

dr Katarzyna Miranowicz-Dzierżawska
dr Jolanta Skowroń
dr Lidia Zapór

ODDZIAŁYWANIE ZWIĄZKÓW CHEMICZNYCH NA STARZEJĄCE SIĘ KOMÓRKI

2016 r.



Opracowano w ramach realizacji III etapu programu wieloletniego „Poprawa bezpieczeństwa i warunków pracy” (2014-2016) finansowanego z zakresu badań naukowych i prac rozwojowych ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego/Narodowego Centrum Badań i Rozwoju. Koordynator programu: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy. Projekt nr I.P07 pn. *Ocena toksyczności w badaniach in vitro wybranych związków chemicznych na starzejących się komórkach*

Starzejące się komórki są odpowiedzialne za przemiany obserwowane w starzejącym się organizmie. Komórki ulegające starzeniu replikacyjnemu oraz przyspieszonemu, powiększają się i stają się płaskie. Zmiana ta obserwowana jest zarówno w przypadku komórek prawidłowych, np. ludzkich komórek mięśni gładkich, fibroblastów, jak i komórek nowotworowych (Alster i Korwek, 2014). Następują również zmiany w strukturze jądra komórkowego, w ekspresji genów, przemianach białkowych i metabolizmie, zmienia się także odporność na apoptozę (Correia-Melo i wsp., 2014). Starzeniu towarzyszy także wzrost ziarnistości komórek. Związane jest to prawdopodobnie ze wzrostem masy lizosomów w komórkach, które uległy starzeniu (Lee i wsp., 2006).

Wyrazem starzenia się komórek diploidalnych jest ich ograniczony czas przeżywania. Jeśli komórki zużyją część swojego potencjału rozrodczego *in vivo*, to odbije się to na liczbie podwojeń populacji, które są w stanie uzyskać *in vitro*.

Stwierdzono, że fibroblasty pochodzące od chorych na choroby powodujące przyspieszone starzenie się organizmu (progerię, zespół Wernera lub zespół Cockayne'a) proliferują (zdolność namnażania komórek) w hodowli krócej niż fibroblasty dobranych pod względem wieku kalendarzowego i płci osób zdrowych (Kawiak, 1998). Wiadomo również, że liczba podwojeń populacji, którą mogą osiągnąć komórki diploidalne *in vitro* jest proporcjonalna do maksymalnej długości życia osobników gatunku, od którego przedstawiciele komórki pochodzą. Największą liczbę podwojeń populacji w hodowli osiągają fibroblasty znanych z długowieczności żółwi z wysp Galapagos (Kawiak, 1998).

Zmiany w komórkach związane ze starzeniem powodują stopniowe zmniejszenie aktywności komórki i prowadzą do zmniejszenia potencjalnych możliwości reagowania na czynniki stymulujące, a jednocześnie przestają w nich funkcjonować procesy naprawcze, co rzutuje na ich odpowiedź na działanie ksenobiotyków tak *in vivo*, jak i *in vitro*.

Wydłużenie „dalszego trwania życia” osób w wieku 65 lat oraz okresu aktywności zawodowej pracowników spowodowało pilną potrzebę uzupełnienia i poszerzenia badań wykonywanych na modelach, w których zachodzą zmiany typowe dla procesu starzenia się. Ich wyniki będą wykorzystane w opracowywaniu narzędzi służących zapewnieniu bezpiecznych warunków pracy również pracownikom w wieku uważanym do tej pory za poprodukcyjny.

Ocena wpływu wybranych rozpuszczalników organicznych, związków skali nano i biopaliw na starzejące się linie komórkowe była przedmiotem badań w ramach projektu I.P.07 realizowanego w CIOP-PIB w latach 2014-2016.

Badania wykonano na dwóch starzejących się liniach komórkowych zakupionych w Amerykańskiej Kolekcji Kultur Typowych: linii diploidalnych fibroblastów płucnych CCD-8Lu (ATCC® CCL-201™) oraz linii diploidalnych fibroblastów skórnych CCD-1136Sk (ATCC® CRL-2697™).

