

Studium fotodynamické aktivity porfyrinových fotosensitizerů na nádorové buněčné linii MCF7

Klára Pížová¹, Eva Kriegová², Martin Petřek², Hana Kolářová¹

¹Ústav lékařské biofyziky, Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta Univerzity Palackého, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc

²Ústav imunologie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc

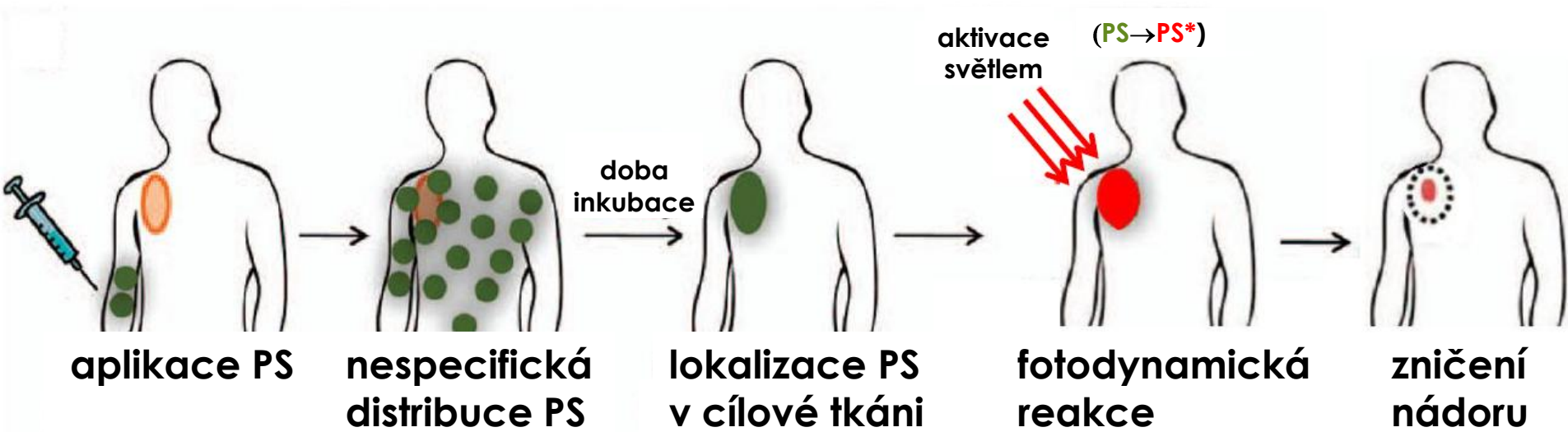
Mgr. Klára Pížová

Školitel : Prof. RNDr. Hana Kolářová, CSc.

BFD 2012



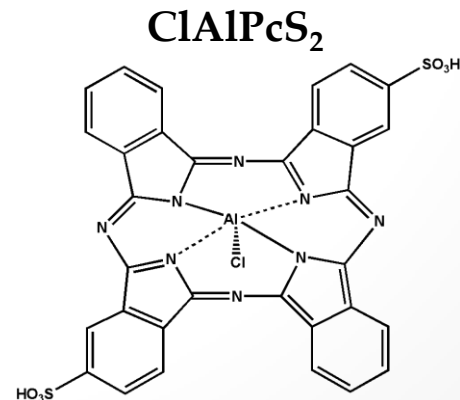
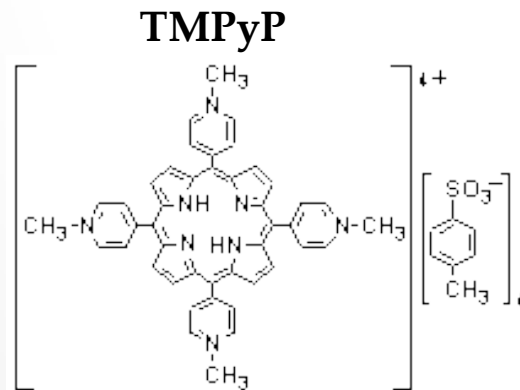
Fotodynamická terapie (PDT)



upraveno podle: Celli et al, 2012

Fotosensitizery

- Látka (léčivo), která se akumuluje přednostně v nádorových buňkách, je aktivována světlem v přítomnosti kyslíku a za těchto podmínek tvoří velmi reaktivní cytotoxické částice.
- deriváty porfyriu
- **TMPyP** $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -Tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl)porphyrin p-Toluenesulfonát
 - Absorpční maximum při 422 nm
- **ClAlPcS₂** chloroaluminium ftalocyanin disulfonát
 - Absorpční maximum při 670 nm



