

Mirjana Kalafatić, Danica Žnidarić i A. Lui
Zoologijski zavod Prirodoslovno-matematičkog
fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

DJELOVANJE CITOSTATIKA SPI 77 NA HIDRU (CNIDARIA)

Abstract

The effect of the cytostatic SPI 77 upon the *Hydra vulgaris* species is distinctly pronounced immediately after treatment. The loos of interstitial cells, cnids and cnidoblasts in the ectoderm as the changes of the zymogen cells in the gastroderm have been observed.

Uvod

Poznato je da citostatici inhibiraju sintezu RNA, što se odražava na sintezu proteina, a s tim u vezi i na mitozu stanica. Istražujući djelovanje derivata citostatika SPI na karcinomatozne stanice štakora *in vivo* (Lombart i Lombart 1964) ustanovili su da se ritam mitoze usporava, kasnije se ubrzava, a potom ponovno opada.

U tijelu hidre citostatici eliminiraju pojedine tipove stanica (Diehl i Burnett 1964, 1965, Müller 1967, Lui i Žnidarić 1976). Spomenuti autori dokazuju da neki citostatici uzrokuju gubitak intersticijalnih stanica te prestanak produkcije knida i knidoblasta, dok procesi regeneracije i pupanja nisu narušeni.

Materijal i metodika rada

Hydra vulgaris koja je upotrijebljena kao objekt istraživanja, držana je na sobnoj temperaturi (oko 21°C), u akvarijskoj vodi. Hidre su svakodnevno hranene ličinkama *Artemia salina*, a nakon toga premještane su u čistu akvarijsku vodu. U pokus su uzimane hidre bez pupa i hidre s jednim pupom, približno jednake tjelesne

težine, dvadeset i četiri sata nakon hranjenja. Citostatik SPI 77 (podofilinska kiselina-acetilhidrazid, Sandoz) razrijeđena je u akvarijskoj vodi. Ispitivano je djelovanje dviju koncentracija i to: 1 ml SPI 77 razrijeđen u 250 ml vode i 1 ml SPI 77 razrijeđen u 300 ml vode. Nakon što su hidre stajale 24 sata u spomenutim otopinama citostatika, premještene su u čistu akvarijsku vodu. Na tim životinjama su svakodnevno praćene morfološke promjene stereomikroskopom. Za citološko-histološka istraživanja hidre su fiksirane u Bouinu 1, 2, 3 i 7. dana nakon tretiranja. Parafinski blokovi rezani su na preparate debljine 7 mikrometara. Rezovi su bojani s 0,1% toluidinskim modrilom, a za analizu knida i knidoblasta neki od preparata bojani su po metodi PAF-HALMI.

REZULTATI

Morfološke promjene hidra tretiranih s 1 ml SPI 77 u 250 ml vode

Neposredno poslije tretiranja gotovo sve (oko 90%) životinja bačvastog su oblika. Lovke su im skraćene na 1/4 normalne duljine i na krajevima su kuglasto proširene. Samo nekoliko životinja drži se podloge, a ostale leže na dnu posudice. U 80% hidra oštećen je i hipostom. Hidre bez pupa i hidre s jednim pupom pokazuju slične morfološke promjene, iako su u hidra s pupom oštećenja nešto blaža. Lovke pupova su također oštećene ali manje nego lovke matičnih jedinki. Drugog dana nakon tretiranja 10% hidra je uginulo. Nekoliko životinja je manje napuhnuto, pa su te životinje poprimile normalniji izgled. Kod 1/3 hidri lovke su skraćene do same baze. Oko 20% pupova se odvojilo, dok su se u kontrolnoj skupini od matičnih jedinki odvojili gotovo svi pupovi. Trećeg dana nakon postavljanja pokusa većina hidra više je slična kontroli nego proteklih dana ali se još uvijek ne drže podloge. Lovke svih hidra se postupno oporavljaju ali su još uvijek za 1/2 kraće od lovki kontrole. Manji broj pupova (oko 10%), odvojilo se od matične jedinice, a u kontroli su se već prvog dana odvojili gotovo svi pupovi. Četvrtog dana lovke su porasle, te su sada normalne duljine. U 50% životinja javljaju se pupovi i to u gastralnoj i subhipostomalnoj regiji. Petog dana nakon tretiranja deformacije su još očitije. Pokoje hidre imaju gva hipostoma, a na neodvojenim pupovima formiraju se novi pupovi koji se nisu odvojili za sve vrijeme promatranja, što je trajalo oko 30 dana. Ukupni broj novonastalih pupova u kontrolnih i tretiranih životinja u toku pokusa bio je podjednak.