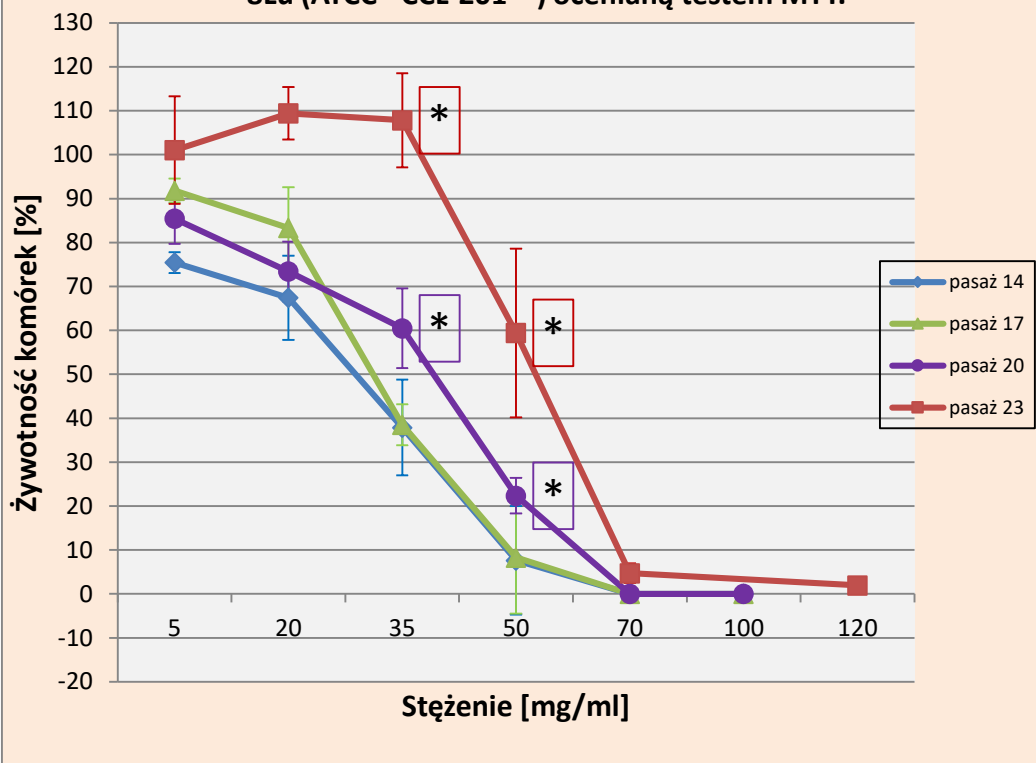
Do oceny cytotoksycznego działania badanych związków wybrano test redukcji bromku 3-(4,5-dimetylotiazolo-2-ylo)-2,5-difenylo-tetrazolu w mitochondriach do określania aktywności metabolicznej komórek (test MTT) oraz test pochłaniania czerwieni obojętnej do oceny integralności błon komórkowych (test NRU).

Badając wpływ rozpuszczalników organicznych komórki narażano na aceton (CAS 67-64-1); 2-propanol (CAS 67-63-0); 2-metoksyetanol (CAS 109-86-4); 2-etoksyetanol (CAS 110-80-5); 1,4-dioksan (CAS 123-91-1) lub tetrahydrofuran (CAS 109-99-9). Zastosowano narażenie trwające 24 h.

