

Studium účinku fotodynamické terapie na buněčné linie

prostřednictvím spektroskopických metod a mikroskopu atomárních sil



Lékařská
fakulta

Univerzita Palackého
v Olomouci

Autor: Oliver Urban

Školitel: Mgr. Lukáš Malina, Ph.D.

Ústav lékařské biofyziky, LF UP v Olomouci

Úvod:

Fotodynamická terapie (PDT) je terapeutická metoda založená na tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS) při reakci světla o určité vlnové délce s fotosensitivní látkou (fotosenzitizérem). Využití PDT nezahrnuje pouze léčbu maligních onemocnění, ale i léčbu kožních onemocnění, jako je akné nebo psoriáza. V současnosti také probíhá mnoho studií, které zkoumají další využití, např. u trombolýzy. Fotosenzitizér Rose Bengal (RB; 4,5,6,7-tetrachlor-2',4',5',7'-tetrajodfluorescein) je hydrofilní xanthenové barvivo, známé především antibakteriálními účinky, přičemž jeho vliv na buněčné linie je stále předmětem výzkumu. Rakovina děložního čípku (HeLa linie) je 3. nejčastější nádorové onemocnění žen, jehož hlavní příčinou je chronická infekce lidským papilomavirem (HPV).

Cíle:

1. Určit hodnotu IC_{50} pomocí MTT testu a ověřit tvorbu ROS u buněčné linie HeLa po použití fotosenzitizéru RB a dávky záření 5 J/cm^2 .
2. Pozorovat morfologické změny u nádorové buněčné linie HeLa před a po PDT pomocí mikroskopu atomárních sil (AFM).

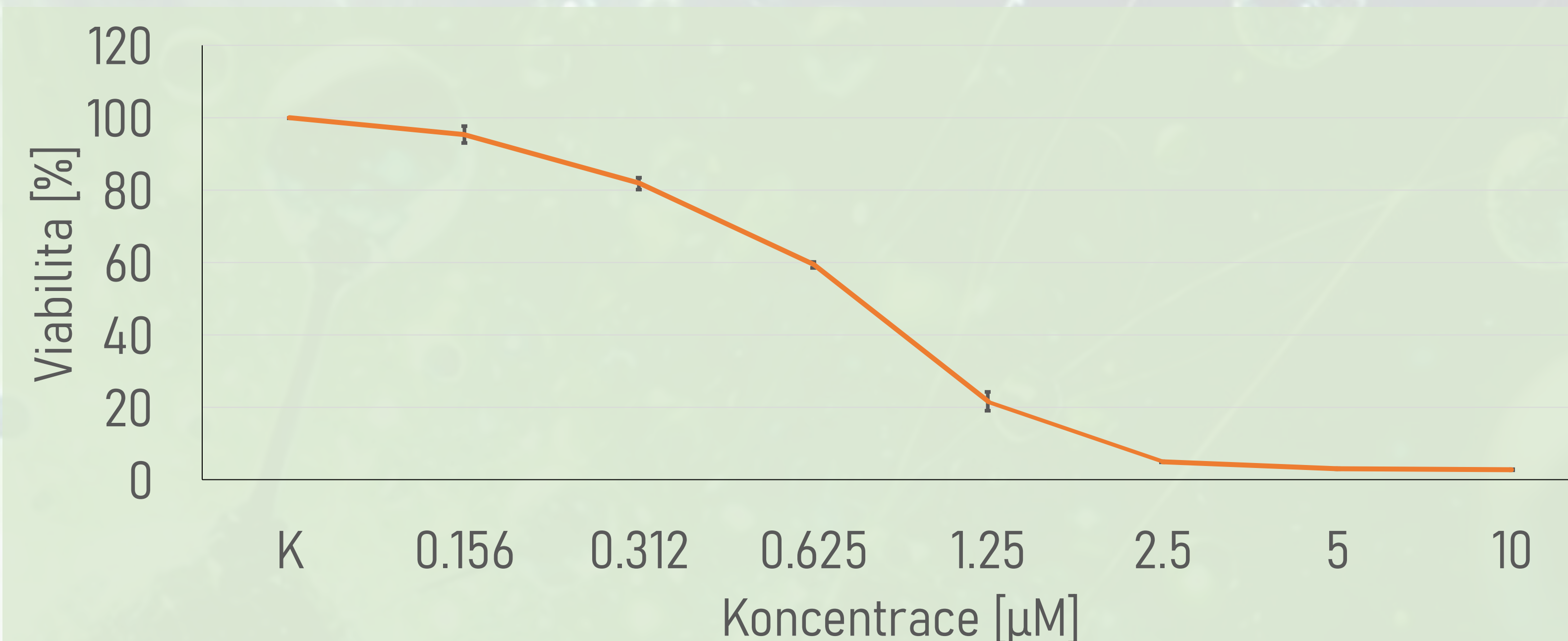
Materiál a metody:

1. Pro MTT test a detekci ROS byl k HeLa buňkám v 96jamkové desce přidán fotosenzitizér (v tripletu) o koncentraci 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312 a 0,156 μM s následnou inkubací (5 % CO_2 ; 37 °C) po dobu 24 hod.
2. V rámci MTT testu byl po ozáření (525 nm v celkové dávce 5 J/cm^2) a inkubaci po dobu 24 hodin přidán k buňkám roztok Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromidu, se kterým byly inkubovány 4 hodiny. Vzniklé fialové krystalky formazanu v živých buňkách byly následně rozpuštěny v DMSO a detekovány měřením absorbance pomocí fluorescenčního readeru Tecan Infinite 200pro při 570 nm a 690 nm.
3. V případě detekce ROS byl k buňkám nejdříve přidán roztok fluorescenční značky CM- H_2DCFDA , která interaguje s ROS za vzniku fluorescence. Po inkubaci 25 minut byly buňky ozářeny (525 nm, dávka záření 5 J/cm^2) a ihned vloženy do readeru pro změření vznikající fluorescence při 480 nm.

4. Příprava buněk v Petriho misce pro analýzu pomocí AFM (BioScope Catalyst, Bruker) zahrnovala přidání fotosenzitizéru o koncentraci IC_{50} , inkubaci 24 hodin, ozáření (525 nm, dávka záření 5 J/cm^2) a opětovnou inkubaci po dobu 24 hodin. Pro následné měření byl použit hrot TAP150 (konstanta pružnosti: 5 N/m) při rychlosti 0,2 Hz.

