

***Wpływ zdeklastrowanego medium hodowlanego RPMIna
żywotność i zdolność proliferacji komórek nowotworowych układu
hematopoetycznego człowieka.***

Anna Och^{1,2}, Marek Och^{1,2}, Igor Elkin³, Zdzisław Oszczyda³, Janusz Kocki²,
Anna Bogucka-Kocka¹

1. Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, ul.
Chodźki 1 20-093 Lublin

2. Zakład Genetyki Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, ul. Radziwiłłowska 11,
20-080 Lublin

3. Nantes- Systemy Nanotechnologii Sp. z o.o., ul. Dolne Młyny 21, 59-700 Bolesławiec

Streszczenie

Celem pracy była ocena wpływu zdeklastrowanego medium hodowlanego RPMI, na żywotność i potencjał proliferacyjny komórek nowotworowych ludzkiej ostrej białaczki T limfocytowej oraz szpiczaka. Analizę procesu apoptozy przeprowadzono z użyciem cytometru przepływowego Navios firmy Beckman Coulter. Dla siedmiu badanych białaczkowych linii komórkowych: HL-60, HL-60/MX1, HL-60/MX2, CCRF/CEM, CEM/C1, J45 oraz U266 zaobserwowano wzrost komórek w fazie apoptozy w wyniku prowadzenia hodowli w RPMI poddanemu wpływowi niskotemperaturowej plazmy, tzw. zdeklastrowane medium hodowlane RPMI.

Wstęp

Choroby nowotworowe stanowią obecnie jeden z największych problemów współczesnej medycyny. Terapia chorób nowotworowych opiera się głównie na radio- oraz chemioterapii. Skuteczność takiego postępowania jest wciąż mocno ograniczona i uzależniona od stopnia zaawansowania choroby. Bez względu na etap rozwoju nowotworu, chemioterapia jest zawsze bardzo toksyczna i wywołuje wiele ciężkich skutków ubocznych. Wśród głównych wymienić możemy - zmiany obrazu krwi, upośledzenie funkcji szpiku, wątroby czy całego układu moczowo-płciowego i inne. Ograniczona skuteczność i wysoka toksyczność leczenia chemicznego skłaniają do poszukiwania alternatywnego rozwiązania. Stąd nowym kierunkiem jest poszukiwanie terapii wykorzystującej zjawiska fizyczne zachodzące w organizmie.

Jednym z rozwiązań branych pod uwagę jest zastosowanie nanotechnologii. Nanotechnologia dotyczy sposobów otrzymywania zróżnicowanych struktur charakteryzujących się rozmiarami od 0,1 do 100 nanometrów. Oznacza to, że wielkość tych struktur jest na poziomie pojedynczych atomów i cząstek. Początek rozwoju nanotechnologii sięga lat 50-tych dwudziestego wieku. W naturze natomiast organizmy żywe od zawsze posiadały struktury kontrolowane na poziomie pojedynczych cząstek. Do takich struktur zaliczyć można przede wszystkim błony biologiczne, jak również strukturę kości, skóry oraz drewna. Światowy rozwój nanotechnologii doprowadził do łączenia tej technologii z medycyną.

Jedną z możliwości wprowadzenia nanotechnologii do leczenia jest wykorzystanie biologicznego wpływu wody na komórki żywego organizmu. Woda jest substancją wyjątkową pod względem fizyko-chemicznym – posiada właściwości odbiegające od przewidywanych dla związków o zbliżonej budowie. Jest jedyną substancją naturalnie występującą w trzech stanach skupienia na Ziemi. Przechodząc w stan stały rozszerza się - przeciwnie do innych cieczy. Jako jedyna znana substancja wykazuje maksimum gęstości w stanie ciekłym, a jej ciepło właściwe ma wartość minimalną w temperaturze ok. 37 °C. Co jednak najistotniejsze, ciekła woda absorbuje promieniowanie elektromagnetyczne, poza wąskim zakresem w obszarze światła widzialnego. Właściwości te są o tyle ważne, że woda

stanowi ok 70% masy ludzkiego organizmu. Zatem jej „jakość” decyduje o funkcjonowaniu całego ustroju na wszystkich poziomach jego działania.

W stworzeniu produktu o nazwie NANO-woda, firma NANTES wykorzystała zdolność wody do absorpcji promieniowania elektromagnetycznego, emitowanego strumieniem niskotemperaturowej plazmy. Woda poddana działaniu niskotemperaturowej plazmy posiada szereg właściwości odbiegających od właściwości standardowo występujących dla wody. Przyczyną tego zjawiska jest wielkość klastrow wody powstających w procesie wytwarzania NANO-wody, które są energetycznie stabilne i tracą zdolność tworzenia gigaklastrow. Pod wpływem niskiej energii oddziaływania jonów, atomy z nieliniowych oscylacji formują się w łańcuchy i wskutek tego cząsteczki stabilizują się w nowych miejscach. Prowadzi to do powstawania i rozwoju nowych metastabilnych grup molekularnych (nanoklastrow). W jednorodnych łańcuchach utworzone nanoklastry odpowiadają elementom "pamięci molekularnej". Krytyczna energia potrzebna do rozwoju samoorganizacji procesów jest mniejsza niż w przypadku nieliniowych łańcuchów molekularnych z już nabudowanymi klastrami. W przypadku nanoklastrow aktywna staje się strefa która określa dalsze procesy samoorganizacji. Powstają skupiska, które zapewniają nowe właściwości fizyczne i chemiczne kompleksów. Zmianie prawdopodobnie ulegają też wiązania wodorowe. W przypadku, gdy woda o zmienionych wiązaniach wodorowych wchodzi w struktury oparte na tych wiązaniach, jak np. DNA i inne kwasy nukleinowe czy białka, może ona wpływać na ich funkcje. Autorzy podjęli się próby oceny wpływu zdeklastrowanego medium hodowlanego RPMI na komórki nowotworowe wywodzące się z układu hematopoetycznego człowieka.

Cel pracy

Celem pracy była ocena wpływu zdeklastrowanego medium hodowlanego RPMI na żywotność i potencjał proliferacyjny komórek nowotworowych ludzkiej ostrej białaczki T limfocytowej oraz szpiczaka.

Materiały i metody

Eksperyment przeprowadzono dla siedmiuróżnych białaczkowych linii komórkowych wywodzących się z ludzkiego układu krwiotwórczego - HL-60, HL-60/MX1, HL-60/MX2, CCRF/CEM, CEM/C1, J45 oraz U266. Linie komórkowe zakupiono w firmie American Type Culture Collection (ATCC) 10801 University Boulevard Manassas, VA 20110 USA. Hodowle utrzymywano w medium hodowlanym RPMI 1640 z L-Glutaminą i NaHCO₃ (Biomed Lublin) oraz w tym samym medium poddanym działaniu niskotemperaturowej plazmy. Medium hodowlane uzupełniano surowicą bydlęcą Fetal Bovine Serum (ATCC 30-2020) do stężenia 10%, dla linii: HL-60/MX1, HL-60/MX2, CCRF/CEM, CEM/C1, J45, U266 oraz do stężenia 20% w przypadku linii HL-60. Stosowano dodatek amfoterycyny B, penicyliny i streptomycyny (ATCC) w ilości 500 mikrolitrów na każde 50 mililitrów pełnej pożywki. Linie zawieszone w medium hodowlanym inkubowano w atmosferze powietrza o stężeniu dwutlenku węgla 5% oraz temperaturze 37°C.

Żywotność hodowli oraz występowanie apoptozy oceniano metodą cytometrii przepływowej z użyciem cytometru przepływowego Navios firmy Beckman Coulter. Zastosowano test z aneksyną V znakowaną FITC oraz jodkiem propidyny (Roche, Switzerland). Liczebność hodowli oceniano za pomocą automatycznego licznika komórek Automatic Cell Counter T10 (Bio-Rad) metodą barwienia błękitem trypanem.