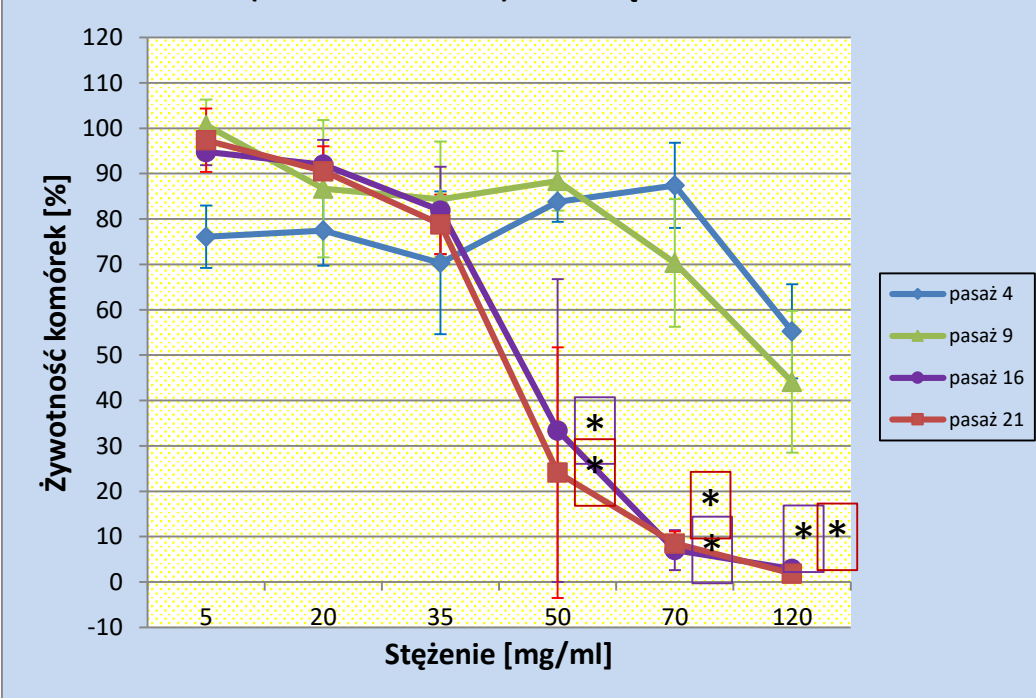
Badania na linii CCD-8Lu (ATCC® CCL-201™) wykonywano w zakresie pasaży 14 ÷ 23. Porównując wartości IC₅₀ uzyskane dla badanych ksenobiotyków stwierdzono, że spośród badanych rozpuszczalników najbardziej toksyczny dla komórek linii CCD-8Lu był 2-etoksyetanol, natomiast najmniej toksyczny okazał się aceton, na którego cytotoksyczne działanie oceniane testem MTT komórki starsze (pasaż 23) stały się mniej wrażliwe niż komórki pasaży wcześniejszych (pasaż 14, 17 i 20). Podobną tendencję zaobserwowano także dla tetrahydrofuranu, zarówno w teście MTT, jak i NRU (ryc. A), chociaż zmiany w teście NRU nie okazały się istotne statystycznie. Statystycznie istotne różnice między żywotnością komórek pasaży starszych (20 i 23) i młodszych (14 i 17) w teście MTT stwierdzono przy narażeniu na 2-propanol przy stężeniu związku wynoszącym 35 mg/ml oraz przy narażeniu na dwa najniższe stężenia 2-etoksyetanolu: 5 oraz 20 mg/ml (komórki starsze były mniej wrażliwe na działanie badanego rozpuszczalnika). Zjawisko mniejszej wrażliwości komórek starszych na działanie rozpuszczalnika organicznego zaobserwowano także w teście NRU przy narażeniu fibroblastów CCD-8Lu na 2-propanol oraz 1,4-dioksan w stężeniach 35 i 50 mg/ml, a także 2-metoksyetanol w zakresie stężeń 35 ÷ 70 mg/ml.

Badania wpływu rozpuszczalników organicznych na komórki linii CCD-1136Sk (ATCC® CRL-2697™) prowadzono na pasażach od 4 do 21. Podobnie jak w stosunku do fibroblastów płucnych także w przypadku tej linii komórkowej najmniej toksyczny okazał się aceton, a najbardziej toksyczny 2-etoksyetanol. Jednocześnie stwierdzono, że starsze fibroblasty skórne (pasaż nr 16 i 21) okazały się z kolei bardziej wrażliwe (odwrotnie niż fibroblasty płucne) na cytotoksyczne działanie badanych rozpuszczalników (ryc. B), chociaż nie przy wszystkich stężeniach badanych związków. Różnice te zaobserwowano zarówno w teście MTT, jak i NRU.

Ryc. A. Wpływ tetrahydrofuranu na żywotność komórek CCD-8Lu (ATCC® CCL-201™) ocenianą testem MTT.



Ryc. B. Wpływ acetonu na żywotność komórek CCD-1136Sk (ATCC® CRL-2697™) ocenianą testem MTT



W badaniach związków skali nano została oceniona cytotoksyczność srebra w postaci nanocząstek wielkości 10 nm, tlenku ceru(IV) w postaci nanoproszku o wielkości cząstek < 25 nm, tlenku cynku(II) w postaci nanoproszku o wielkości cząstek < 50 nm oraz porównawczo tlenku cynku(II) o wielkości cząstek < 5 μ m.

Ocenę wrażliwości starzejących się komórek linii CCD-1136Sk (ATCC[®] CRL-2697[™]) na cytotoksyczne działanie badanych związków chemicznych prowadzono na pasażach 6 ÷ 31, natomiast na linii fibroblastów płucnych CCD-8Lu (ATCC[®] CCL-201[™]) porównano cytotoksyczne działanie badanych związków na komórkach pasaży nr 11 ÷ 22.

Porównując wartości IC₅₀ wyznaczone dla badanych związków na komórkach obu linii komórkowych stwierdzono, że najsilniejsze działanie cytotoksyczne wykazywało srebro o wielkości cząstek 10 nm, natomiast najslabiej działał tlenek ceru(IV) o wielkości cząstek < 25 nm.