Morfološke promjene u hidra tretiranih s 1 ml SPI 77 u 300 ml vode

Neposredno poslije tretiranja oko 50% životinja leži na podlozi. One su napuhnute, bačvastog oblika, a lovke su im skraćene na 1/3 normalne duljine, dok su ostale hidre svojim izgledom sli-

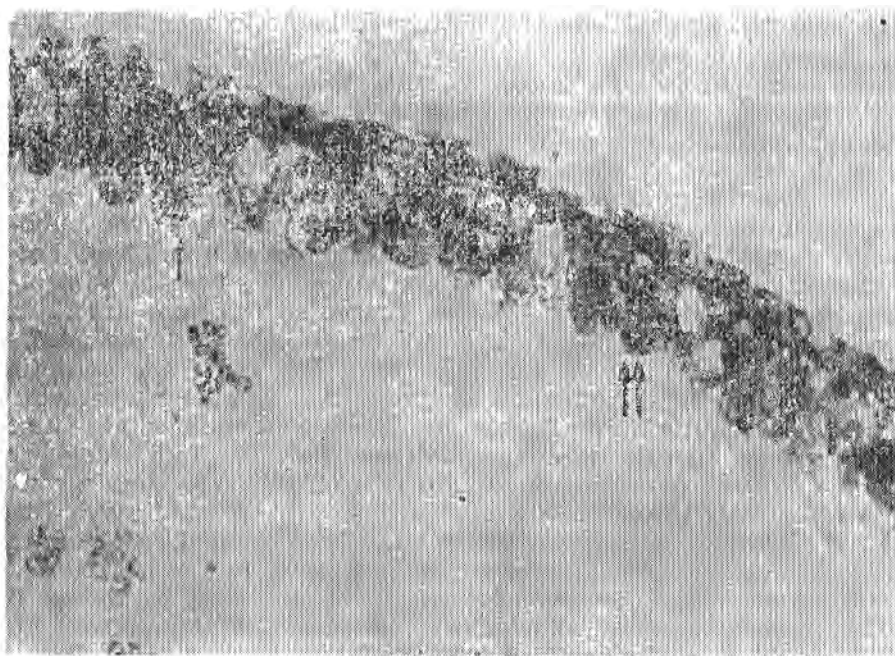


čne kontroli. Krajevi oštećenih lovaka su kuglasto zadebljali. Lovke pupova i u ovom slučaju pokazivale su blaža oštećenja nego lovke matičnih jedinki. U skupini tretiranih životinja odvojilo se 30% pupova, a u kontrolnoj skupini 80% pupova. Drugog dana nakon tretiranja kod manjeg broja jedinki lovke su se još više skratile. Na podlozi leži podjednak broj životinja kao i prošlog dana. U 50% tretiranih životinja odvojili su se pupovi, dok su se za to vrijeme u kontrolnoj skupini odvojili svi pupovi. Lovke pupova su porasle, pa su samo neznatno kraće od lovki u kontrole. Trećeg dana iza tretiranja 50% životinja poprimile su izgled kontrolnih životinja. Napuhnutosť hidra je znatno slabija nego proteklog dana. Lovke pupova su gotovo normalne duljine, a i lovke matičnih jedinki su se znatno oporavile. Oko 50% tretiranih životinja ima nove pupove, a kontrolne životinje 10%. Četvrtog dana samo manji broj životinja drži se podloge. Lovke matičnih jedinki su se oporavile pa su sada normalne duljine. Kod 15% hidri mogu se uočiti pupovi i u stopalnom dijelu. Deformacije tretiranih životinja petog dana još su uočljivije, a javljaju se u 30% slučajeva. Neke od tih hidra imaju dva hipostoma, rašljaste lovke te pupove koji se nisu odvojili od matičnih jedinki, a na njima su nastajali novi pupovi. Tako spojeni ostali su do kraja praćenja pokusa. U ovoj skupini životinja ukupan broj novonastalih pupova u toku pokusa bio je podjednak kao u kontroli.