Część eksperymentalna

Linie hodowlań równoległe w pożywce standardowej i w pożywce poddanej działaniu niskotemperaturowej plazmy. Gęstość hodowli utrzymywano pomiędzy 10^5 a 10^6 żywych komórek na mililitr.

Celem przeprowadzenia pomiaru żywotności i oceny apoptozy pobierano jeden mililitr zawiesiny hodowli z każdej butelki do polietylenowych, jednorazowych ependorfów i wirowano 10 minut przy prędkości 800 obrotów na minutę. Następnie odciągano supernatant z nad osadu komórek. Komórki uzupełniano 1 ml PBS otrzymując zawiesinę komórek w PBS. Z tak przemytej zawiesiny komórek, pobierano 100 μ l roztworu i przenoszono do jednorazowych falkonów. Następnie dodawano uprzednio przygotowane r-ry aneksyny V (1 μ l) i jodku propidiiowego (5 μ l). Mieszaninę reakcyjną inkubowano 15 minut w temperaturze 4°C, w ciemnym miejscu. Po upływie tego czasu dodawano 400 μ l buforu dostarczonego z odczynnikami i dokonywano pomiaru. Pomiary wykonano po 0, 3, 6, 24 i 48 godzinach.

W celu przeprowadzenia oceny proliferacji mierzono liczebność komórek w teście z błękitem trypanu. Zawiesinę komórek (1 ml) pobierano z falkonów hodowlanych do polietylenowych, jednorazowych ependorfów i wirowano przez 10 minut przy prędkości 800 obrotów na minutę. Następnie odciągano supernatant z nad osadu komórek. Do pozostałych komórek dodawano 1 ml PBS i przemywano zawiesinę. Po odwirowaniu pobierano 10 μ l zawiesiny i dodawano 10 μ l roztworu błękitu trypanu. Całość inkubowano 2 minuty w temperaturze pokojowej. Następnie dokonywano pomiaru przy użyciu licznika Automated Cell Counter TC10 firmy Bio-Rad. Pomiary wykonywano po 0, 3, 6, 24 i 48 godzinach. Materiał pobierano równolegle.

Wyniki

Komórki wszystkich linii hodowane na podłożu standardowym nie wykazywały spadku żywotności ani spadku potencjału proliferacji. Przez cały czas trwania eksperymentu zachowały żywotność na poziomie 80-90%. Liczebność komórek na poziomie 10^5 - 10^6 żywych komórek na mililitr hodowli wskazywała na niezakłócony przebieg procesów życiowych badanych komórek (Rys.1- 11).

Komórki wszystkich linii hodowanych na podłożu poddanym działaniu niskotemperaturowej plazmy weszły na szlak apoptoz. Efekt był porównywalny dla wszystkich linii białaczki ostrej – HL60, HL-60/MX1, HL-60/MX2, CCRF/CEM, CEM/C1, J45 oraz szpiczakowej – U266. Pomiar z zastosowaniem cytometrii przepływowej wykazały przechodzenie komórek do śmierci na drodze apoptozy, poprzez fazę wczesnej apoptozy, po której następował etap późnej apoptozy. Po upływie 48 godzin żywotność każdej z linii zbliżała się do zera.

Pomiar liczebności komórek hodowanych na podłożu poddanym działaniu niskotemperaturowej plazmy potwierdził spadek żywotności komórek. Stwierdzono obniżenie gęstości komórek hodowanych na podłożu poddanym działaniu niskotemperaturowej plazmy. Po 24 godzinach liczność komórek wynosiła około 10^4 komórek na ml. Po 48 godzinach zakres liczby komórek wynosił poniżej 10^4 komórek na ml hodowli i był poza zasięgiem pomiarowym aparatu. Hodowla komórek w podłożu standardowym charakteryzowała się niezmienną gęstością, możliwą do pomiaru automatycznym licznikiem komórek w zakresie 10^5 - 10^6 żywych komórek na mililitr hodowli.

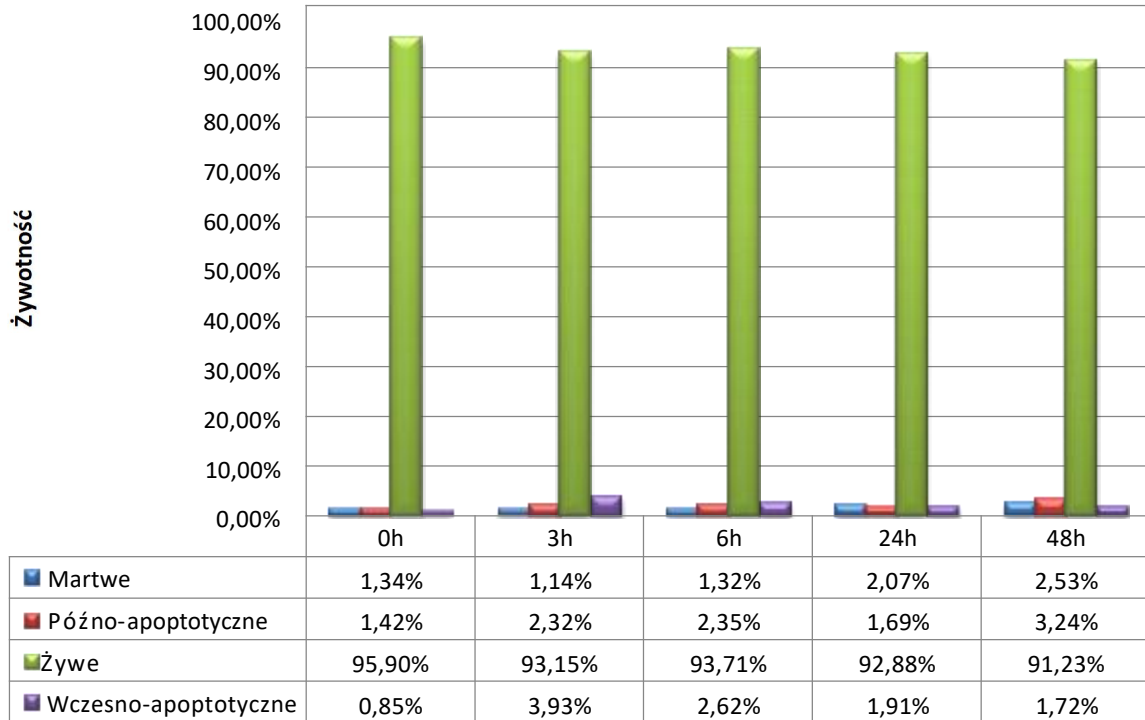
Wnioski:

Linie komórkowe hodowane na standardowym podłożu wykazywały prawidłową gęstość hodowli, co wskazuje na niezakłóconą proliferację komórek. Żywotność linii utrzymała się w trakcie trwania eksperymentu na poziomie 80-90%.