Wartości IC₅₀ wyznaczone dla srebra o wielkości cząstek 10 nm w badaniach na kolejnych pasażach komórek CCD-1136Sk wahały się w zakresie 38 ÷ 59 μ M w teście MTT oraz 73 ÷ 94 μ M w teście NRU, jednakże nie zaobserwowano wyraźnego trendu wzrastającego/malejącego wynikającego ze starzenia się komórek. Wartości te na komórkach CCD-8Lu wynosiły od 54 do 65 μ M w teście MTT oraz od 85 do 94 μ M w teście NRU.

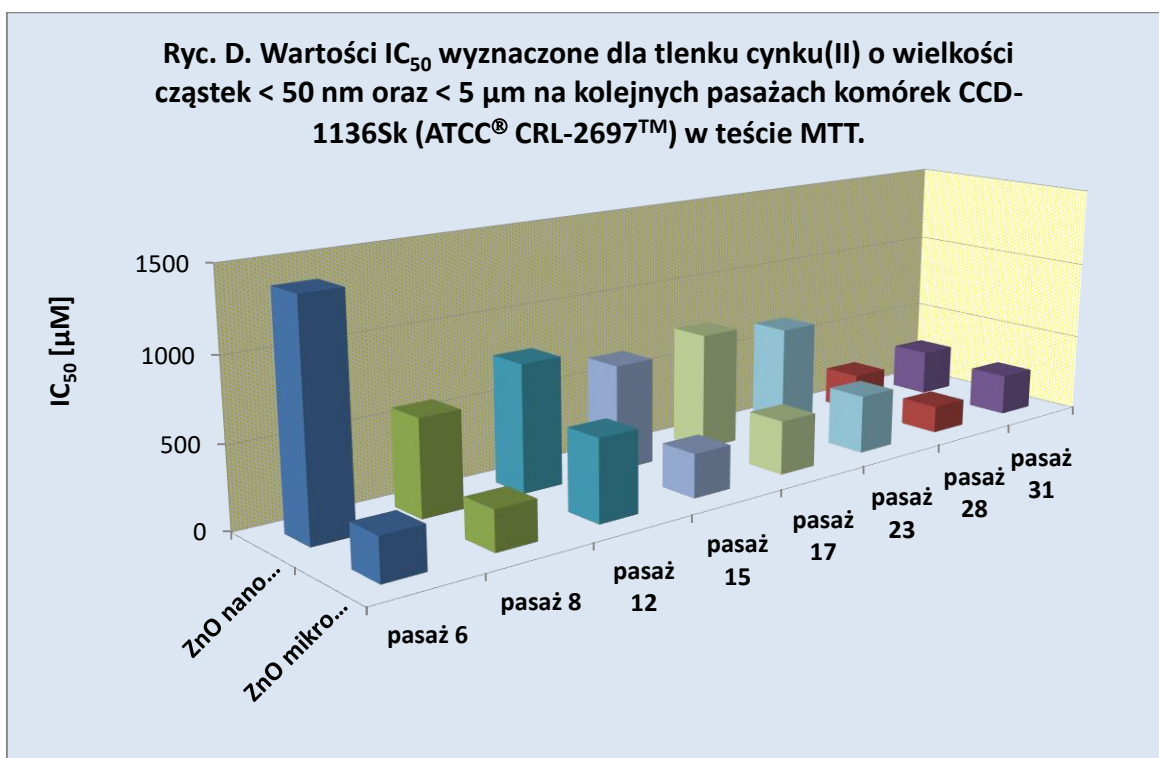
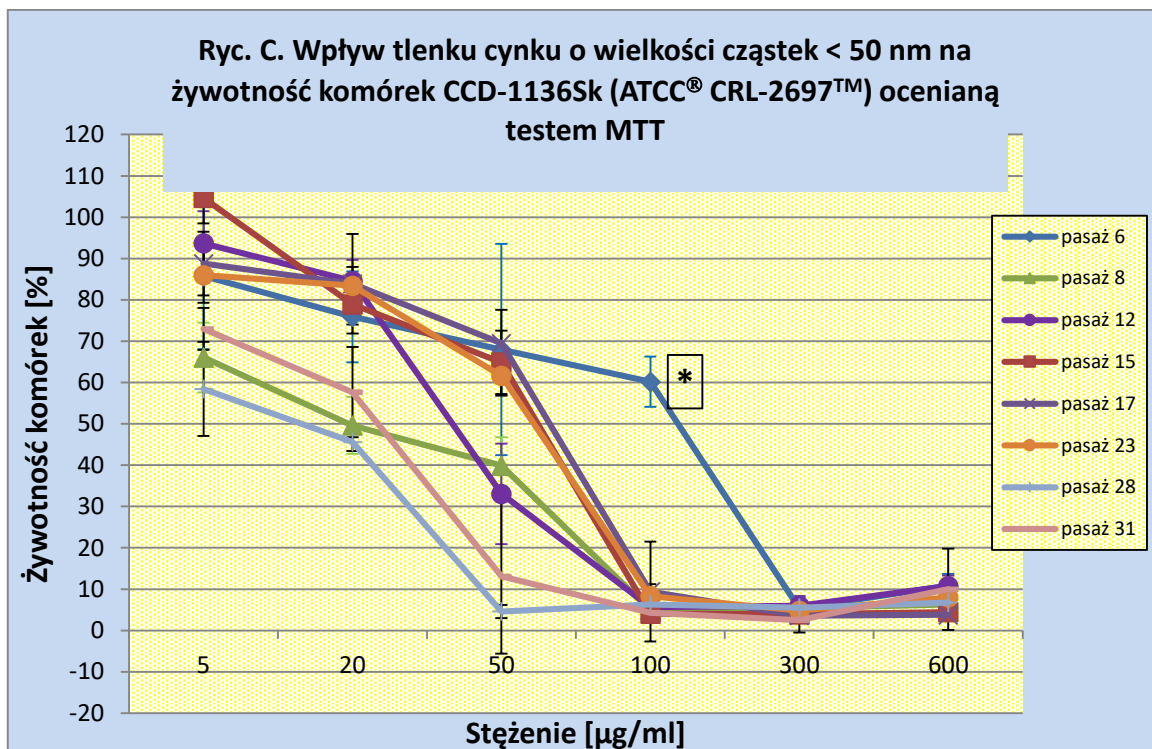
Wartości IC₅₀ dla nanotlenku cynku wyznaczone na komórkach CCD-1136Sk oscylowały w zakresie od 1384 μ M dla pasaży nr 6 do 290 μ M dla pasaży nr 31 oraz od 1687 μ M dla pasaży nr 6 do 539 μ M dla pasaży nr 28, odpowiednio w teście MTT i NRU. Na badanych pasażach komórek CCD-8Lu wartości IC₅₀ dla nanotlenku cynku wyznaczone w zakresie 503 ÷ 766 μ M oraz 577 ÷ 798 μ M, odpowiednio w teście MTT i NRU.