Citološko-histološke promjene hidra tretiranih s 1 ml SPI 77 u 250 ml vode

Hidre bez pupa i hidre s jednim pupom pokazivale su slične citološko-histološke promjene iako su hidre s pupom bile neznatno otpornije. Neposredno poslije tretiranja bačvast oblik hidra koji se primjećivao stereomikroskopom, odrazio se i u citološkoj slici. Pokazalo se da je na svim mjestima ektodermalni i gastrodermalni sloj tanji nego na preparatima kontrolnih životinja. Na pojedinim mjestima ektoderm je oštećen. Primjećuje se da su na pojedinim mjestima vanjske membrane pojedinih stanica ektoderma također uništene (slika 1 i 2). U ektodermu nema intersticijalnih stanica u grozdovima, a broj knida i knidoblasta je smanjen. Ektodermalni sloj građen je uglavnom od mioepitelnih stanica između kojih se nađe pokoja intersticijalna stanica, te pokoja knida i knidoblast. U gastrodermu nalazimo bazofilna bezstrukturna tjelešca. Broj knida i knidoblasta u gastrodermu je veći nego u kontrole. Broj zimogenih stanica također je smanjen u odnosu na kontrolu. To je naročito uočljivo u hidra bez pupa. Gotovo sve zimogene stanice promjenile su oblik i položaj. One su smještene po cijelom gastrodermu, poprimile su okrugao oblik pa su slične mukoznim stanicama (slika 1 i 2). U gastralnoj šupljini ima mnogo slobodnih stanica, a među njima su brojne knide i knidoblasti. Mukozne stanice se ne razlikuju od takvih stanica u kontrole. Dru-

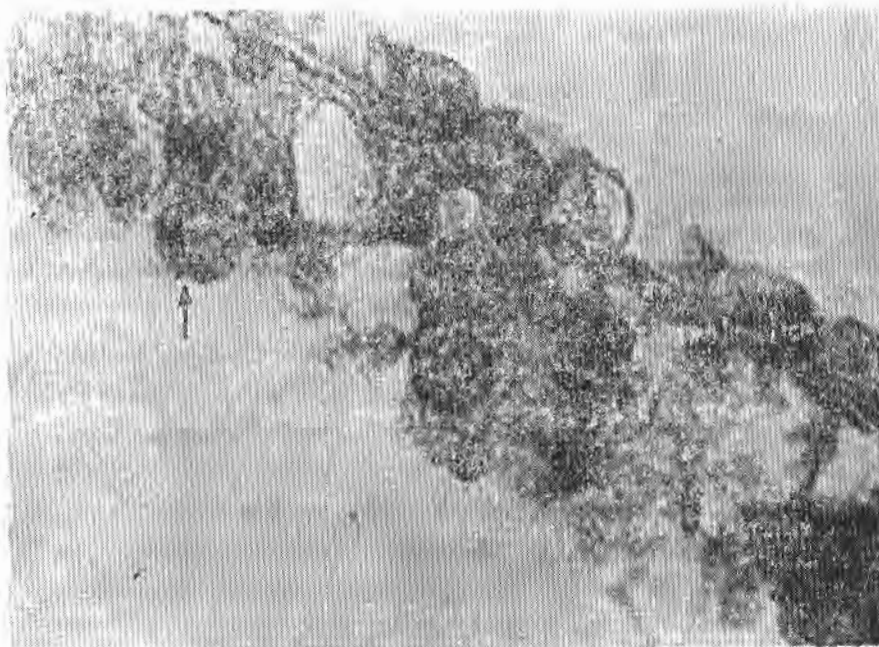




Slika 1. — Hidre bez pupa tretirane 24 sata s 1 ml SPI 77 u 250 ml vode, prvog dana nakon tretiranja. Oštećen je površinski ektodermalni sloj. Broj intersticijalnih stanica, knida i knidoblasta je smanjen. U gastrodermu susrećemo knide i knidoblaste (strelica). Zimogene stanice su također promjenjene (dvije strelice). (Toluidin, 16x2x3,2).