Stress response geny

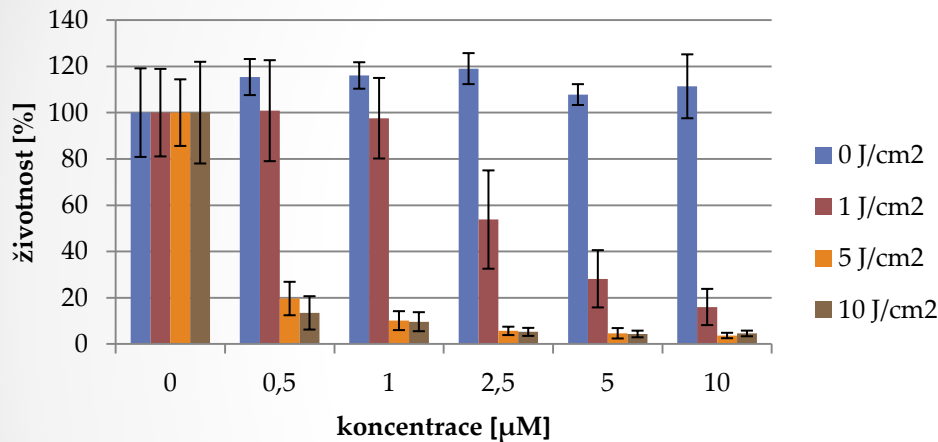
- PDT může vyvolat řadu buněčných a molekulárních změn, především má vyvolávat buněčnou smrt.
- **C-fos** spolu s proteinem c-jun tvoří transkripční faktor AP1. AP-1 se podílí na řízení buněčného cyklu, buněčné proliferace, diferenciaci, odpovědi na stres a spouštění apoptózy přes signální dráhu MAPK (mitogen-activated protein kinase).
- **C-myc** je transkripčním faktorem řady genů řídících buněčný cyklus (pozdní G1 cykliny a cyklin dependentní kinázy). Rovněž je důležitým spouštěčem apoptózy, fungující přes vnitřní mitochondriální apoptotickou dráhu.
- **Dusp1** (dual specificity phosphatase 1) je enzym, který defosforyluje threoninové a tyrosinové zbytky na proteinech. Patří mezi důležité řídicí prvky hlavních signálních drah.
- aktivují se v odpověď na oxidační nebo teplotní stres, pod vlivem poškození DNA nebo jiných buněčných komponent ROS, UV nebo jinými fyzikálními a chemickými faktory → **po PDT**

Metodika

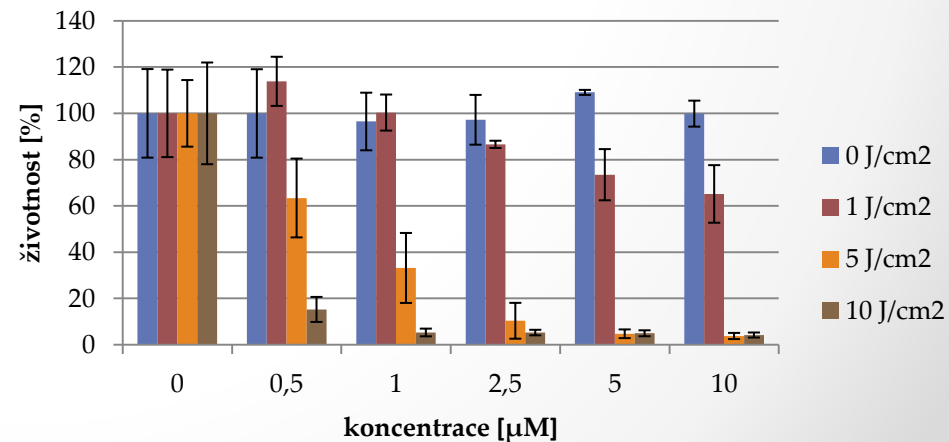
- **Buňky:** MCF7 (karcinom prsu)
- **Inkubace:** 37°C, 5% CO₂, médium DMEM
- **Fotosensitizery:** TMPyP a ClAlPcS₂, koncentrace 0,5 – 10 μmol/l
- **Ozáření:** 414 nm (pro TMPyP) a 660 nm (pro ClAlPcS₂), dávka ozáření 1; 5 a 10 J/cm²
- **MTT test:** 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)- 2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromid, absorbance 570 a 690 nm (fluororeader Synergy HT)
- **Detekce reaktivních kyslíkatých částic (ROS):** sonda CM-H₂DCFDA (Invitrogen), fluorescence 485/540 nm (fluororeader Synergy HT)
- **Detekce buněčné smrti:** Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Sigma Aldrich), fluorescenční mikroskop Olympus IX81
- **Exprese genů:** izolace celkové RNA (Total RNA Purification Kit, Norgen), reverzní transkripce (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit, Roche), real-time PCR (FastStart Taq DNA Polymerase, dNTPack, Roche; TaqMan sondy, Applied Biosystems)
 - sledované geny DUSP1, C-MYC a C-FOS
 - referenční gen PSMB2

