

# Studium fotodynamických reakcí na nádorových buněčných liniích

**Autor:** Lýsková Š., **Školitel:** Tománková K., Doc. Ing. Ph.D.

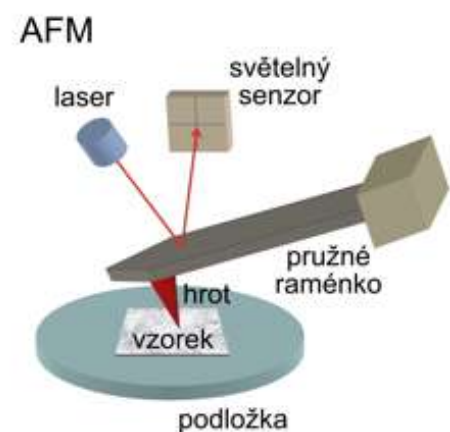
Fotodynamická terapie (PDT) je jednou z nových metod léčby některých nádorových onemocnění. Spočívá v aplikaci fotosenzitivní látky (senzitivizéru) a ozáření buněk zdrojem světla za přítomnosti kyslíku, což vede k tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS), které způsobují buněčnou smrt. Současně je poškozeno cévní zásobení tumoru a ten odumírá. Fotosenzitivní látka musí splňovat určité vlastnosti – primárně se hromadí v nejrychleji proliferujících (nádorových) buňkách a zároveň je rychle odstraňována z buněk zdravé tkáně, sama o sobě není cytotoxická a její absorpční maximum odpovídá vlnové délce použitého záření. Záření s vyšší vlnovou délkou prostupuje do tkáně hlouběji než záření s nižší vlnovou délkou, přesto červené světlo (na hranici s infračervenou oblastí) proniká maximálně 1 cm do hloubky tkáně. PDT je tak využívána hlavně v dermatologii a dokonce i pro tzv. purging (čištění) kostní dřeně při autologní transplantaci.

V cytoplazmě eukaryotických buněk se nachází vlákna cytoskeletu. Vytváří trojrozměrnou síť, která určuje tvar a pružnost buňky a zajišťuje její pohyb. Mezi vlákna cytoskeletu patří aktinová filamenta, intermediární filamenta a mikrotubuly. Během fotodynamické reakce dochází k přeskupení vláken cytoskeletu. Toto poškození zobrazujeme moderními mikroskopickými metodami, mikroskopií atomárních sil a fluorescenční konfokální mikroskopií. Měření bylo provedeno na buňkách karcinomu děložního čípku, linie HeLa, použitý senzitivizér TMPyP.

## Metody studia

Mikroskopie atomárních sil (AFM) je metoda, vyznačující se vysokou citlivostí, která umožňuje zobrazovat živé buňky v reálném čase, v jejich fyziologickém prostředí a bez nutnosti dlouhé přípravy vzorku. Při zobrazování dosahujeme vysokého rozlišení snímků, srovnatelného s elektronovou mikroskopií. Podstatou AFM je interakce mezi sondou mikroskopu a povrchem vzorku. Sonda se skládá z hrotu, jenž je přiblížen k buněčnému povrchu na vzdálenost, na kterou se projevují síly mezi atomy hrotu a atomy složek plazmatické membrány buňky. Hrot je

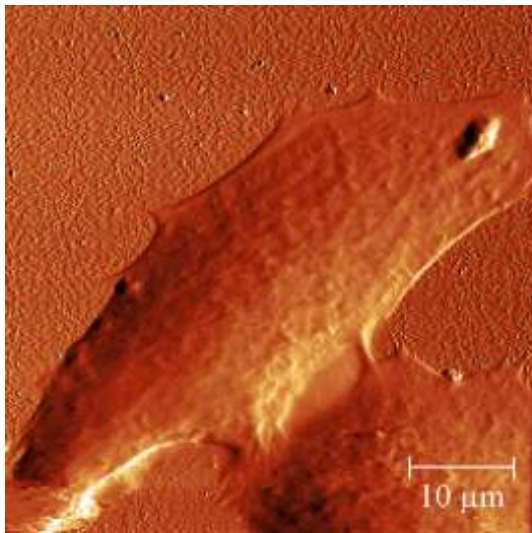
Obr. 1 Princip mikroskopie atomárních sil



Zdroj: [http://www.aldebaran.cz/bulletin/2012\\_44\\_afm.php](http://www.aldebaran.cz/bulletin/2012_44_afm.php) 8.4.2015

připevněn na pružný nosník, a ten se ohýbá v závislosti na síle působící na hrot. Od nosníku se pak odráží laserový paprsek, dopadá na fotodetektor a podle jeho výchylek od původní polohy v průběhu celého skenování je pak digitální formou zpracován trojrozměrný obraz povrchu buňky. Přesná poloha sondy při skenování je zajištěna velmi citlivými piezoelektrickými polohovači.

