

VLIV PORFYRINŮ NA MECHANICKÉ VLASTNOSTI BUNĚČNÉ LINIE HELA

Jakub Malohlava, Kateřina Tománková, Hana Kolářová

Ústav lékařské biofyziky, Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc, 585 632 200, jakub.malohlava@upol.cz

Abstrakt

Porfyriny jsou významnou skupinou fotosenzitizérů uplatňujících se při fotodynamické terapii. Fotofyzikální vlastnosti porfyrinů jsou ovlivněny přítomností centrálního iontu. V této práci jsme se zaměřili na vliv nového fotosenzitizéru MgTPPS₄ na buněčnou linii HeLa. Pro vyhodnocení kvalitativních a kvantitativních změn jsme použili mikroskopii atomárních sil a konfokální mikroskopii. Zjistili jsme, že dochází ke statisticky signifikantním změnám v morfologii a mechanických vlastnostech buněk.

Klíčová slova: *fotodynamická terapie; mechanické vlastnosti; mikroskopie atomárních sil; F aktin; cytoskelet.*

Úvod

Fotodynamická terapie (PDT) je alternativní postup při léčbě některých nádorových onemocnění. Pro navození fotodynamického efektu je potřeba součinnosti tří faktorů: fotosenzitizéru, světla specifické vlnové délky a kyslíku. PDT využívá fakt, že v nádorové tkáni se akumuluje fotosenzitizér. Po následném ozáření nádoru se produkuje singletní kyslík a další reaktivní formy kyslíku (ROS), jako je peroxid vodíku, superoxidový anion, hydroxylový radikál, které vedou k nevratným změnám v nádorové tkáni. Kromě přímého cytotoxického poškození PDT působí i na cévní zásobení tumoru a vyvolává reakci imunitního systému [1].

Mikroskopie atomárních sil (AFM) [2] se řadí k moderním mikroskopickým technikám. V průběhu své historie se vyvinula ze zobrazovacího k vysoce univerzálnímu nástroji a umožňuje sledování dalších charakteristik zkoumaného systému. Princip AFM není složitý. Na pružném nosníku je umístěn ostrý hrot, který při přiblížení k povrchu s ním začne silově interagovat. Mezi hlavní interakce patří van der Waalsovy, coulombické a kapilární síly. Na základě těchto interakcí dojde k prohnutí nosníku, což je detekováno prostřednictvím optického systému. Následně dojde k počítačem řízené rekonstrukci a vytvoření topografického obrazu s velmi vysokým rozlišením. Rozlišení dosahuje 0,1 nm vertikálně a 1 nm horizontálně.

Silová spektroskopie je velkou aplikační oblastí AFM. Jedná se o měření silových interakcí mezi vzorkem a ostrým hrotem. Základem měření je nanoindentace, kdy ve zvoleném místě je hrot vtlačěn do vzorku a je zaznamenáno prohnutí nosníku. Takto vzniklá křivka, F-d křivka, je dále analyzována a na jejím základě jsou určeny hledané parametry, např. Youngův modul pružnosti, nespecifické adhezní síly nebo disipační energie.

Vztah mezi vnějším prostředím a cytoskeletárním systémem se odráží v mechanických vlastnostech buněk. Cytoskeleton se skládá z několika hlavních skupin proteinů: mikrofilament, intermediální filament a mikrotubulů. Podílí se na mnoha životně důležitých funkcích, jako je adheze, buněčné dělení, migrace či diferenciaci. Změna těchto struktur může sloužit jako patofyziologický marker [3].

Materiál a metody

V této práci byla použita buněčná linie HeLa. 10^5 buněk bylo kultivováno v médiu DMEM (Dulbecco's Eagle Medium) s 10 % FBS (Fetal Bovine Serum), 200 mM L-glutaminem a 0,4 % antibiotiky (penicilin/streptomycin) v Petriho miskách se skleněným dnem (Will-Co). Inkubovány byly ve standardních podmínkách s 5% CO_2 při 37°C.

Pro navození fotodynamického jevu byly buňky po dobu 24 h kultivovány s nově syntetizovaným fotosenzitizérem MgTPPS_4 o koncentraci 10 μM a 0 μM jako kontrola. Poté byly ozářeny zdrojem světla s maximem emise při vlnové délce 414 nm po dobu nezbytnou k dosažení celkové dávky ozáření 5 J/cm^2 . Následně byly buňky kultivovány dalších 20 h v čerstvém médiu.

Kontrolní buňky a buňky po PDT byly zobrazovány prostřednictvím mikroskopu atomárních sil Bioscope Catalyst (Bruker) za použití zobrazovacího módu PeakForce QNM se skenovací rychlostí 0,2 Hz. Byl použit hrot DNP 10 s rezonanční frekvencí 16 – 28 kHz a nominální konstantou tuhosti 0,12 N/m. Pro zjištění Youngova modulu pružnosti byly vyhodnocovány Fd křivky (Force vs distance curves) naměřené ve Force Volume módu s rychlostí 5,58 Hz. K fitování Fd křivek byl použit Sneddonův model:

$$F = \frac{2}{\pi} \frac{E}{1-\nu^2} \tan(\alpha) \delta^2$$

kde α je poloviční vrcholový úhel hrotu, E je Youngův modul, ν je Poissonův poměr a δ je deformace buňky. Pro buňky je Poissonův poměr volen 0,5. AFM obrazy byly zpracovány programem Gwyddion 2.34 a silové křivky byly analyzovány prostřednictvím SPIP 6.0.10.