Detekce životnosti buněk – MTT test

TMPyP

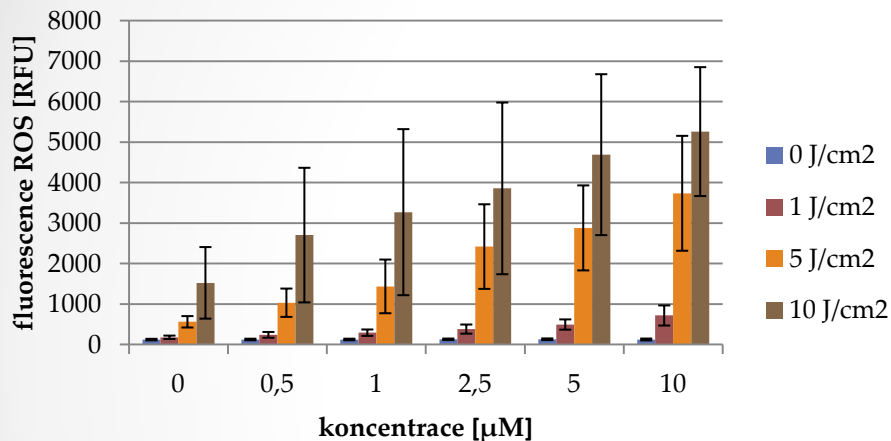


ClAlPcS₂

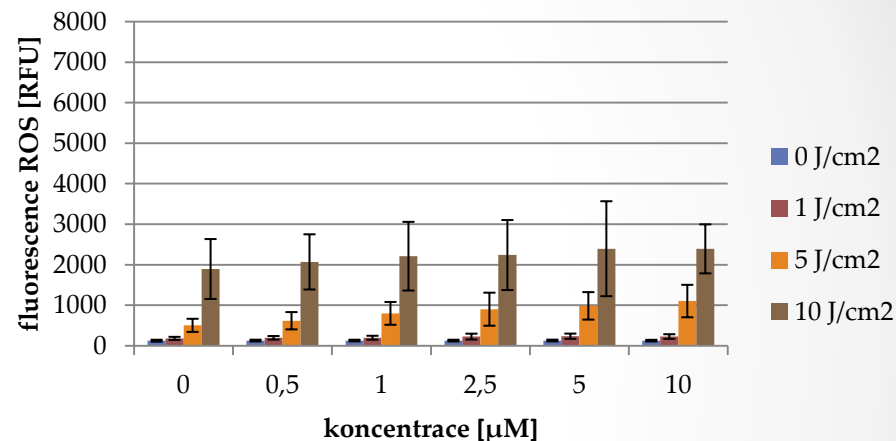


Detekce reaktivních kyslíkatých částic (ROS)