Jednocześnie stwierdzono, że dwa ostatnie pasaże komórek CCD-1136Sk (pasaż 28 i 31) okazały się bardziej wrażliwe na działanie nanotlenku cynku(II) niż pasaże wcześniejsze. Było to wyraźniej widoczne w teście MTT niż teście NRU, w którym obserwowano większą zmienność wartości IC₅₀ oznaczanych w poszczególnych pasażach.

Analizując przebieg krzywych zależności żywotności komórek od stężenia badanego związku dla kolejnych pasaży fibroblastów CCD-1136Sk w teście MTT stwierdzono zwiększoną wrażliwość dalszych pasaży komórek (nr 28 i 31), (Ryc. C), przy narażeniu komórek na tlenek cynku(II) o wielkości cząstek < 50 nm w stężeniu 50 μ g/ml. Jednocześnie komórki najmłodszego pasaży (nr 6) były statystycznie istotnie najmniej wrażliwe na badany związek o stężeniu 100 μ g/ml. Podobną prawidłowość zaobserwowano również w teście NRU, chociaż nie dotyczyła ona najstarszego pasaży komórek (nr 31). Zmian takich nie stwierdzono przy narażeniu fibroblastów skórných na srebro metaliczne o wielkości cząstek 10 nm.

Tlenek cynku(II) o wielkości cząstek < 50 nm wykazywał słabsze działanie cytotoksyczne na komórki fibroblastów skóry oraz płuc niż ten sam związek o wielkości cząstek < 5 μ m. Zjawisko to obserwowano zarówno w teście MTT (Ryc. D), jak i NRU.

Tlenek ceru(IV) wykazywał bardzo niską cytotoksyczność zarówno dla komórek CCD-1136Sk, jak i CCD-8Lu i w badaniach nie uzyskano obniżenia żywotności komórek o 50%. Również w miarę postępującego procesu starzenia się komórki obu linii nie wykazywały większej wrażliwości na działanie CeO₂ w stopniu, który umożliwiłby wyznaczenie rzeczywistej wartości IC₅₀.



