

Využití buněčných kultur v lékařském výzkumu

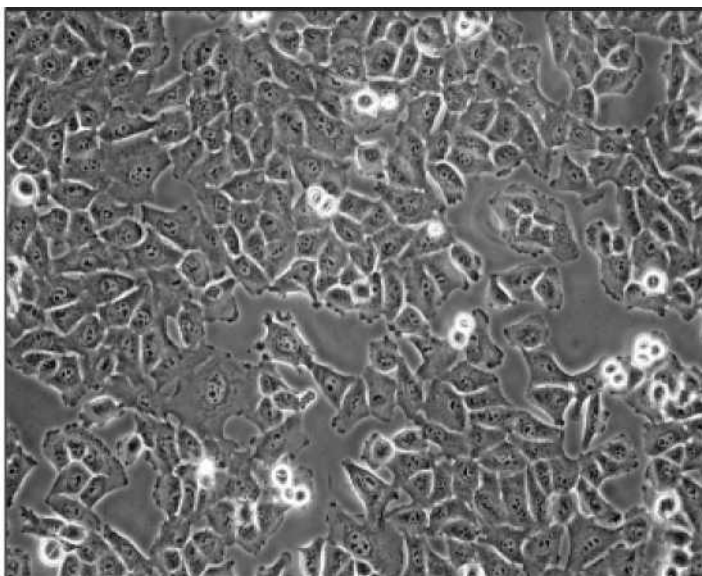
Prof. Dr. rer. nat. habil. Peter C. Dartsch, diplomovaný biochemik

1. Úvod a pozadí

Společnost Dartsch Scientific GmbH se od svého založení v roce 2002 v bezprostředním sousedství univerzitního města Tübingen ve Švábsku zabývá výzkumem a vývojem využití orgánově specifických buněčných kultur zcela bez pokusů na zvířatech. Kromě standardních metod společnost vyvinula také řadu vlastních zkušebních metod, které se úspěšně používají pro zkoumání účinných látek nebo směsí účinných látek v rozličných oborech. V popředí zájmu jsou nejen samotné prospěšné účinky, ale zkoumají se i možné toxické účinky. Na vybraných příkladech budou zdůrazněny možnosti orgánově specifických buněčných kultur v lékařském výzkumu. Pozornost je také zaměřena na zkoumání produktů a postupů, které se dříve v konvenční medicíně setkávaly spíše se skepticismem, ale jsou velmi zajímavé v některých oborech, jako je alternativní, komplementární a holistická medicína. Jednotlivé sekce jsou záměrně prezentovány v chronologickém pořadí a ve formě anekdot („uprostřed vědeckého života“).

2. Co znamená buněčná kultura?

Jako buněčnou kulturu označujeme kultivaci živočišných nebo rostlinných buněk v živném médiu mimo organismus. V zásadě se kromě původu (druh a orgán) rozlišuje mezi immortalizovanými (nesmrtelnými) buněčnými liniemi, tj. buňkami tkáňového typu, které se mohou během své kultivace neomezeně množit a jsou velmi stabilní ve svých vlastnostech, a primárními buňkami. Posledně jmenované jsou čerstvě izolované buňky z orgánů, které mají v kultuře pouze omezenou délku života a poté stárnou a odumírají nebo se s rostoucím věkem in vitro mění ve svých vlastnostech velmi silně ve výchozí buňku a nelze je použít pro další studie. Kritická hodnota je u většiny primárních buněk kolem čtvrté až osmé pasáže, tzn. tyto buňky se po izolaci dělily asi 8 až 20krát. Pokud je to možné, je použití buněčných linií primárním doporučením z důvodů nákladů (obrázek 1). Buněčné kultury jsou nyní široce využívány v základním biologickém a lékařském výzkumu, vývoji a výrobě biotechnických produktů a při výrobě například vakcín a monoklonálních protilátek.



Obr. 1: Mikrofotografie typické buněčné kultury adherentních fibroblastů pojivové tkáně (buněčná linie L-929) v logaritmické růstové fázi mnoha mitotickými buňkami v různých stádiích buněčného dělení, ale také několik buněk, které odumřely v důsledku apoptózy (= programovaná buněčná smrt).