Fig. 1. — Budless hydras treated for 24 hours with 1 ml SPI 77 in 250 ml water, on the first day after treatment. Surface ectodermal layer is damaged. In the ectoderm the number of interstitial cells, cnids and cnidoblasts is reduced. In the gastroderm there are cnids and cnidoblasts (arrow). Zymogen cells are also changed (two arrows). (Toluidine, 16x2x3,2).

gog dana iza tretiranja stanični slojevi su nešto deblji nego prošlog dana. U ektodermu i gastrodermu se uočavaju slične citološko-histološke promjene kao i prošlog dana (slika 3). Jedino se primjećuje veći broj gastrodermalnih intersticijalnih stanica, dediferenciranih zimogenih stanica. Trećeg dana citološko-histološka slika se znatno ne razlikuje u odnosu na prošle dane. Sve membrane epitelnih stanica ektoderma su se uglavnom oporavile (slika 4). U ektodermu se nalazi pokoja intersticijalna stanica, a broj knida i knidoblasta je izrazito manji nego u kontrole. U gastrodermu kao i drugog dana nakon tretiranja ima više gastrodermalnih intersticijalnih stanica nego u kontrole. Sedam dana poslije postavljanja pokusa ektoderm i gastroderm slični su ektodermu



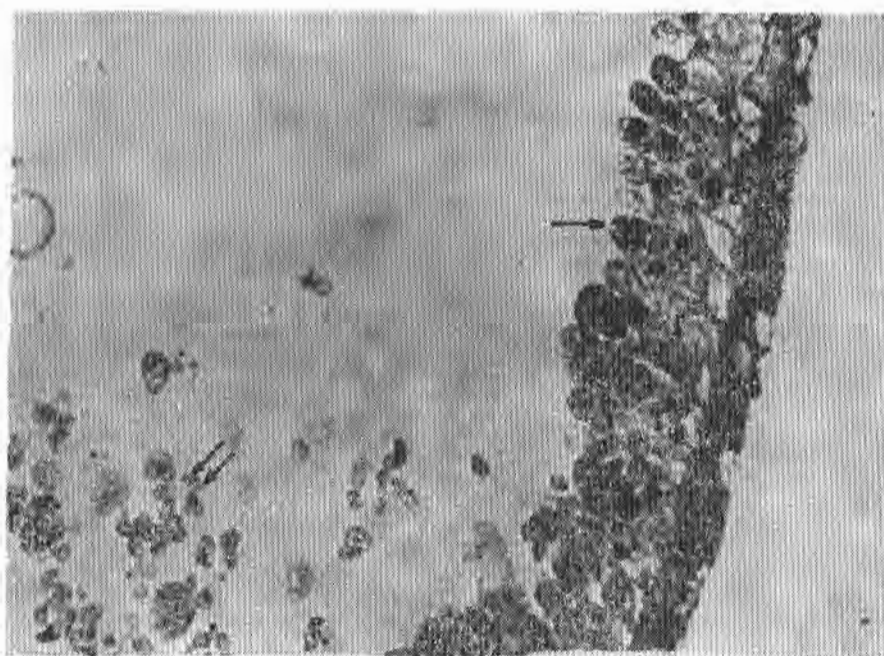
Slika 2. — Hidre bez pupa tretirane 24 sata s 1 ml SPI 77 u 250 ml vode, prvog dana nakon tretiranja. Zimogene stanice su smještene po cijelom gastrodermu. Okruglog su oblika s velikim granulama (strelica). (Toluidin, 40x2x3,2).

Fig. 2. — Budless hydras treated for 24 hours with 1 ml SPI 77 in 250 ml water, on the first day after treatment. Zymogen cells are found all over the gastroderm. They are round-shaped with big granules (arrow). (Toluidine, 40x2x3,2).

i gastrodermu kontrolnih životinja. U ektodermu samo na pojedinim mjestima manjkaju intersticijalne stanice. U gastodermu, također na pojedinim mjestima smanjen je broj zimogenih stanica, a pokoje od njih su još uvijek promjenjene.

