

Sprawozdanie z wykonania projektu badawczego:

„ODDZIAŁYWANIE POLA MAGNETYCZNEGO GENEROWANEGO PRZEZ STYMULATOR ADR PROTECT NA CZYNNOŚĆ LUDZKICH KOMÓREK IMMUNOKOMPETENTNYCH *in vitro*”

Celem przeprowadzonych badań była ocena stymulatora ADR Protect odnośnie możliwości immunotropowego oddziaływania pola magnetycznego wytwarzanego przez stymulator oraz, w przypadku stwierdzenia takich wpływów, wstępne określenie ich charakteru i zakresu.

Badania przeprowadzono na zlecenie producenta stymulatora ADR Protect w okresie maj-październik 2001 r. w Pracowni Immunologii Zakładu Ochrony Mikrofalowej WIHE (Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii) w Warszawie, w oparciu o przedstawione uprzednio założenia projektu, zgodnie z przyjętym zakresem metod doświadczalnych i harmonogramem badań.

Material i metody

Wpływy stymulatora ADR wobec układu hodowli komórek odpornościowych badano w dwu wariantach doświadczeń :

1. Przed założeniem hodowli komórkowych płyn hodowlany (RPMI 1640) eksponowano w polu ADR przez 15 min i następnie używano tego płynu w procedurze zakładania i prowadzenia hodowli. Porównano wyniki hodowli w płynie poddanym ekspozycji z wynikami hodowli w płynie kontrolnym. W tym wariantcie przeprowadzono 10 doświadczeń. Każdorazowo do izolowania i hodowli komórek immunokompetentnych używano krwi obwodowej zdrowych mężczyzn (dawcy krwi w wieku 20 – 26 lat).
2. Zakładano dwa zestawy hodowli komórek odpornościowych w dwu płytkach hodowlanych (Nuncoln microplate), przy czym pod jedną z nich na cały okres hodowli (72 godz) umieszczano odpowiednio dostosowany emiter pola magnetycznego ADR. Porównano wyniki uzyskane w płytkach eksponowanych z wynikami płytek kontrolnych. Przeprowadzono 20 doświadczeń w takim układzie. Każdorazowo do izolowania i hodowli komórek immunokompetentnych używano krwi obwodowej zdrowych mężczyzn (dawcy krwi w wieku 20 – 26 lat).

Hodowle komórek mononuklearnych izolowanych z krwi osób zdrowych (krwiodawcy bez klinicznych objawów ostrych lub przewlekłych chorób infekcyjnych) przeprowadzano zgodnie z metodą opisaną uprzednio (1) z późniejszą modyfikacją (2). Każdą hodowlę komórek zakładano identycznie w trzech dołkach płytki, a wynik końcowy podawano jako wartość średnią z tych trzech hodowli.

W skrócie : każdorazowo układ doświadczalny obejmował dwie płytki (eksponowaną i kontrolną) zawierające identyczne zestawy mikrohodowli. Każda mikrohodowla zawierała 10^5 komórek w 0.2 ml RPMI 1640 + 15% inaktywowanej autologicznej surowicy. Odpowiednie triplety hodowli były pozostawione bez stymulacji, stymulowane fitohemaglutyniną (PHA HA16, Murex Biotech, 0.4 $\mu\text{g}/\text{hod}$) lub konkanawaliną A (Con A, Sigma, 8 $\mu\text{g}/\text{hod}$). Hodowle inkubowano 72 godz w inkubatorze ASSAB w temp. 37°C w wilgotnej atmosferze 5% CO_2 w powietrzu. W 24 godz inkubacji przeprowadzono w odpowiednich tripletach mikrohodowli rearanżacje opisane uprzednio (1, 2) a na 18 godz przed zakończeniem hodowle wyznakowano ^3H -tymidyną (3HTdR, Ammersham, akt. spec. 2 Cu/mM) w dawce 0.4 $\mu\text{Cu}/\text{hod}$. Po zakończeniu hodowli pomiary wbudowanej 3HTdR przeprowadzono w liczniku scyntylicyjnym Packard Tri-carb 2100 TR. Opisany układ hodowli pozwalał na oznaczenie :

- spontanicznego wbudowywania 3HTdR,
- odpowiedzi proliferacyjnej na PHA,
- odpowiedzi na Con A, (wyniki przedstawiono jako średnie liczby rozpadów promieniotwórczych – dpm – $\times 10^3/\text{hod}$),
- wskaźnika aktywności supresyjnej limfocytów T (SAT),
- wskaźnika wysycenia receptorów IL-2,
- wskaźnika wpływu monokin (IL-1ra/IL-1 β) na proliferację limfocytów (wskaźnik LM).

