



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

---

Fakulta biomedicínského inženýrství  
Katedra přírodovědných oborů

**Spektroskopická studie fotodynamických procesů ve  
fluorescenčním modelu rakovinné tkáně**

**Spectroscopic study of photodynamic processes in tumor  
mimicking fluorescence phantom**

Diplomová práce

Studijní program: Biomedicínská a klinická technika

Studijní obor: Přístroje a metody pro biomedicínu

Vedoucí práce: Ing. Petr Brůža, Ph.D.

**Jana Hrtáňová**

---

Kladno, květen 2016

Katedra přírodovědných oborů

Akademický rok: 2015/2016

## Z a d á n í   d i p l o m o v é   p r á c e

Student: **Jana Hrtáňová**  
Studijní obor: Přístroje a metody pro biomedicínu  
Téma: **Spektroskopická studie fotodynamických procesů ve fluorescenčním modelu rakovinné tkáně**  
Téma anglicky: Spectroscopic study of photodynamic processes in tumor mimicking fluorescence phantom

### Z á s a d y   p r o   v y p r a c o v á n í :

Fotodynamická terapie (photodynamic therapy, PDT) je metoda léčby nádorových onemocnění, založená na selektivní akumulaci fotosenzitivní látky v nádorové tkáni. Následné osvětlení tkáně vede k fotochemickým změnám fotosenzitivní látky, tvorbě reaktivních kyslíkových radikálů a následně k buněčné smrti. Pro vývoj nových technik a metod PDT je nezbytný pre-klinický model nádorové tkáně. Přes výraznou expanzi PDT technik není k dispozici standardizovaný model nádorové tkáně, ani protokol pro dozimetrii PDT během ozařování. Cílem projektu je navrhnout model lokalizované nádorové tkáně s odpovídajícími optickými vlastnostmi, a realizovat fluorescenční měření přítomnosti kyslíkových radikálů při ozařování modelu tumoru. Zkonstruovaný model bude v budoucnu využit m.j. pro vývoj technik selektivního ozařování tkáně při PDT a vývoje metod kvantitativní dozimetrie při PDT.

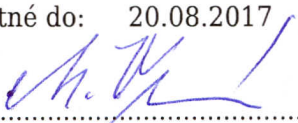
### Realizace projektu:

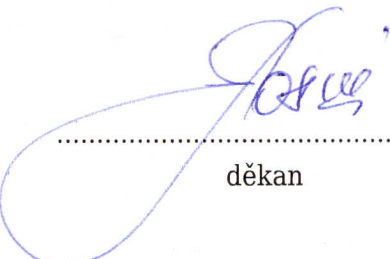
- 1) Prokažte generaci kyslíkových radikálů ve vodním prostředí za použití fluorescenčních sond;
- 2) navrhnete a realizujete fantom rakovinné tkáně pro kvantitativní studium účinku selektivního ozařování při PDT;
- 3) změřte absorpční a fluorescenční spektra protoporfyrinu IX (PpIX) inkorporovaného ve fantomu. Naměřená spektra porovnejte se spektry PpIX ve vodním prostředí;
- 4) studujte generaci kyslíkových radikálů ve fantomu za použití fluorescenčních sond a výsledky porovnejte s daty z úlohy 1).

### Seznam odborné literatury:

- [1] N. Haj-Hosseini, B. Kistler, K. Wårdell, Development and characterization of a brain tumor mimicking fluorescence phantom, Proc. SPIE 8945, Design and Performance Validation of Phantoms Used in Conjunction with Optical Measurement of Tissue VI, Vol. 8945, No. 5, 2014
- [2] D. A. Boas, C. Pitris, N. Ramanujam, Handbook of Biomedical Optics, ed. 1, Taylor & Francis Group, LLC, 2011, ISBN 978-1-4200-9037-6
- [3] Nyokong, T., Ahsen, V. , Photosensitizers in Medicine, Environment, and Security, ed. 1, Springer, 2012, ISBN 978-90-481-3870-8

Vedoucí: Ing. Petr Brůža, Ph.D.  
Konzultant: Ing. Dalibor Pánek, Ph.D.  
Zadání platné do: 20.08.2017

  
.....  
vedoucí katedry / pracoviště

  
.....  
děkan

V Kladně dne 12.12.2015

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci s názvem Spektroskopická studie fotodynamických procesů ve fluorescenčním modelu rakovinné tkáně vypracovala samostatně a použila k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k diplomové práci.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu §60 Zákona č.121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V Kladně dne 18. května 2016

.....

podpis

## **Poděkování**

V úvodu bych chtěla vyjádřit poděkování vedoucímu diplomové práce panu Ing. Petru Brůžovi, Ph.D. za odborné vedení při vypracování celého úkolu a za zdroj inspirací, kterou mě vzájemná spolupráce s ním obohatila. Současně děkuji panu Ing. Daliboru Pánkovi, Ph.D. a paní Mgr. Janě Turňové za poskytnutí potřebného vybavení a pomoci. Rovněž děkuji panu prof. MUDr. Pavlu Kučerovi Ph.D. za podnětná setkání plná cenných rad a doporučení.

## Anotace

Fotodynamická terapie (PDT, Photodynamic therapy) je léčebný postup využívající interakce světla s fotosenzitivní látkou, jejímž výsledkem je produkce reaktivních kyslíkových forem (ROS, Reactive Oxygen Species) a následná destrukce ozářených buněk. Jednou z možných cest vedoucích k optimalizaci léčebných výsledků v rámci dozimetrie je začlenění fluorescenční značky citlivé na přítomnost reaktivních kyslíkových forem do ozařované oblasti.

Cílem práce je navržení tkáňového modelu umožňujícího studium generace reaktivních kyslíkových forem s ohledem na osvitové podmínky a typ fotosenzitivní látky začleněné do tohoto modelu. V první fázi je provedena charakterizační studie fotochemických změn, k nimž dochází v ozařovaném vodném prostředí obsahujícím protoporphyrin IX (PpIX). Následně jsou vyhodnoceny fluorescenční vlastnosti a odezva PpIX inkorporovaného do ozařovaného modelového systému. V obou prostředích je využito vlastností dihydroethidina jako zástupce fluorescenční sondy citlivé na přítomnost reaktivních kyslíkových forem.

Výsledky studie provedené na vodných roztocích a ve fluorescenčním tkáňovém modelu zachycují rozdílné spektrální charakteristiky použitých složek ve smyslu stability a citlivosti pro osvitové a bez osvitové podmínky. V obou prostředích byl zaznamenán nárůst intenzity fluorescence DHE-fotoproduktu v návaznosti na vzrůstající koncentraci PpIX a zvyšující se světelnou dávku. Lineární průběh vzájemné závislosti fluorescence PpIX a signálu generovaného fotoproduktu byl potvrzen v agarózovém modelovém prostředí pro nízké hodnoty optického výkonu (1 mW).

**Klíčová slova:** Fotodynamická terapie, reaktivní kyslíkové druhy, PDT dozimetrie, fluorescenční tkáňový model, Dihydroethidium

## Annotation

Photodynamic therapy (PDT) is a treatment method exploiting an interaction of light with photosensitive substance that results in reactive oxygen species (ROS) production and subsequently in cell destruction. One of the possible ways how to optimize a treatment outcome in a dosimetric manner lies in incorporation of fluorescence probe sensitive for ROS generation in irradiated area.

The objective of the work is to design a tissue-mimicking model which would enable a study of the generation of reactive oxygen species with the respect to exposure conditions and the type of photosensitive substance incorporated in this model. The initial phase includes performance of the characterization study of photochemical changes occurring in the irradiated aqueous medium containing protoporphyrin IX ( PpIX ). Subsequently, the fluorescence response of PpIX incorporated in irradiated model system is evaluated. In both environments, the properties of dihydroethidium as a representative fluorescent probe sensitive to the presence of reactive oxygen species were exploited.

The experiments performed in water environment and tissue-simulating phantom show a different behavior of both substances (PpIX, DHE) specifically in their sensitivity and stability in response to irradiation and non-irradiation conditions. The presented approach, i.e. the monitoring of DHE-photoproduct fluorescence intensity in connection with PpIX photobleaching shows linearity among photobleaching and photoproduct data in case of low irradiance (1 mW) and agar-basis medium. There was also registered an increase in fluorescence intensity of photoproduct with increasing PpIX concentration and radiant exposure for both environmental conditions.

**Keywords:** Photodynamic therapy, reactive oxygen species, PDT dosimetry, fluorescence tissue-simulating phantom, Dihydroethidium

# Obsah

Seznam obrázků	vi
Seznam zkratk	ix
Úvod	1
<b>1 Fotodynamická terapie</b>	<b>3</b>
1.1 PDT v historii . . . . .	3
1.2 Mechanismus fotodynamického působení . . . . .	4
1.3 Nové směry ve vývoji PDT . . . . .	5
1.3.1 Dopravníkové systémy fotosenzitivních látek . . . . .	7
<b>2 Reaktivní kyslíkové formy</b>	<b>9</b>
2.1 Tvorba reaktivních kyslíkových forem . . . . .	9
2.2 Singletový kyslík . . . . .	10
<b>3 Dozimetrické metody</b>	<b>13</b>
3.1 Přímá detekce . . . . .	14
3.2 Photobleaching fotosenzitivní látky . . . . .	14
3.3 Alternativní dozimetrické přístupy . . . . .	16
3.4 Detekce využívající fluorescenčních značek . . . . .	16
<b>4 Detekce ROS ve vodném prostředí</b>	<b>18</b>
4.1 Vlastnosti použitých sloučenin . . . . .	18
4.1.1 Protoporfyrin IX (PpIX) . . . . .	18
4.1.2 Dihydroethidium (DHE, Hydroethidium, HE) . . . . .	22
4.1.3 Ethidium vs. hydroxyethidium . . . . .	24
4.2 Přístrojové vybavení . . . . .	26
4.3 Použité roztoky . . . . .	27
4.4 Průběh experimentů . . . . .	27
4.5 Výsledky měření . . . . .	28
4.5.1 Fluorescenční odezva roztoků DHE . . . . .	29
4.5.2 Vliv koncentrace DHE na vývoj signálu fotoproduktu . . . . .	31
4.5.3 Vliv koncentrace PpIX na na vývoj signálu fotoproduktu . . . . .	34
<b>5 Detekce ROS ve fluorescenčním tkáňovém modelu</b>	<b>37</b>
5.1 Složení tkáňových modelů . . . . .	37
5.2 Přístrojové vybavení . . . . .	38
5.2.1 MicroMax 384 Microwell-Plate Reader . . . . .	38