Citološko-histološke promjene hidra tretiranih s 1 ml SPI 77 u 300 ml vode

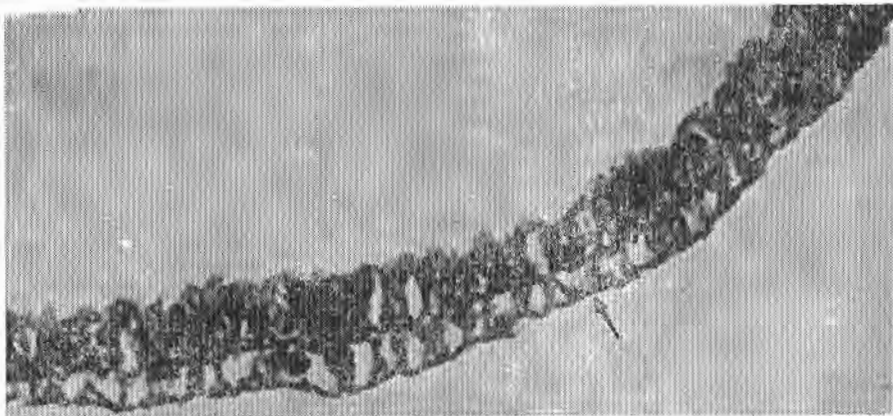
Neposredno poslije tretiranja i u ovoj koncentraciji manji broj životinja ima bačvast oblik, pa su u tih životinja oba stanična sloja stanjena. Na mnogobrojnim mjestima manjka površinski mukozni sloj. U ektodermu nema velikih grozdova intersticijalnih stanica. Tih je stanica manje i pojedinačno su razasute po ektodermu. Knidoblasta i knida je znatno manje nego u kontrole. U gastralnoj šupljini su mnogobrojne velike bestrukturane stanice, te



Slika 3. — Hidre s jednim pupom tretirane 24 sata s 1 ml SPI 77 u 250 ml vode, drugog dana nakon tretiranja. Broj intersticijalnih stanica, knida i knidoblasta je smanjen. U gastrodermu su promijenjene zimogene stanice (strelica). Gastralna šupljina je ispunjena slobodnim stanicama (dvije strelice). (Toluidin, 16x2x3,2).

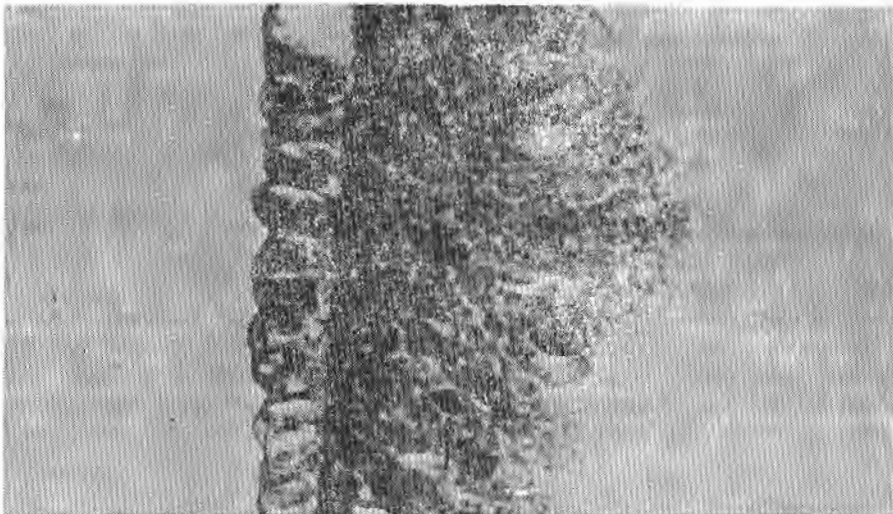
Fig. 3. — Hydras with one bud treated for 24 hours with 1 ml SPI 77 in 250 ml water, on the second day after treatment. In the ectoderm the number of interstitial cells as well as cnids and cnidoblasts is reduced. In the gastroderm zymogen cells are changed (arrow). The gastral cavity is filled with free cells (two arrows). (Toluidine, 16x2x3,2).

knide i knidoblasti. Broj zimogenih stanica je vidljivo smanjen, a mnoge od njih promijenile su oblik i položaj. Smještene su duboko u gastrodermu, okruglog su oblika s brojnim svijetlim granulama, te liče na mukozne stanice. U gastrodermu se nalazi više knidiblasta i knida nego u kontroli, a prisutna su i bezstrukturna bazofilna tjelešca, kojih u kontroli nema. Drugog dana nakon tretiranja citološko-histološka slika tretiranih životinja se nije bitnije mijenjala. Broj intersticijalnih stanica te broj knida i knidoblasta je još uvijek znatno manji. U gastrodermu je manje zimogenih stanica. Gotovo sve su promijenjenog oblika i položaja. Razasute su po cijelom gastrodermu. Neke od njih su okruglog oblika s velikim svijetlim granulama, slične mukoznim stanicama.



