

STRESZCZENIE

Wpływ wybranych terapii czynników fizykalnych na przeżywalność i proliferację komórek w modelu *in vitro*.

Słowa kluczowe: promieniowanie laserowe, pole magnetyczne, MTT, cytometria przepływowa, *in vitro*.

Celem pracy była ocena wpływu wybranych czynników fizykalnych na proliferację i przeżycie ludzkich komórek prawidłowych oraz nowotworowych. Celem szczegółowym była analiza wpływu pola magnetycznego (zmiennego i stałego pola magnetycznego niskiej częstotliwości) oraz promieniowania laserowego na proliferację oraz przeżywalność komórek w hodowli *in vitro*.

Postawiono następujące pytania badawcze:

1. Czy promieniowanie laserowe wpływa na przeżywalność komórek nowotworowych skóry (A431), komórek skóry - keratynocytów (HaCaT), komórek skóry - fibroblastów (NHDF)?
2. Czy zmienne pole magnetyczne wpływa na przeżywalność komórek nowotworowych skóry (A431), komórek skóry - keratynocytów (HaCaT), komórek skóry - fibroblastów (NHDF)?
3. Czy stałe pole magnetyczne wpływa na przeżywalność komórek nowotworowych skóry (A431), komórek skóry - keratynocytów (HaCaT), komórek skóry - fibroblastów (NHDF)?
4. Czy promieniowanie laserowe wpływa na proliferację komórek nowotworowych skóry (A431), komórek skóry - keratynocytów (HaCaT), komórek skóry - fibroblastów (NHDF)?
5. Czy zmienne pole magnetyczne wpływa na proliferację komórek nowotworowych skóry (A431), komórek skóry - keratynocytów (HaCaT), komórek skóry - fibroblastów (NHDF)?
6. Czy stałe pole magnetyczne wpływa na proliferację komórek nowotworowych skóry (A431), komórek skóry - keratynocytów (HaCaT), komórek skóry - fibroblastów (NHDF)?

Metoda i materiał badawczy: Badania przeprowadzono na liniach komórkowych: A431 (ludzkie komórki płaskonabłonkowego raka skóry), NHDF (prawidłowe komórki ludzkich fibroblastów), HaCaT (prawidłowe komórki ludzkich keratynocytów). Ekspozycję na promieniowanie laserowe oraz pole magnetyczne stałe i zmienne

przeprowadzono przez trzy kolejne dni, w tych samych przedziałach czasowych. Eksperyment na wszystkich wyżej wskazanych liniach komórkowych (A431, NHDF, HaCaT), przeznaczonych do testu MTT powtarzano w trzech cyklach, a do cytometrii przepływowej w dwóch. Następnie analizie poddane były uśrednione wyniki ze wszystkich trzech powtórzeń testu MTT oraz dwóch powtórzeń cytometrii przepływowej. W przypadku promieniowania laserowego komórki poddawano ekspozycji według zastosowanej dawki trzy razy dziennie przez 3 kolejne dni. Przerwy między kolejnymi naświetlaniami wynosiły czterdzieści minut. Zastosowano dawki: 1 J/cm², 8 J/cm² i 15 J/cm², wypełnienie: 100%, pole zabiegowe: w płytkach 96-dołkowych, przeznaczonych do testu MTT 30,912 cm², a w płytkach 6-dołkowych, przeznaczonych do analizy cyklu komórkowego: 54 cm², tryb emisji: ciągły. Czas trwania pojedynczej ekspozycji wynosił każdorazowo 3 minuty.

W przypadku pola magnetycznego stałego i zmiennego komórki były eksponowane również według zastosowanej dawki dwa razy dziennie przez 3 kolejne dni. Przerwy między ekspozycjami wynosiły sześćdziesiąt minut. Komórki traktowano dawkami: wartości indukcji znamionowej przy ścianie aplikatora 2,5 mT, 6 mT i 12 mT natomiast w geometrycznym środku aplikatora 0,5 mT, 4 mT i 10 mT oraz analogicznie o częstotliwości 2 Hz, 60 Hz i 120 Hz. Zastosowano zmienne oraz stałe pole magnetyczne. W przypadku ekspozycji na pole magnetyczne zmienne spectrum wynosiło 10 Hz, czas trwania impulsu 1 s i przerwy 0,8 s, kształt pola sinusoidalny ze względu na jego uniwersalne zastosowanie. Czas oddziaływania pola magnetycznego wynosi każdorazowo 10 minut. Płytki umieszczano w geometrycznym środku aplikatora.