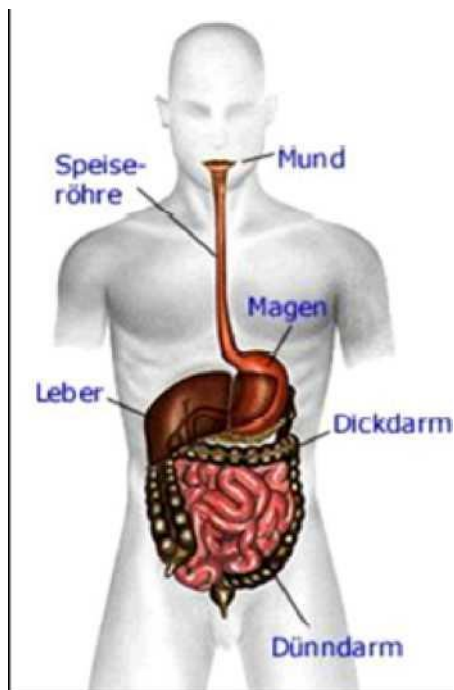
3. Vybrané příklady z vlastní praxe. pro použití orgánově specifických buněčných kultur a / nebo in vitro modelů

3.1. Možná toxicita amygdalinu uvolněním kyanovodíku v kyselém prostředí

V roce 2006 proběhl před 11. senátem správního soudu v Dolním Sasku soudní spor mezi lékárenskou komorou německé spolkové země a rezidentním lékárníkem, který plnil vysoce vyčištěný amygdalin do kapslí a prodával je pacientům s rakovinou. Je třeba vědět, že amygdalin se používá jako léčba rakoviny v oblasti alternativního lékařství nebo se také předepisuje jako doplňkový prostředek po chemoterapii. Amygdalin je složkou hořkých mandlí a meruňkových jader a podle běžného (a stále převládajícího) učení štěpí jako cyanogenní glykosid během trávicího procesu těžkou a vysoce toxickou kyselinu kyanovodíkovou. Otázka soudního sporu nespočívala v ověření účinnosti amygdalinu jako léčiva proti rakovině, ale zda amygdalin prodávaný lékárníkem měl skutečně nezbytnou čistotu a zda tento amygdalin během průchodu trávicím traktem skutečně štěpí kyanovodík. Ze zřejmých důvodů nebylo možné ani testování na zvířatech, ani testování na dobrovolnících, takže nakonec byla oslovena moje firma, protože jsme vyvinuli trávicí model s přidanou buněčnou kulturou (obr. 2), který byl vytvořen na míru pro řešení sporu.

Po provedení určených testů jsem byl tehdy předvolán k soudu jako externí znalec, abych výsledky ještě jednou představil ústně a odpověděl na otázky soudců. Výsledek našich výzkumů ukázal, že i při prázdném žaludku s pH žaludeční šťávy 1,8 a 37 ° C se od amygdalinu neodštěpí žádný kyanid, takže se také nemůže vyvinout žádný kyanovodík. Kromě chemické analýzy gastrointestinální šťávy byl proveden test toxicity s fibroblasty pojivové tkáně a střevními epiteliálními buňkami.

Kromě toho byl napadaný amygdalin z více než 97 % čistý. Tvorba kyseliny kyanovodíkové z hořkých mandlí a meruňkových jader je založena na současné přítomnosti další složky, beta-glukosidázy, která v kyselém prostředí enzymaticky podporuje štěpení amygdalinu.



Obr. 2: Hlavní součásti trávicího modelu.

- (1) Ústa => syntetické sliny
Anorgan. komponenty: NaCl, NaSCN, KCl, Na₂SO₄, NaHCO₃, KH₂PO₄, CaCl₂
Organ. komponenty: Močovina, kyselina močová. Mucin z prasečí slinivky, u-amiláza pH 5,6 - extrakční doba do 2 min / 37 °C
- (2) Žaludek => žaludeční šťáva
Anorgan. komponenty: NaCl, KCl, KH₂PO₄,
Organ. komponenty: Mucin z prasečí slinivky, pepsin ze žaludeční sliznice prasete pH: 1,6-1,8 (prázdný žaludek) až pH 5,5 (plný žaludek) - extrakční doba až 8 h/37 °C
- (3) Tenké střevo => střevní (dvanácterníková) šťáva
Anorgan. komp.: KCl, CaCl₂, MgCl₂, NaHCO₃
Organ. komponenty: Trypsin a pankreatin ze slinivky prasete. Lipázy a žlučový extrakt z prasete. pH: 5.8-7,6 - extrakční doba až 16 h/37°C
- (4) Játra => primární metabolizace (first pass)

