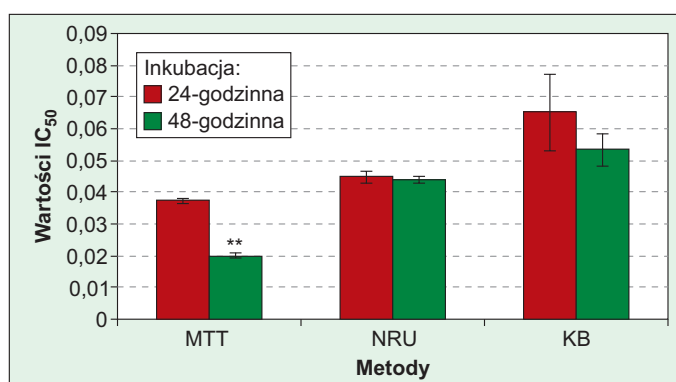
Wyniki i omówienie

Na podstawie przeprowadzonej analizy statystycznej wykazano istotne różnice ($p < 0,01$) cytotoksycznego działania monenzyny i narazyny w czasie 24- i 48-godzinnej inkubacji. Zastosowane testy pozwoliły na porównanie cytotoksyczności obu preparatów poprzez określenie wrażliwości elementów subkomórkowych hepatocytów na badane antybiotyki. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, iż monenzyna i narazyna odznaczały się bardzo niskimi wartościami IC_{50} (różnica dwu rzędów wielkości) w porównaniu z tiamem, związkiem o dobrze rozpoznanej cytotoksyczności wobec hepatocytów (9). Najniższe wartości IC_{50} uzyskano w teście MTT w czasie 24-godzinnej inkubacji, które dla monenzyny wynosiły $0,027 \pm 0,001 \mu M$, dla narazyny $0,037 \pm 0,001 \mu M$. Wskazuje to na wyższą cytotoksyczność monenzyny w porównaniu z narazyną odnośnie do zaburzeń procesów mitochondrialnych. Jednakże po 48 godzinach wartości IC_{50} wyznaczone tą metodą były podobne dla obu antybiotyków (ryc. 1 i 2). Odmienne niż w teście MTT przedstawiały się wartości IC_{50} dla narazyny za pomocą metod NRU i KB. Były one niższe w porównaniu z monenzyną zarówno po 24-, jak i po 48-godzinnej inkubacji (ryc. 1 i 2). Należy zatem wnioskować, iż narazynę charakteryzuje większa cytotoksyczność w porównaniu z monenzyną w zakresie uszkodzeń błon komórkowych, zaburzeń syntezy białka i proliferacji. Wyższą cytotoksyczność monenzyny i/lub jej metabolitów w porównaniu z narazyną, w zakresie zaburzeń procesów mitochondrialnych w pierwszej dobie inkubacji, tłumaczyć można większym potencjałem przenoszenia kationów. Związane może to być z różnicą w budowie chemicznej obu związków i odmiennym procesem mikrosomalnego metabolizmu monenzyny, zachodzącym w cytochromie P-450 A3, co prowadzi do powstawania toksycznych metabolitów (3, 10). Nie poznano dotychczas biotransformacji i izoenzymu-(ów) cytochromu P-450 uczestniczących w metabolizmie narazyny. Wnikanie jonów sodu do wnętrza komórki powoduje aktywację przenośnika Na^+/H^+ oraz ATP-azy, prowadząc, z jednej strony, do



Ryc. 1. Średnie wartości IC_{50} (μM) monenzyny oznaczane za pomocą testów MTT, NRU KB w czasie 24- i 48-godzinnej inkubacji hepatocytów

Objaśnienia: ** różnica statystycznie istotna ($p < 0,01$)