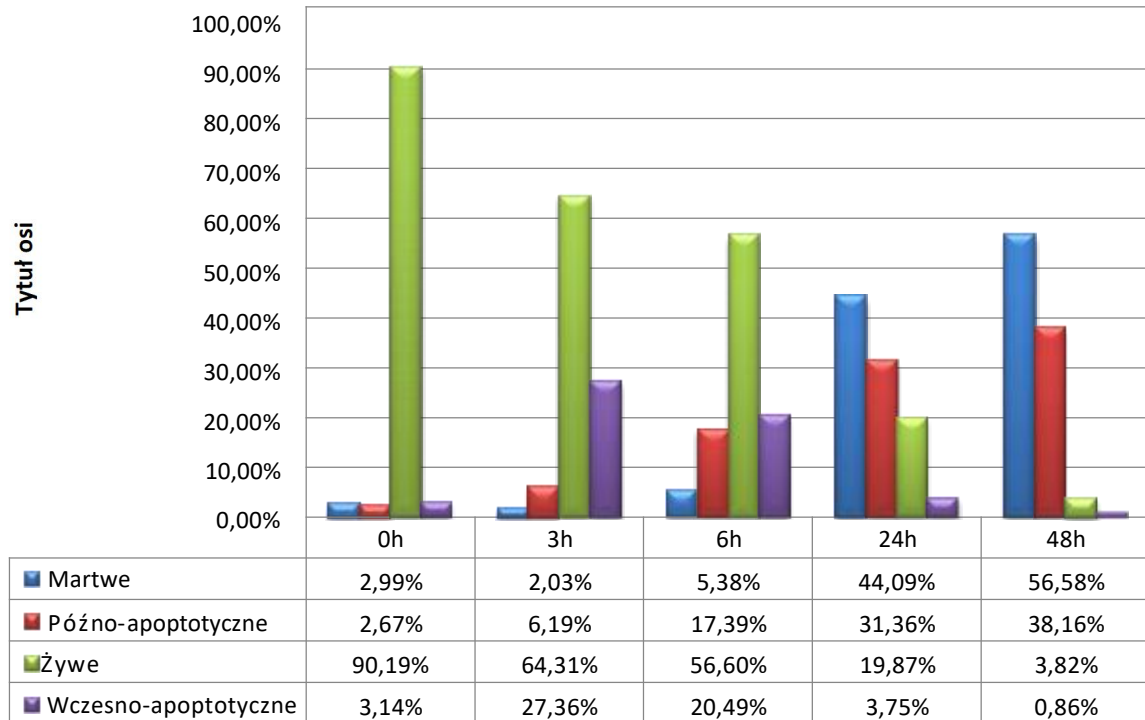
W hodowli komórek na podłożu poddanym działaniu niskotemperaturowej plazmy obserwowano spadek gęstości hodowli w miarę upływu czasu. Po 24 godzinach gęstość hodowli wynosiła ponad 10^4 komórek na ml. Po 48 godzinach zakres liczby komórek na ml hodowli wynosił poniżej 10^4 komórek na ml i był poza zasięgiem pomiarowym licznika. Wskazuje to na zahamowanie proliferacji komórek. Największy spadek żywotności zaobserwowano dla linii U266 i CCRF/CEM. Najwyższy procent przeżycia wykazały linie - HL60 i HL60/MX2.

Faza wczesnej apoptozy pojawiła się w większości przypadków pomiędzy 6 a 24 godziną eksperymentu. Po upływie 24 godzin procent komórek znajdujących się we wczesnej fazie apoptozy obniżył się, przy czym proporcjonalnie wzrastał procent komórek znajdujących się w fazie późnej apoptozy. Istotnym jest fakt, że nie zaobserwowano masowej nekrozy, a procent komórek martwych kształtował się na poziomie 20% dla linii: HL60, HL-60/MX1, HL-60/MX2, , CEM/C1 oraz J45. Dla linii U266 i CCRF/CEM na poziomie 60%. Poznanie i wyjaśnienie przyczyn oraz mechanizmów działania wody zdeklastrowanej na komórki nowotworowe wymaga wiele czasu i pracy. Fakt wpływu proapoptotycznego pożywki poddanej wpływowi plazmy stanowi przesłankę do dalszych badań. Wyniki eksperymentu pozwalają przypuszczać, że produkt firmy NATES mógłby znaleźć potencjalne zastosowanie w leczeniu białaczek oraz innych nowotworów.