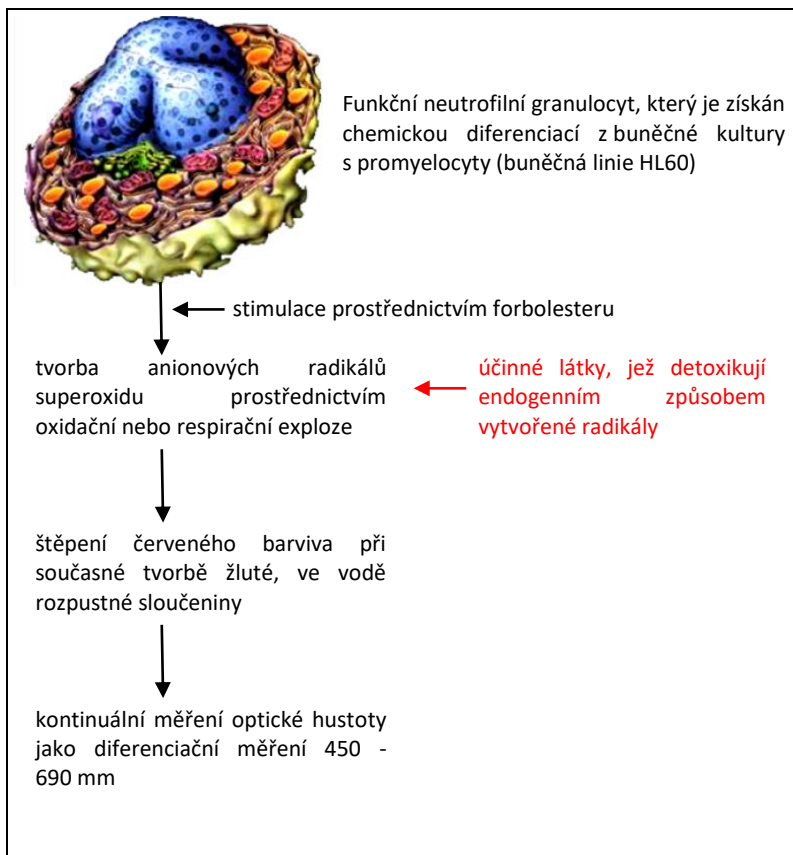
3.2. Protizánětlivý účinek extraktů mušlí slávky zelenoústé z Nového Zélandu

Téměř současně se na firmu Dartsch Scientific obrátila společnost z Nového Zélandu a dotazovala se, zda bychom mohli vyvinout testy buněčné kultury in vitro, pomocí nichž by bylo možné vzájemně porovnat protizánětlivé účinky různých výtažků slávky zelenoústé rostoucí pouze na Novém Zélandu. Je důležité poznamenat, že především jemně extrahované a vysoce aktivní extrakty oleje z mušlí s lyprinolem a už méně tak prášek představují jednu z nejdůležitějších terapeutických možností u chronických zánětů kloubů, jako je artróza, artritida, atd.

Po několika měsících vývojové práce poskytl spolehlivý a reprodukovatelný výsledek tzv. funkční test neutrofilů, který byl dále vyvinut z vědecké literatury. Při něm se rutinně množí lidské promyelocyty v suspenzních kulturách a diferencují se na funkční neutrofilny působením chemického činidla po dobu několika dnů (obr. 3). Podobně jako neutrofilní granulocyty v krvi, jsou tyto in vitro diferencované buňky schopny vytvářet ve formě oxidační exploze vysoce reaktivní anionové radikály superoxidu. In vivo tak tyto buňky činí nejen v krvi pro obranu a fagocytózu mikrobiálních patogenů, ale také migrují do zánětlivé tkáně a udržují zánětlivý proces neustálým vytvářením radikálů.

Máme-li nyní syntetickou, rostlinnou nebo živočišnou účinnou látku, která narušuje tento začarovaný kruh trvalé přítomnosti radikálů, a to buď inhibicí produkce radikálů v zánětlivé tkáni, nebo přímou neutralizací vznikajících radikálů, máme velmi dobrou šanci produkovat potenciálně protizánětlivou účinnou látku. V počáteční fázi jsme tento

test rozsáhle ověřili známými protizánětlivými léčivy, jako jsou Ibuprofen, Diclofenac nebo Meloxicam, jakož i s dalšími nesteroidními antirevmatiky (NSA).