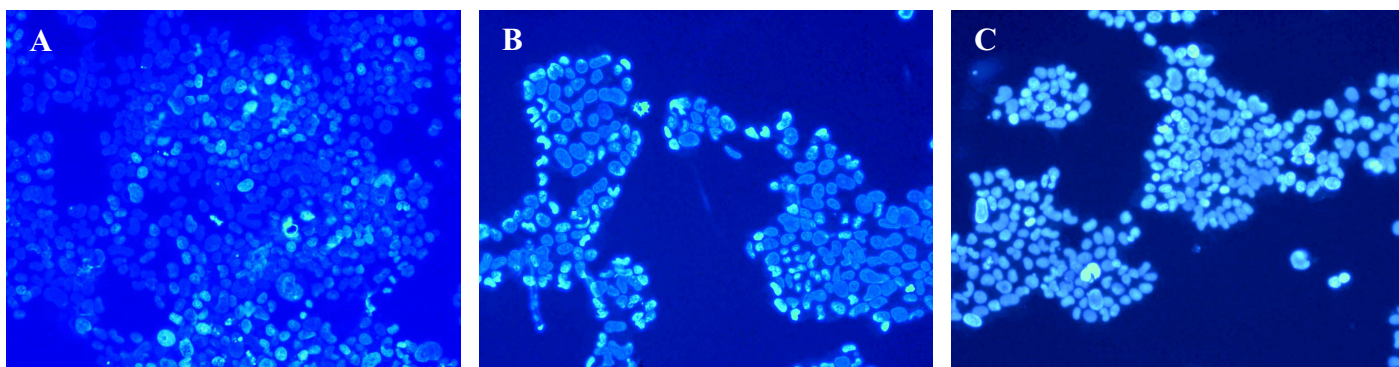


Ryc. 2. Średnie wartości IC_{50} (μM) narazyny wyznaczone za pomocą testów MTT, NRU KB w czasie 24- i 48-godzinnej inkubacji hepatocytów

Objaśnienia: jak na ryc. 1.

alkalizacji środowiska wewnątrzkomórkowego związanego z wpływem protonów, a z drugiej, do obniżenia poziomu ATP. Aktywny transport Na^+ związany jest również ze wzrostem stężenia jonów wapniowych wewnątrz komórki (2). Zwiększone odkładanie wapnia zmusza mitochondria do jego magazynowania w celu utrzymania homeostazy. W momencie przeładowania mitochondriów wapniem następuje zahamowanie fosforylacji oksydatywnej, co prowadzi do śmierci komórki (1). Badania innych autorów wskazują, że przy poziomie 10^{-8} M tych antybiotyków dochodzi do zahamowania o 43% aktywności procesów komórkowych w mitochondriach, aparacie Golgiego i lizosomach (10, 14).

Zachodzące zmiany w komórce pod wpływem obu badanych substancji wpływały na jej zdolność syntezy białka i proliferację. Inni autorzy na podstawie testu wbudowania znakowanej tymidyny w DNA wykazali hamowanie proliferacji różnych fibroblastów w czasie 24-godzinnej inkubacji w zakresie $0,08-1 \mu M$ monenzyny (7). Wyniki IC_{50} otrzymane z oznaczeń za pomocą metody pomiaru całkowitego białka komórkowego (KB) wykonane w czasie 24- i 48-godzinnej inkubacji komórek z monenzyną są porównywalne z podanym wyżej zakresem. Natomiast wartości IC_{50}



Ryc. 3. Obraz fluorescencji hepatocytów (pow. $\times 200$) poddanych działaniu monenzyny i narazyny w ilościach określonych jako średnie IC_{50} z trzech testów (MTT, NRU, KB) (barwienie za pomocą jodku propiolinowego i Hoechst 33342)
 Objaśnienia: A – kontrola, B – działanie monenzyny, C – działanie narazyny

dla narazyny nie mogą być odniesione z uwagi na brak danych w piśmiennictwie, jakkolwiek istotnym faktem są ich niższe wartości w porównaniu z monenzyną.

Dane piśmiennictwa wskazują na zbliżoną toksyczność narazyny i monenzyny w warunkach narażenia zwierząt *in vivo*, co objawia się podobnym obrazem klinicznym zatrucia u wielu gatunków. Wskaźnik toksyczności ostrej u szczurów LD_{50} dla narazyny jest niższy niż monenzyny, wynosi on odpowiednio 21,1 mg/kg m.c. i 34 mg/kg m.c. (13, 14). Odnosząc te wartości do IC_{50} wyznaczonego metodami *in vitro* można sądzić, iż niższy wskaźnik LD_{50} dla narazyny jest wynikiem dominacji reakcji cytotoksycznych w zakresie uszkodzenia błon komórkowych, zaburzenia syntezy białka komórkowego (testy NRU i KB). W związku z powyższym niższa wartość LD_{50} dla narazyny koreluje z niższymi wskaźnikami cytotoxyczności IC_{50} w tych testach.

O toksyczności monenzyny i narazyny decyduje dawka, czas narażenia oraz z pewnością rodzaj komórek narażonych na ich działanie. W miarę wydłużania czasu inkubacji hepatocytów z badanymi antybiotykami wzrastała ich cytotoxyczność, co przedstawiają wartości IC_{50} oznaczane wymienionymi testami (ryc. 1 i 2).