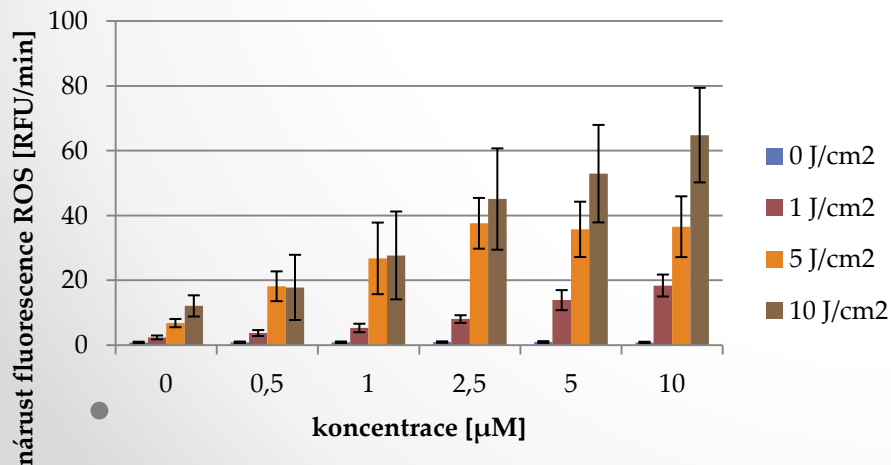
TMPyP - počáteční hodnoty



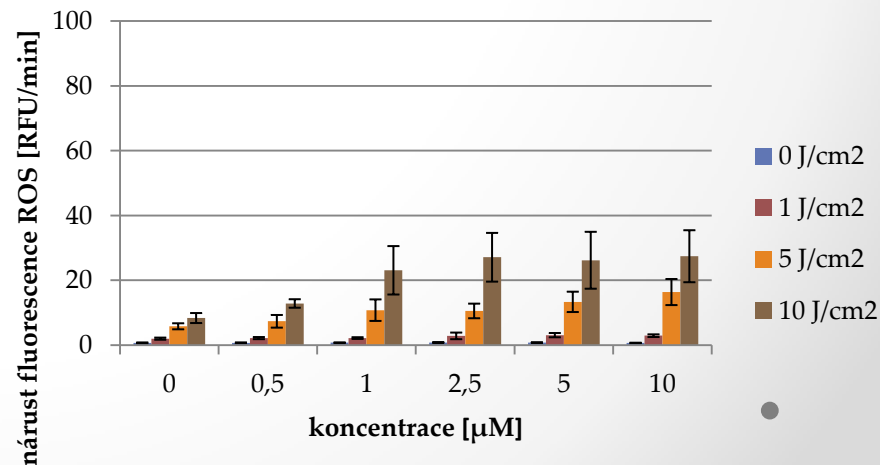
ClAlPcS₂ - počáteční hodnoty



TMPyP - kinetika 10min

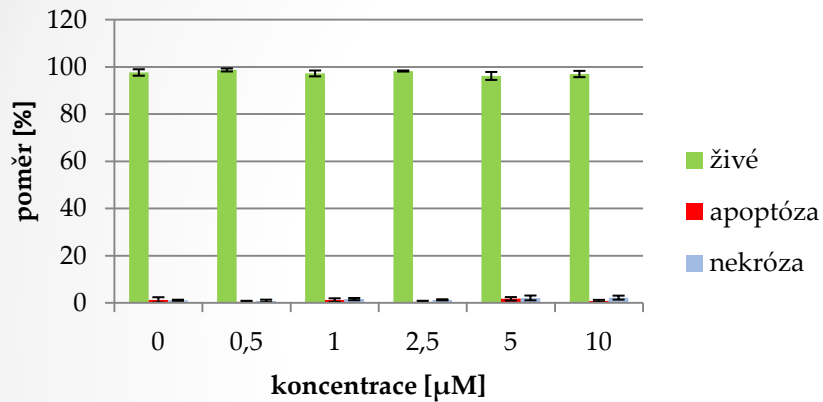