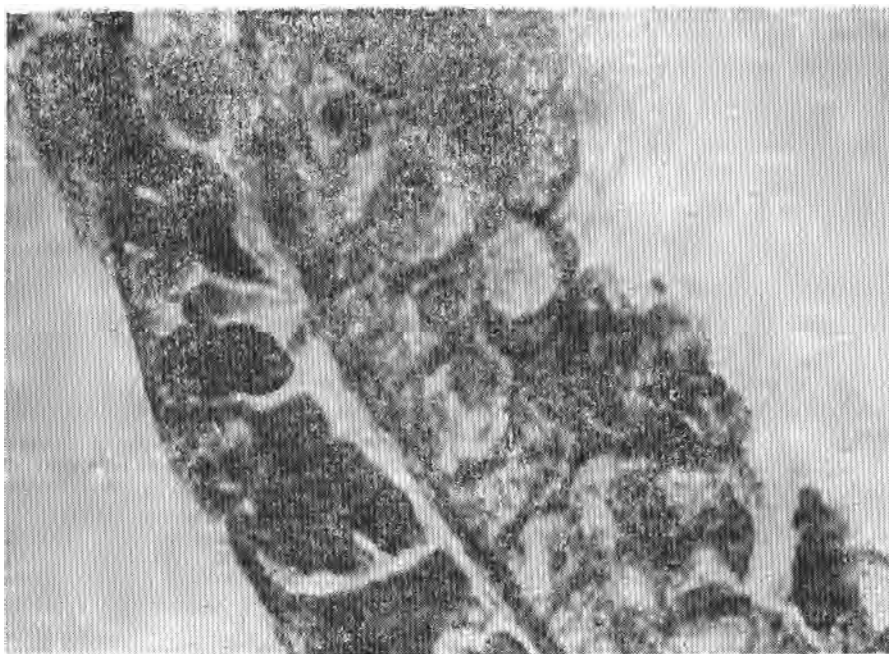
Slika 4. — Hidre bez pupa tretirane 24 sata s 1 ml SPI 77 u 250 ml vode, trećeg dana nakon tretiranja. Membrane mioepitelnih stanica ektoderma su gotovo oporavljene (strelica). Broj intersticijalnih stanica, te knida i knidoblasta je očito smanjen u odnosu na kontrolu. (Toluidin, 16x2x3,2).

Fig. 4. — Budless hydras treated for 24 hours with 1 ml SPI 77 in 250 ml water, on the third day after treatment. The membranes of myoepithelial cells of the ectoderm almost recovered (arrow). The number of interstitial cells as well as of cnids and cnidoblasts is evidently reduced in relation to the control. (Toluidine, 16x2x3,2).



Slika 5. — Hidre bez pupa tretirane 24 sata s 1 ml SPI 77 u 300 ml vode, drugog dana nakon tretiranja. U ektodermu su intersticijalne stanice, knide i knidoblasti rijetki. U gastrodermu su promjenjene zimogene stanice (strelica) (Toluidin, 16x2x3,2).

Fig. 5. — Budless hydras treated for 24 hours with 1 ml SPI 77 in 300 ml water, on the second day after treatment. In the ectoderm interstitial cells, cnids and cnidoblasts are scarce. In gastroderm zymogen cells are changed (arrow). (Toluidine, 16x2x3,2).



Slika 6. — Hidre bez pupa tretirane 24 sata s 1 ml SPI 77 u 300 ml vode, sedam dana nakon tretiranja. Citoško-histološka građa tretiranih hidri slična je kontrolnim životinjama. (Toluidin, 40x2x3,2).

Fig. 6. — Budless hydras treated for 24 hours with 1 ml SPI 77 in 300 ml water, on the seventh day after treatment. Cytohistological structure of the hydras treated is similar to the control animals. (Toluidine, 40x2x3,2).

Neke su izgubile vakuolizirani apikalni dio te sliče gastrodermalnim intersticijskim stanicama (slika 5). Trećeg dana iza tretiranja u ektodermu ima više slobodnih intersticijskih stanica nego proteklog dana. Knide i knidoblasti su rijetki. U gastrodermu se uočavaju slične promjene kao prošlih dana, samo ima više gastrodermalnih intersticijskih stanica nego ranije. Sedmog dana nakon tretiranja ektoderm je sličan kontroli (slika 6). U gastrodermu se još uvijek nađu pojedine promijenjene zimogene stanice.