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej z zastosowaniem testu parametrycznego *t* Studenta i testu nieparametrycznego par bliźniaczych (*twin pair test*) Wilcoxona, gdzie analizowano indywidualne różnice między próbkami eksponowanymi na ADR i kontrolnymi.

Wyniki

Porównanie wyników 10 doświadczeń obejmujących hodowle przeprowadzone w płynie hodowlanym (RPMI 1640) kontrolnym i w płynie poddanym uprzedniej ekspozycji w polu płytki ADR, przedstawiają tabele 1 i 2.

W hodowlach prowadzonych w pożywce eksponowanej w polu płytki ADR stwierdzono wyższe wartości spontanicznego wbudowywania ^3H -tymidyny w porównaniu z hodowlami prowadzonymi w pożywce kontrolnej (odpowiednio 4.20 ± 2.69 oraz $1.63 \pm 0.81 \times 10^3$ dpm). Różnice były statystycznie znamienne, zarówno w odniesieniu do wartości średnich jak i do liczby doświadczeń z wynikiem wskazującym na występowanie różnic. Nie stwierdzono natomiast istotnych zmian wartości określających reaktywność limfocytów na mitogeny (PHA i Con A), wskaźniki P/C, aktywności supresyjnej limfocytów T (SAT) i stopnia wysycenia receptorów

interleukiny-2. Obserwowano tendencję do spadku wartości wskaźnika LM (wskaźnik interakcji limfocytów z monokinami), lecz różnice nie wykazywały znamienności statystycznej.

W tabeli 3 i 4 przedstawiono wyniki 20 doświadczeń porównujących wyniki otrzymane w hodowlach eksponowanych w polu płytki ADR w całym okresie hodowli i w hodowlach kontrolnych. W tej serii doświadczeń nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w wartościach badanych parametrów. Podobnie jak w poprzedniej serii doświadczeń, stwierdzono występowanie tendencji do wzrostu wartości spontanicznego wbudowywania 3H-tymidyny oraz do spadku wartości wskaźnika LM w hodowlach eksponowanych na wpływ płytki ADR.

Wnioski

- 1. Zastosowanie w hodowli komórek mononuklearnych krwi ludzkiej pożywki RPMI-1640 eksponowanej w polu magnetycznym płytki ADR (15 min) przed jej użyciem w hodowli, powoduje w porównaniu z zastosowaniem pożywki kontrolnej wzrost spontanicznego wbudowywania 3H-tymidyny oraz obniżenie wartości wskaźnika wpływu monokin na limfocyty (LM), pozostawiając pozostałe parametry oceny (odpowiedź na PHA i Con A, wskaźnik SAT i wskaźnik wysycenia receptorów IL-2) bez istotnych zmian wartości.**
2. Ekspozycja hodowli ludzkich komórek mononuklearnych krwi w polu płytki ADR w całym okresie hodowli (72 godz) w porównaniu z hodowlami kontrolnymi, prowadzi do wystąpienia zmian podobnych jak w przypadku eksponowania samej pożywki (przed hodowlą) na wpływ płytki ADR (tendencja do wzrostu spontanicznego wbudowywania 3H-tymidyny i obniżenie wskaźnika LM).
3. Przeprowadzone badania wskazują, że ekspozycja w polu płytki ADR wywiera bezpośredni wpływ na stan pożywki hodowlanej RPMI 1640 wywołując w niej zmiany o nieznanym charakterze. Zmiany te warunkują wtórnie wystąpienie opisanych powyżej zmian czynnościowych hodowanych komórek odpornościowych.
4. Obserwowane zmiany czynnościowe hodowanych komórek można wstępnie interpretować (co wymaga dalszego doświadczalnego potwierdzenia) jako rezultat zmiany aktywności monocytów w zakresie wytwarzanych monokin regulujących stopień proliferacji limfocytów.
5. Dla wykluczenia lub wykazania możliwości bezpośredniego oddziaływania pola ADR na komórki odpornościowe niezbędne jest przeprowadzenie dalszych badań na

modelu doświadczalnym eliminującym pośrednie oddziaływanie na medium hodowlane.