Przy ocenie działania biopaliw na starzejące się komórki do badań zastosowano cztery biopaliwa – trzy produkty II generacji otrzymane w procesie transestryfikacji tłuszczów odpadowych, takich jak: przeterminowany olej rzepakowy (BP I), odpadowy tłuszcz zwierzęcy (BP II), roślinny olej posmażalniczy (BP III) oraz jeden produkt transestryfikacji surowego oleju rzepakowego (BP IV). Badania wpływu biopaliw na komórki linii CCD-1136Sk prowadzono na pasażach 8 ÷ 23, natomiast na komórkach CCD-8Lu na pasażach 15 ÷ 26. Komórki narażano na frakcję biopaliw rozpuszczalną w wodzie, otrzymaną przez wytrząsanie każdego z biopaliw z medium hodowlanym właściwym dla danej linii komórkowej w stosunku 3:1 (v/v) przez 18 h (zgodnie z metodą opisaną przez Chou i wsp., 2003).

Porównując wartości IC_{50} wyznaczone dla badanych związków na komórkach CCD-1136Sk stwierdzono, że najsilniejsze działanie cytotoksyczne wykazywało biopaliwo BP II, natomiast najslabiej działało biopaliwo BP IV (ryc. E). Prawidłowość taką zaobserwowano zarówno w teście MTT, jak i NRU. Badane biopaliwa działały w podobny sposób na komórki CCD-8Lu.

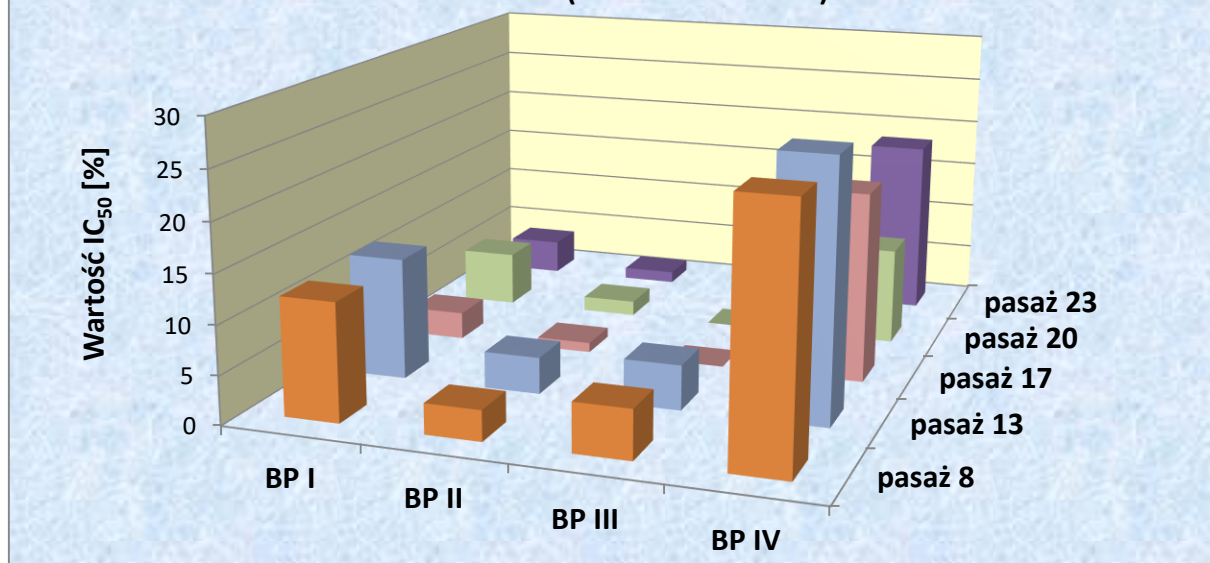
Toksyczność badanych biopaliw określona na podstawie uzyskanych wartości IC_{50} była odzwierciedleniem zawartości w nich estrów kwasów tłuszczowych (EK): największe stężenia tych związków oznaczono z wykorzystaniem sprzężonych technik chromatografii gazowej z detekcją spektrometrii mas w biopaliwie BP II, czyli w biopaliwie z tłuszczu zwierzęcego. Stężenie estrów kwasów tłuszczowych w biopaliwie I było o 27%, w biopaliwie III o 30%, a biopaliwie IV o 22% mniejsze w stosunku do biopaliwa II.