5.2.2	Osvitový zdroj . . . . .	39
5.2.2.1	Charakteristika osvitového zdroje . . . . .	40
5.2.2.2	Řídící software a regulace výstupního optického výkonu . . . . .	42
5.3	Konstrukční provedení tkáňových modelů . . . . .	43
5.4	Průběh experimentů . . . . .	44
5.5	Výsledky měření . . . . .	46
5.5.1	Pilotní studie . . . . .	46
5.5.2	Vliv optického výkonu na vývoj signálu fotoproduktu . . . . .	50
5.5.3	Vliv koncentrace PpIX na vývoj signálu fotoproduktu . . . . .	54
<b>6</b>	<b>Diskuze</b>	<b>57</b>
	<b>Závěr</b>	<b>59</b>
	<b>Literatura</b>	<b>60</b>
<b>A</b>	<b>Obsah CD</b>	<b>67</b>



# Seznam obrázků

1.1	Historie PDT - časová osa . . . . .	3
1.2	Spektrální překryv LuAG:Pr a PpIX . . . . .	5
1.3	Nové mechanismy generace singletového kyslíku . . . . .	7
1.4	Vazba PpIX s molekulou GC . . . . .	8
2.1	Změny účastníků se generace ROS . . . . .	9
2.2	Molekulární orbitály kyslíku . . . . .	10
2.3	Jablonskeho diagram . . . . .	11
3.1	Molekula Protoporfyrinu IX . . . . .	14
3.2	Schéma fotooxidativní destrukce porfyrinové sloučeniny . . . . .	15
3.3	Spektrální charakteristiky použitých sloučenin . . . . .	17
4.1	Srovnání excitačních spekter PpIX pro různá prostředí . . . . .	19
4.2	Srovnání emisních spekter PpIX pro různá prostředí . . . . .	19
4.3	Modely agregujících molekul PpIX . . . . .	20
4.4	Excitační spektra PpIX pro odlišná pH roztoků . . . . .	21
4.5	Emisní spektra roztoků PpIX s obsahem Tween 0.1% a 0% . . . . .	22
4.6	Fluorescenční spektra roztoku DHE . . . . .	23
4.7	Reakce DHE s ROS . . . . .	24
4.8	Fluorescenční spektra reakčního produktu DHE . . . . .	25
4.9	Fluorescenční spektra ethidia a 2-hydroxiethidia . . . . .	25
4.10	Osvitový zdroj pro vodné roztoky . . . . .	26
4.11	Fluorescenční spektra DHE bez osvitů a s osvitěm . . . . .	29
4.12	Fluorescenční spektra EOH bez osvitů a s osvitěm . . . . .	29
4.13	Celkové srovnání časového vývoje intenzit fluorescence EOH a DHE . . . . .	30
4.14	Emisní spektra PpIX, DHE a EOH v ozařovaném a referenčním roztoku . . . . .	31
4.15	Časové vývoje intenzity fluorescence PpIX, DHE a EOH . . . . .	33
4.16	Emisní spektra PpIX a EOH v ozařovaném roztoku . . . . .	34
4.17	Srovnání časových vývoju intenzit fluorescence PpIX a EOH - vodný roztok . . . . .	35
4.18	Srovnání časových vývoju intenzit fluorescence DHE a EOH - vodný roztok . . . . .	35
5.1	Microwell Plate Reader . . . . .	39
5.2	Osvitový zdroj pro agarózové modely . . . . .	40
5.3	Emisní spektra SMD diod . . . . .	41
5.4	Absorpční spektrum PpIX a emisní spektrum 405 nm diody . . . . .	41
5.5	Ukázka programového nastavení regulace výkonu jednotlivých párů diod. . . . .	42
5.6	Průběhy optických výkonů tří sousedních diod (F1D, F2D a F3D) v čase. . . . .	42
5.7	Zapojení napěťového stabilizátoru . . . . .	42
5.8	Srovnání emisních spekter DHE s odečtem a bez odečtu agarózy . . . . .	46

5.9	Srovnání emisních spekter PpIX s odečtem a bez odečtu agarózy . . . . .	46
5.10	Srovnání emisních spekter PpIX v agaróze . . . . .	47
5.11	Emisní spektra PpIX, DHE a EOH v neozařovaných vzorcích . . . . .	48
5.12	Fluorescenční spektra PpIX a DHE v ozařovaném tkáňovém modelu . . . . .	50
5.13	Fluorescenční spektra EOH v ozařovaném tkáňovém modelu . . . . .	51
5.14	Průběh bodově měřené fluorescence PpIX a EOH . . . . .	52
5.15	Korelace průběhů signálů PpIX a EOH v ozařovaném tkáňovém modelu . . . . .	52
5.16	Emisní spektra PpIX a EOH v ozařovaném a referenčním tkáňovém modelu . . . . .	54
5.17	Průběh bodově měřené fluorescence PpIX a EOH . . . . .	55
5.18	Korelace průběhů signálů PpIX a EOH v ozařovaném tkáňovém modelu . . . . .	56
A.1	Elektronické schéma obvodu jedné větve LED diod . . . . .	68
A.2	Ovládání optického výkonu mini LED pole . . . . .	69

## Seznam zkratek

PDT	Photodynamic Therapy (Fotodynamická terapie)
ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktivní kyslíkové formy)
PpIX	Protoporphyrin IX (3,7,12,17-Tetramethyl-8,13-divinyl-2,18-porphinedipropionic acid)
DHE	Dihydroethidium (HE, Hydroethidium)
2-OH-E	2- hydroxyethidium (EOH)
E	Ethidium
VIS	Visible Light (Viditelné světlo)
UVA	Ultraviolet A (Ultrafialové záření A)
HPD	Hematoporphyrin Derivate (Hematoporfyrinový derivát)
PS	Fotosenzitivní látka, fotosenzibilizátor
RTG	Rentgenové záření
FRET	Förster Resonance Energy Transfer (Försterův rezonanční přenos energie)
UCN	Upconversion Nanoparticles (Up-konvertující nanočástice)
NIR	Near Infrared (Blízká infračervená oblast)
QD	Quantum Dot (Kvantová tečka)
NP	Nanoparticle (Nanočástice)
GC	Glycol Chitosan
DLI	Drug Light Interval
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Deoxyribonukleová kyselina)
SOLD	Singlet Oxygen Luminescence Dosimetry
NADH	redukovaný Nikotinamid Adenin Dinukleotid
TMPyP	meso-Tetra(N-methyl-4-pyridyl)porphine tetratosylate salt
5-ALA	kyselina 5-aminolevulinová

# Úvod

Fotodynamická terapie (PDT, Photodynamic therapy) je díky svým přednostem významným přispěvatelem v oblasti léčby rakovinných onemocnění, kde spolu s chirurgickým přístupem, radioterapií a chemoterapií tvoří dnes již pevný základ pro léčbu některých patologických stavů. Důležitost fotodynamické terapie potvrzuje i její uplatnění v nenádorové terapii. Atraktivita PDT spočívá v samotném funkčním principu, kdy je pro destrukci patogenních oblastí využita interakce světla, fotosenzitivní látky a kyslíku. Všechny tři složky jsou z hlediska výskytu a dostupnosti přirozenou součástí organismu a jeho okolí, tudíž nepředstavují významnou zátěž v porovnání s ostatními léčebnými přístupy.

I když bylo v oblasti PDT dozimetrie provedeno velké množství studií a vznikla celá řada dozimetrických přístupů, umožňujících kvantitativně hodnotit výsledky léčby, stále chybí standardizovaný model, který by našel uplatnění v klinické praxi. Zlepšení dozimetrických metod vedoucích k optimalizaci léčebných výsledků, například z hlediska určení minimální světelné dávky postačující k zničení patogenní tkáně, lze nalézt v alternativní metodě monitorování produkce reaktivních kyslíkových forem (ROS). Generaci ROS, v odezvě na osvit, je možné zprostředkovaně měřit pomocí fluorescenční sondy, jejíž fotofyzikální vlastnosti jsou v přítomnosti reaktivních kyslíkových forem měněny. Celkovou signální intenzitu vznikajícího fotoproduktu lze následně využít jako měřítko dodané světelné dávky s ohledem na koncentraci fotosenzitivní látky a kyslíku v místě osvitů. Studie využívající modelového systému s následnou aplikací na buněčné prostředí představuje důležitý nástroj pro zefektivnění účinnosti léčby. Tkáňový model na rozdíl od živého prostředí umožňuje provádět experimentální měření v kontrolovaném a relativně homogenním prostředí. Díky vzájemné provázanosti všech tří činitelů vystupujících v procesu PDT (světlo, fotosenzitivní látka a koncentrace kyslíku) lze tyto parametry modifikovat a výsledný efekt pozorovat na dobře popsaném systému. Významnost tkáňových fantomů spočívá v možnosti propojení teoretických modelů s experimentálními výsledky. Další výhodou je jejich dostupnost, nenáročná laboratorní výroba a časová stabilita oproti tkáňovým vzorkům. [1, 2]

Cílem práce je navržení tkáňového modelu a studium produkce reaktivních kyslíkových forem během osvitů modelu obsahujícího fotosenzitivní látku protoporphyrin IX (PpIX). Současně je charakterizována fluorescenční odezva PpIX začleněného do vodného prostředí v návaznosti na osvitové podmínky. V obou systémech byla měřena fluorescence dihydroethidia jako zástupce fluorescenční sondy citlivé na přítomnost reaktivních kyslíkových forem. Pro zajištění hydrogelového prostředí byl vytvořen fluorescenční tkáňový model na agarózové bázi, který díky obsahu absorbující a rozptylové složky splňoval nároky na optické vlastnosti tkáně. Obě prostředí umožnila studium vlivu různých osvitových schémat na generaci reaktivních kyslíkových forem. Rovněž bylo možné hodnotit proces degradace fotosenzitivní látky (photobleaching) jako průvodní jev generace ROS při foto-

dynamické reakci.