ClAlPcS₂ - kinetika 10min

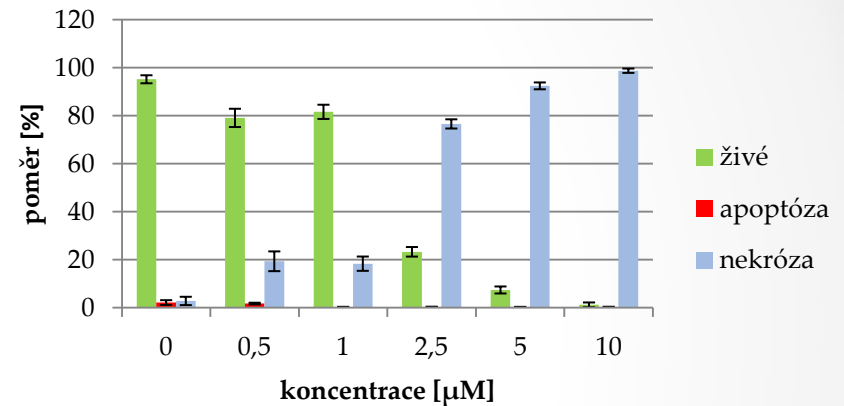


Detekce buněčné smrti - TMPyP

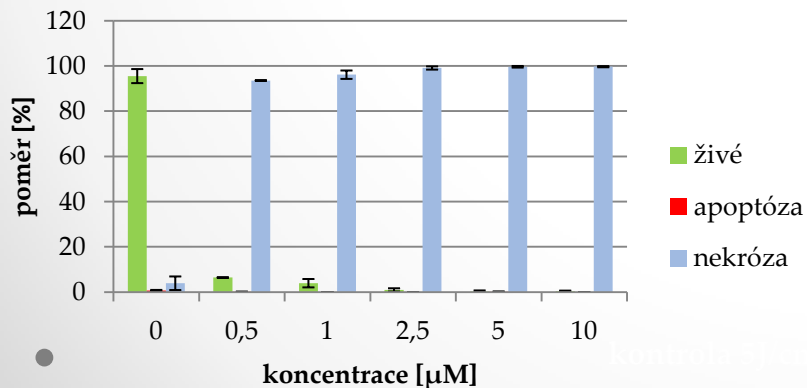
TMPyP - 0 J/cm²



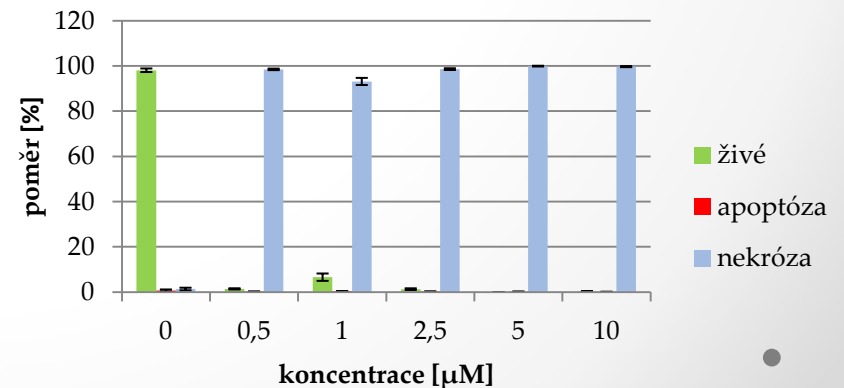
TMPyP - 1 J/cm²