Obr. 2 Zobrazení buňky mikroskopií AFM po ošetření fotodynamickou reakcí



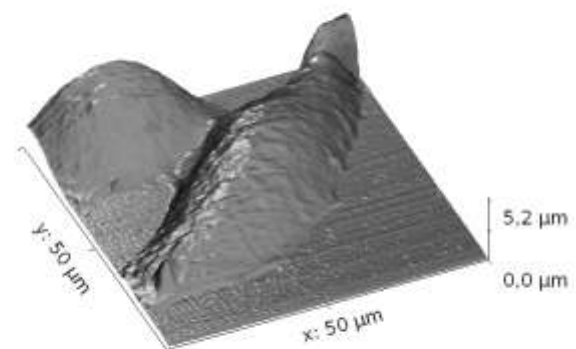
Zdroj: vlastní zpracování

může dotknout vzorku. Nejvýhodnější je použití nekontaktního módu s úpravou – nosník je rozkmitán a místo ohnutí měříme velikost amplitudy kmitu. Poslední, Peak Force Tapping mód vychází z pokleповého režimu, kdy v každém bodě snímku navíc měří silové  $F-d$  (*Force-distance*) křivky, jejichž různá matematická interpretace umožňuje z jednoho signálu získat až 8 druhů výsledků.

Vedle zobrazení povrchu buněk můžeme prostřednictvím AFM vypočítat a zobrazit jejich mechanické vlastnosti za použití naměřených silových  $F-d$  křivek. DMT modul pružnosti, deformabilita, velikost adhezních sil, velikost disipativních sil a jejich změna oproti hodnotám naměřeným u buněk před terapií určují efektivitu PDT. Zvýšená tuhost buněčné membrány souvisí se změnou struktury vláken cytoskeletu a je typická pro odumírající buňky.

Rozlišujeme čtyři zobrazovací módy AFM: při kontaktním módu je hrot v kontaktu s povrchem vzorku a odpuzivé síly způsobí konvexní zakřivení nosníku. Pokud se v skenovaném poli nachází výraznější nerovnost, hrozí porušení povrchu buňky hrotem. Opakem je nekontaktní mód, kdy se hrot pohybuje v určité vzdálenosti nad povrchem. V každém bodě je udržováno konstantní ohnutí nosníku podle přednastavené hodnoty. K sestavení snímku se použije změna vzdálenosti hrotu od vzorku v daném bodě pro zachování konstantního ohnutí. Obdobou nekontaktního je pokleповý mód, ovšem nosník je rozvíbrován více a hrot se místy může dotknout vzorku.

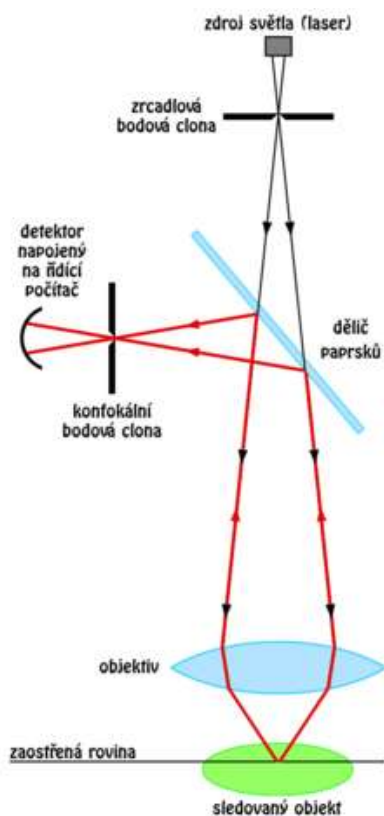
Obr. 3 Trojrozměrné zobrazení výšky buňky po terapii



Zdroj: vlastní zpracování

*Příprava a měření:* Buňky byly kultivovány ve 2 ml DMEM média po 24 h, poté byly vystaveny působení senzitiséru 0,1  $\mu\text{M}$  TmPyp po dobu 24 h při 37°C, následovalo propláchnutí médiem a ozáření LED diodami (414 nm) po dobu 250 s, dávka ozáření 5  $\text{Jcm}^{-2}$ . Poté byly buňky inkubovány 20 h v čerstvém médiu. Měření bylo provedeno mikroskopem Bruker BioScope Catalyst (AFM) spojeným s invertovaným optickým mikroskopem Olympus IX81, použitý typ hrotu pyramidový  $\text{Si}_3\text{N}_4$  (DNP 0,12  $\text{Nm}^{-1}$ , vrcholové zakřivení hrotu 20 nm), při skenovací rychlosti 0,2 Hz, mód měření PeakForce QNM, Software NanoScope, prostředí skenování: tekuté médium DMEM. Snímky byly zpracovány Softwarem Gwydion.