Linia CCRF hodowlaw pożywcze standardowej

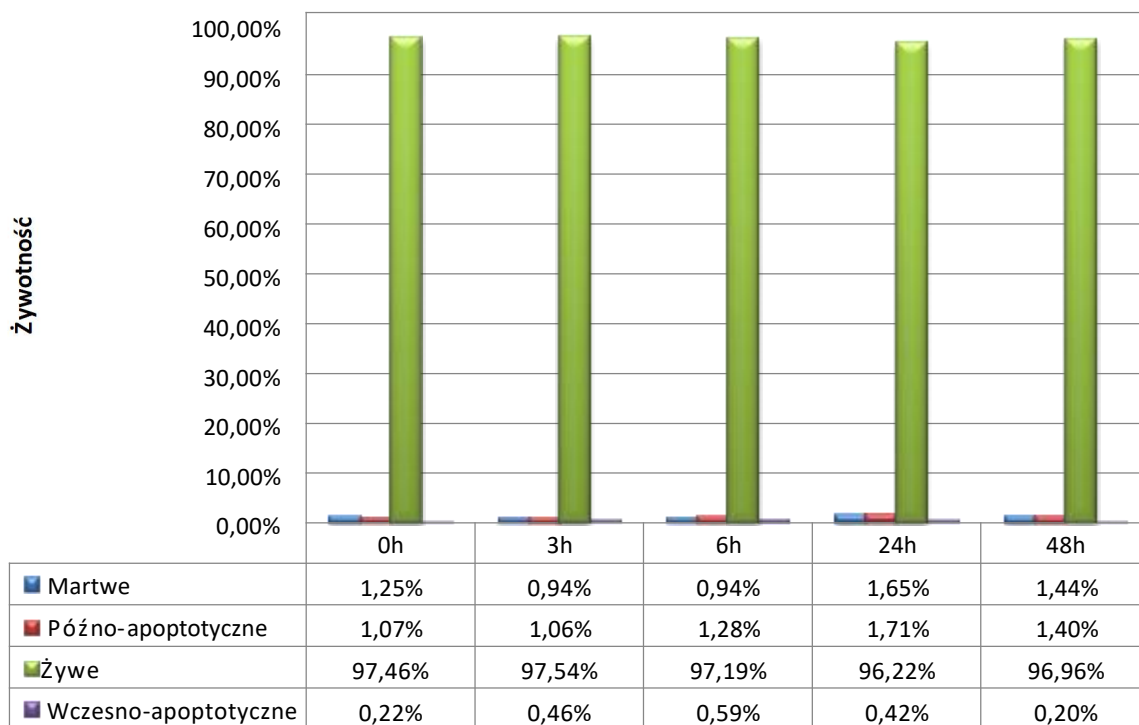


Linia CCRF hodowanaw NANO-medium

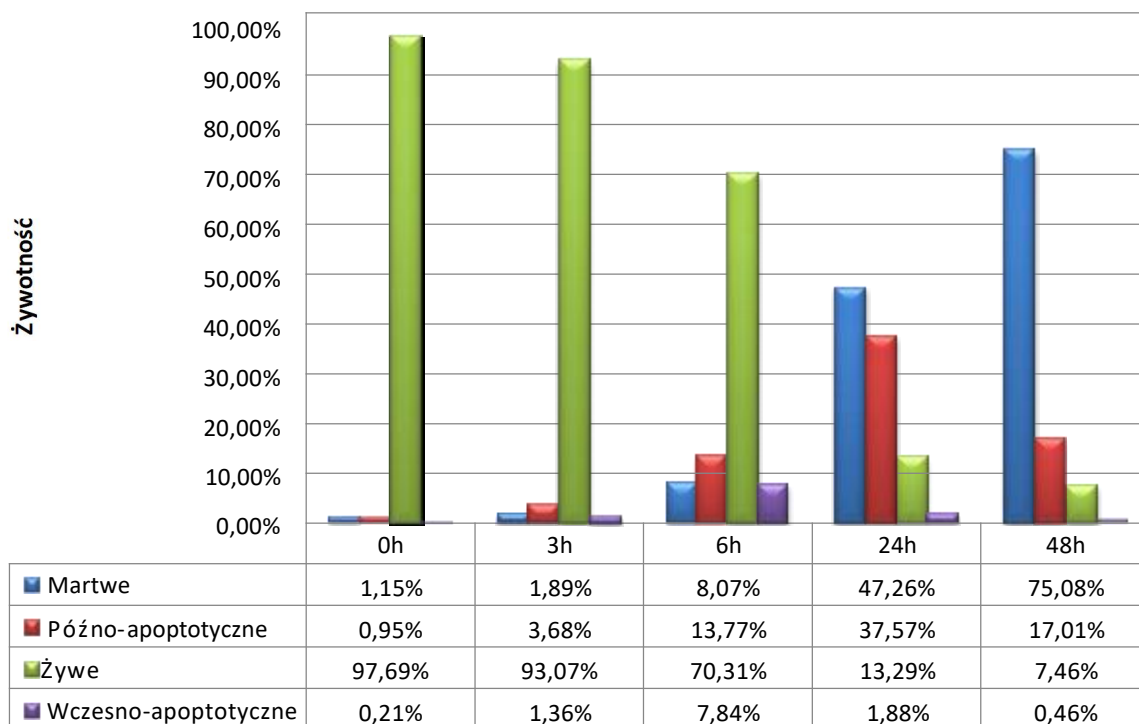


Rysunek 1. Porównanie przebiegu procesu apoptozy dla linii CCRF poddanej wpływowi NANO-medium.

Linia U266 hodowanaw pożywce standardowej

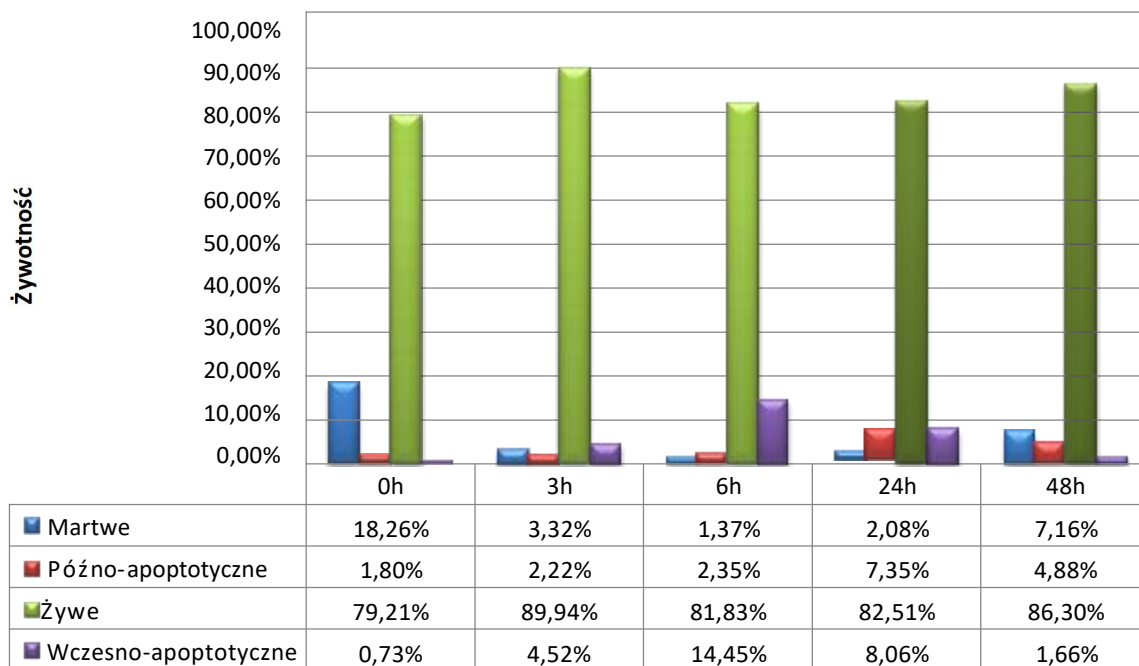


Linia U266 hodowanaw NANO-medium

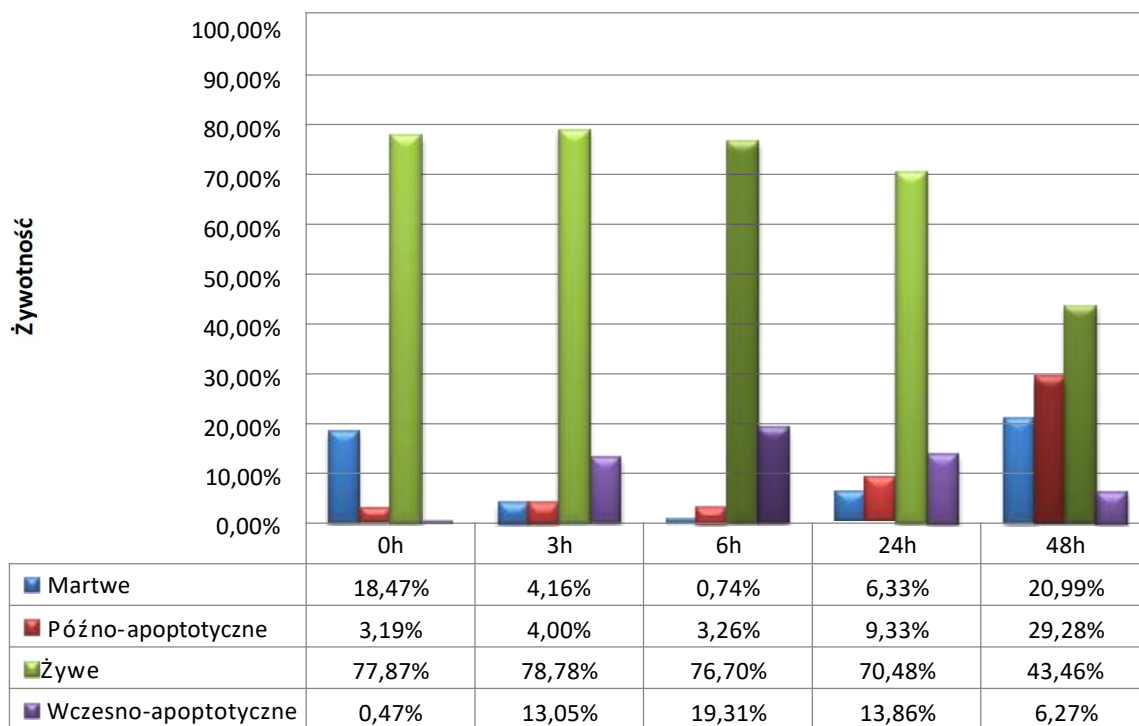


Rysunek 2. Porównanie przebiegu procesu apoptozy dla linii U266 poddanej wpływowi NANO-medium.