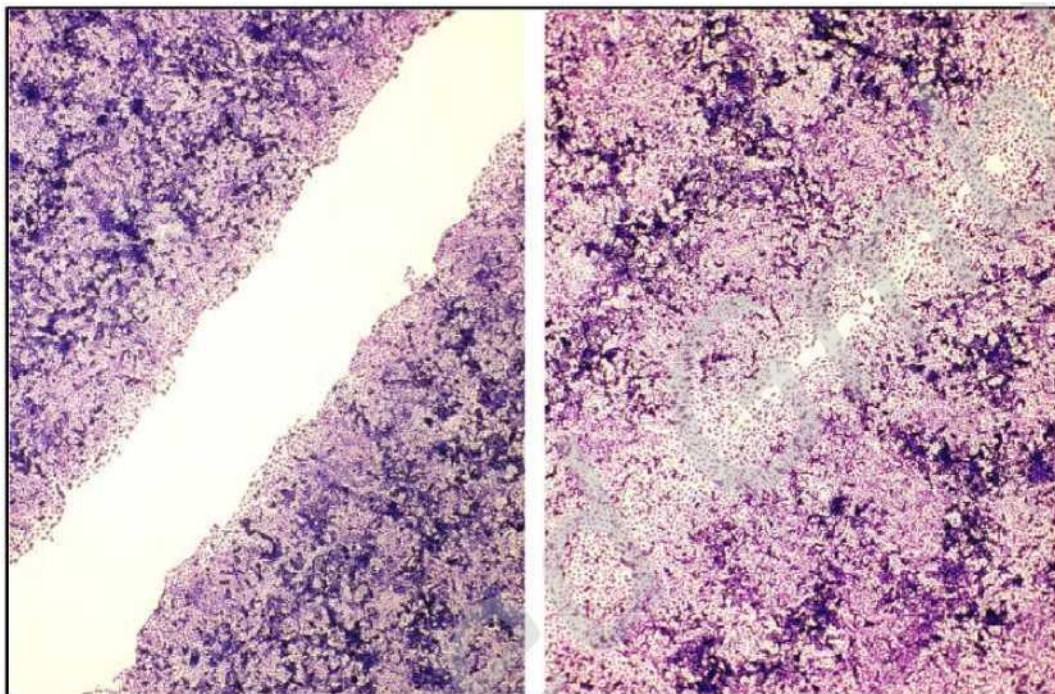


Obr. 3 Simulace zánětlivé reakce ve tkáni prostřednictvím endogenně generovaných kyslíkový radikálů ve funkčních neutrofylech.

Za zmínku stojí: Přípravky se slávkou zelenoústou jsou velmi účinné při kloubních obtížích u psů i koní. V případě posledně jmenovaných se to opakovaně ukázalo v rámci osobních zkušeností s určitými a také námi samotnými testovanými formulemi. Tento test nám dodnes dobře sloužil při screeningu a dalším vývoji farmaceutických látek, stejně jako v potravinářských a krmných doplňcích, kosmetice a podobně a přispěl k více než 30 vědeckým publikacím. Mimo jiné jsme tuto metodu použili i k prozkoumání nové bylinné zubní pasty obsahující účinné mikroorganismy a pozitivní výsledky jsme zveřejnili v roce 2011 v Německém zubařském věstníku. Ačkoli časopis původně tento článek nechtěl přijmout, byl to právě tento článek, který získal výroční cenu Německé společnosti pro zubní, ústní a čelistní medicínu za nejnovativnější publikaci roku 2011.

3.3. Regenerace buněk a hojení ran

Prostřednictvím procesů regenerace buněk se in vivo obnovuje funkčnost poškozené tkáně. Pokud předcházelo poranění, lze v tzv. granulační fázi dosáhnout imigrací a dělením typu buněk převládajících v dotyčné tkáni uzavření a konsolidace tkáně. Zejména je tato fáze simulována ve zde použitém testovacím systému. Fibroblasty pojivové tkáně jsou zasety do speciálních silikonových kultivačních vložek se čtyřmi přihrádkami uspořádanými do kříže, které byly předtím přilepeny ke dnu kultivačních misek, čímž vytvořily definovanou oblast bez buněk. Po dosažení uzavřené buněčné vrstvy jsou vložky opatrně odstraněny pinzetou. Zůstávají mezi jednotlivými oddíly tak zachovány ostře ohraničené oblasti bez buněk. Buňky nyní mohou migrovat do těchto bezbuněčných oblastí a uzavírat tam bezbuněčné oblasti pomocí zvýšeného dělení buněk (obr. 4). Repopulace bezbuněčného prostoru se (volitelně) kontinuálně zaznamenává pomocí časosběrné video-mikroskopie a buňky se pak po 24 hodinách fixují a obarví. I s pomocí tohoto testovacího systému bylo dosud úspěšně zkoumáno mnoho různých testovaných látek na jejich vlastnosti podporující regeneraci buněk.