Předložená práce je tematicky rozdělena do pěti oddílů. První kapitola zasazuje PDT do historického kontextu a přibližuje léčebné principy interakce světla, fotosenzitivní látky a kyslíku z fyzikálně chemického pohledu. Závěr kapitoly přináší náhled na nové směry ve vývoji fotosenzitivních látek a způsobů jejich interakce s excitačními zdroji, které zásadním způsobem rozšiřují a vylepšují aplikaci PDT. Samostatnou kapitolu tvoří oblast dozimetrických metod. Následující kapitoly práce se věnují experimentální fázi, která je rozdělena do dvou hlavních částí. První část se věnuje detekci reaktivních kyslíkových forem ve vodném prostředí, druhá pak studuje formaci ROS v agarózovém prostředí fluorescenčního tkáňového modelu. Závěrečná sekce zahrnuje vyhodnocení výsledků získaných v průběhu měření a diskuzi nových přístupů rozvíjejících dosavadní poznatky.

Zvolený postup studia fotochemických jevů nejprve ve vodném a následně v agarózovém prostředí, vychází ze snahy ověřit formaci ROS v nejjednodušším možném systému. Další motivací je nalezení optimálních podmínek (koncentrace použitých sloučenin, osvitové podmínky) pro charakterizaci generace ROS ve složitějším, tkáň imitujícím modelu.

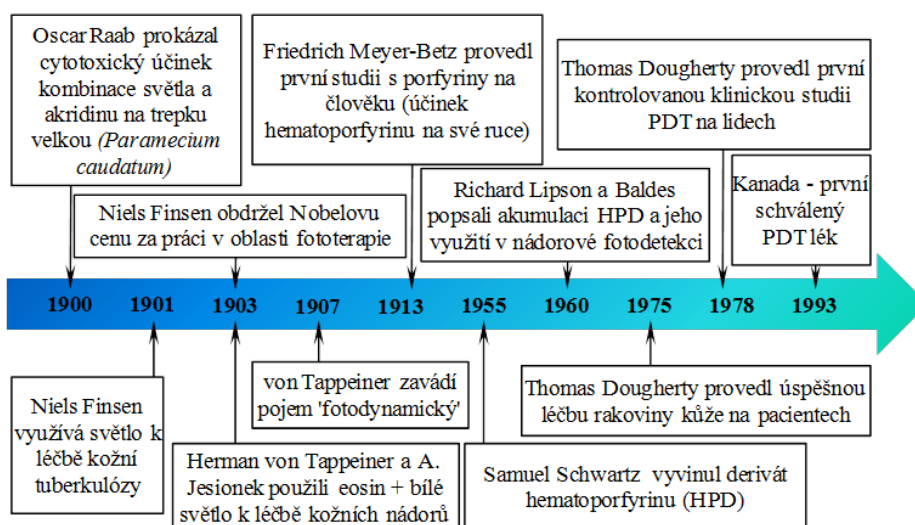
# Kapitola 1

## Fotodynamická terapie

Fotodynamická terapie (PDT, Photodynamic therapy) je léčebný postup využívající interakce světla s fotosenzitivní látkou (PS, fotosenzibilizátor, fotosenzitivní látka), jejímž výsledkem je destrukce ozářených buněk. První krok vedoucí k buněčné smrti zahrnuje zvýšenou akumulaci PS v patogenních buňkách, kde po ozáření světelným zdrojem s vhodnou emisní charakteristikou (vlnová délka spadá do absorpčního spektra použité fotosenzitivní látky) dochází za přítomnosti kyslíku ke generaci reaktivních kyslíkových forem (ROS, Reactive Oxygen Species). Vzniknuvší reaktivní kyslíkové formy, zejména pak singletový kyslík, mají díky své chemické povaze schopnost vyvolat cytotoxický účinek.

### 1.1 PDT v historii

Již před 3500 lety byla v oblastech Indie a Egypta používána rostlina *Ammi majus L.* k léčbě poruchy kožní pigmentace vitiliga. V pozdějších letech byla z této rostliny izolována účinná látka psoralen, která v kombinaci s UVA vykazuje terapeutický efekt, tzv. PUVA terapie (psoralen + UVA). [3] Vybrané historické milníky ve výzkumu léčebných účinků světla v kombinaci se sloučeninami citlivými na světlo jsou uvedeny na obrázku 1.1.



Obrázek 1.1: Významné události v historickém vývoji fotodynamické terapie. Převzato a upraveno z [4].

## 1.2 Mechanismus fotodynamického působení

Výsledný fotodynamický efekt na buněčné a tkáňové úrovni je ovlivněn mnoha vzájemně se ovlivňujícími faktory. Mezi rozhodující činitele patří typ fotosenzitivní látky, její extra a intracelulární lokalizace a výsledná koncentrace v patologické tkáni závisující na podané dávce a akumulaci v čase od podání (DLI, Drug-Light Interval). Další důležitou roli hraje celková světelná dávka ( $J/m^2$ ), zářivá energie zdroje (W) a koncentrace kyslíku v místě osvitů. [4]

Mechanismus fotodynamického působení na úrovni tkání a výsledná cytotoxicita je popisován pomocí tří reakčních typů. V prvním případě jde o přímé působení PS prostřednictvím generace reaktivních kyslíkových forem na buňku, které způsobí její poškození vedoucí k nekróze, apoptóze nebo autofagii. Druhá možnost zahrnuje poškození cév zásobujících patologické tkáň, což vede k nedostatečnému tkáňovému okysličení. Cévní poškození je významně ovlivněno časem mezi aplikací fotosenzitivní látky a světelnou expozicí, kdy dlouhé časové prodlevy umožňují PS difundovat do nádorové tkáně, a snižují tak vaskulární poškození. Třetím mechanismem je aktivace imunitní odezvy vůči patologické tkáni v důsledku zánětlivých změn vyvolaných aplikací PDT. Oba naposled zmíněné způsoby jsou řazeny do kategorie nepřímého působení vedoucího k buněčné smrti. [4]

Hlavním cytotoxickým efektozem ve fotodynamickém procesu je molekula singletového kyslíku, která svými oxidativními vlastnostmi poškozuje zejména aminokyselinové zbytky v proteinech a DNA. Místo akumulace fotosenzitivní látky na subcelulární úrovni je ovlivněno jednak její chemickou charakteristikou (náboj, hydrofobicita), tak buněčnou linií. [5] Záporný náboj dvojšroubovice DNA upřednostňuje interakce zejména s fotosenzitizátory majícími kladně nabitě postranní řetězce, jako je tomu například u molekuly TMPyP. [6, 7]

V širším pohledu existuje více mechanismů vedoucích k buněčné smrti, protože akumulace PS uvnitř buňky zahrnuje více celulárních podjednotek, jejichž poškození v důsledku tvorby ROS vyvolává odlišné změny. Na buněčné úrovni rozlišujeme poškození organel indukovaná ROS, která mohou vést k nekróze, apoptóze, nebo k autofagii.

Apoptické změny jsou nejčastěji vyvolány mitochondriálním poškozením, které vede k uvolnění cytochromu c (Cyt c) a následné aktivaci kaspázové kaskády, štěpící buněčné struktury - proteiny buněčného skeletu nebo proteiny vyztužující jadernou membránu. K apoptóze může dojít i na základě aktivace receptorů buněčné smrti. Apoptické změny lze z morfologického hlediska pozorovat jako fragmentaci DNA, kondenzaci chromatinu a celkové buněčné smrštění. Vlastnosti změněného buněčného povrchu zapříčiní bezprostřední fagocytózu buňky, aniž by došlo k vylití buněčného obsahu do okolí. [8] Apoptické změny podporují zejména fotoaktivní sloučeniny akumulované v mitochondriích (5-ALA-PpIX) nebo v endoplazmatickém retikulu. [9] Nekróza je nepředvídaná, náhlá buněčná smrt způsobená akutním poraněním fyzikálního nebo chemického původu. Z morfologického pohledu se buněčná nekróza projevuje zvětšením buněčného objemu, porušením plazmatické membrány a vylitím buněčného obsahu, což způsobuje zánětlivou reakci v místě výskytu. K buněčné nekróze přispívají fotosenzitivní látky lokalizované v lysozomech a plazmatické membráně (PpIX). [9, 10, 7] Autofagie je katabolický proces zahrnující degradaci poškozených buněčných organel a proteinů v lysozomech. K procesu dochází bez

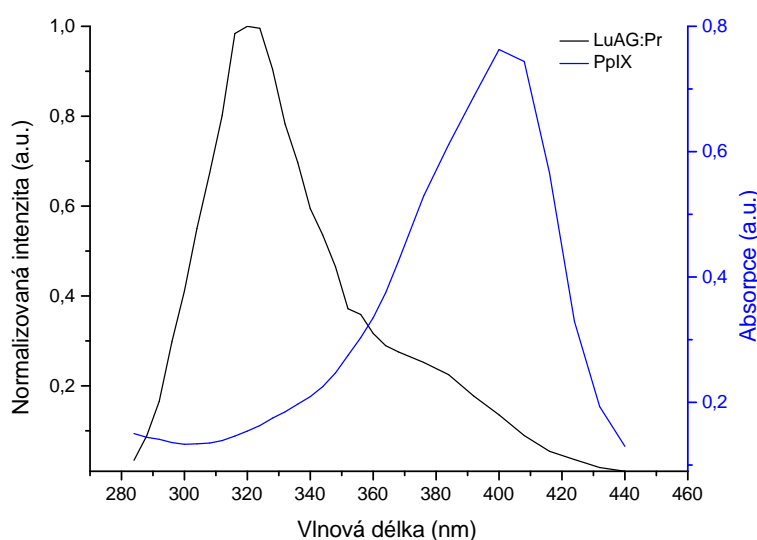
ohledu na lokalizaci PS.