TMPyP - 5 J/cm²

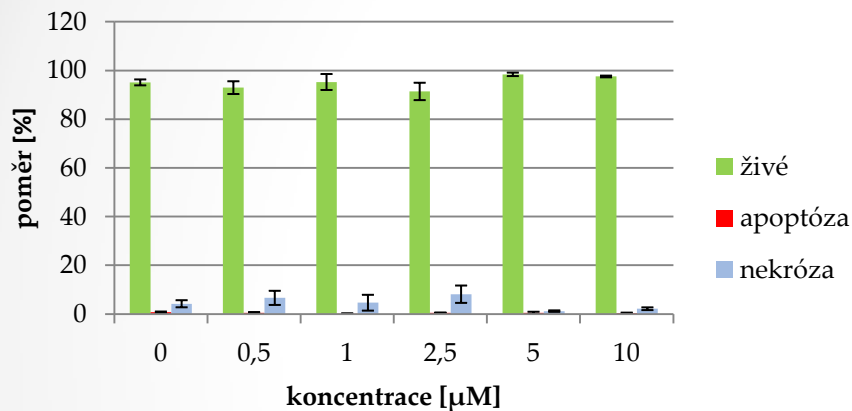


TMPyP - 10 J/cm²

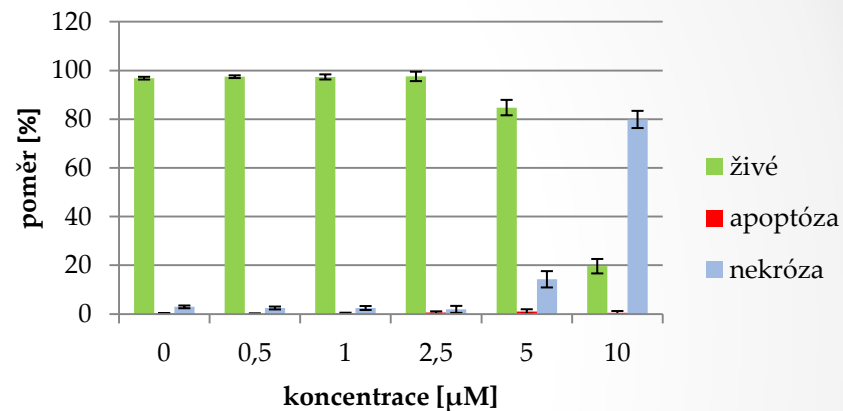


Detekce buněčné smrti – ClAlPcS₂

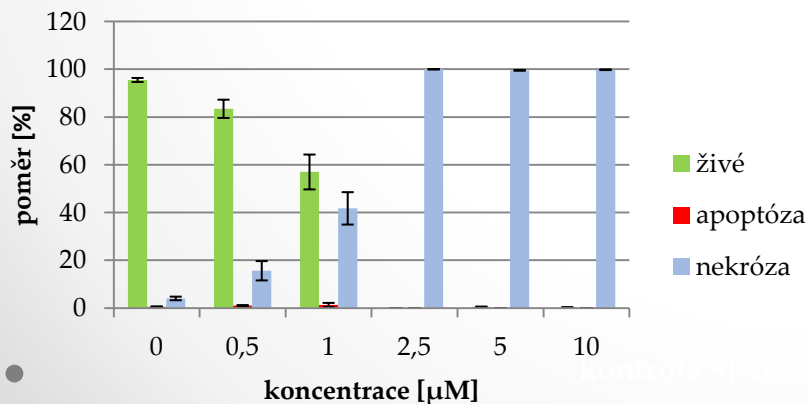
ClAlPcS₂ - 0 J/cm²