Pro fluorescenční značení byly buňky fixovány 4% paraformaldehydem a následně permeabilizovány 0,1% Tritonem X-100. Značení F-aktinu bylo provedeno pomocí fluorescenční barvy Alexa Fluor 532 Phalloidin. Zobrazení probíhalo na systému Axio Observer Z1 (Zeiss), vybaveným spinning diskem Yokogawa CSU X1, a objektivem 63x/1.4 N.A.

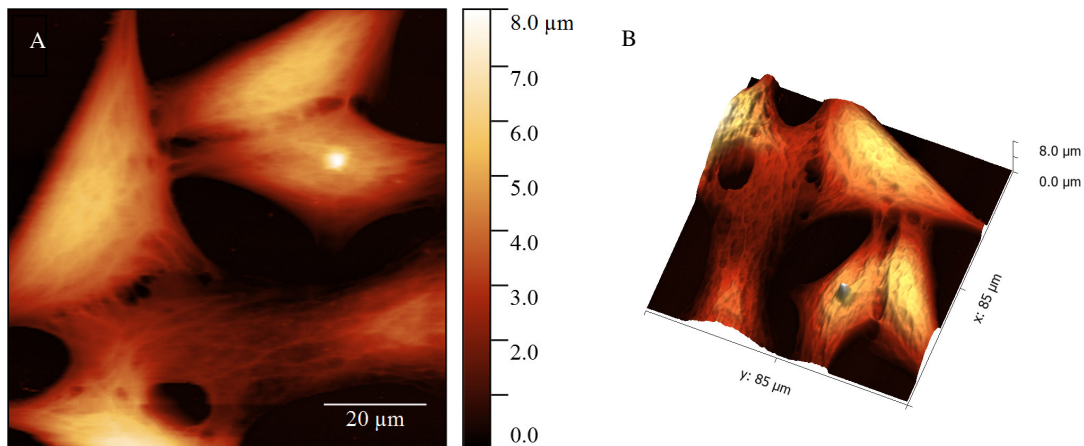
Výsledky a diskuse

V této práci jsme zkoumali vliv nového porfyrinového senzitizeru MgTPPS_4 . K evaluaci změn vyvolaných fotodynamickou terapií jsme použili fluorescenční konfokální mikroskopii a mikroskopii atomárních sil. Metaloporfyriny s centrálním iontem Mg jsou charakterizovány vyššími kvantovými výtěžky singletního kyslíku a delší dobou excitovaného tripletního stavu [4]. Lokalizace fotosenzitizeru uvnitř buňky je důležitým faktorem, neboť životnost singletního kyslíku je krátká a difúze tohoto radikálu nepřesahuje vzdálenost 20 nm [5].

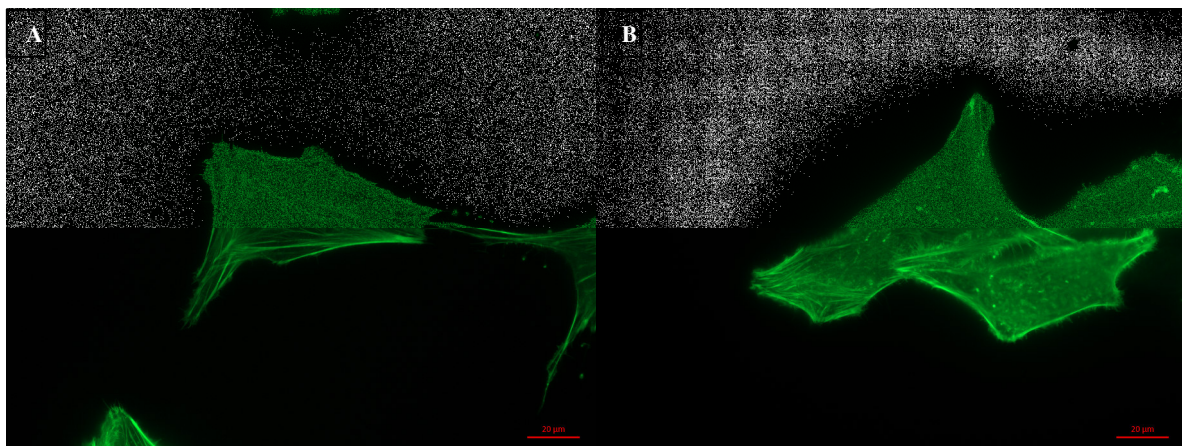
Morfologické parametry můžeme použít ke zhodnocení stavu buněk, podobně jako Jin a kol. [6], kdy posuzovali změny tvaru erytrocytů způsobené nemocí a stářím. Obrázek 1 představuje 2D (A) a 3D (B) reprezentaci výškového kanálu AFM při měření buněčné linie HeLa. Prostřednictvím AFM můžeme vyhodnocovat topografické parametry a jejich změny. Výška buněk po fotodynamické terapii je statisticky signifikantně vyšší oproti kontrolním buňkám.