To zda dojde k buněčné nekróze nebo apoptóze závisí na koncentraci fotosenzitivní látky a na světelné dávce. Menší světelné dávky vedou k apoptickým změnám, zatímco u vyšších koncentrací PS nebo vyšších optických dávek převažují nekrotické změny. [8] Při zachování celkové světelné dávky, kdy jsou buňky vystaveny světelným zdrojům o různých výkonech, je možné pozorovat převahu apoptických změn v případě nižšího výkonu, oproti nekrotickým procesům vyvolaným zdrojem o vyšším výkonu. [11]

### 1.3 Nové směry ve vývoji PDT

Léčebný rozsah PDT pokrývá nádorová i nenádorová onemocnění (aktinická keratóza, věkem podmíněná makulární degenerace, arteroskleróza, dentální infekce), přičemž limitujícím faktorem byla až doposud nepovrchová lokalizace patogenní tkáně, znemožňující průnik viditelného světla do hlubších vrstev těla (absorpce většiny PS je v oblasti  $< 700$  nm). Využitím endoskopů v kombinaci s optickými vlákny je tento problém z části překonán a rozšiřuje léčbu i na tělní dutiny (močový měchýř, plíce, jícn).

Dalším perspektivním přístupem k překonání optické tkáňové bariéry pro viditelnou oblast spektra je zapojení zářivého přenosu energie z excitované nanočástice na molekulu PS (Nanoparticles – PDT). Excitace nanočástice je docílena vysokoenergetickým typem záření např.: RTG. Nanočástice s vhodnou emisní charakteristikou (překryv emisního spektra nanočástice s absorpčním spektrem PS, viz příklad PpIX jako fotosenzitivní látka a LuAG:Pr jako zástupce luminiscenční nanočástice na obrázku 1.2), pak funguje jako excitační zdroj pro PS.[12]



Obrázek 1.2: Normalizované emisní spektrum LuAG:Pr ( $\lambda_{ex} = 2.88$  nm) a absorpční spektrum Protoporphyrinu IX (PpIX). Měření fluorescence LuAG:Pr bylo provedeno na aparatuře blíže popsané v [13], absorpční spektrum roztoku PpIX v ethanolu ( $10 \mu\text{M}$ ) bylo měřeno na spektrofotometru UV-3600 (Shimadzu, Japonsko).

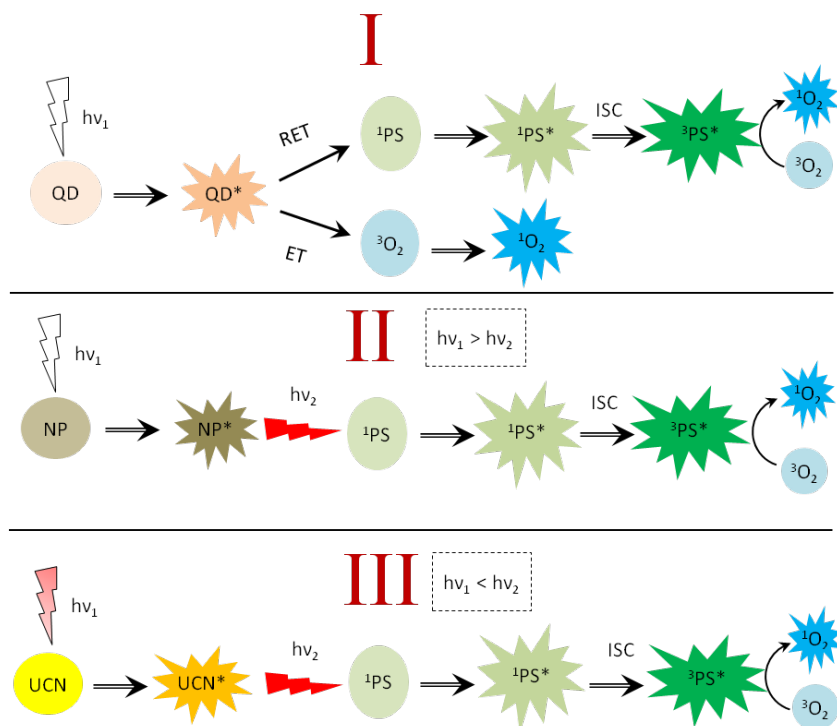


Kvantové tečky oproti fluorescenčním nanočásticím umožňují přímou i nepřímou generaci singletového kyslíku pomocí nezářivého energetického přenosu (FRET, Förster resonance energy transfer). Kvantové tečky v excitovaném elektronovém stavu mohou skrz energetický přenos excitovat molekulu PS, která je na kvantovou tečku navázána (nepřímá generace  $^1\text{O}_2$ ) nebo přímo interagovat s molekulou kyslíku. [14, 15]

Využití vlastností up-konvertujících nanočástic (UCN, Upconversion nanoparticles), kdy po excitaci dochází ke generaci světla o kratší vlnové délce než je excitační, umožňuje generovat  $^1\text{O}_2$  v hlubších tkáňových oblastech. UCN, obvykle lanthanoidy dopované nanočástice ( $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}, \text{Yb}$ ) s navázanou fotosenzitivní látkou, lze excitovat například laserem v blízké infračervené oblasti (absorpční koeficient hlavních tkáňových chromoforů je pro oblast NIR nižší – oblast tkáňového optického okna 700 – 1000 nm), kdy následnou emisí v oblasti VIS je excitována fotosenzitivní látka a generován  $^1\text{O}_2$ . [16, 17]

Výše zmíněné přístupy umožňují rozšíření PDT na hluboko lokalizovaná ložiska patogenní tkáně, kam viditelná spektrální oblast nepronikne. Navíc lze některé postupy uplatnit v kombinaci s konvenční radioterapií, kdy je možné snížit radiační dávku v důsledku podpůrného působení PDT v místě nádorů. [18] Schematické znázornění generace singletového kyslíku s využitím kvantových teček, luminiscenčních nanočástic a up-konvertujících nanočástic pro metodu PDT je zachyceno na obrázku 1.3.

V oblasti vývoje fotosenzitivních látek je snahou posouvat jejich absorpční vlastnosti do blízké infračervené spektrální oblasti ( $> 700$  nm) v důsledku vyšší pronikavosti do tkání. Pro fotosenzitivní látky s absorpcí v kratších vlnových délkách je možné využít dvou-fotonové excitace v infračervené oblasti, která však klade nároky na fotosenzitivní látku z hlediska účinnosti dvou-fotonové absorpce. Kromě možnosti hloubkově aktivovat PS, přináší koncept dvou-fotonové excitace výhodu v přesně lokalizovaném excitačním objemu, kdy k aktivaci dochází ve fokálním objemu excitačního paprsku. Dosaženou prostorovou přesností je možné snížit nároky na akumulaci selektivitu fotosenzitivní látky. Nově vyvinuté fotosenzitivní látky s vysokou účinností dvou-fotonové absorpce, jakými jsou například konjugované porfyrinové dimery, byly zkoumány v in vivo podmínkách na myším modelu v postupu vedoucím k selektivnímu uzávěru cévního úseku. [19]



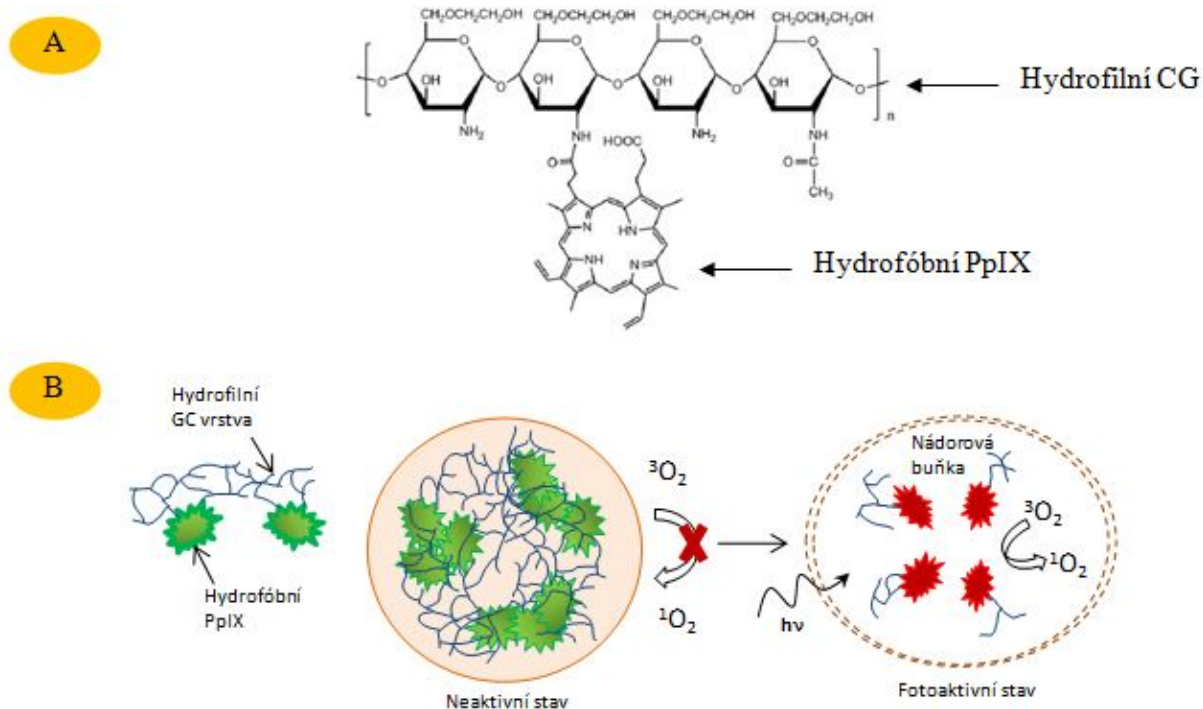
Obrázek 1.3: Schematické znázornění využití kvantových teček (QD) – I, luminiscenčních nanočástic (NP) – II a up-konvertujících nanočástic (UCN) – III, ke generaci singletového kyslíku ( $^1\text{O}_2$ ). PS, fotosenzitivní látka (základní stav); \*, excitovaný stav; RET, rezonanční přenos energie (Resonance Energy Transfer); ET, přenos energie (Energy Transfer); ISC, mezisystémový přechod (InterSystem Crossing). Upraveno z [20].