6. Uzyskane wyniki nie mają bezpośredniego przełożenia na ocenę komórek poddanych wpływom pola ADR i na możliwość wnioskowania o rodzaju takich oddziaływań na stan czynnościowy komórek w organizmie (*in vivo*).

Piśmiennictwo.

1. Dąbrowski M.P. i wsp.: Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987, 496, 697-706.
2. Dąbrowski M.P. i wsp.: Mediators of Inflamm., 2001, 10, 101-107.

Wykonawcy badań doświadczalnych:

- prof. dr hab. med. Marek P. Dąbrowski;
- dr n. przyr. Elżbieta Sobiczewska;
- dr n. med. Wanda Stankiewicz;
- zespół techników Pracowni Immunologii ZOM WIHiE.

Warszawa, 23 październik 2001 r.

Tabela I.

Spontaniczne wbudowywanie ^3H -tymidyny i odpowiedź na mitogeny komórek jednojądrzastych krwi (KJK) ludzkiej w 72-godzinnej mikrohodowli prowadzonej na pożywce poddanej 15-minutowemu działaniu płytki ADR PROTECT.

	Spontaniczne wbudowywanie ^3H -tymidyny bez dodatku mitogenu ($\times 10^3\text{DPM}/10^5$ komórek) (N = 10)		Odpowiedź KJK indukowana PHA ($\times 10^3\text{DPM}/10^5$ komórek) (N = 10)		Odpowiedź KJK indukowana Con-A ($\times 10^3\text{DPM}/10^5$ komórek) (N = 10)		Współczynnik P/C (odpowiedzi PHA/Con-A) (N = 10)	
	kontrola	ADR PROTECT	kontrola	ADR PROTECT	kontrola	ADR PROTECT	kontrola	ADR PROTECT
Średnia arytmetyczna wyników (x)	1.60	4.20	68.35	66.68	46.87	49.09	1.6	1.3
Odchylenie standardowe (SD)	0.76	2.69	33.22	27.73	25.00	30.59	0.58	0.29
Ocena statystyczna różnic (p)	p = 0.015		nieznamienna		nieznamienna		nieznamienna	
Analiza różnic w grupie (Liczba przypadków)	powyżej normy	9	1		2		1	
	w normie	1	8		7		7	
	poniżej normy	0	1		1		2	
Analiza statystyczna różnic (test par Wilcoxona)	p < 0.015		nieznamienna		nieznamienna		nieznamienna	
Sumaryczna analiza statystyczna	Wzrost wartości po działaniu ADR PROTECT; różnica statystycznie znamienna.		Brak różnicy między próbkami		Brak różnicy między próbkami		Brak różnicy między próbkami	

Tabela II.

Parametry immunoregulacyjne (wskaźniki SAT, LM, stopień wysycenia receptora interleukiny-2 [IL-2]) komórek jednojądrzastych krwi (KJK) w 72-godzinnej mikrohodowli *in vitro* prowadzonej na pożywce poddanej 15-minutowemu działaniu płytki ADR PROTECT.