Linia HL60/MX1 hodowana w pożywce standardowej

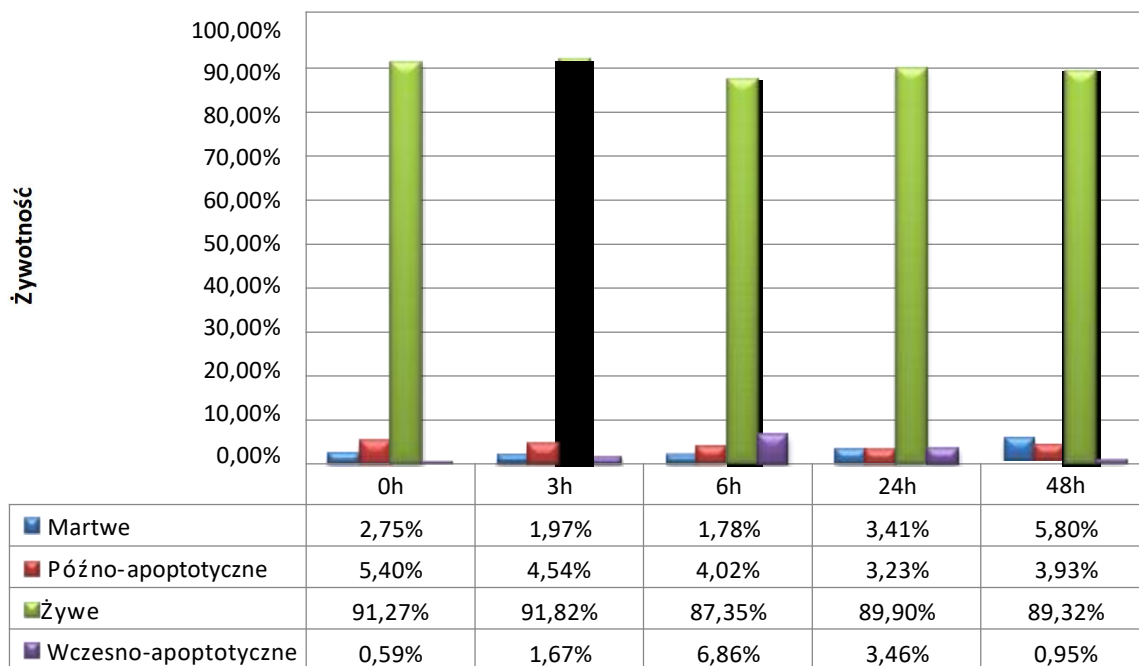


Linia HL60/MX1 hodowana w NANO-medium

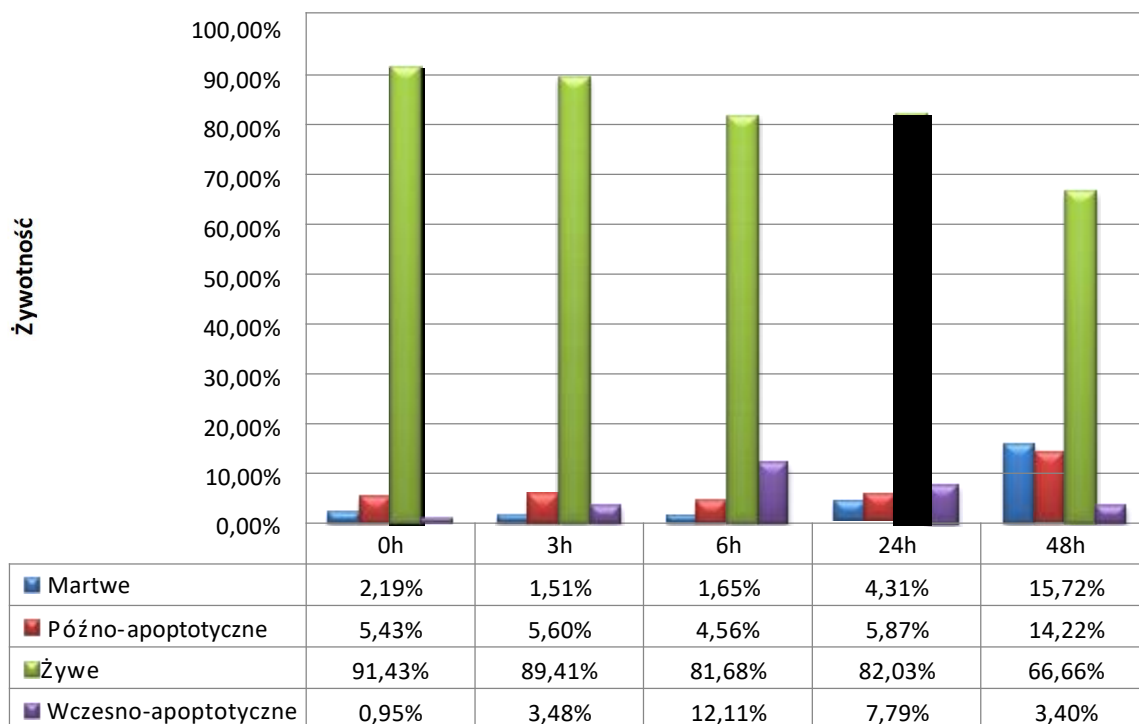


Rysunek 3. Porównanie przebiegu procesu apoptozy dla linii HL60/MX1 poddanej wpływowi NANO-medium.