Kontrole w badaniach stanowiły komórki wyjmowane z inkubatora na czas potrzebny do ekspozycji komórek badanych, nie były one jednak poddawane działaniu pola magnetycznego ani promieniowania laserowego.

Normalność rozkładu zmiennych przeprowadzono z zastosowaniem testu Shapiro-Wilka. Dla sprawdzenia istotności różnic w analizie cyklu komórkowego oraz przeżywalności pomiędzy grupami zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji – jednoczynnikowa ANOVA (one-way ANOVA). Analizę post-hoc wykonano za pomocą testu Bonferroniego. Poziom istotności przyjęto na poziomie $p < 0.05$. Analizę statystyczną wykonano przy użyciu programu Statistica 13 (TIBCO Software Inc.)

Wyniki: Wykazano brak zmian w proliferacji i przeżywalności ocenianych komórek pod wpływem promieniowania laserowego i pola magnetycznego zmiennego oraz stałego.

Wnioski:

1. Promieniowanie laserowe w zakresie dawek terapeutycznych nie wpływa na przeżywalność prawidłowych i nowotworowych komórek skóry w warunkach *in vitro*.
2. Promieniowanie laserowe w zakresie dawek terapeutycznych nie wpływa na proliferację prawidłowych i nowotworowych komórek skóry w warunkach *in vitro*.
3. Stałe i zmienne pole magnetyczne w zakresie dawek terapeutycznych nie wpływa na przeżywalność prawidłowych i nowotworowych komórek skóry w warunkach *in vitro*.
4. Stałe i zmienne pole magnetyczne w zakresie dawek terapeutycznych nie wpływa na proliferację prawidłowych i nowotworowych komórek skóry w warunkach *in vitro*.

Przeprowadzone badania pokazały, że ekspozycja na stałe oraz zmienne pole magnetyczne, a także promieniowanie laserowe w zakresie dawek terapeutycznych nie wpływa na proliferację oraz zmiany w cyklu komórkowym ludzkich komórek raka skóry (A431), a także prawidłowych komórek skóry keratynocytów (HaCaT) oraz fibroblastów (NHDF). Na podstawie przeprowadzonych badań wysnuć należy wnioski, że ekspozycja na ww. czynniki fizykalne może przynosić pozytywne stymulacje prozdrowotne u pacjentów na drodze innych mechanizmów molekularnych, niż zmiany badane w niniejszej pracy. Dodatkowo, otrzymane wyniki mogą sugerować także, że terapia fizykalna jest stosunkowo bezpieczna dla pacjentów, ponieważ nie stymuluje miejscowo komórek skóry do niekontrolowanych podziałów, co mogłoby być początkiem indukowania procesu kancerogenezy. Z drugiej strony, wyniki badań zaprezentowanych w niniejszej monografii mają charakter wstępny, i należy zaznaczyć, że na ich podstawie nie można potwierdzić bezpieczeństwa stosowania terapii fizykalnych u pacjentów onkologicznych.

Kontynuacja i rozszerzenie badań dotyczących wpływu promieniowania laserowego oraz pola magnetycznego na komórki zdrowe i nieprawidłowe jest niezbędne w celu ustalenia ewentualnych przeciwwskazań do ich stosowania.

ABSTRACT

Influence of selected therapies of physical factors on cell survival and proliferation in vitro model.

Key words: laser radiation, magnetic field, MTT test, flow cytometry, *in vitro*.

The aim of the study was to evaluate the influence of selected physical factors on the proliferation and viability of healthy and cancerous human cells. The specific objective was to analyse the effects of magnetic fields (variable and constant low frequency magnetic fields) and laser radiation on cell proliferation and viability *in vitro* culture.