Obr. 4 Princip konfokálního mikroskopu



Zdroj: [http://www.wikiskripta.eu/index.php/Konfok%C3%A1ln%C3%AD\\_mikroskop](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Konfok%C3%A1ln%C3%AD_mikroskop) 4.4.2015

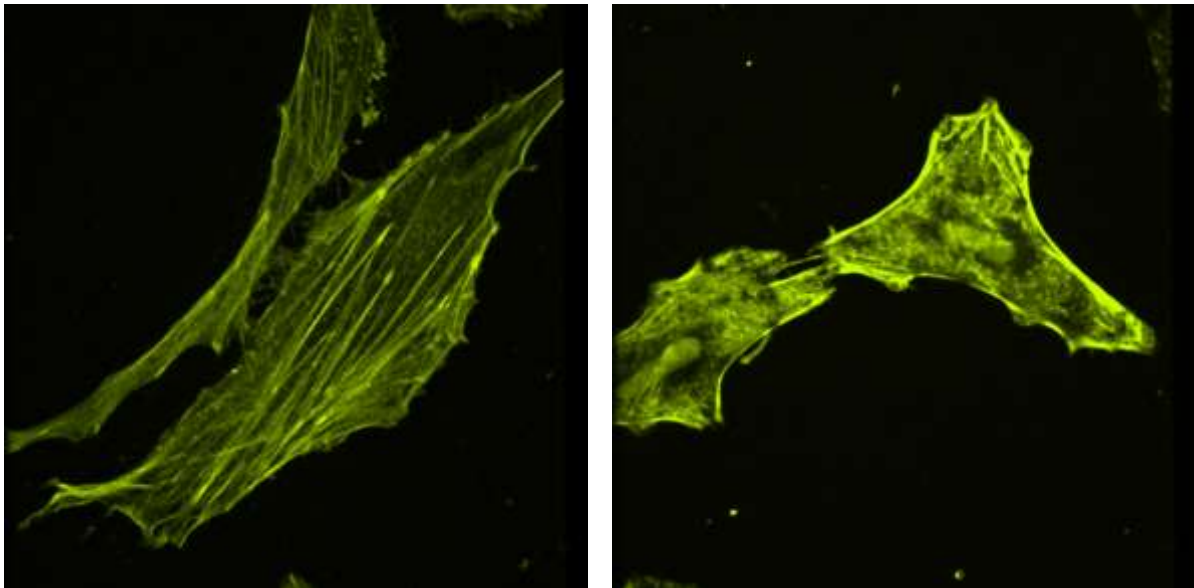
Lepšího zobrazení změn cytoskeletu dosáhneme použitím konfokálního fluorescenčního mikroskopu. Jedná se o optický mikroskop, který umožňuje zobrazit jednotlivé řezy buňkou. Zdroj světla generuje laserový paprsek, ten poté prochází přes bodovou clonu, objektiv a dopadá na vzorek. Vzorek je označen fluorescenčním barvivem, které pohlcuje část dopadajícího světla a následně je vyzáří jako emitované fluorescenční záření, které jde spolu s odraženým světlem zpět přes objektiv a odráží se od polopropustného zrcadla na bodovou clonu (ta odfiltrává světlo z jiných rovin) a dopadá na fotonásobič. Takto získáme obraz jednoho bodu, pro zobrazení celé roviny se postup opakuje.

*Příprava a měření:* Buňky byly ošetřeny stejně jako při pozorování AFM. Měřili jsme pomocí mikroskopu ZEISS Observer Z1 (s rotujícím diskem), Software Zen System 2012. Pro zobrazení aktinových filament byl vzorek nabarven Phalloidinem (emituje v zeleném spektru), aktivací vlnová délka laserového paprsku byla 488 nm. Pro zobrazení buněčných jader bylo použito barvivo DAPI (emitující záření modré) a měření provedeno při vlnové délce 405 nm. Dále byly zobrazeny mikrotubuly, které byly označeny protilátkami  $\alpha$ -tubulinu (emituje v červeném spektru), s aktivací vlnovou délkou 561 nm.

## Výsledky měření

Měření pomocí mikroskopie atomárních sil bylo prokázáno, že před ošetřením fotodynamickou reakcí buňky tvoří téměř konfluentní vrstvu, po aplikaci PDT terapie se oddalují a mají mezi sebou více prostoru. Mění se také jejich rozměry, buňky se vlivem snižující adheze zkracují a zvyšují. Modul pružnosti, vypočtený z  $F-d$  křivky, narůstá. Z toho plyne, že buňky ošetřené fotodynamickou reakcí mají nižší elasticitu a vyšší tuhost. Při zobrazování pomocí konfokální fluorescenční mikroskopie je patrné, že u buněk před terapií jsou aktinová filamenta lokalizována na periferii buňky. Po ozáření v rámci PDT se již po pěti minutách objevují v perimembránovém prostoru a mezibuněčná interakce je inhibována.

