

Projekt ma na celu poznanie mechanizmu śmierci komórek nowotworowych HeLa, po wyindukowaniu w nich reaktywnych form tlenu, za pomocą fotouczulaczy z grupy porfirogenów.

Terapia fotodynamiczna jest zaaprobowanym методом leczenia nowotworów, w której efekt terapeutyczny otrzymujemy dzięki współdziałaniu dwóch czynników - światła i fotouczulacza. Po podaniu fotouczulacza, leczone miejsce oświetlane jest promieniowaniem o odpowiedniej długości fali. Powoduje to generację wolnych rodników, które natychmiast reagują z chorymi tkankami, powodując śmierć komórek. Terapia ta może być stosowana w wielu rodzajach schorzeń - od trądziku po zmiany nowotworowe. Właściwe jest zastosowanie jako fotouczulacza takiej substancji, która bez udziału światła jest dla organizmu obojętna. W tym projekcie zwrócimy uwagę na wybrane przez nas do badań porfirogeny. Strukturalnie związki te są podobne do porfiryn, które znane są ze swojego działania fotouczulającego i mają swoje dobrze zakorzenione miejsce w terapii fotodynamicznej. Jak wiemy, przewaga nad innymi porfirogenami i co powoduje, że warto je badać? Odpowiedzią jest ich wysoka absorpcja światła czerwonego, które przenika przez tkanki znacznie lepiej niż światło w jakimkolwiek innym kolorze. Porfirogeny pochłaniają czerwony promieniowanie ponad dziesięciokrotnie efektywniej niż porfiryny. Dzięki temu, można doznać zmian nowotworowych ulokowanych głęboko, pod skórą, osiągając lepsze efekty leczenia.

Badania proponowane w tym projekcie skupione będą na mechanizmach śmierci komórek nowotworowych z linii HeLa. Z pozoru temat ten może wydawać się mało interesujący dla chemika. Nic bardziej mylnego. Szlaki śmierci komórkowej indukowane w warunkach stresu oksydacyjnego, jakie niewątpliwie występują podczas terapii fotodynamicznej, to bardzo szeroki i nie całkiem jeszcze poznany temat zaczynający się na poziomie molekularnym, a mający konsekwencje dla komórek, tkanek i całego organizmu. Zwykle wymienia się trzy drogi, jakimi może podlegać komórka: nekroza, apoptoza i autofagia. Zwykle szlaki te przebiegają równoległe, jednak wiadomo, że natężenie czynnika stresowego (w terapii fotodynamicznej będzie to np. dawka światła, stężenie fotouczulacza i efektywność generacji wolnych rodników) odgrywa kluczową rolę w tym, który mechanizm przeważa. Najkorzystniejsza jest przewaga apoptozy, która bywa również nazywana programowaną samobójstwem komórki, ponieważ ten rodzaj śmierci nie wyrządza szkody otaczającym komórkom, powstający w jej wyniku materiał organiczny jest pochłaniany przez organizm. Przewaga nekrozy ma znacznie poważniejsze konsekwencje. Ponieważ komórka ulega fragmentacji, wydostający się z niej materiał powoduje stan zapalny, rozprzestrzeniający się na okoliczne tkanki, co może prowadzić do niewydolności nerek i śmierci pacjenta.

Z naszych wstępnych badań nad porfirogenami wnioskujemy, że działają one jako wydajne fotouczulacze w terapii fotodynamicznej. Powodują śmierć komórek nowotworowych nawet kilkadziesiąt razy efektywniej niż fotouczulacze dostarczane jako leki. Indukowany przez nie mechanizm śmierci nie został jednak poznany i uważamy, że warto poświęcić czas na jego określenie, gdyż sam fakt działania fototoksycznego nie gwarantuje jeszcze przyszłej skuteczności tych związków. W projekcie chcemy obserwować zmiany na poziomie molekularnym, zachodzące w komórkach nowotworowych poddanych naświetlaniu w obecności porfirogenów i tak ustalić stężenia związków, dawki promieniowania i inne parametry, aby faworyzowana była apoptoza. Przykładowo, apoptotyczne komórki różnią się od nieapoptotycznych ekspresją fosfatydyloseryny na powierzchni ich błony komórkowej. Można to wykorzystać przez podanie barwnika, który przyłączy się do tych eksponowanych części, takiego jak aneksyna V, a następnie za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej można te komórki odróżnić. Od tego właśnie zamierzamy zacząć badania mechanizmu. Innym markerem apoptozy jest relokacja cytochromu c z mitochondriów do cytoplazmy oraz ekspresja białek proapoptotycznych, które również będą obserwowane. Znacznie trudniejsza jest prawidłowa identyfikacja nekrozy. Jednak to zadanie także zostanie zrealizowane za pomocą obrazowania DNA jedrowego. Charakterystyczna dla nekrozy jest, bowiem kondensacja chromatyny, co może być zaobserwowane wykorzystując rozdzielczą mikroskopii fluorescencyjnej. Na koniec zostaną określone optymalne warunki służące faworyzowaniu apoptozy i eliminowaniu nekrozy.