Obr. 4: Prostor bez buněk krátce po odstranění silikonových vložek (vlevo) a po 24 hodinách (vpravo), ve kterých fibroblasty pojivové tkáně migrovaly do prostoru bez buněk a tam se rozdělily. Šířka bezbuněčného prostoru ve srovnání s neošetřeným kontrolním vzorkem slouží jako hodnotící kritérium.

3.4. Buňky dýchacích cest na rozhraní Air-Liquid

Novinkou v roce 2016 jsou studie buněčné biologie na kultivované lidské buněčné linii plic v ponořené kultuře (účinná látka se nachází ve živném médiu, do kterého jsou buňky ponořeny) nebo primárních lidských buněk z horních a dolních dýchacích cest. V případě nazálních epitelálních buněk mohou být tyto buňky zkoumány buď přímo po odběru, nebo kultivovány na porézní membráně, takže izolované jednotlivé buňky se znovu diferencují. Trik spočívá v tom, že bazolaterální část buněk vyčnívá do kultivačního média a odtud je celá buňka zásobována živinami, přičemž apikální část buňky, včetně buněk nově vznikajících v průběhu diferenciaci, se nachází ve vzduchu. Přesně tuto situaci máme v našich dýchacích cestách. Prostřednictvím těchto testovacích systémů je možné

provést celou řadu studií in vivo týkajících se farmakologie a toxikologie in vitro, přičemž mohou být testované látky vedeny přes buňky jako aerosoly (= místní aplikace), jakož i v kultivačním médiu, které zde hraje roli krve, k níž jsou dopravovány bazolaterální části buněk, které nepřijdou do kontaktu s dechem (= systémová aplikace). Kromě vitality buněk mohou být parametrem měření také frekvence kmitání řasinek zjištěné pomocí video-mikroskopie se záznamem pomalého pohybu nebo morfologie buněčných vrstev v průřezu. S těmito testovacími systémy byly dosud úspěšně zkoumány nové formulace nosních kapek a antivirových účinných látek, jakož i rozdíly v účincích tabákových cigaret ve srovnání s elektronickými cigaretami a jejich tekutinami na dýchací cesty.