### 1.3.1 Dopravníkové systémy fotosenzitivních látek

Celá řada fotosenzitivních látek vykazuje ve vodném prostředí hydrofobní vlastnosti, které se projevují tvorbou agregátů. Samozhášení excitovaných agregátů snižuje kvantový výtěžek delta kyslíku a odezva nádorové tkáně na ozáření je tak nižší. Z důvodů překonání těchto obtíží je vývoj systémů pro zlepšení doručení fotosenzitivních látek do cílové oblasti zásadní. Mezi dopravníkové systémy (PS – vektor), které fungují jako nosiče fotosenzitivních látek a jsou za tímto účelem zkoumány, patří liposomy (vesikly tvořené fosfolipidovou dvojvrstvou), polymerní nanočástice a polymerní micely. [21, 22]

Další motivací ve vývoji systémů PS – vektor je zvýšení akumulární specifity v oblasti nádoru (Tumor site-specific PDT), která snižuje ohrožení zdravých buněk na minimum. Významným přínosem na tomto poli jsou aktivovatelné fotosenzitivní látky (Activatable Photosensitisers), které využívají chemického spojení PS a regulační molekuly (regulátor). V oběhovém systému se navázaná molekula fotosenzitivní látky vyskytuje v latentní (neaktivní) formě. Fotodynamicky neaktivní stav přechází v aktivní až v nádorové tkáni, poté co je rozštěpena vazba PS – regulátor, a to pomocí endogenních stimulů charakteristických pro nádor – nízké pH, enzymatická aktivace. Jako příklad lze uvést vazbu hydrofobní fotosenzitivní látky (PpIX) s hydrofilní polymerní molekulou (přírodní polysacharidy) viz obrázek 1.4, kdy se ve vodném prostředí vytvoří struktura způsobující shlukování molekul PS vedoucí k samozhášení excitovaných stavů. Znovuobnovení fotoaktivity nastává až v nádoru, kde dojde k rozrušení polymerní vazby a následné separaci

jednotlivých molekul fotosenzitivní látky, čímž je obnovena schopnost tvorby delta kyslíku po excitaci PS. [23, 24]



Obrázek 1.4: Vazba protoporfyrinu IX s molekulou glykol chitosanu (PpIX-GC) – A, vedoucí k tvorbě samozhášecího komplexu (neaktivní stav) s nemožností fotosenzitizované reakce po dobu trvání vazby – B. Převzato a upraveno z [23, 22].

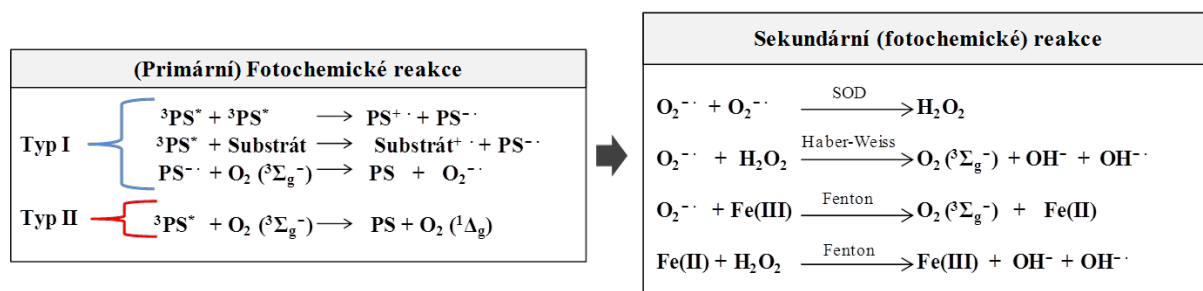
# Kapitola 2

## Reaktivní kyslíkové formy

Reaktivní kyslíkové formy (ROS, Reactive Oxygen Species) jsou chemicky pozměněné molekuly, které mohou vznikat například fotosenzitizovanou reakcí prvního nebo druhého typu. [25] Mechanismus jednotlivých reakcí je blíže popsán v následující kapitole.

### 2.1 Tvorba reaktivních kyslíkových forem

Deaktivací proces (zhašení) tripletního stavu molekuly senzitivátoru, vedoucí ke vzniku reaktivních kyslíkových forem, lze rozdělit do dvou skupin. První reakční typ (Typ I) spočívá v přenosu elektronu nebo vodíkového atomu mezi excitovanou molekulou fotosenzitivní látky v tripletním stavu a substrátem (např.: buněčné organely, jiné molekuly), což vede k tvorbě volných aniontových nebo kationtových radikálů, například superoxidů ( $O_2^{\cdot-}$ ). Vytvořené radikálové molekuly mohou následně interagovat s molekulou kyslíku a produkovat další reaktivní kyslíkové formy. Druhý typ reakce (Typ II) zahrnuje energetický přenos mezi excitovanou molekulou fotosenzitivní látky v tripletním stavu a molekulou kyslíku viz kapitola 2.2, který vede k tvorbě singletového kyslíku. Zjednodušené schéma reakčních mechanismů vedoucích k tvorbě ROS je znázorněno na obrázku 2.1. [5]



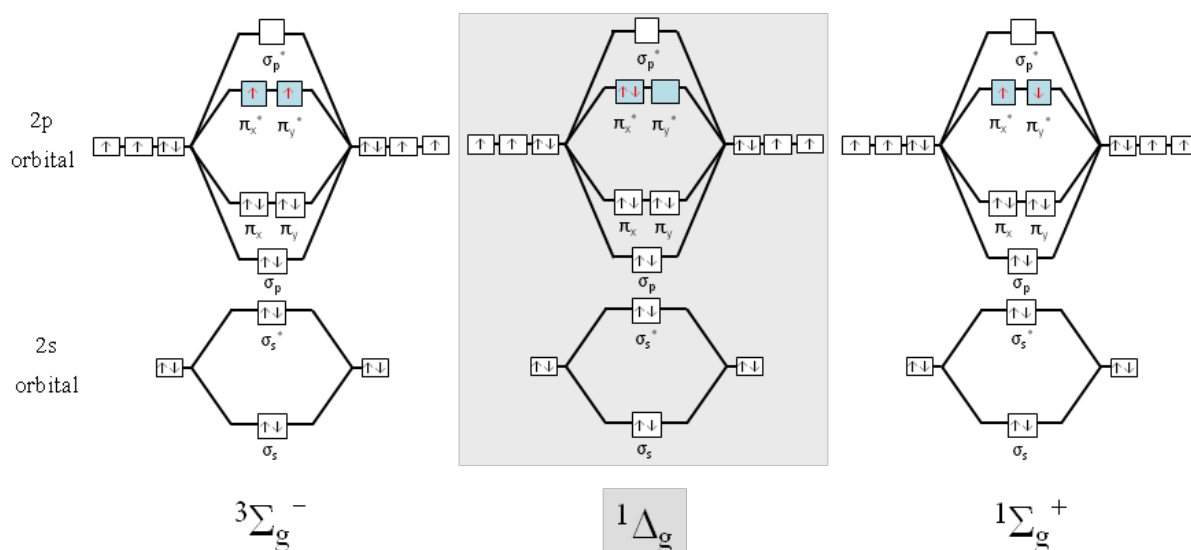
Obrázek 2.1: Grafické znázornění fotofyzikálních a fotochemických změn účastnících se fotodynamického procesu a následujících chemických reakcí.  $H_2O_2$ , peroxid vodíku;  $O_2(^1\Delta_g)$ , singletový kyslík (excitovaný stav);  $O_2(^3\Sigma_g^-)$ , tripletní kyslík (základní stav);  $O_2^{\cdot-}$ , superoxidový anion;  $OH^{\cdot-}$ , hydroxilový radikál; SOD, superoxid dismutáza;  $X^{-/+}$  anion/kation molekula;  $X^{\cdot}$ , radikálová molekula. Převzato a upraveno z [26]

Typ a výtěžnost fotodynamicky generovaných kyslíkových forem je značně ovlivněna bezprostředním okolím senzibilizátoru, jak bylo prokázáno ve studii [27]. Převládajícím reakčním typem tripletního stavu fotosenzitivní látky s okolím je energetický přenos, vedoucí ke vzniku singletového kyslíku, který však může být v případě nízké koncentrace

kyslíku nahrazen prvním reakčním typem. [28] Generace singletového kyslíku prostřednictvím energetického přenosu je uskutečnitelná pouze u typů fotosenzitivních látek, jejichž energetický rozdíl mezi základním a excitovaným tripletním stavem je vyšší, než je energie potřebná k excitaci kyslíku (94 kJ/mol).

## 2.2 Singletový kyslík

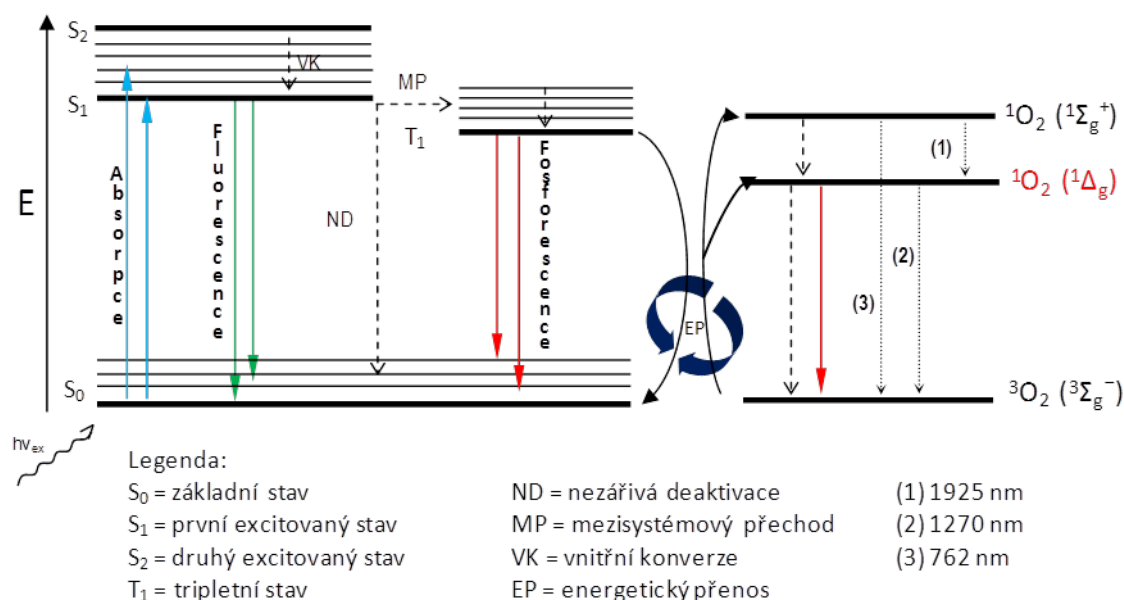
Singletový kyslík ( $^1O_2$ ) respektive jeho stabilnější forma ( $^1\Delta_g$ , delta kyslík) je excitovanou molekulou základního tripletového stavu molekulárního kyslíku, která je hlavním cytotoxickým činitelem vystupujícím v procesu PDT. V základním stavu ( $^3\Sigma_g^-$ ) má molekula kyslíku v nejvyšším antivazebném orbitalu dva nepárové elektrony s paralelními spiny, tzn. spinová multiplicita je 3 (triplet) a její reaktivita s většinou okolních látek, převážně v singletových stavech, je omezena (spinový zákaz). Reaktivita excitované kyslíkové formy ( $^1\Delta_g$ ) se odvíjí od elektronového obsazení orbitalů. Singletová forma kyslíku obchází Hundovo pravidlo o obsazování degenerovaných orbitalů a ve svém excitovaném stavu má všechny elektrony spárovány, tzn. spinová multiplicita je 1 (singlet) a reakce s okolními látkami je spinově dovolena. [6] Schéma molekulárních orbitalů jednotlivých kyslíkových forem je na obrázku 2.2.