Diskusija

Istraživajući djelovanje derivata citostatika SPI na karcinomatозne stanice štakora *in vivo* (Lombart i Lombart 1964) ustanovili su da se ritam mitoze usporava, kasnije se ubrzava a potom ponovo opada. Citostatik SPI 77 u ispitivanim koncentracijama na tijelu hidre izaziva u oba pokusa morfološke i citološke promjene koje su naročito izražene u prvim danima poslije

tretiranja. Neposredno nakon tretiranja životinje poprimaju bačvast oblik. Takav oblik zadržavaju prva tri dana nakon tretiranja, a nakon toga napuhnutost postepeno nestaje i životinje poprimaju normalan oblik. U jačoj koncentraciji citostatik uzrokuje veća oštećenja i smrtnost u 10% hidra. Stječe se dojam da citostatik SPI 77 djeluje uglavnom na uzdužne miofibrile mioepitelnih stanica hidre pa se tom prilikom kontrahiraju pa životinja dobija kuglast oblik. Djelovanje je prolazno, jer se citostatik postepeno gubi iz tijela. Mišićne fibrile se tada relaksiraju i tijelo hidre dobiva normalan oblik. Može se pretpostaviti i to da se citostatik SPI 77 vrlo brzo veže na pojedine stanične strukture, te stanice postaju osmotski aktivnije, pa intenzivni prodor vode u tijelo hidre izaziva napuhnutost.

Istraživanjima na hidri (Žnidarić i Lui 1969, Lui i Žnidarić 1976, te Žnidarić et al. 1980) utvrdili su eliminatorno djelovanje pojedinih citostatika na intersticijalne stanice ektoderma. Diferencijacija postojećih intersticijalnih stanica nije narušena, iako citostatici djeluju na mitozu stanica (Piero 1961, Whitson 1965, Ansevin i Wimberly 1969, Weitlauf 1974). Ako je kočenje diobe intersticijalnih stanica dugotrajno posljedica toga je smanjenje broja knida i knidoblasta, što je u ovim pokusima naročito izraženo drugog i trećeg dana nakon tretiranja. Međutim očito je i direktno djelovanje citostatika SPI 77 na knide i knidoblaste, jer ih je već prvog dana nakon tretiranja u ektodermu manje. Oni se nalaze u povećanom broju u gastrodermu, a osim toga čine najveći postotak slobodnih stanica u gastronalnoj šupljini.

Mioepitelne stanice ektoderma i gastroderma nisu se bitnije promijenile pod utjecajem ovog citostatika osim što su uslijed kontrakcije fibrila postale plosnatije u prvim danima poslije tretiranja.

U gastrodermu se u prvim danima poslije tretiranja smanjuje broj zimogenih stanica, dok se broj mukoznih stanica znatno ne mijenja. Naročito trećeg dana poslije tretiranja uočava se povećan broj gastrodermalnih intersticijalnih stanica. To vodi k zaključku da su se zimogene stanice dediferencirale u gastrodermalne intersticijalne stanice, koje mogu migrirati i prelaziti u ektoderm i ondje se diferencirati u ektodermalne stanice. Nakon trećeg dana inhibicija mitoze izazvana citostatikom je postepeno prestala. Zimogene stanice su se normalno dijelile i dediferencirale u gastrodermalne intersticijalne stanice, koje su svojom migracijom u ektoderm potpuno nadoknadile intersticijalne stanice koje su se zatim normalno diferencirale u knide i knidoblaste. Sedmog dana postiže se gotovo normalna citološko-histološka slika tretiranih životinja.

Broj novonastalih pupova u toku pokusa u tretiranih i kontrolnih životinja bio je podjednak, što navodi na zaključak da djelovanje citostatika SPI 77 na mitozu stanica nije utjecalo na proces pupanja.

Zaključci

Hydra vulgaris s pupom i bez pupa tretirana je s citostatikom SPI 77 koji izaziva izrazite morfološke i citološke promjene u prva tri dana nakon tretiranja. U ektodemu se uočava gubitak intersticijalnih stanica, te smanjenje broja knida i knidoblasta kojih u gastrodermu ima više u odnosu na kontrolu. Osim toga u gastralnoj šupljini najveći dio slobodnih stanica čine upravo knide i knidoblasti. Zimogene stanice u gastrodermu se diferenciraju u mukozne stanice, a primjećena je njihova povećana dediferencijacija u gastrodermalne intersticijalne stanice, koje prelaze u ektoderm i tu se diferenciraju u druge tipove stanica. Sedmog dana nakon tretiranja hidre su morfološki i citološko-histološki gotovo oporavljene.