The following research questions were asked:

1. Does laser radiation affect the viability of skin cancer cells (A431), skin cells - keratinocytes (HaCaT), skin cells - fibroblasts (NHDF)?
2. Does the variable magnetic field affect the viability of skin cancer cells (A431), skin cells - keratinocytes (HaCaT), skin cells - fibroblasts (NHDF)?
3. Does the permanent magnetic field affect the viability skin cancer cells (A431), skin cells - keratinocytes (HaCaT), skin cells - fibroblasts (NHDF)?
4. Does laser radiation affect the proliferation of skin cancer cells (A431), skin cells - keratinocytes (HaCaT), skin cells - fibroblasts (NHDF)?
5. Does the variable magnetic field affect the proliferation of skin cancer cells (A431), skin cells - keratinocytes (HaCaT), skin cells - fibroblasts (NHDF)?
6. Does the permanent magnetic field affect the proliferation of skin cancer cells (A431), skin cells - keratinocytes (HaCaT), skin cells - fibroblasts (NHDF)?

Research Method and Material: The studies were conducted on cell lines: A431 (human squamous cell skin cancer), NHDF (normal cells of human fibroblasts), HaCaT (normal cells of human keratinocytes). Exposure to laser radiation and constant and variable magnetic fields was carried out for three consecutive days at the same time intervals. The experiment on all the above indicated cell lines (A431, NHDF, HaCaT) intended for the MTT assay was repeated in three cycles and for flow cytometry in two cycles. The mean results of all three replicates of the MTT test and two replicates of flow cytometry were then analysed. In the case of laser radiation, the cells were exposed at the applied dose three times a day for 3 consecutive days. Intervals between successive exposures were forty minutes. Doses: 1 J/cm², 8 J/cm² and 15 J/cm², filling: 100%, treatment area: 96-hole plates, intended for MTT test 30,912 cm², and 6-hole

plates, intended for cell cycle analysis: 54 cm², emission mode: continuous. The duration of a single exposure was 3 minutes each time.

For constant and variable magnetic fields, the cells were also exposed at the applied dose twice daily for 3 consecutive days. The intervals between exposures were sixty minutes. Cells were treated at doses of: nominal induction values at the applicator wall of 2.5 mT, 6 mT and 12 mT and at the geometric centre of the applicator of 0.5 mT, 4 mT and 10 mT and analogously at frequencies of 2 Hz, 60 Hz and 120 Hz. Variable and permanent magnetic fields were used. For magnetic field exposure, the variable spectrum was 10 Hz, the pulse duration of 1 s and the interval of 0.8 s, the shape of the sinusoidal field due to its universal application. The duration of the magnetic field is 10 minutes each time. The plates were placed in the geometric center of the applicator.

Controls in the studies were cells removed from the incubator for the time needed to expose the test cells, but were not exposed to magnetic fields or laser radiation.

To test the significance of differences in cell cycle analysis and viability between groups, one-way ANOVA (one-way ANOVA) was used. The post-hoc analysis was performed using the Bonferroni test. The level of significance was taken at $p < 0.05$. Statistical analysis was performed using the program: TIBCO Software Inc. (2017). Statistica (data analysis software system), version 13. <https://www.tibco.com/>.

Results: There were no changes in proliferation and survival of the evaluated cells under the influence of laser radiation and variable and constant magnetic fields.

Conclusions:

1. Laser radiation in the therapeutic dose range does not affect the survival of normal and cancerous skin cells *in vitro*.
2. Laser radiation in the therapeutic dose range does not affect the proliferation of normal and cancerous skin cells *in vitro*.
3. The constant and variable magnetic field within the therapeutic dose range does not affect the survival of normal and cancerous skin cells *in vitro*.
4. The constant and variable magnetic field within the therapeutic dose range does not affect the proliferation of normal and cancerous skin cells *in vitro*.

Studies have shown that exposure to permanent and variable magnetic fields as well as laser radiation in the therapeutic dose range does not affect proliferation and cell cycle changes of human skin cancer cells (A431) as well as normal skin keratinocytes

(HaCaT) and fibroblasts (NHDF). Based on the conducted studies, it should be concluded that exposure to the above-mentioned physical factors may bring positive pro-health stimuli in patients through different molecular mechanisms than the changes studied in this paper. In addition, the results obtained may also suggest that physical therapy is relatively safe for patients, as it does not locally stimulate skin cells to divide uncontrolledly, which could be the beginning of inducing the process of carcinogenesis. On the other hand, the results of the studies presented in this monograph are preliminary, and it should be noted that on their basis it is not possible to confirm the safety of the use of physical therapies in cancer patients.

Continuation and extension of studies on the effects of laser radiation and magnetic field on healthy and abnormal cells is necessary in order to establish possible contraindications to their use.