Obrázek 2.2: Schéma molekulárních orbitalů tripletního kyslíku – kyslík v základním stavu (vlevo), singletového kyslíku s nižší (uprostřed) a vyšší energií (vpravo). Upraveno z [29].

Tvorba singletového kyslíku spojená s fotosenzitizovanou reakcí probíhá nepřímo prostřednictvím molekuly senzitivátoru, zjednodušené schéma této reakce je na obrázku 2.3. Poté, co senzibilní látka v základní stavu  $S_0$  (např. PpIX) absorbuje světelné kvantum, a dostane se tak do určitého excitovaného stavu  $S_x$ , přechází na nejnižší excitovaný stav  $S_1$  odkud může procesy vnitřní konverze (VK) nebo fluorescenčním přechodem skončit opět v základním stavu  $S_0$ . K deaktivaci z  $S_1$  může docházet i tzv. mezisystémovým přechodem (MP), kdy se po změně spinu elektronu dostane fotosenzitivní látka do tripletního stavu. Zde molekula setrvává z důvodu spinového zákazu a může reagovat se svým okolím například s kyslíkem v základním (tripletním) stavu. Deaktivací (zhášením v podobě energetického přenosu) tripletního stavu PS dojde k vybuzení tripletní molekuly kyslíku do jednoho ze

dvou singletových stavů s odlišnou energií ( $^1\Delta_g$  a  $^1\Sigma_g^+$ ). Stablnější singletový kyslík  $^1\Delta_g$  je energeticky nižší formou ( $94.1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) oproti  $^1\Sigma_g^+$  ( $156.9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Jelikož je přechod mezi  $^1\Sigma_g^+$  a  $^1\Delta_g$  spinově dovolený, nastává s vysokou pravděpodobností, a nepřímou tak přispívá k tvorbě  $^1\Delta_g$ . [6] U většiny fotosenzitivních látek, jakými jsou například porfyriny a jejich deriváty, je charakteristická vysoká výtěžnost tripletního stavu a tudíž i výtěžnost singletového kyslíku (0.3 – 0.8).



Obrázek 2.3: Jablonského diagram znázorňující energetické přechody, tvorbu singletového kyslíku energetickým přenosem a zářivé přechody (1) - (3) využívané k přímé detekci singletového kyslíku.

Mimo fotosenzitizovanou reakci je možné singletový kyslík generovat i fyzikálním mechanismem aplikace mikrovlnného výboje v kyslíkové atmosféře, chemickou cestou při reakci chlornanu s peroxidem vodíku (chemiluminiscenční reakce s emisí na 634 nm), nebo přímou excitací molekulárního kyslíku na vlnové délce 1270 nm. [30] Doba života této vysoce reaktivní molekuly je ovlivněna okolním prostředím a pohybuje se mezi 4  $\mu\text{s}$  ve vodě až 72 min v plynech. [31] V biologických systémech je doba života  $< 0.04 \mu\text{s}$ , z čehož vyplývá i krátký dosah působnosti ( $< 0.02 \mu\text{m}$ ) tudíž jsou škody jím způsobené omezeny na místo akumulované fotosenzitivní látky. [32, 33] Jedná se zejména o plazmatické membrány a buněčné organely, viz stručný popis buněčného působení v kapitole 1.2. [8] Přesná buněčná lokalizace se odvíjí od charakteristiky fotosenzitivní látky, kdy v případě hydrofobní molekuly PpIX byl zaznamenán výskyt v blízkosti plazmatických membrán. [21, 7] Hydrofilní molekuly naproti tomu obtížně difundují skrz plazmatickou membránu, do buňky se tak mohou dostávat endocytózou a jejich zvýšená akumulace je v cytoplazmě buňky. [5] Aniontové substituční skupiny na porfyrinových makrocyclech některých fotosenzitivních látek, jsou zodpovědné za zvýšenou akumulaci schopnost v nádoru v důsledku nízkého pH prostředí. [10]

Účinnost PDT se odvíjí od efektivity tvorby  $^1O_2$ . Tvorba delta kyslíku je ovlivněna typem fotosenzitivní látky a jejími fotofyzikálními charakteristikami (výťažnost tripletních stavů podmiňující tvorbu singletového kyslíku), rozpouštědlem (pH, hydrofobicita). [24] Výťažnost singletového kyslíku je v polárních rozpouštědlech, jakým je například voda, o zhruba polovinu nižší, než je tomu v případě nepolárních rozpouštědel, jakým je toluen. Přenos náboje excitované molekuly, výrazný v polárních rozpouštědlech, představuje negativní deexcitační cestu z tripletního stavu z hlediska tvorby singletového kyslíku, která je tímto způsobem snížena. V organických rozpouštědlech při pokojové teplotě je kyslík díky difúzním procesům zastoupen v koncentraci  $1-3 \times 10^{-3}$  M. Koncentrace kyslíku v polárních rozpouštědlech je o řád nižší, než je tomu v některých běžných organických rozpouštědlech. [34] Koncentrace kyslíku v základním stavu je v důsledku fotodynamické akce snižována. Negativním projevem tohoto jevu může být snížená odezva nádorové tkáně na léčbu. Možná řešení spočívají ve snížení optického výkonu nebo zapojení frakcionovaného režimu osvitů, kdy je zajištěna reoxygenace ozařované oblasti.

# Kapitola 3

## Dozimetrické metody

Existuje více obtížně měřitelných parametrů, které je potřeba znát pro stanovení účinné světelné dávky v PDT, tzn. pro vyvolání cytotoxického efektu. Obecně se jedná o kombinaci tří nejdůležitějších, vzájemně provázaných složek, jejichž různé zastoupení ve fotodynamickém procesu významně ovlivňuje výsledný terapeutický efekt: kyslík, fotosenzitivní látka a světelný zdroj. [33] Dozimetrické metody v PDT lze dělit na přímé, explicitní a implicitní. Explicitní přístup zahrnuje součinnost všech tří vzájemně propojených proměnných – světlo, koncentrace PS a stupeň okysličení. Komplikovanost tohoto přístupu vychází ze vzájemné provázanosti všech tří složek, jak je ilustrováno na schématu 3.1. Z nákresu vyplývají následující skutečnosti. Při terapeutickém ozáření dochází v důsledku fotodynamických změn k degradaci fotosenzitivní látky (bleaching PS) za současné spotřeby kyslíku ( $^3O_2$ ). Spotřeba kyslíku vede k tkáňové deoxygenaci, v jejímž důsledku se snižuje hloubka průniku světla (nárůst tkáňové absorpce). [35]

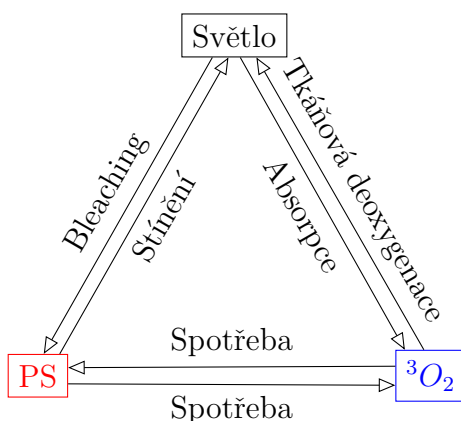


Schéma 3.1. Příklad vzájemné provázanosti tří hlavních proměnných (světlo, fotosenzitivní látka – PS, kyslík –  $^3O_2$ ) vystupujících ve fotodynamickém procesu. Převzato a upraveno z [36].

Implicitní přístup se zaměřuje na jeden parametr, kdy je do vztahu dán například proces photobleachingu a koncentrace kyslíku, nebo výkon světelného zdroje ve vztahu k tvorbě delta kyslíku. Díky znalosti vzájemné provázanosti všech tří složek, je možné studovat jejich různé poměrové kombinace, s cílem zlepšit výsledný terapeutický efekt s co nejvyšší mírou ochrany zdravé tkáně.[37]

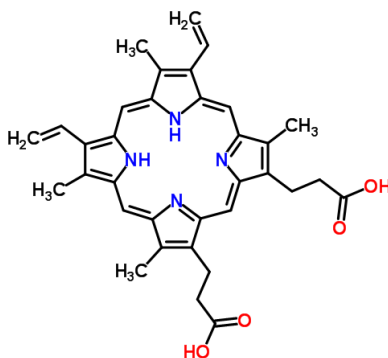


## 3.1 Přímá detekce

Jednou z přímých fyzikálních metod měření obou energetických stavů singletového kyslíku je detekce jejich radiačních přechodů, zejména fosforescence  $^1\Delta_g$  při 1270 nm (SOLD, Singlet-oxygen luminescence dosimetry). Díky nízkému kvantovému výtěžku fosforescence a krátké době života delta kyslíku, klade detekce signálu velké nároky na přístrojové vybavení a její provedení na tkáňové úrovni je obtížné. Pokroky v detekčních systémech (fotonásobiče citlivé v NIR) vedly k možnosti provádět studie vlivu kumulativní dávky  $^1\Delta_g$  na buněčné a tkáňové úrovni v in vitro i in vivo podmínkách. [38, 39] V in vitro podmínkách se lze dále zaměřit na fluorescenční signál přechodu  $^1\Sigma_g^+ \rightarrow ^1\Delta_g$  při 1925 nm, nebo fosforescenční odezvu přechodu  $^1\Sigma_g^+ \rightarrow ^3\Sigma_g^-$  při 764 nm. [40] Vybrané fluorescenční přechody využívané k detekci jsou znázorněny na obrázku 2.3. Detekce delta kyslíku při 1270 nm umožňuje studium jeho tvorby na buněčné úrovni. [31]