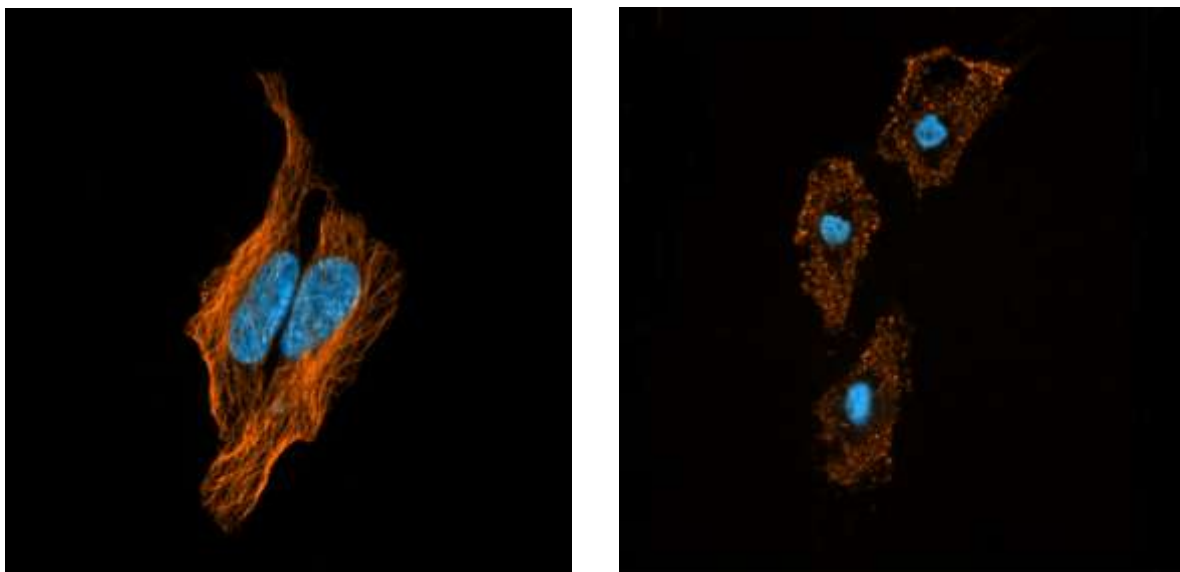
Obr. 5 a 6 Zobrazení aktinových filament fluorescenční mikroskopii před (vlevo) a po fotodynamické reakci (vpravo)



*Zdroj: vlastní zpracování*

Mikrotubuly neošetřených buněk tvoří síť kolem buněčného jádra. Po PDT se část mikrotubulů rozloží na tubulin, který se nahromadí v perinukleární oblasti. Zároveň, kvůli celkovému rozvolnění cytoskeletu dochází k tzv. blebbing, kdy se vytvoří nepravidelné záhyby cytoplazmatické membrány (bleby), které obsahují tubulin.

Obr. 7 a 8 Zobrazení mikrotubulů (červeně) a buněčných jader (modře) fluorescenční mikroskopií před fotodynamickou reakcí (vlevo) a po ní (vpravo)



( vlastní zpracování)

## Seznam použité literatury

### Odborné publikace

1. Kirmizis, D., Logothetidis, S., (2010): Atomic force microscopy probing in the measurement of cell mechanics
2. Uzdensky, A., Kolpakova, E., Juzeniene, A., Juzenas, P., Moan, J., (2004): The effect of sub-lethal ALA-PDT on the cytoskeleton and adhesion of cultured human cancer cells

### Internetové zdroje

1. [http://www.wikiskripta.eu/index.php/Konfok%C3%A1ln%C3%AD\\_mikroskop](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Konfok%C3%A1ln%C3%AD_mikroskop), 1.4.2015
2. <file:///E:/Blebbing%20%E2%80%93%20Wikipedie.htm>, 3.4.2015
3. [http://cs.wikipedia.org/wiki/Fotodynamick%C3%A1\\_terapie](http://cs.wikipedia.org/wiki/Fotodynamick%C3%A1_terapie), 31.3.2015
4. <http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/fotodynamicka-terapie-v-lecbe-aktinicke-keratozy-455349>, 1.4.2015
5. [http://eamos.pf.jcu.cz/amos/kra/externi/kra\\_7169/ch09.htm](http://eamos.pf.jcu.cz/amos/kra/externi/kra_7169/ch09.htm), 31.3.2015
6. [http://cs.wikipedia.org/wiki/Konfok%C3%A1ln%C3%AD\\_mikroskop](http://cs.wikipedia.org/wiki/Konfok%C3%A1ln%C3%AD_mikroskop), 2.4.2015
7. <http://www.img.cas.cz/vyzkum/pavel-draber/>, 2.4.2015