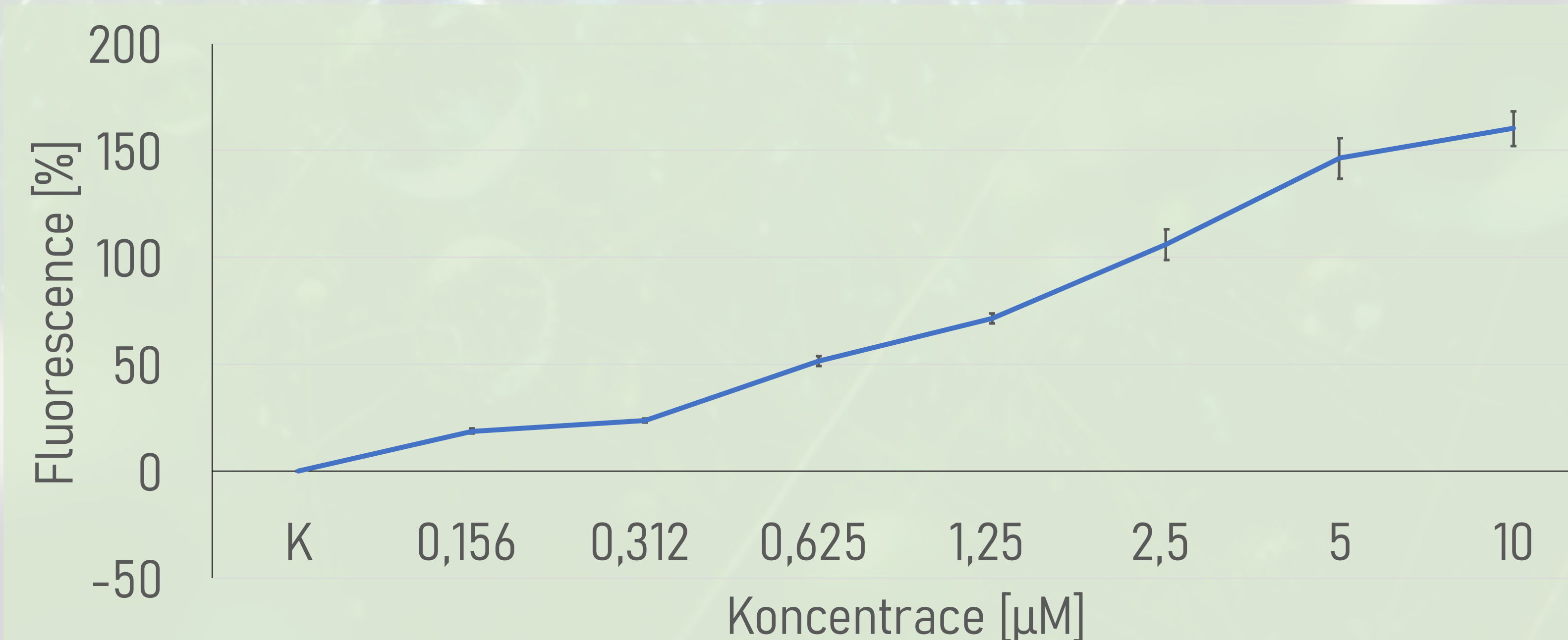
Výsledky:

1. Výsledky viability z MTT testu byly vloženy do programu Phototox 2.0, který vypočítal hodnotu IC_{50} - **0,74487 μM** .