## 3.2 Photobleaching fotosenzitivní látky

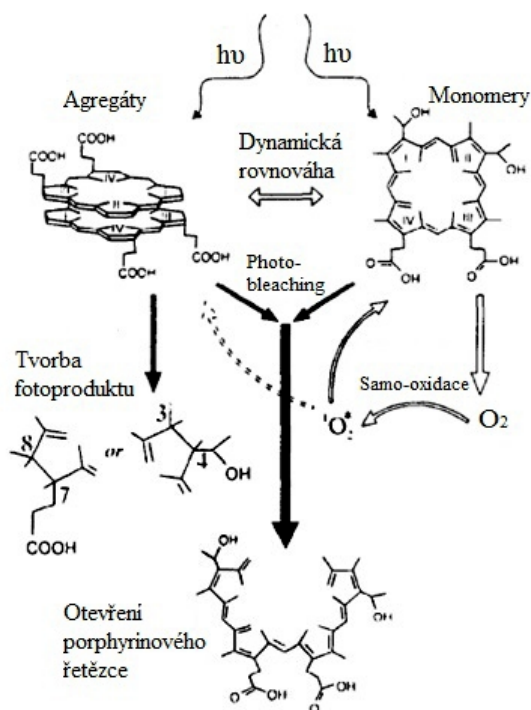
Velká skupina fosenzitivních látek využívaných ve fotodynamické terapii je na bázi porfyrinů (terapyrrolové makrocykly viz obrázek 3.1), látek vykazujících zvýšenou citlivost k fotochemickému odbourávání (photobleaching). Na základě předpokladu, že je tento jev způsoben oxidačními schopnostmi generovaných reaktivních kyslíkových forem, je možné photobleaching využít pro stanovení výtěžku  $^1O_2$ . V kombinaci s buněčnou odezvou na tvorbu delta kyslíku je tento dozimetrický přístup účinnou kvantitativní metodou (například pro určení prahové dávky delta kyslíku). [6]



Obrázek 3.1: Molekula Protoporfyriu (PpIX).

Měření poklesu intenzity fluorescence během osvitů patogenní tkáně, které je využíváno v dozimetrii, vychází z funkčního principu samotného procesu. Výchozím předpokladem je skutečnost, že reakce vedoucí k buněčné smrti během PDT, tedy generace ROS, je příčinou fotochemické destrukce senzitivní látky. Na základě této úvahy byla provedena celá řada studií zabývajících se jevem photobleachingu ve vztahu k PDT. V důsledku ozáření roztoku obsahujícího fluorofor (například látky na bázi porfyrinů) může docházet k procesům (v závislosti na intenzitě světelného zdroje, délce osvitů, pH roztoku, koncentraci kyslíku v roztoku) fotodegradace (photobleaching) a chemické modifikace (tvorba fotoproduktů například photoprotoporfyriu v roztoku PpIX). V prvním případě dochází k destrukci porfyrinového makrocyklu, jejímž spektrálním projevem je nárůst absorpce

ve viditelné a UV oblasti spolu s poklesem intenzity fluorescence. Formace fotoproduktů (porfyrinové agregáty) v druhém případě vede ke spektrálnímu posunu a k možnému vzniku nových fluorescenčních pásů těchto produktů v emisním spektru. [41] Samotné fotoprodukty mohou fungovat jako fotosenzitivní látky, a přispívat tak k produkci singletového kyslíku, čímž nepřímo podporují proces photobleachingu mateřské fotosenzitivní molekuly. Samy však vykazují relativní rezistivitu vůči procesu fotodegradace. [42] Schematické znázornění procesu fotodegradace a tvorby agregovaných forem vlivem působení delta kyslíku je na obrázku 3.2.



Obrázek 3.2: Proces photobleachingu vlivem působení singletového kyslíku na monomerní a agregovanou porfyrinovou strukturu. [41]

Analýzou spektrálních změn (pokles intenzity fluorescence; posun nebo nárůst v jiné oblasti absorpčního spektra – viz nárůst absorpce na 670 nm v případě PpIX), vyvolaných různou intenzitou osvitů, lze hodnotit fotostabilitu fluoroforu. Se snižující se koncentrací fotosenzitivní látky v roztoku (v důsledku fotodestrukce) klesá i množství produkováného singletního kyslíku. Jestliže je množství kyslíku v základním stavu vlivem fotodynamických změn snižováno a není zajištěna zpětná reoxygenace roztoku, je proces fotodegradace omezen. Naopak, dochází-li k zpětné difúzi kyslíku do roztoku, je fotodegradace posílena. Oba fenomény lze porovnávat při kontinuálním a frakcionovaném osvitě, kdy rozdělení světelné dávky na úseky umožňuje účinnější reoxygenaci místa, a efekt photobleachingu je tak posílen. [43, 44, 45] Současně bylo prokázáno, že nižší intenzity světelných zdrojů vedou k nižší spotřebě kyslíku, čímž je posílen cytotoxický efekt zejména u nádorů, jejichž cévní zásobení je oproti zdravé tkáni omezeno a dostupnost kyslíku je tudíž snížena. [46]

Při měření photobleachingu fotosenzitivních látek je třeba zvážit, zda je tento proces na kyslíku závislý (foto-oxidativní) nebo nezávislý, kdy k poklesu dochází i při absenci kyslíku v důsledku nevratných reakcí excitovaných stavů fotosenzitivních látek s okolím. [47, 48]

Ověřit tento jev lze přidáním specifického zhášedce singletového kyslíku jakým je  $NaN_3$  (azid sodný) do roztoku, kdy je pozorována snížená produkce fotoproduktů (tzn. nižší fotodegradace). Další metodou je probublání roztoku inertním plynem ( $N_2$ ,  $Ar$ ), která vede k vytěsnění kyslíku. [43] Dále lze využít jako rozpouštědla na místo vody ( $H_2O$ ) těžkou vodu ( $D_2O$ ), v které je prodloužená doba života delta kyslíku a tudíž podpořena fotodegradace. Roztok je možné probubláním kyslíkem prosytit, případně podle potřeby zvolit takové rozpouštědlo, v kterém je rozpustnost kyslíku vyšší nebo nižší. [49]

Koncentrace fotosenzitivní látky v místě osvitů ovlivňuje stupeň fotodegradace a současně i způsob, jakým k němu dochází. Při vyšších koncentracích PS se uplatňuje fotochemická degradace vyvolaná působením delta kyslíku, naopak nižší koncentrace fotosenzitivní látky vedou k bleachingu prostřednictvím interakce tripletního stavu s okolím molekuly. [50] Photobleaching lze v klinické praxi považovat za negativní jev, který vede k poklesu koncentrace fotosenzitivní látky, čímž je redukována tvorba singletového kyslíku a tudíž dochází ke snížení účinnosti PDT. V jiném pohledu je možné využít tohoto jevu k dozimetrickým účelům a sledovat intenzitu fluorescence fotosenzitivní látky v reálném čase. V in vivo podmínkách je proces photobleachingu komplexním dějem, který je ovlivňován mnoha faktory, a to jak v bezprostředním okolí PS, tak i samotným charakterem PS.

### 3.3 Alternativní dozimetrické přístupy

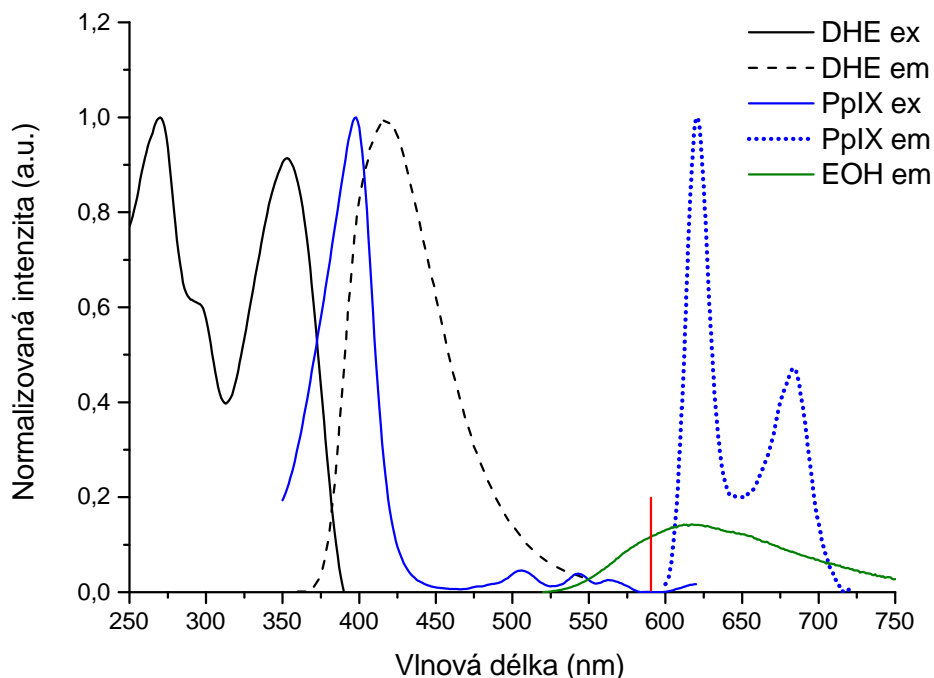
Fluorescenční odezva buněčných chromoforů na průběh PDT, jako ukazatel životaschopnosti buňky, se jeví jako vhodný nástroj k určení potřebné expoziční dávky pro vyvolání cytotoxicity. Konkrétním příkladem buněčného fluoroforu je nikotinamid adenin dinucleotid (NADH), koenzym účastnící se buněčného dýchání v mitochondriích, jehož fluorescenční signál je v důsledku mitochondriálního poškození redukován. Měření expoziční dávky je tudíž omezeno na signální odezvu NADH. [51] Vaskulární změny vyvolané v důsledku fotodynamického působení mohou sloužit jako další přímý ukazatel odezvy na léčbu, zejména v případě fotosenzitivních látek cílících na mikrovaskulární nádorovou síť. Vyhodnocení poklesu krevního průtoku v cévách v oblasti postižené tkáně při aplikaci PDT lze provést pomocí difúzní korelační spektroskopie v blízké infračervené oblasti. [52]