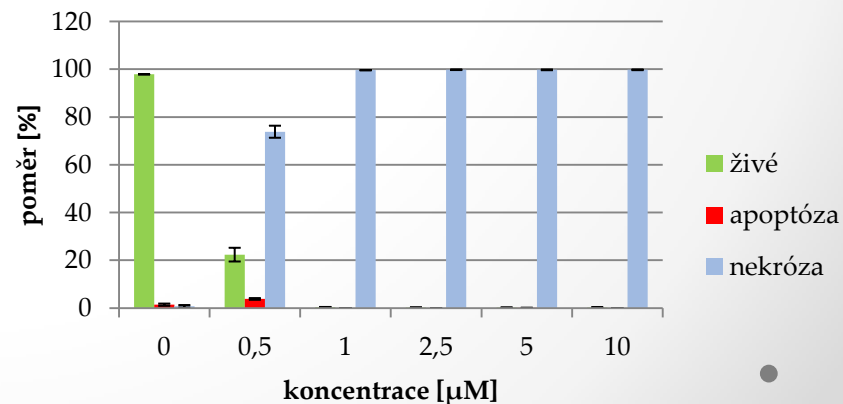
ClAlPcS₂ - 1 J/cm²



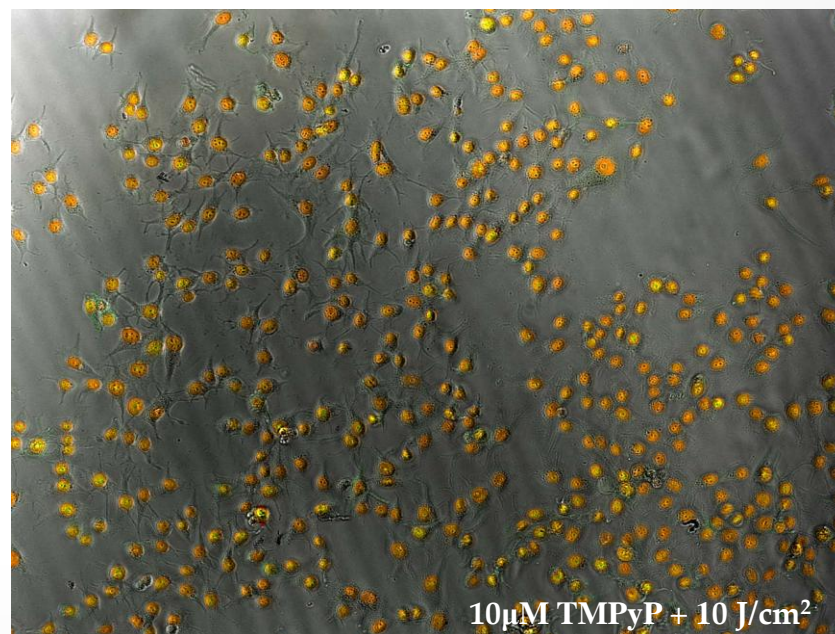
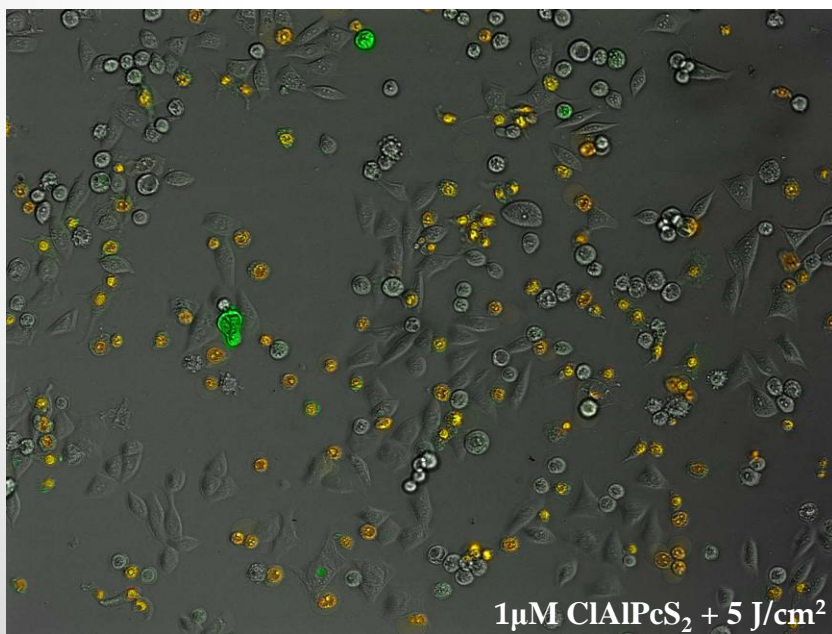
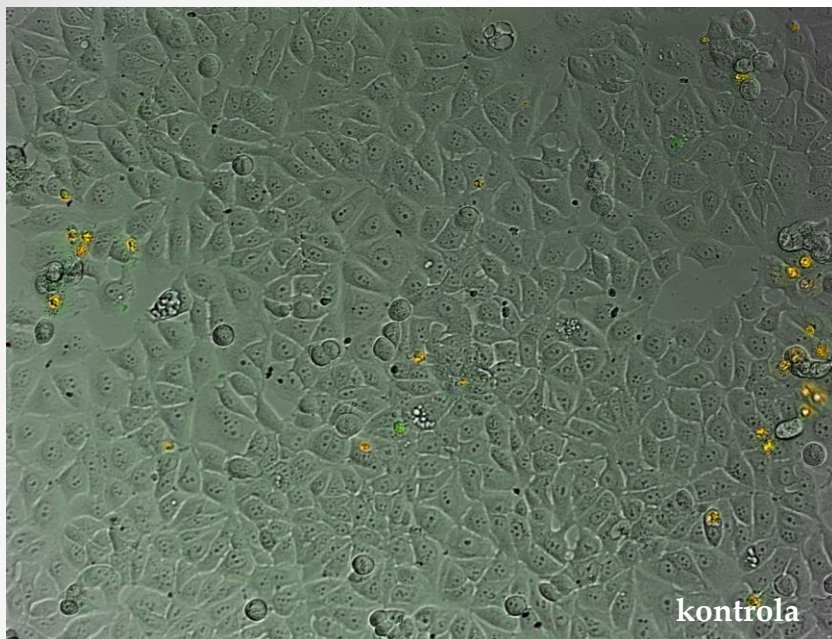
ClAlPcS₂ - 5 J/cm²