Wartości IC_{50} wyznaczone dla BPI w badaniach na kolejnych pasażach komórek CCD-1136Sk wahały się w zakresie 2,81 ÷ 12,52% w teście MTT oraz w zakresie 2,95 ÷ 9,56% w teście NRU, dla BPII był to zakres 1,00 ÷ 3,80% w teście MTT oraz 0,91 ÷ 2,80% w teście NRU. Dla BPIII wartości IC_{50} wyznaczone na kolejnych pasażach komórek CCD-1136Sk w testach MTT i NRU wynosiły odpowiednio: 0 ÷ 5,06% i 0 ÷ 3,82%, natomiast dla BPIV 10,08 ÷ 26,51% oraz 5,76 ÷ 18,01%. Komórki CCD-8Lu wykazywały porównywalną wrażliwość na cytotoksyczne działanie badanych biopaliw.

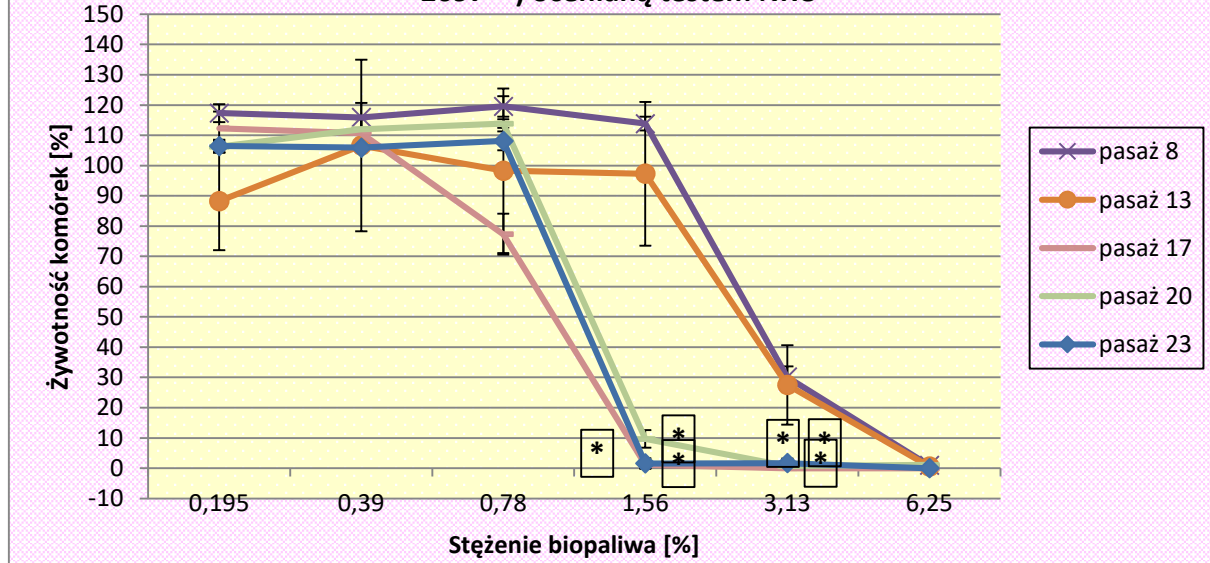
Komórki CC-1136Sk wczesnych pasażów (8 i 13) charakteryzowały się większą odpornością na cytotoksyczne działanie badanych biopaliw, co było szczególnie widoczne w środkowym zakresie stosowanych stężeń ksenobiotyków. Począwszy od pasażu nr 17 występowało zjawisko zwiększonej wrażliwości komórek CCD-1136Sk na działanie badanych biopaliw. Wyraźne zwiększenie wrażliwości starszych pasażów komórkowych zaobserwowano przy narażeniu komórek na BPI i BPII (Ryc. F) i BPIII.

Tendencję wzrostu wrażliwości komórek na działanie badanych biopaliw II generacji w miarę ich starzenia się zaobserwowano również w przypadku narażenia komórek CCD-8Lu na BPI, BPIII i BPIV.

