

Zintegrowane systemy AFM-Raman i AFM-IR jako nowoczesne narzędzia w analizie uszkodzeń radiacyjnych

Wszystkie żywe organizmy są cały czas narażone na promieniowanie jonizujące ze źródeł naturalnych. Promieniowanie ma bezpośredni wpływ na tkanki i komórki, dlatego jego działanie wykorzystuje się m.in. w leczeniu nowotworów. Promieniowanie rzeczywiście ma negatywny wpływ na biocząsteczki, np. na DNA. Śledzenie zmian w DNA spowodowanych napromieniowaniem jest więc szczególnie istotne z punktu widzenia funkcjonowania i rozmnażania się komórek. Ideą niniejszego projektu jest więc poszerzenie wiedzy dotyczącej problemu uszkodzeń radiacyjnych w komórkach spowodowanych promieniowaniem jonizującym oraz efektów towarzyszących (np. efekt obserwatora). Głównym obiektem badań będzie DNA, przy czym zmiany w innych biocząsteczkach (lipidy, białka) również będzie badane. Badania będą prowadzone na linii komórkowej PC-3, która jest linią raka prostaty. Głównym celem projektu jest analiza wpływu niskich dawek promieniowania jonizującego na układy biologiczne na poziomie komórkowym, subkomórkowym oraz molekularnym przy użyciu wybranych niedestrukcyjnych metod spektroskopowych. Ogromny rozwój technik spektroskopii oscylacyjnej stwarza niepowtarzalną szansę na uzyskanie nowych informacji o uszkodzeniach radiacyjnych w komórkach przy zastosowaniu układów z nanometryczną rozdzielczością przestrzenną. Dodatkowo, technika TERS (z ang. Tip Enhanced Raman Spectroscopy) wydaje się być potencjalnym narzędziem badania lokalnych uszkodzeń w niewielkich układach biologicznych, takich jak DNA.

Metodyka badań eksperymentalnych jak i teoretycznych dla proponowanego projektu obejmuje kilka etapów, co jest konsekwencją koniecznością przygotowania materiału badawczego oraz przeprowadzenia odpowiednich pomiarów eksperymentalnych. Pierwszym etapem jest hodowla komórkowa umożliwiająca przygotowanie przedmiotu badań, czyli komórek linii PC-3. Następnie komórki będą poddane naświetlaniom promieniowaniem jonizującym w celu wytworzenia uszkodzeń radiacyjnych. Naświetlania będą prowadzone przy użyciu dwóch rodzajów promieniowania, tj. promieniowania rentgenowskiego oraz protonów. Naświetlania będą prowadzone również w dwóch trybach, tj. normalnej wiązki i mikrowiązki. W pierwszym przypadku całość próbki będzie naświetlana i badane będą jedynie uszkodzenia radiacyjne wywołane promieniowaniem. W drugim przypadku naświetlane będą poszczególne komórki, co pozwala na badanie uszkodzeń w konkretnych komórkach jak również efektów ubocznych (np. efekt obserwatora). Kolejnym etapem będą testy biologiczne (test mikrojądrowy i kometowy), które będą przeprowadzone w celu określenia liczby jak i typów uszkodzeń radiacyjnych w badanych komórkach. Istotą badań eksperymentalnych będą badania spektroskopowe. Przedmiotem tych badań będą trzy typy próbek, tj. komórki żywe, komórki utrwalone oraz wyizolowane jądra komórkowe. Badania w skali mikrometrycznej będą prowadzone pod mikroskopem w celu określenia dominujących typów uszkodzeń oraz dystrybucji uszkodzeń w badanej kolonii komórek. Pomiar w skali nanometrycznej będą prowadzone natomiast pod mikroskopem AFM (z ang. Atomic Force Microscopy) w celu uzyskania bardziej szczegółowej informacji na temat konkretnych uszkodzeń w komórce, tj. typu poszczególnych uszkodzeń i ich dystrybucji w komórce. Oprócz pomiarów punktowych, zastosowane będą również techniki pozwalające na szybki pomiar większych obszarów badanych obiektów, w tym mapowanie czy obrazowanie 3D. Dodatkowo użycie techniki TERS pozwoli na skanowanie niewielkich fragmentów DNA w celu identyfikacji powstałych tam uszkodzeń radiacyjnych. Badania biologiczne wymagają znacznej liczby próbek, co ciągnie za sobą konieczność analizy statystycznej. W tym projekcie użyte zostaną metody hierarchicznej analizy skupień (HCA) oraz głównych składowych (PCA). Uzupełnieniem badań eksperymentalnych będą obliczenia teoretyczne pozwalające na wyznaczenia dawek promieniowania zdeponowanego w komórkach (symulacje Monte Carlo) oraz wyznaczenie struktur elektronowych i teoretycznych widm oscylacyjnych (obliczenia kwantowo-chemiczne).

Uzasadnieniem podjęcia problemu uszkodzeń radiacyjnych jest niewątpliwie rosnące zagrożenie ze strony coraz większej liczby źródeł promieniowania jonizującego w naszym najbliższym otoczeniu. Rozwój cywilizacyjny niesie za sobą narażenie ludzkości na dodatkowe narażenie częstym napromieniowaniem o niskich dawkach. Ze względu na generowanie uszkodzeń w strukturze DNA, promieniowanie jonizujące może prowadzić do zmian nowotworowych. Oczywisty jest więc fakt konieczności prowadzenia intensywnych badań nad wpływem tego typu promieniowania na układy biologiczne. Szczególnie istotne jest prowadzenie badań w skali nanometrycznej, gdyż wszystkie procesy uszkodzeń zachodzą w skali molekularnej. Dlatego też w proponowanym projekcie jako metody badawcze wskazano na metody spektroskopii oscylacyjnej wykorzystujące możliwości mikroskopu sił atomowych (AFM). Dzięki temu, sygnał spektroskopowy będzie pochodził z pojedynczych fragmentów nici DNA i możliwe będzie śledzenie konkretnych uszkodzeń radiacyjnych jak również procesów ich naprawy. Ponadto, technika TERS wydaje się obiecującym narzędziem do analizy nanometrycznych struktur komórkowych takich jak DNA czy białka.