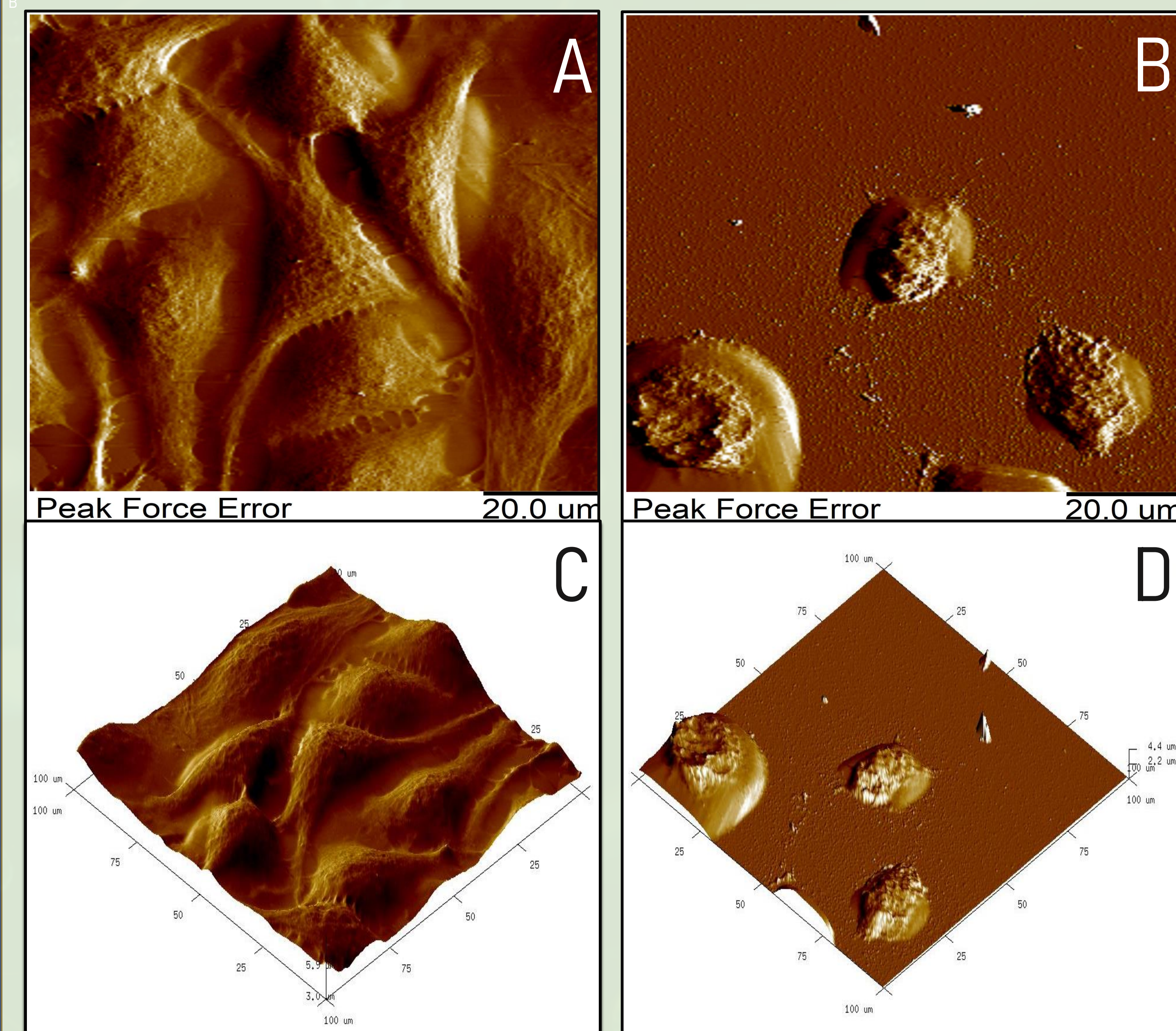
Graf č. 1: Graf závislosti viability na koncentraci fotosenzitizéru

2. Naměřené hodnoty detekovaných ROS jsou v grafu uvedeny jako nárůst vůči kontrole. Ze zjištěných výsledků je jasně patrný procentuální nárůst reaktivních forem kyslíku (v nejvyšší koncentraci až 160 %), což potvrzuje nejen schopnost fotosenzitizéru Rose Bengal tyto ROS tvořit, ale také jeho celkový potenciál v rámci fotodynamické terapie jako takové.



Graf č. 2: Procentuální nárůst ROS v porovnání s kontrolou

3. Analýza povrchu HeLa buněk před a po PDT pomocí mikroskopie atomárních sil detailně zobrazuje morfologické změny, které vlivem terapie nastaly. Nejenže je patrná ztráta typického tvaru HeLa buněk, ale lze také pozorovat ztrátu buněčných spojů a vylití obsahu poškozených/usmrčených buněk.



Obrázek č. 1: Zobrazení HeLa buněk pomocí AFM

A - 2D zobrazení buněk před PDT; B - 2D zobrazení buněk po PDT; C - 3D zobrazení buněk před PDT; D - 3D zobrazení buněk po PDT (Zdroj: vlastní)

Závěr:

Prokázali jsme, že fotosenzitizér Rose Bengal je v daném nastavení potenciálně vhodnou látkou pro fotodynamickou terapii. Zjištěná hodnota IC_{50} je srovnatelná či dokonce nižší než u jiných fotosenzitizérů, které se testují na HeLa buněčné linii. Pomocí mikroskopie atomárních sil jsme byli schopni zachytit morfologické změny buněk, ke kterým dochází vlivem PDT. Na základě získaných snímků lze také usuzovat, že se v případě analyzovaných buněk jednalo nejspíše o nekrotický typ buněčné smrti.