	SAT (wskaźnik aktywności supresorowej limfocytów T) (N = 10)		LM (wskaźnik interakcji limfocyt – monokiny) (N = 10)		Stopień wysycenia receptorów interleukiny-2 (IL-2 %) (N = 10)	
	kontrola	ADR PROTECT	kontrola	ADR PROTECT	kontrola	ADR PROTECT
Średnia arytmetyczna wyników (x)	27.20	23.70	30.40	12.40	80.20	85.00
Odchylenie standardowe (SD)	12.60	8.98	32.31	9.75	16.40	10.57
Ocena statystyczna różnic (p)	niezamienna		zamienna (p=0.07)		niezamienna	
Analiza różnic w grupie (Liczba przypadków)	powyżej normy	2	1		1	
	w normie	6	5		8	
	poniżej normy	2	4		1	
Analiza statystyczna różnic (test par Wilcoxon)	niezamienna		zamienna		niezamienna	
Sumaryczna analiza statystyczna	Brak różnicy między próbkami		Tendencja do spadku wartości po działaniu ADR PROTECT; różnica statystycznie znamienne.		Brak różnicy między próbkami	

Tabela III.

Spontaniczne wbudowywanie ³H-tymidyny i odpowiedź na mitogeny komórek jednojądrzastych krwi (KJK) ludzkiej w 72-godzinnej mikrohodowli poddanej działaniu płytki ADR PROTECT przez cały okres hodowli.

	Spontaniczne wbudowywanie ³ H-tymidyny bez dodatku mitogenu (x 10 ³ DPM/10 ⁵ komórek) (N = 20)		Odpowiedź KJK indukowana PHA (x 10 ³ DPM/10 ⁵ komórek) (N = 20)		Odpowiedź KJK indukowana Con-A (x 10 ³ DPM/10 ⁵ komórek) (N = 20)		Współczynnik P/C (odpowiedzi PHA/Con-A) (N = 20)	
	kontrola	ADR PROTECT	kontrola	ADR PROTECT	kontrola	ADR PROTECT	kontrola	ADR PROTECT
Średnia arytmetyczna wyników (x)	1. 62	2. 20	69. 79	68. 29	41. 08	36. 63	1.86	2.01
Odchylenie standardowe (SD)	0. 58	1. 20	27338	19. 82	19. 82	16. 73	0.63	0.50
Ocena statystyczna różnic (p)	nieznamienna (p = 0.06)		nieznamienna		nieznamienna		nieznamienna	
Analiza różnic w grupie (Liczba przypadków)	powyżej normy	5	1		1		2	
	w normie	14	18		17		16	
	poniżej normy	1	1		2		2	
Analiza statystyczna różnic (test par Wilcoxona)	nieznamienna		nieznamienna		nieznamienna		nieznamienna	
Sumaryczna analiza statystyczna	Tendencja do wzrostu wartości po działaniu ADR PROTECT; różnica statystycznie nie znamienna.		Brak różnicy między próbkami		Brak różnicy między próbkami		Brak różnicy między próbkami	

Tabela IV.

Parametry immunoregulacyjne (wskaźniki SAT, LM, stopień wysycenia receptora interleukiny-2 [IL-2]) komórek jednojądrzastych krwi (KJK) w 72-godzinnej mikrohodowli poddanej działaniu płytki ADR PROTECT przez cały okres hodowli.

	SAT (wskaźnik aktywności supresorowej limfocytów T) (N = 20)		LM (wskaźnik kooperacji limfocyt – monocyt) (N = 20)		Stopień wysycenia receptorów interleukiny-2 (IL-2 %) (N = 20)	
	kontrola	ADR PROTECT	kontrola	ADR PROTECT	kontrola	ADR PROTECT
Średnia arytmetyczna wyników (x)	23.84	18.01	17.70	11.50	82.9	87.6
Odchylenie standardowe (SD)	17.34	13.10	10.59	7.58	14.7	10.5
Ocena statystyczna różnic (p)	nieznamienna		p < 0.05 (p = 0.04)		nieznamienna	
Analiza różnic w grupie (Liczba przypadków)	powyżej normy	4	4		2	
	w normie	11	7		17	
	poniżej normy	5	9		1	
Analiza statystyczna różnic (test par Wilcoxona)	nieznamienna		nieznamienna (Średnia różnic 6.2 ± 12.2)		nieznamienna	
Sumaryczna analiza statystyczna	Brak różnicy między próbkami		Tendencja do spadku wartości po działaniu ADR PROTECT; różnica statystycznie nie znamienna.		Brak różnicy między próbkami	

