Ministry of Higher Education
and Scientific Research
University of Baghdad

Advanced confocal laser scanning microscopy imaging in assessment of metabolic changes in human epithelial cells (MCF 10A)

A Thesis

Submitted to the Institute of Laser for Postgraduat Studies, University of Baghdad in Partial Fulfillment of Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy in Laser/Biology

By

Kaiser Neama Madlum

MSc. Laser/ Biology

2004

Supervised by

Assist. Prof. Dr. Amel Mustafa Maki

2013 AD 1435AH

Abstract

MCF10A breast epithelial cells that have high glycolysis rate (Warburg effect) were used as a model in this study to evaluate the effectiveness of fluorescence lifetime imaging technique to monitor metabolic alterations associated with cancer treatments. MCF10A cells were divided into two groups: the first group was cultivated in the Mammary Epithelial Basal Medium (MEBM) supplemented with 3% horse serum (complete medium) before and during the treatment, the second group was cultivated in (MEBM) without horse serum (serum free medium) before and during the treatment. Four anticancer agents (2-Deoxy-D-Glucose (2-DG), Lonidamine, Oxythiamine Chloride, and 4-(Chloromethyl) Benzoyl Chloride (4-CMBC)) were used in addition to the mitochondrial uncoupler agent Carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCP) to induce metabolic perturbation due to inhibition of glucose metabolism or dissipation of mitochondrial membrane potential required for the energy production. Control groups were examined in the presence of the medium only. The fluorescence lifetime of cellular NADH was measured after different incubation periods with the inhibitors according to the type of the inhibitors using Leica SP2 multiphoton confocal laser scanning microscope equipped with fluorescence lifetime imaging components.

Results showed a significant decrease ($p<0.05$) in the mean fluorescence lifetime (τm) and fluorescence lifetimes of the free ($\tau 1$) and bound($\tau 2$) NADH after the treatment with CCCP in serum free medium without any change in the relative contribution of free to bound form. The treatment with 2-DG caused a significant increase ($p<0.05$) in the mean fluorescence lifetime and fluorescence lifetimes of the free and bound NADH with increased amount of free NADH in the cells. A significant

decrease ($p<0.05$) was observed in the mean fluorescence lifetime after the treatment with Lonidamine associated with a significant increase in the amount of free to bound NADH after 24 hours in the presence of serum and after 2,24, and 48 hours in the absence of serum. Oxythiamine treatment showed no significant differences in the mean fluorescence lifetime between control and treatment groups in the presence or the absence of serum. The fluorescence lifetime of free NADH showed a significant increase ($p<0.05$) in the first hour of treatment only in the presence of serum. The relative contributions of free and bound NADH showed a significant decrease ($p<0.05$) in the first hour and a significant increase after 48 hours of treatment in the absence of serum. The addition of 4-chloromethyl benzoyl chloride caused a significant decrease ($p<0.05$) in the mean fluorescence lifetime after 2 and 24 hours of treatment in the absence of serum. A significant increase ($p<0.05$) was observed in the fluorescence lifetime of free NADH after 48 hours of treatment in the presence of serum, and a significant decrease after 2 hours in the absence of serum. Fluorescence lifetime of bound NADH showed a significant increase ($p<0.05$) only after 2 hours of treatment in the absence of serum. A significant decrease ($p<0.05$) in the free to bound NADH ratio was observed after 24 and 48 hours of treatment in the presence of serum and after 24 hours in the absence of serum. The results from this study indicate that fluorescence lifetime imaging technique could be a beneficial tool to follow the metabolic alterations associated with cancer treatments. It was also successful to recognize minute changes in free to bound NADH ratios in epithelial cells.