4. Aktuální výzkumné projekty mezi vědeckým přijetím a skepticismem

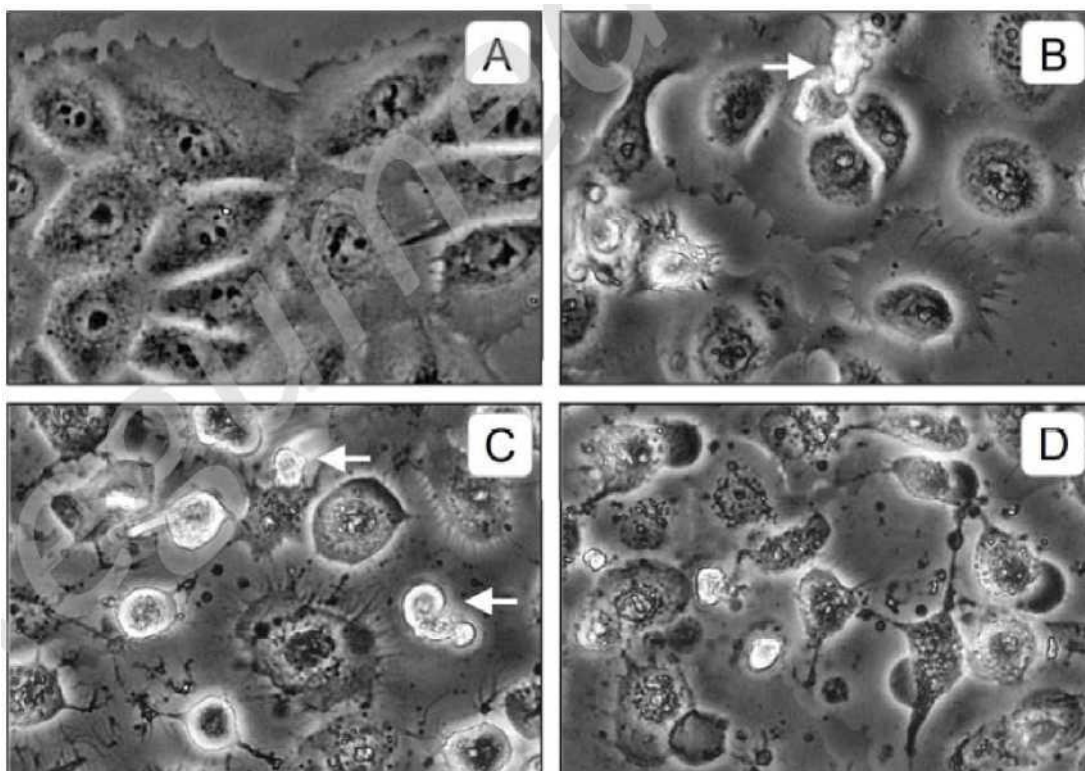
Tyto aktuální projekty mají společné to, že jsem jako vědecký „zastávce tvrdé linie“ byl v posledních 10 letech konfrontován s produkty a jevy, které jsem zpočátku skepticky odmítl bez bližšího prozkoumání, ale v určitém okamžiku mě pak popadla zvědavost a pak už byl nutný jen velmi malý krok, abych porazil můj skepticismus a zapojil se do zcela nových myšlenek bez jakýchkoli předsudků.

4.1. Proutkaři a geopatogenní zóny

Primárním podnětem pro mé otevřenější myšlení byla asi před 6 lety žádost Asociace pro geobiologii e.V., zda se chci stát členem vědecké rady. Nenechal jsem se dlouho přemlouvat a záhy jsem byl přímo uprostřed dění a slyšel jsem o věcech, které ze mě dělaly velkého skeptika. Sdružení má výzkumný dům v Odenwaldu, ve kterém byla několikrát proutkaři detekována a přesně změřena výrazná geologická poruchová zóna. Tato poruchová zóna je tak výrazná, protože se zde nachází jak zlomy ve skále, tak i se zde současně nachází průnik Hartmanovy mřížky, která pokrývá celou Zemi, a nakonec je zde navíc ještě přítomna silná podzemní vodní žíla. Citlivé osoby na tomto místě vykazují během velmi krátké doby výrazné fyziologické změny. Přesně na tomto místě byly nakonec s velkým úsilím a náklady vybudovány jak inkubátor, tak i vyhodnocovací stanice, a další inkubátor na nezatíženém kontrolním místě jen o jeden metr dále. Buňky pojivové tkáně v odpovídajících vícenásobných kultivačních destičkách byly pak ponechány dva dny na geopatogenní zóně resp. na kontrolním místě a poté byla určena vitalita buněk. Testy byly samozřejmě provedeny v několika časově oddělených jednotlivých pokusech. Buňky v patogenní zóně reagovaly stimulací jejich bazálního metabolismu až do 45 %. Bylo také možné přiřadit různé stimulační oblasti na více kultivačních destičkách, k nimž došlo prostřednictvím různých podílů tří rušivých parametrů. Z výsledků vyšetření nelze odvodit, zda tato stimulace na buněčné úrovni vede k omezení pohody nebo dokonce k poškození zdraví. Je to však důkazem, že účinek geopatogenních zón lze naprosto jasně prokázat i v zcela neutrálním vědeckém testovacím systému na buněčné úrovni. Práce byla publikována v březnovém čísle 2014 časopisu CO.med.

