

Katarzyna Biezuńska- Kusiak¹, Jolanta Saczko¹, Julita Kulbacka¹, Olga Michel¹, Anna Choromańska¹, Joanna Weźgowiec². **Ocena apoptozy oraz przeżywalności w ludzkich liniach komórkowych gruczolakoraka piersi- wrażliwej (MCF-7/WT) i odpornej (MCF-7/DX) na dokсорubicynę po zastosowaniu elektroporacji z wapniem.** ¹Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, ²Katedra Protetyki Stomatologicznej, Zakład Materiałoznawstwa, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu.

Opiekun pracy: prof. dr hab. Jolanta Saczko

STRESZCZENIE

Wapń spełnia wiele różnorodnych funkcji w ludzkim organizmie. Większość reakcji wewnątrzkomórkowych wymaga obecności wapnia i często zależy od nawet niewielkich zmian stężenia tego pierwiastka w cytozolu.

Metoda elektroporacji (EP) powoduje powstawanie w błonie komórkowej tymczasowych nanoporów pod wpływem zewnętrznego pola elektrycznego. Dzięki temu powstają dodatkowe drogi transportu dla leków i drobnych molekuł.

Badania przeprowadzono na ludzkich liniach komórkowych gruczolakoraka piersi: wrażliwej (MCF-7/WT) i odpornej na dokсорubicynę (MCF-7/DX). Do elektroporacji zastosowano następujące parametry (przy 8 impulsach 100us, 1 Hz): 800V/cm, 1000V/cm, 1200V/cm, 1400V/cm.

Użyto następujących roztworów wapnia: 0.25mM, 0.5mM, 1mM, 5mM.

Przeprowadzono 2 rodzaje doświadczeń: z zastosowaniem EP oraz EP z roztworem wapnia.

Przeżywalność określono metodą testu MTT. W celu przeprowadzenia terapii komórki inkubowano przez 24 i 48h, po zastosowaniu EP oraz EP z wapniem.

Do wykrywania fragmentacji DNA związanego z apoptozą zastosowano metodę TUNEL, w której obserwuje się brunatne zabarwienie komórek apoptotycznych. Wolne grupy 3'OH pękniętych nici DNA oceniono przy użyciu zestawu ApopTag (Oncor). Hodowlę komórkową prowadzono na 8-dołkowych szkiełkach (Erie Scientific). Inkubacja trwała 24h, po zastosowaniu EP oraz EP z wapniem. Eksperymenty powtarzano 3 razy.

Najlepsze efekty uzyskano po zastosowaniu EP z wapniem; procentowa przeżywalność komórek była niższa w porównaniu z zastosowaniem tylko jednej metody. Stwierdzono również obecność apoptozy. Najbardziej zadowalające efekty uzyskano przy użyciu wyższego napięcia-1200 oraz 1400 V/cm (niezależnie od stężenia wapnia). Przy niższych napięciach wyraźny spadek przeżywalności wystąpił po użyciu 5 mM roztworu wapnia. Wtedy też występowało najwięcej komórek apoptotycznych. Niższą przeżywalność zaobserwowano po 48h, szczególnie przy dużych napięciach.

Przedstawione wyniki potwierdzają skuteczność przeciwnowotworowej aktywności wapnia indukowanego EP wobec badanych komórek. Bardziej oporna na leczenie jest linia MCF-7/DX. W przypadku komórek wrażliwych wykazano największy spadek przeżywalności po 48h dla wszystkich stosowanych stężeń wapnia i natężeniu pola 1400 V/cm. Zastosowanie EP jako jedynej metody nie powoduje tak silnego działania przeciwnowotworowego. Komórki linii MCF-7/WT okazały się bardziej wrażliwe na działanie samej EP.

Wyniki otrzymane w ramach projektu pokazują możliwość zastosowania EP przy obciążeniu komórek nowotworowych wapniem, jako skutecznego działania przeciwnowotworowego. Technika elektrochemioterapii jest bezpieczna.