Prilikom tretiranja hidri s ovim citostatikom nakon regeneracije utvrđeno je i do 50% deformiranih oblika. Hidre koje su bile normalnog oblika nakon regeneracije normalno su se ponašale i razmnožavale kao i kontrolne životinje.

LITERATURA

- Ansevin, K. D. and Wimberly, M. A. (1969): Modification of regeneration in *Dugesia tigrina* by actinomycine D. *J. Exp. Zool.* 172:349-462.
- Diehl, F. A. and Burnett, A. L. (1964): The role of interstitial cells in the maintenance of *Hydra*. I. specific destruction of interstitial cells in normal, asexual, non budding animals, *J. Exp. Zool.* 115:253-260.
- Diehl, F. A. and Burnett, A. L. (1965): The role of interstitial cells in the maintenance of *Hydra*. III. Regeneration of hypostome and tentacles, *J. Exp. Zool.* 158:299-318.
- Llombart, A. y Llombart, A. Jr. (1964): Trastornos inducidos en el ritmo divisional y en la morfología de la mitosis por los derivados podofilínicos SPI y LH-22B en el carcinoma ascítico de Ehrlich. Symposium sobre mitosis e inhibidores en la quimioterapia oncologica, Madrid.
- Lui, A. and Žnidarić, D. (1976): Effects of dactinomycin (actinomycin D) on budless *Hydra* and during its budding process, *Z. mikrosk. -anat. Forsch.* 90:261-272.
- Müller, W. (1967): Differenzierungs potenzen und Geschlechtsstabilität der I-Zellen von *Hydractinia echinata*, *Roux' Arch.*, 159:412-432.
- Piero, L. J. (1961): Teratogenic action of actinomycine D in the embryonic chick. II. Early development. *J. Exp. Zool.* 148:241-250.

- Žnidarić, D. and Lui, A. (1969): Dedifferentiation of gland cells in *Hydra* and further development of interstitial cells arising from them, *Wilhelm Roux' Arch.* 162:374-383.
- Žnidarić, D. and Lui, A. (1978): Regeneration of proximal and distal part of *Hydra* body cut in the middle of gastral cavity and treated with Dactinomycine, *Z. mikrosk. -anat. Forsch.* 91:369-377.
- Žnidarić, D. Lui, A. and Kalafatić, M. (1980): Elimination of Zymogen cells and their Derivates in *Hydra*, *Z. mikrosk. -anat. Forsch.* 94:179-187.
- Weitlauf, H. M. (1974): Effect of actinomycine D on protein synthesis by delayed implanting mouse embryos in vitro, *J. Exp. Zool.* 189:197-202.
- Whitson, G. L. (1965): The effects of actinomycin D and ribonuclease on oral regeneration in *Stentor coeruleus*, *J. Exp. Zool.* 160:207-214.

EFFECTS OF CYTOSTATIC SPI 77 UPON HYDRA (CNIDARIA)

Mirjana Kalafatić, Danica Žnidarić and Ante Lui
Institute of Zoology, University of Zagreb, Yugoslavia

Summary

A research on the effects of the cytostatic SPI 77 (podophilin acid — acetilhydrazid, Sandoz) upon *Hydra vulgaris* has been done. Hydras were treated for 24 hours with two different concentrations: 1 ml SPI 77 in 250 ml water and 1 ml SPI 77 in 300 ml water. Morphological changes on animal bodies were observed daily by means of a stereomicroscope. Due to the effects of the cytostatic the hydras became like inflated barrels. Their tentacles got shortened and thickened at the ends. In a smaller number of treated hydras the damage of the hypostome and the mortality are evident. The damaged parts regenerate after several days but many of the hydras become deformed (teratomes).

Cyto-histological structure also changed. During the first days after treatment both cell layers are thin. The outer wall of the ectoderm is damaged. Interstitial cells, cnids and cnidoblasts of the ectoderm are missing. Mature cnids are very numerous in the gastroderm and gastral cavity both as free cells and united with other cells. In the gastroderm the number of zymogen cells is reduced. Their position and structure are changed. Some of the zymogen cells differentiate into mucous ones and others dedifferentiate into gastrodermal interstitial cells. Structural cell changes remain even after their morphological recovery. In distinction from some other cytostatics, SPI 77 acts immediately after treatment.