4.2. Elektromagnetická pole a oxidační stres

Život **bez** mobilního telefonu a s ním spojená trvalá dosažitelnost je pro většinu moderních lidí stěží představitelný. To se týká zejména mladé generace. Z původně exkluzivní hračky se telefon během okamžiku stal každodenním společníkem na celém světě. Přibližně 7 miliard lidí dnes používá mobilní telefon - žádné zařízení v lidské historii nezažilo podobně rychlý průnik na trh. Přestože mobilní telefon není zdaleka jediným „znečišťovatelem“ našeho prostředí elektromagnetickým zářením (jinými jsou kromě jednoduchých napájecích kabelů, například telefony DECT a wifi, a dokonce i naslouchadla), je obzvláště důležité, že se tyto telefony často nosí přímo na těle nebo při telefonování spočívají přímo na uchu. Vysílací anténa je instalována přímo v mobilním telefonu a záření je emitováno více či méně sféricky - a tedy také ve směru hlavy. Již několik let zkoumáme na buněčné reakce na různá zařízení, která produkují elektromagnetické záření. Stále znovu se ukazuje, že - nezávisle na počtu buněk usmrčených zářením - je základní mechanismus vždy stejný: Oxidační stres (obr. 5). Ten kromě přímého poškození buněk (integrita buněčné membrány, DNA, lipidů) vede vždy ke zvýšení programované buněčné smrti (= apoptóza) v buněčné populaci. Zkoumáme však i zařízení od německého výrobce, která jsou schopna specificky kompenzovat atermální část záření, což významně snižuje zatížení těla.



Obr. 5: Časová sekvence ztráty vitality buněk v kultivovaných fibroblastech pojivové tkáně v důsledku oxidačního stresu po dvou hodinách expozice atermálnímu záření aktivně vysílajícího mobilního telefonu a následné inkubaci bez dalšího vlivu.

- (A) Vzhled buněk bezprostředně po dvouhodinové expozici s typickou morfologií buněk ve tvaru plachty a dobře rozpoznatelným buněčným jádrem a částic jader, jakož i tmavšími cytoplazmatickými výtoky, které představují přední stranu pohybujících se buněk.
- (B) 6 hodin po expozici se buňky smrští a zakulatí a v již mrtvých buňkách se objeví první výskyt apoptotických částic.
- (C) Po 12 hodinách nacházíme první tmavé trosky zničených buněk.
- (D) Po 24 hodinách většina buněk odumřela a v kultuře plave již jen buněčný odpad. Bílé šipky označují apoptotické buňky. Série obrázků zveřejněná v P.C. Dartsch: Záření mobilních telefonů a oxidační stres. Naturopathy Journal 20: 30-32 (2018).

4.3. Přírodní pramenitá voda a následně informovaná voda a její příznivé účinky na zdraví

Voda je základem veškerého života a naše tělo tvoří více než 70 % této chemické sloučeniny. Až do doby cca před dvěma lety byla pro mne voda prostě jen H₂O a mokrá. Koupat jsem se v ní mohl až při teplotě nejméně 26 °C. Za ony dva roky jsem provedl řadu testů s vodou, které nemají nic společného s natištěnou analýzou minerálů, nýbrž s příznivými účinky na buněčnou úroveň. Přes počáteční skepticismus se ukázalo, že **voda nerovná se voda** a existují významné rozdíly v účincích mezi tradiční neperlivou vodou (ve skutečnosti mrtvou vodou díky reverzní osmóze) a živou pramenitou vodou nebo dodatečně aktivovanou a informovanou kohoutkovou vodou. Tyto tři pojmy živá, aktivovaná, informovaná voda znamenají pozitivní vibrace uložené ve vodě, které buď vznikají při průchodu zemskou kůrou (například v artéských pramenitých vodách), nebo jsou následně vpraveny do kohoutkové vody pomocí technických systémů. Nejsem odborník na vodu, a nemohu proto uvádět žádné další komentáře k vibracím a jejich ukládání. Velice mi to však připomíná účinek homeopatických léků ve vysokých ředěních, kde již nejsou přítomny žádné molekuly účinné látky, ale pravděpodobně pouze specifické informace ve vodě, které jsou předávány protřepáním.

Když odhlédneme od skutečnosti, že existuje řada produktů, ve kterých jsem v rámci slepých studií nemohl najít rozdíl mezi aktivovanou vodou a původní vodou, seznámil jsem se s několika, u nichž jsem byl více než překvapen. Tyto vody nejenže dokázaly stimulovat vitalitu buněk a podpořit regeneraci buněk pojivových tkání, ale měly také antioxidační a protizánětlivý potenciál. Některé z vod také dokázaly významně zvýšit buněčný metabolismus funkčních neutrofilů, a tak určitě in vivo měly vliv na zlepšení imunitu mikrobiálních patogenů v krvi. Získané výsledky in vitro jsou ve velmi dobré korelaci s klinickými studiemi pramenité a léčivé vody a často pomáhají vysvětlit občasné překvapivé výsledky u dobrovolníků / pacientů.