Linia HL60/MX2 hodowana w pożywkach standardowej

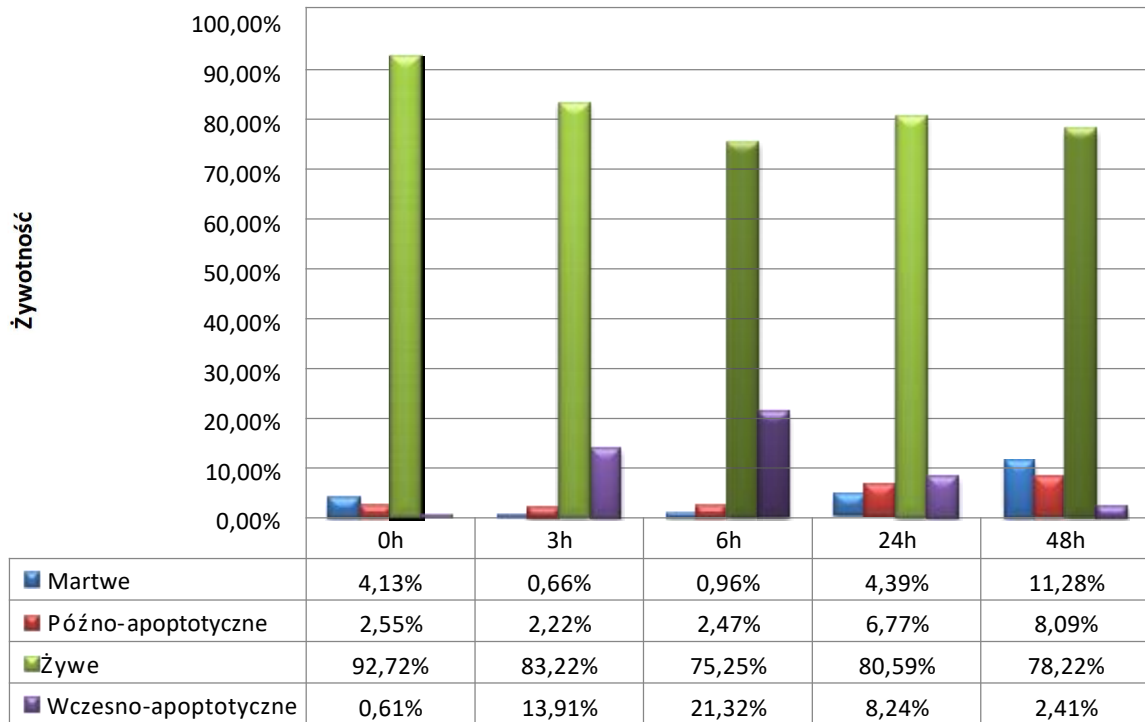


Linia HL60/MX2 hodowana w NANO-medium

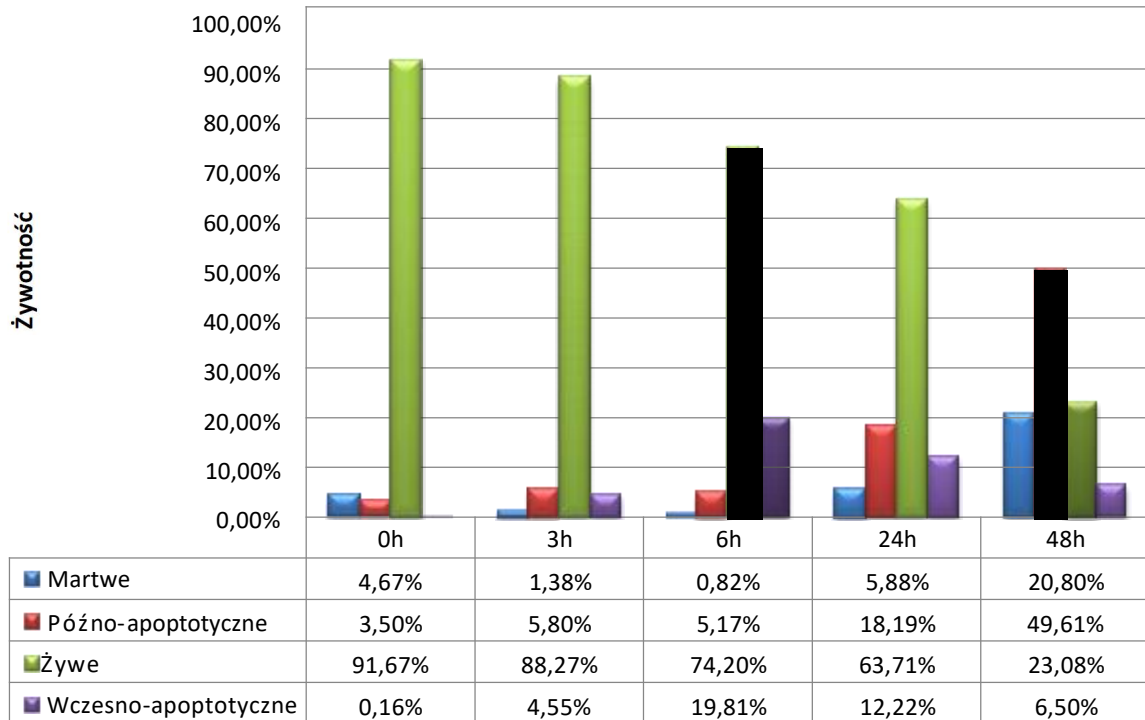


Rysunek 4. Porównanie przebiegu procesu apoptozy dla linii HL60/MX2 poddanej wpływowi NANO-medium.

Linia J45 hodowanaw pożywce standardowej

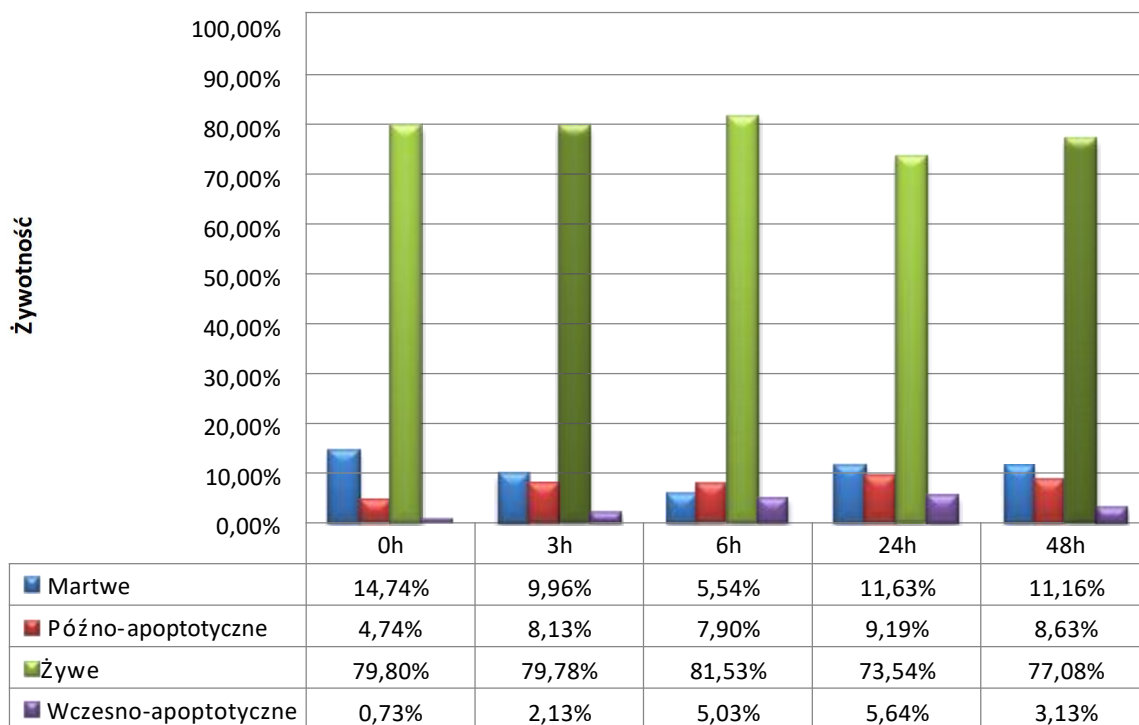


Linia J45 hodowanaw NANO-medium

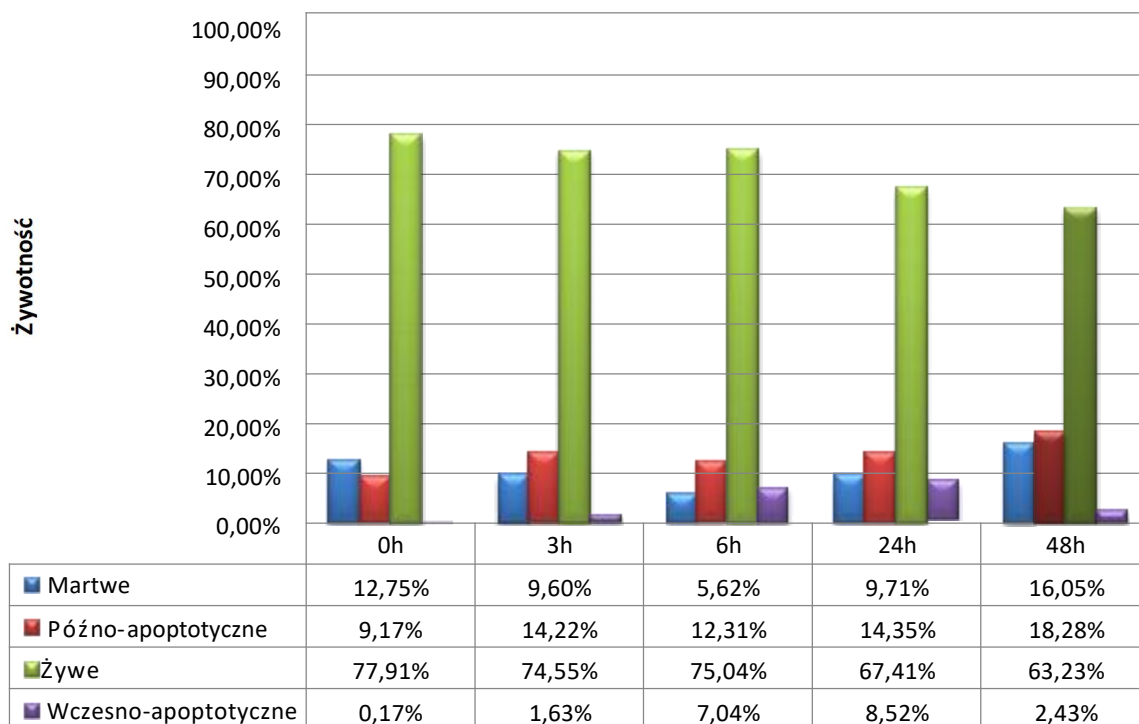


Rysunek 5. Porównanie przebiegu procesu apoptozy dla linii J45 poddanej wpływowi NANO-medium.