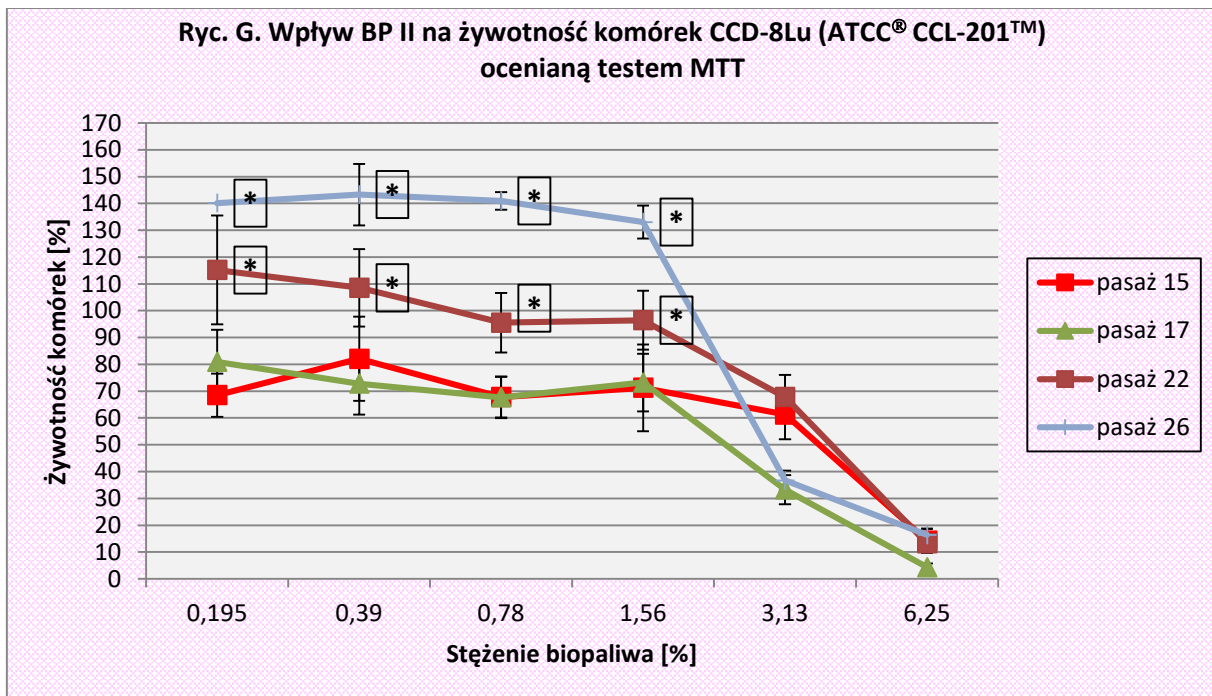
Ryc. E. Porównanie wartości IC_{50} badanych biopaliw wyznaczonych na podstawie testu MTT w badaniach na kolejnych pasażach komórek CCD-1136Sk (ATCC® CRL-2697™)



Ryc. F. Wpływ BP II na żywotność komórek CCD-1136Sk (ATCC® CRL-2697™) ocenianą testem NRU



Analiza przebiegu krzywych zależności żywotności komórek CCD-8Lu od stężenia biopaliwa BP II ocenianej testem MTT wskazuje natomiast, iż fibroblasty płucne w miarę starzenia się mogą także stawać się mniej wrażliwe (zjawisko odwrotne niż w przypadku fibroblastów pochodzenia skórno), co miało miejsce przy narażeniu tego typu komórek na rozpuszczalniki organiczne (Ryc. G).



Uzyskane wyniki wskazują, że wrażliwość starzejących się komórek na cytotoksyczne działanie rozpuszczalników organicznych, związków skali nano oraz biopaliw może zmieniać się w miarę ich starzenia się, jednak kierunek tych zmian nie okazał się jednoznaczny. Stwierdzono, że kolejne pasaże diploidalnych ludzkich fibroblastów mogą reagować odmiennie na cytotoksyczne działanie tych samych ksenobiotyków. Kluczowe znaczenie w cytotoksycznym działaniu związków chemicznych na młodsze i starsze pasażę komórkowe może mieć stężenie badanego związku.

Piśmiennictwo

- Alster O., Korwek Z.: *Znaczniki starzenia komórkowego*. Postępy Biochemii 2014, 60(2): 138-146.
- Chou C. C., Riviere J. E., Monteiro-Riviere N. A.: *The cytotoxicity of jet fuel aromatic hydrocarbons and dose-related interleukin-8 release from human epidermal keratinocytes*. Arch Toxicol, 2003, 77: 384-391.
- Correia-Melo C., Hewitt G., Passos J.F.: *Telomeres, oxidative stress and inflammatory factors: partners in cellular senescence?* Longev Healthspan 2014, 3: 1-9.
- Kawiak J. (red.): *Podstawy cytofizjologii*. PWN, wyd. 5., 1998.
- Lee B.Y., Han J.A., Im J.S., Morrone A., Johung K., Goodwin E.C., Kleijer W.J., DiMaio D., Hwang E.S.: *Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase*. Aging Cell 2006, 5: 187-195.