Obraz hepatocytów wskazuje w większości na apoptyczną śmierć komórek poddanych działaniu badanych antybiotyków (ryc. 3). O apoptozie lub nekrozie komórki decyduje poziom jej zasobów energetycznych, co związane jest z aktywnością metaboliczną mitochondriów. W wyniku uszkodzenia błon komórkowych przez antybiotyki jonoforowe dochodzi do obniżenia błonowego potencjału mitochondrialnego. Prowadzi to do spadku poziomu ATP, który odgrywa istotną rolę w procesie śmierci komórki. Wiadomo, że o śmierci apoptycznej lub nekrotycznej komórki decyduje rodzaj i dawka czynnika indukującego cytotoxyczność, czas jego ekspozycji na komórki oraz rodzaj komórek poddanych działaniu tego czynnika. W konsekwencji apoptozę i/lub nekrozę może indukować ten sam czynnik. Mollenhauer (8) zaobserwował nekrotyczną śmierć komórek mięśniowych pod wpływem działania monenzyny. Odmienne spostrzeżenia poczynili inni

autorzy (11), rozpoznając apoptyczny mechanizm śmierci wywołanej przez monenzynę, ale badania nie dotyczyły hepatocytów. Wnoszą to prezentowane wyniki badań, wskazujące na apoptozę hepatocytów szczura wywołaną zastosowanymi jonoforami w ilościach oznaczonych wartościami IC_{50} .

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na zróżnicowane działanie badanych jonoforów, zaburzających odmienne procesy zachodzące w organellach hepatocytów szczura. Jednakże w myśl toksykologicznych przesłanek, wydanie właściwej oceny cytotoxycznych efektów wywoływanych przez ksenobiotyki powinno być poparte badaniami w hodowlach komórkowych zwierząt docelowych.

Piśmiennictwo

1. Bolkent S., Zierold K.: Effects of the ionophores valinomycin, ionomycin and gramicidin A on the element compartmentation in cultured rat hepatocytes. *Toxicol. In Vitro* 2002, 16, 159-165.
2. Gawel A., Mazurkiewicz M.: Przebieg zatrucia narazyną w stadzie indyków rzeźnych. *Medycyna Wet.* 2004, 60, 154-159.
3. Dacasto M., Ceppa L., Cornaglia E., Valenza F., Carletti M., Bosio A., Bosia S., Ugazio G., Nebbia C.: Effects of the ionophore antibiotic monensin on hepatic biotransformations and target organ morphology in rats. *Pharmacol. Res.* 1999, 39, 5-10.
4. INVITTOX – The ERGATT/FRAME Data Bank of In Vitro Techniques in Toxicology „The FRAME cytotoxicity test (Kenacid Blue)” 1992, Nr 3b.
5. INVITTOX – The ERGATT/FRAME Data Bank of In Vitro Techniques in Toxicology „The Neutral Red cytotoxicity assay” 1992, Nr 64.
6. INVITTOX – The ERGATT/FRAME Data Bank of In Vitro Techniques in Toxicology „MTT assay” 1990, Nr 17.
7. Liteplo R. G.: Transformed rodent cells exhibit increased resistance to the carboxylic ionophores monensin and nigericin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991, 174, 483-488.
8. Mollenhauer H. H., Morre D. J., Rowe L. D.: Alteration of intracellular traffic by monensin; mechanism, specificity and relationship to toxicity. *Biochem. Biophys. Acta* 1990, 1031, 225-246.
9. Muzyczuk-Piekarska A., Kowalska-Pylka H., Cybulski W., Rzeski W.: Ocena cytotoxycznego działania fungicydów o budowie benzotiazolidinów. *Medycyna Wet.* 2004, 60, 1124-1128.
10. Nebbia C., Ceppa L., Dacasto M., Nachtmann C., Carletti M.: Oxidative monensin metabolism and cytochrome P450 3A content and functions in liver microsomes from horses, pigs, broiler chicks, cattle and rats. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 2001, 24, 399-403.
11. Park W. H., Seol J. G., Kim E. S., Kang W. K., Im Y. H., Jung Ch. W. B. K., Lee Y. Y.: Monensin-mediated growth inhibition in human lymphoma cells through cell cycle arrest and apoptosis. *Brit. J. Haematol.* 2002, 119, 400-409.
12. Novilla M. N.: The veterinary importance of the toxic syndrome induced by ionophores. *Vet. Hum. Toxicol.* 1992, 34, 66-70.
13. Novilla M. N., Owen N. V., Todd G. C.: The comparative toxicology of narasin in laboratory animals. *Vet. Hum. Toxicol.* 1994, 36, 318-323.
14. Oehme F. W., Pickrell J. A.: Analysis of the chronic oral toxicity of polyether ionophore antibiotics in animals. *Vet. Hum. Toxicol.* 1999, 41, 251-257.

Adres autora: lek. wet. Lidia Radko, ul. Akademicka 12, 21-033 Lublin