Linia HL60 hodowanaw pożywce standardowej

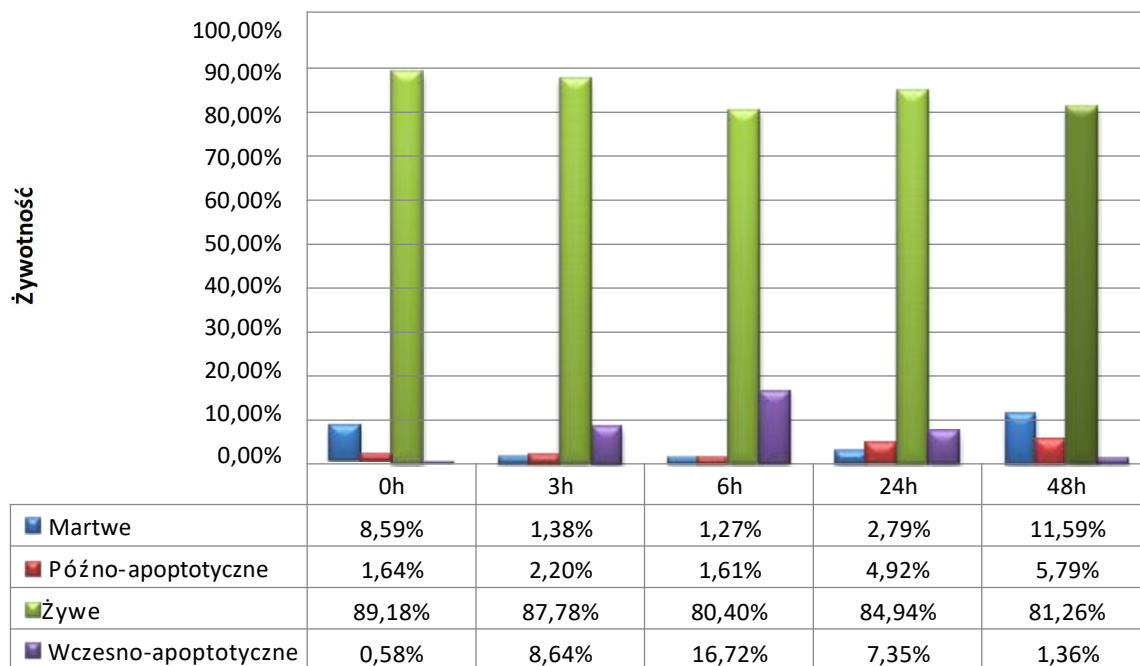


Linia HL60 hodowanaw NANO-medium

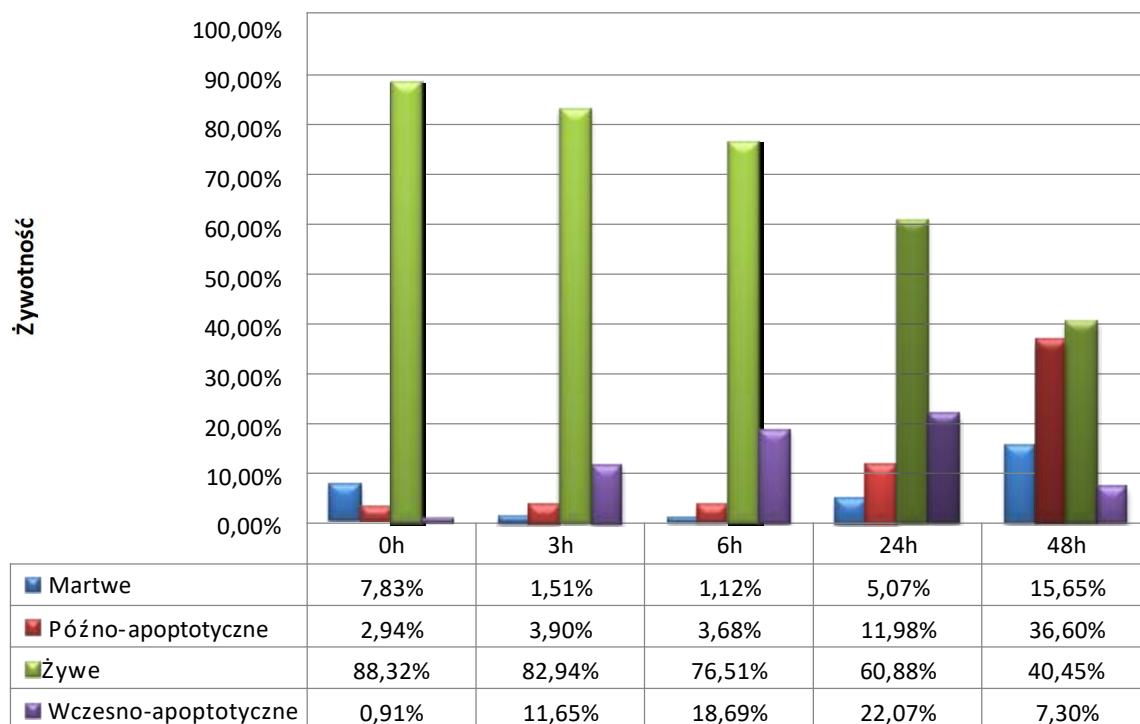


Rysunek 6. Porównanie przebiegu procesu apoptozy dla linii HL60 poddanej wpływowi NANO-medium.

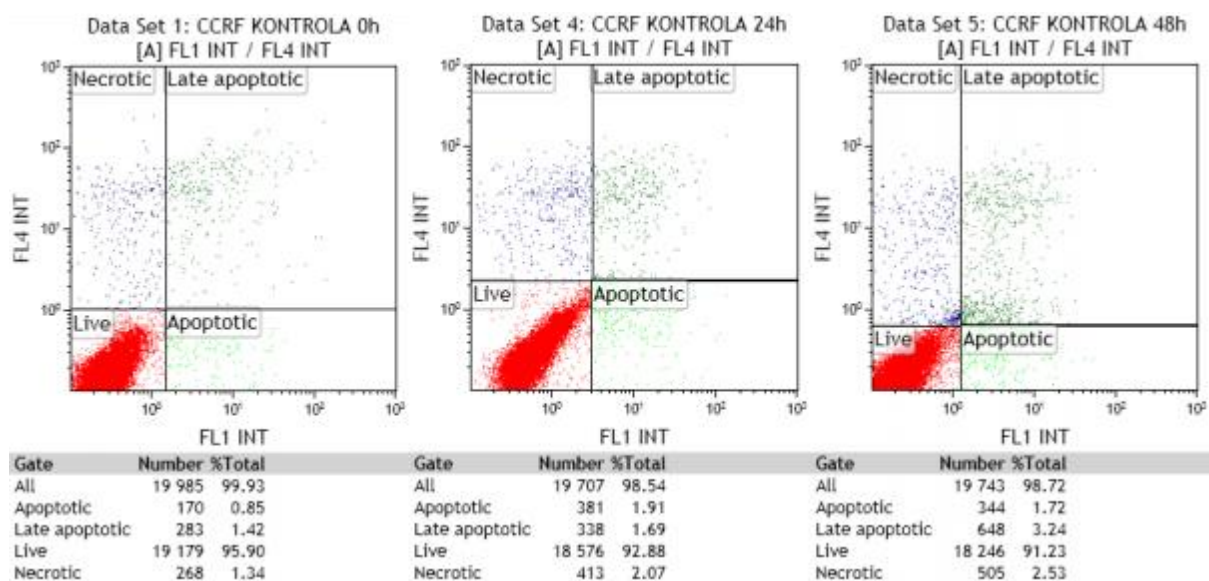
Linia CEM/C1 hodowanaw pożywcze standardowej