ClAlPcS₂ - 10 J/cm²

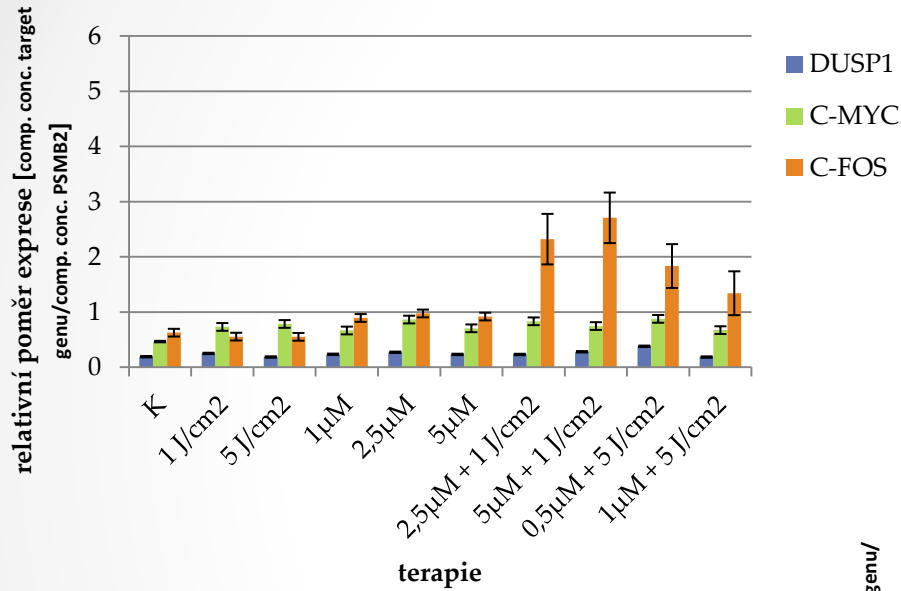


Detekce buněčné smrti

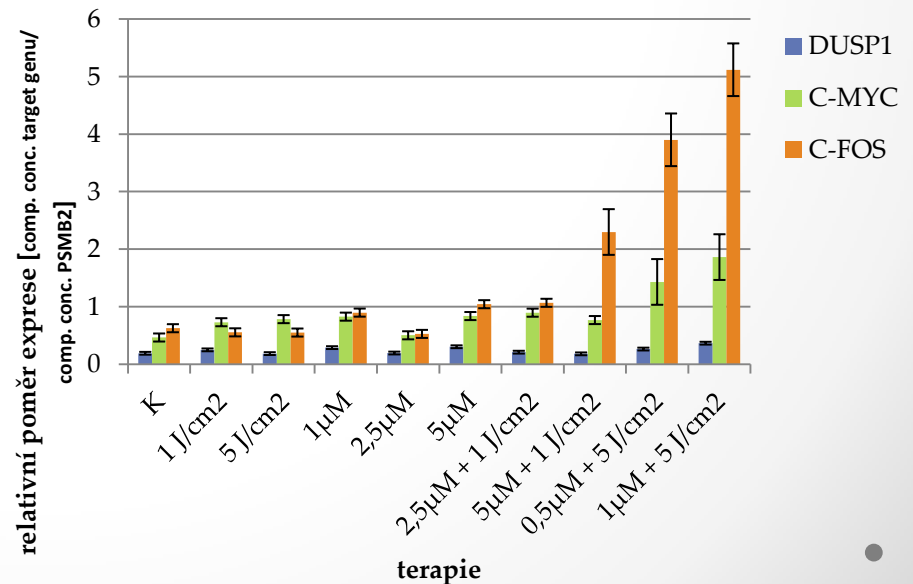


Expresse stress response genů

Expresse 1 h po PDT s TMPyP



Expresse 1 h po PDT s ClAlPcS₂



Shrnutí

- Životnost buněk klesá a produkce ROS i rychlost jejich tvorby roste se stoupající koncentrací fotosensitizeru v kombinaci se zvyšující se dávkou ozáření.
 - Oba sensitizery se jeví jako efektivní.
- Buňky po aplikaci PDT zanikají převážně nekrózou.
- Po PDT s CIAIPcS₂ se projevila overexprese genu C-FOS.

Poděkování

- projektu **Biomedicína pro regionální rozvoj a lidské zdroje** CZ.1.05/2.1.00/01.0030
- Kolektivu Ústavu lékařské biofyziky
- Ústavu molekulární a translační medicíny
- Ústavu imunologie

Děkuji za pozornost