Mechanické vlastnosti patří mezi hlavní charakteristiky stavu buněk a tkání. Jsou primárně určeny systémem cytoskeletárních proteinů a interakcí s vnějším prostředím. PDT kromě jednotlivých organel také působí na cytoskelet. Na obrázku 3 můžeme sledovat reorganizaci jednoho z hlavních cytoskeletárních proteinů – F-aktinu. Aktinová filamenta se převážně nalézají v perifériích pod buněčnou membránou a G-aktin je rozprostřen v cytoplazmě a v okolí jádra. Po PDT se rapidně snižuje zastoupení cytoplazmatického G-aktinu, přičemž F-aktin je zasažen

z počátku nepatrně [7]. Změny mechanických vlastností souvisí se změnou cytoskeletárních proteinů, zejména s aktinovými mikrofilamenty. Rotsch a Radmacher [8] vystavili buňky látkám ovlivňující polymerizaci mikrofilament a mikrotubulů, a zjistili, že rozrušení aktinových vláken má vliv na pokles Youngova modulu, kdežto mikrotubuly nevykazují výraznější efekt na změnu elasticity. Nádorové HeLa buňky podrobené PDT vykazují statisticky signifikantně vyšší Youngův modul pružnosti oproti buňkám, které PDT vystaveny nebyly.



Obrázek 1. 2D (A) a 3D (B) reprezentace výškového kanálu AFM Bioscope Catalyst, snímáno skenovací rychlostí 0,2 Hz, velikost skenu $85 \times 85 \mu\text{m}$, rozlišení 256×256 , hrot DPN s nominální konstantou tuhosti $k = 0.12 \text{ N/m}$.



Obrázek 2. Změna distribuce aktinu před (A) a po (B) PDT, značeno fluorescenční barvou Alexa Fluor 532 Phalloidin.

Závěr

Cytoskelet hraje důležitou roli při mnoha funkcích, jako je pohyb, adheze, buněčné dělení nebo strukturální integrita. Změny v cytoskeletárním systému vedou ke změnám mechanických vlastností, které mohou sloužit jako indikátor změn způsobených rakovinou. Naše práce se

zaměřila na změny způsobené novým porfyrinovým senzitizerem MgTPPS₄, a byla potvrzena jeho účinnost.

Poděkování

Práce vznikla za podpory projektu LF_2015_008 a NPU I LO1304.

Literatura

- [1.] AGOSTINIS, P., BERG, K., CENGEL, K. A., FOSTER, T. H., GIROTTI, A. W., GOLLNICK, S. O., HAHN, S. M., HAMBLIN, M. R., JUZENIENE, A., KESSEL, D., KORBELIK, M., MOAN, J., MROZ, P., NOWIS, D., PIETTE, J., WILSON, B. C., GOLAB, J. *Photodynamic therapy of cancer: An update*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2011, roč. 61, s. 250-281.
- [2.] BINNIG, G., QUATE, C. F. *Atomic force microscope*. Physical Review Letters, 1986, roč. 56, s. 930-933.
- [3.] BERQUAND, A., HOLLOSCHI, A., TRENDELENBURG, M., KIOSCHIS, P. *Analysis of cytoskeleton-destabilizing agents by optimized optical navigation and AFM force measurements*. Microscopy Today, 2010, roč. 18, s. 34-37.
- [4.] KUBAT, P., MOSINGER, J. *Photophysical properties of metal complexes of meso-tetrakis(4-sulphonatophenyl) porphyrin*. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 1996, vol. 96, s. 93-97.
- [5.] TSAI J. C., WU C. L., CHIEN H. F., CHEN C. T. *Reorganization of cytoskeleton induced by 5-aminolevulinic acid – mediated photodynamic therapy and its correlation with mitochondrial dysfunction*. Lasers in Surgery and Medicine, 2005, roč. 36, s. 398-408.
- [6.] JIN, H., XING, X., ZHAO, H., CHEN, Y., HUANG, X. et al. *Detection of erythrocytes influenced by aging and type 2 diabetes using atomic force microscope*. Biophysical and Biophysical Research Communications, 2010, roč. 391, s. 1698-1702.
- [7.] LIU, T., WU, L. Y., BERKMAN, C. E. *Prostate-specific membrane antigen-targeted photodynamic therapy induces rapid cytoskeletal disruption*. Cancer Letters, 2010, roč. 296, s. 106-112.
- [8.] ROTSCH, C., RADMACHER, M. *Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: An atomic force microscopy study*. Biophysical Journal, 2000, roč. 78, s. 520-535.

Abstract

Porphyrins are important group in photodynamic therapy (PDT). Its photophysical properties are significantly affected by a central ion. In this work, we focused on an impact of newly synthesised photosensitizer MgTPPS₄ on HeLa cell line. Atomic force microscopy and confocal microscopy were used to quantify and qualify structural characteristic before and after PDT. We observed statistically significant changes in morphology and mechanical properties of HeLa cells.