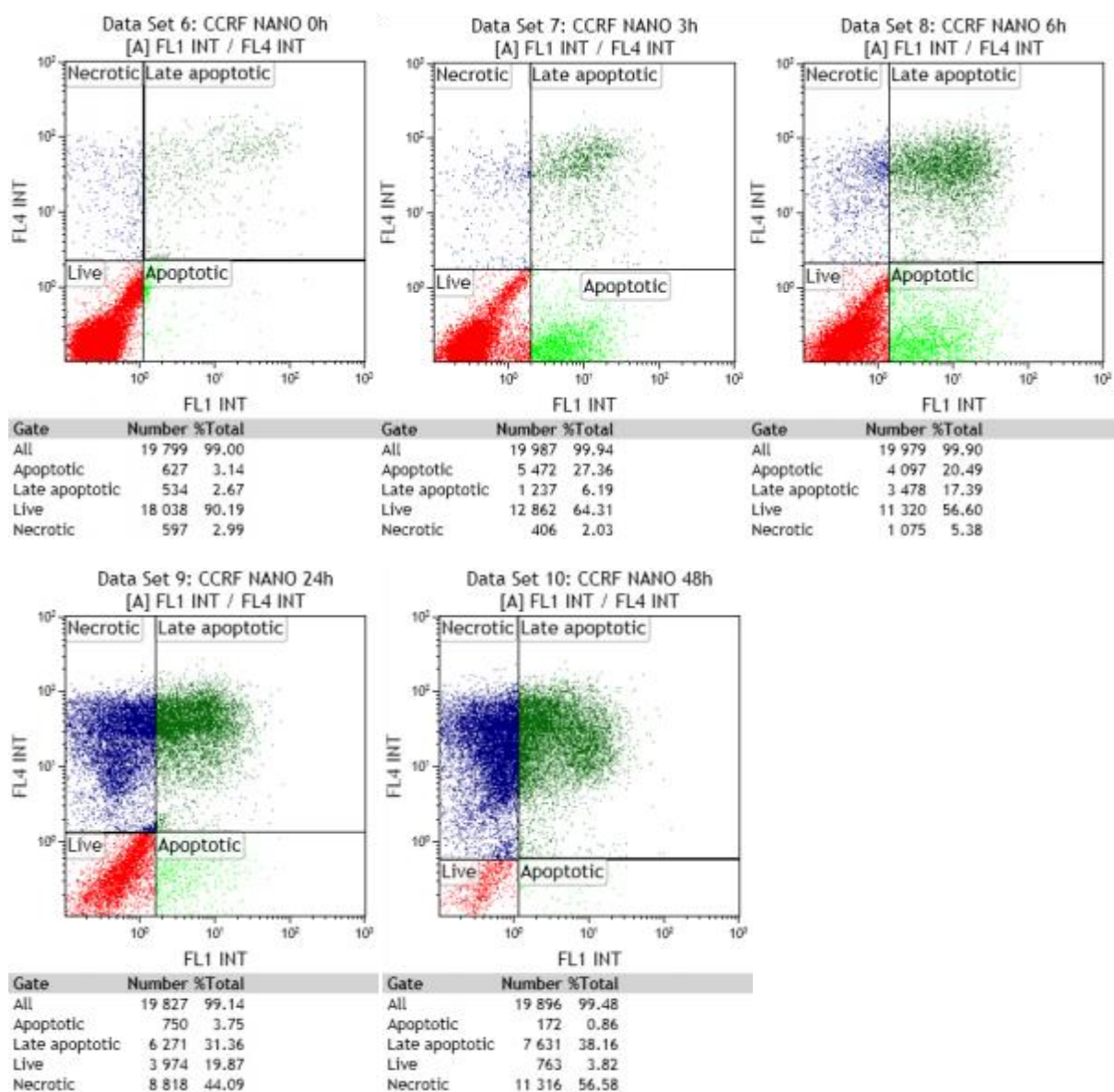
LiniaCEM/C1 hodowanaw NANO-medium



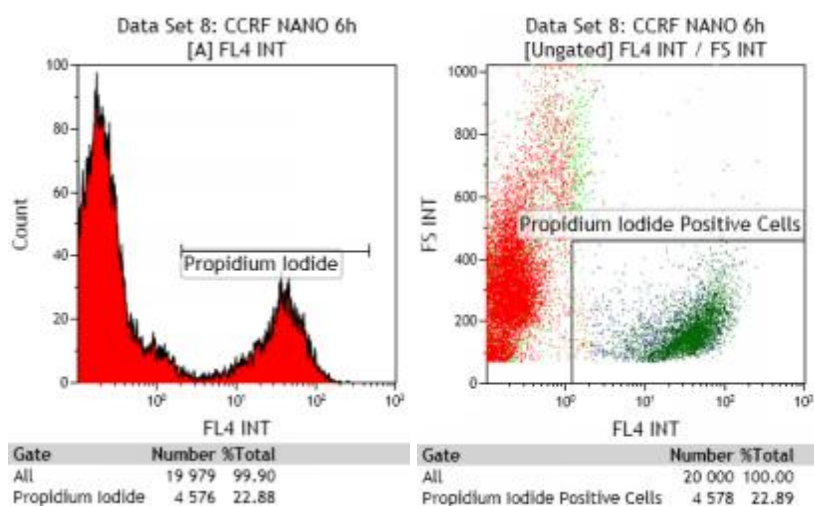
Rysunek 7. Porównanie przebiegu procesu apoptozy dla linii CEM/C1 poddanej wpływowi NANO-medium.



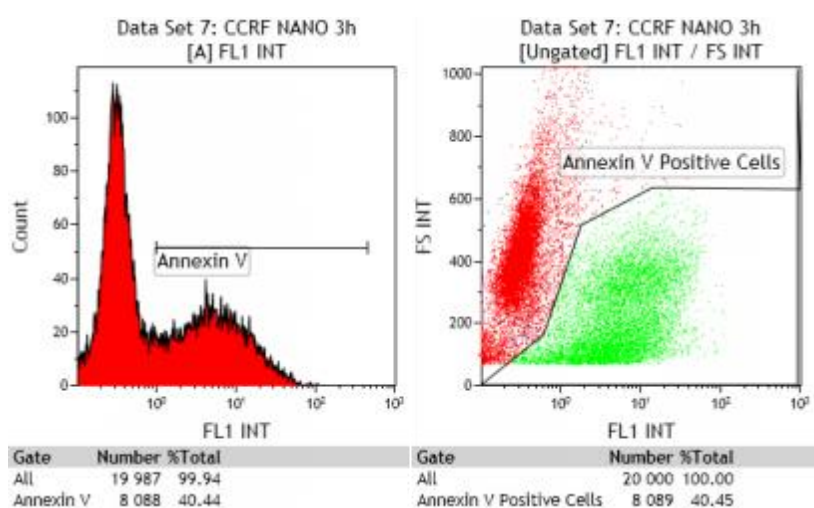
Rysunek 8. Zmiany żywotności linii CCRF hodowanej w kontrolnym medium hodowlanym RPMI, w odstępach czasowych: 0h, 24h oraz 48h.



Rysunek 9. Zmiany żywotności linii CCRF hodowanej w zdeklastrowanym medium hodowlanym RPMI, w odstępach czasowych: 0h, 3h, 6h, 24h oraz 48h.



Rysunek 10. Sygnał od jodku propidowego dla komórek martwych i późno apoptotycznych. Linia CCRF, zdeklastrowane medium hodowlane RPMI, czas: 6h.



Rysunek 11. Sygnał od aneksyny V dla komórek wczesno i późno apoptotycznych. Linia CCRF, zdeklastrowane medium hodowlane RPMI, czas: 3h.