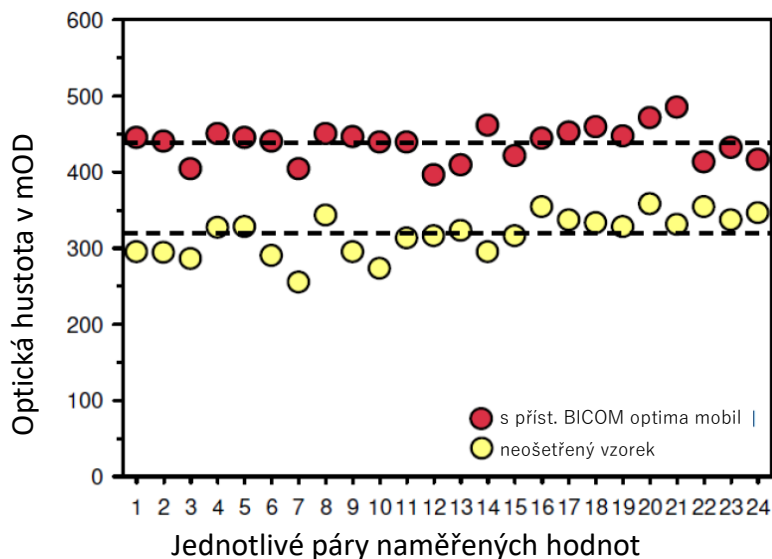
4.4. Biorezonanční přístroj BICOM® a jeho účinek na buněčné úrovni

V říjnu 2017 byla společnost Dartsch Scientific GmbH pověřena, prozkoumat pomocí nejmodernějších buněčných biologických metod, zda lze prokázat příznivé účinky biorezonanční metody BICOM na kultivované buňky pojivové tkáně. Teprve po několika pokusech po dobu několika měsíců se podařilo zjistit příznivé účinky. To souvisí se složitostí metody a citlivostí měřicího zařízení, protože při praktické aplikaci s buněčnými kulturami musely být zváženy a nejprve optimalizovány i ty nejmenší detaily.

Společnost REGUMED nám poskytla zapůjčený přístroj BICOM optima mobil. V závěrečné fázi optimalizace byl navíc použit BICOM Power Applicator GST71 (optima) uložený po dobu expozice v mini inkubátoru při 37 °C. Jako základ byl použit programový řetězec „Patogeny Aí“ 10325 a všechny tři podprogramy byly nastaveny na dobu 30 minut, takže jeden expoziční cyklus činil 90 minut. Tento cyklus jsme nechali proběhnout 2x po sobě během expozice buněčných kultur, takže buňky byly celkem exponovány po dobu 180 minut. Pohárek se vzorky vpravo nahoře vždy v rámci těchto pokusů obsahoval stejné kultivační médium a vzorky buněk, které byly před experimentem předem ošetřeny za stejných podmínek.

Samozřejmě víme, že doba expozice člověka by neměla přesáhnout jednu hodinu. Zde však vyvstala primární otázka, zda lze prostřednictvím biorezonanční metody BICOM vůbec dosáhnout pozitivní buněčné reakce.

Stručně řečeno, aplikace mobilního přístroje BICOM optima 2 generace v kultivovaných buňkách pojivové tkáně vedla k výrazné a statisticky významné stimulaci vitality buněk (obr. 6), což u lidí může vést k vyšší fyzické výkonnosti, a tím ke zlepšení pohody. Kromě toho také významně zlepšila (= zkrátila) regeneraci buněk / hojení ran stimulací buněčné migrace a dělení buněk.



Obr. 6: Grafické znázornění absolutních naměřených hodnot vitality buněk pojivové tkáně po expozici přístrojem BICOM optima mobil ve srovnání s neošetřeným vzorkem. Na obrázku jsou vyneseny jednotlivé páry měřených hodnot stejných prohlubní obou kultivačních destiček s 96 jamkami a příslušná průměrná hodnota je zobrazena jako přerušovaná čára. Je jasně zřejmé, že i přes výkyvy, které biologický měřicí systém v zásadě znamená, je průměrná hodnota pro exponované buňky výrazně vyšší než pro neošetřené buňky.

Poznámka: Zde uvedené studie byly téměř vždy prezentovány i ve vědeckých publikacích, pokud nejsou předmětem utajení.