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة بغداد

تصوير متقدم بالمجهر الليزري الماسح متّحد البؤرة في تقدير التغيرات الأيضية في الخلايا الطلائية البشرية نوع MCF10A

أطروحة مقدمة
الى معهد الليزر للدراسات العليا / جامعة بغداد
لأستكمال نيل درجة دكتوراه فلسفة في الليزر/علوم الحياة

تقدم بها
قيصر نعمه مظلوم

ماجستير ليزر\علوم الحياة

2004

بأشراف
أ.م.د. أمل مصطفى مكي

1435 هـ ٢٠١٣ م

الخلاصة

استخدمت في هذه الدراسة خلايا الثدي الطلانية نوع MCF10A ذات معدل التحلل السكري المرتفع (ظاهرة واربرغ) كنموذج لتقديركفاءة تقنية تصوير عمر التفلور لمراقبة التغيرات الايضية المرتبطة بمعالجات السرطان. قسمت الخلايا الى مجموعتين: نميت المجموعة الاولى في وسط Mammary Epithelial Basal Medium (MEBM) مدعم ب ٣% مصل الحصان قبل واثناء المعاملة، نميت المجموعة الثانية في نفس الوسط لكن بدون مصل الحصان قبل واثناء المعاملة. استخدمت اربع انواع من مضادات السرطان هي (2-Deoxy-D-glucose, Lonidamine, Oxythiamine Chloride, and 4-(Chloromethyl) Benzoyl Chloride) بالاضافة الى عامل فك الاقتران المايتوكونديري (Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone) لاحداث اضطراب ايضي نتيجة تثبيط ايض الكلوكوز او تبديد الجهد الغشائي للمايتوكوندريا المطلوبة لانتاج الطاقة. اختبرت مجاميع السيطرة بوجود الوسط فقط. قيس زمن العمر التفلوري لجزيئات NADH الخلوية بعد فترات حضن مختلفة مع المثبطات حسب نوع المثبط باستخدم المجهرالليزري الماسح المتحد البؤرة متعدد الفوتونات المجهز بوحدة تصوير العمر التفلوري.

اظهرت النتائج انخفاضا معنويا($p<0.05$) في متوسط عمر التفلور (τ_m) واعمار التفلور لجزيئة NADH الحرة (τ_1) والمرتبطة (τ_2) بعد المعاملة مع CCCP في الوسط الخالي من المصل بدون اي تغيير في المساهمة النسبية للشكل الحر الى المرتبط. سببت المعاملة بـ2-DG زيادة معنوية ($p<0.05$) في متوسط عمر التفلور واعمار التفلور لل NADH الحرة والمرتبطة مع زيادة كمية NADH الحرة في الخلايا.لوحظ وجود انخفاض معنوي ($p<0.05$)في متوسط عمر التفلور بعد المعاملة بالLonidamine مصحوبا بزيادة معنوية ($p<0.05$) في نسبة NADH الحرة الى المرتبطة بعد ٢٤ ساعة بوجود المصل وبعد ٢و٢٤و٤٨ ساعة عند عدم وجود المصل.المعالجة ب Oxythiamine لم تظهر اي اختلاف معنوي في متوسط عمر التفلور بين مجموعتي السيطرة والمعاملة بوجود وعدم وجود المصل . اظهر عمر تفلور NADH الحرة زيادة معنوية ($p<0.05$) في الساعة الاولى من المعالجة فقط عند وجود المصل. اظهرت المساهمة النسبية لNADH الحرة الى المرتبطة انخفاضا معنويا ($p<0.05$) في الساعة الاولى وارتفاعا معنويا($p<0.05$) بعد ٤٨ ساعة في الوسط الخالي من المصل.سببت اضافة 4-chloromethyl benzoyl chloride انخفاضا معنويا ($p<0.05$) في متوسط عمر التفلور بعد ساعتين و ٢٤ ساعة من المعالجة بغياب المصل. لوحظت زيادة معنوية ($p<0.05$) في عمر التفلور لNADH الحرة بعد ٤٨ ساعة عند وجود المصل وانخفاض معنوي ($p<0.05$) بعد ساعتين عند عدم وجود المصل. اظهرعمر التفلور للNADH المرتبطة زيادة معنوية ($p<0.05$) فقط بعد ساعتين من العالجة بغياب المصل . لوحظ انخفاض معنوي ($p<0.05$) في نسبة الNADH الحرة الى المرتبطة بعد ٢٤ و٤٨ ساعة من العالجة بوجود الصل وبعد ٢٤ ساعة بغياب المصل.

تشير النتائج المستحصلة من هذه الدراسة الى ان تقنية تصوير عمر التفلور يمكن ان تكون اداة مفيدة لمتابعة التغيرات الايضية المرتبطة بمعالجات السرطان كما انه كان ناجحا في تمييز التغيرات الدقيقة في نسبة الNADH الحرة الى المرتبطة في الخلايا الطلائية.