### 3.4 Detekce využívající fluorescenčních značek

Pro účely detekce reaktivních kyslíkových forem (ROS) v médiích je využíváno vlastností fluorescenčních sond (značek), které v přítomnosti reaktivních kyslíkových forem mění své fotofyzikální vlastnosti. V současnosti existuje velká škála komerčně dostupných fluorescenčních sond, které mohou díky své specifitě prokázat přítomnost konkrétního typu ROS. Produkce kyslíkových forem může být kvantifikována monitorováním změn ve fluorescenčním spektru dané chemické značky jako nárůst signální odezvy jejího reakčního produktu. Současně lze tuto odezvu korelovat s úbytkem intenzity fotosenzitivní látky, k němuž dochází v důsledku tvorby reaktivních forem kyslíku (proces photobleachingu). [37]

Přítomnost reaktivních kyslíkových forem v roztocích PpIX a ve fluorescenčním tkáňovém modelu byla v experimentální části práce studována pomocí dihydroethidia (DHE, Hydroethidium - HE), jehož bližší popis je obsahem kapitoly 4.1.2. Výhodou spektrálního měření odezvy ozařovaného systému PpIX + DHE je minimální překryv absorpčního pásu

PpIX s emisním pásem generovaného fotoproduktu, díky čemuž není signál reakčního produktu potlačen. Na obrázku 3.3, kde jsou zobrazeny spektrální charakteristiky použitých sloučenin je tato vlastnost dobře viditelná.



Obrázek 3.3: Normalizovaná excitační ( $\lambda_{em(PpIX)} = 630$  nm, ( $\lambda_{em(DHE)} = 400$  nm) a emisní spektra ( $\lambda_{ex(PpIX)} = 405$  nm,  $\lambda_{ex(DHE)} = 350$  nm,  $\lambda_{ex(EOH)} = 480$  nm) PpIX, DHE a EOH ve vodných roztocích (demineralizovaná voda + < 1 % DMSO). Červená značka odpovídá emisní vlnové délce (580 nm) používané k detekci vznikajícího fotoproduktu (EOH).

# Kapitola 4

## Detekce ROS ve vodném prostředí

Studium generace reaktivních kyslíkových forem ve vodném prostředí a následně v agarózovém tkáňovém modelu, kdy oba systémy obsahují porfyrinovou fotosenzitivní látku (PpIX) je možné provést pomocí fluorescenční sondy (DHE), jejíž fotofyzikální vlastnosti jsou v přítomnosti kyslíkových forem měněny. V experimentálním přístupu je využito konverze molekuly dihydroethidia (DHE, Hydroethidium - HE) na molekulu 2 – hydroxyethidia (EOH), viz obrázek 4.7, vlivem působení molekuly superoxidu, která je generována jako vedlejší produkt redukce singletového kyslíku. Oxidace dihydroethidia na 2 – hydroxyethidiový kationt je ireverzibilním procesem. [30, 53] Výrazný podíl molekuly superoxidu na buněčné smrti byl prokázán ve studii [54], využívající ve fotodynamickém procesu PpIX, jehož tvorba byla podpořena podáním 5-ALA. Znalost emisních vlastností oxidované formy dihydroethidia (DHE-fotoprodukt) umožňuje provedení časově rozlišené studie vývoje fluorescenčního signálu fotoproduktu v odezvě na fotodynamickou reakci v ozařovaném prostředí. Úbytek fotosenzitivní látky (PpIX) v roztoku lze propojit s nárůstem fluorescenčního signálu EOH, který je úměrný koncentraci superoxidů v prostředí. Díky vlastní fluorescenční charakteristice neoxidované formy dihydroethidia ( $\lambda_{ex} = 350$  nm,  $\lambda_{em} = 400$  nm) je možné detekovat i úbytek DHE v průběhu fotodynamického působení na systém DHE + PpIX.

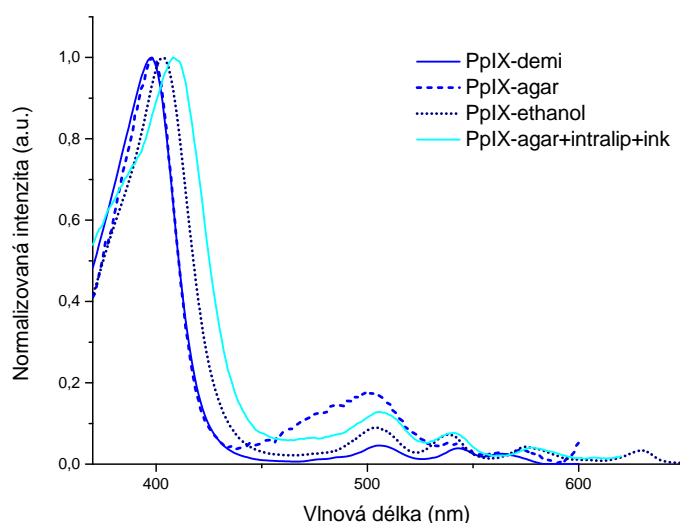
Tato kapitola je věnována studiu fluorescenční odezvy dihydroethidia v návaznosti na osvit roztoků obsahujících fotosenzitivní látku (PpIX). V úvodní části jsou představeny chemické sloučeniny použité v experimentech, se zaměřením na jejich chemicko-fyzikální vlastnosti. Je uveden popis spektrofluorimetru FluMax-4 (Horiba, Japonsko) využívaného k charakterizaci součástí vodných roztoků, tkáňových modelů a k měření spektrální odezvy těchto systémů na osvit. Dále je uveden postup přípravy vodných roztoků s proměnnou koncentrací obou složek (PpIX, DHE). Druhá polovina kapitoly obsahuje výsledky kontrolního měření provedeného na roztocích obsahujících pouze DHE. Tento oddíl uzavírají části studie sledující vliv koncentrace PpIX na vývoj signálu fotoproduktu v ozařovaných roztocích s konstantní koncentrací DHE.

### 4.1 Vlastnosti použitých sloučenin

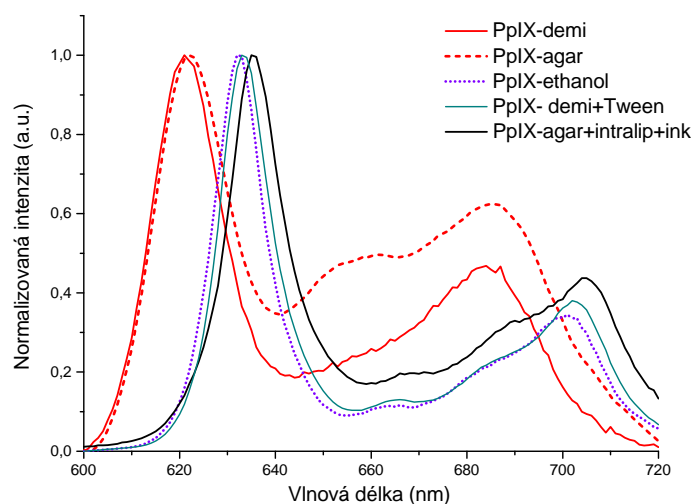
#### 4.1.1 Protoporfyrin IX (PpIX)

Protoporfyrin IX (PpIX) je nejběžněji v přírodě se vyskytující porfyrinová struktura sestávající z hydrofobní části, kterou tvoří centrální tetrapyrrolový řetězec a hydrofilního

propionového úseku, struktura molekuly PpIX je na obrázku 3.1. Jedná se o lipofilní molekulu, která je metabolickým prekurzorem chlorofylů a cytochromů, typu hemoglobin. Bivalentní povaha předurčuje molekulu PpIX umístěnou do vodného prostředí k tvorbě micelárních struktur, případně vyšších agregovaných polymerních forem. Typické absorpční spektrum PpIX sestává z výrazného absorpčního maxima okolo 400 nm, tzv. Soretova pásu, menší absorpční kapacita spadá do oblasti tzv. Q-pásu, kde jsou pozorovatelné čtyři peaky v rozmezí 500 až 650 nm, jak je patrné z obrázku 4.1. Emise PpIX využívaná při fluorescenčně naváděné resekcí nádorových ložisek leží v oblasti 630 a 700 nm. V klinické praxi se produkce PpIX v patologické tkáni podporuje vnějším podáním 5-aminolevulinové kyseliny (ALA) vystupující jako prekurzor PpIX.

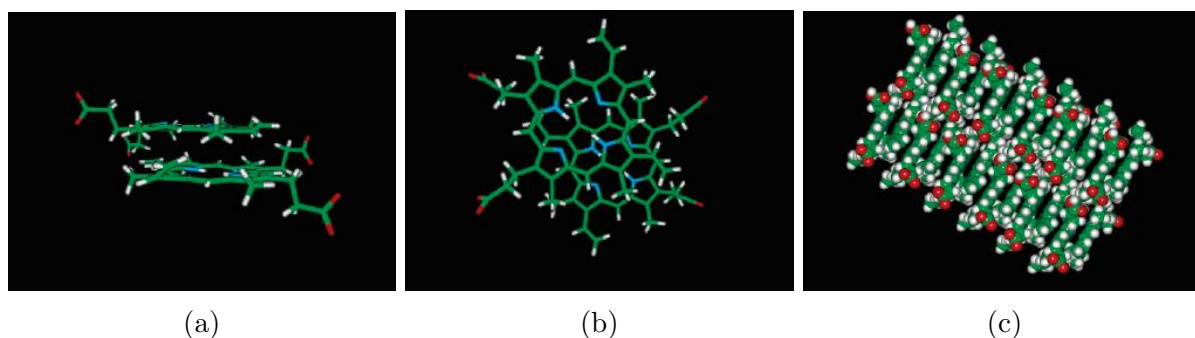


Obrázek 4.1: Celkové srovnání normalizovaných excitačních spekter ( $\lambda_{em} = 620$  nm) PpIX-demineralizovaná voda, PpIX-agaróza, PpIX-ethanol a PpIX-tkáňový model (agaróza, intralipid 1%, inkoust 0.2%).



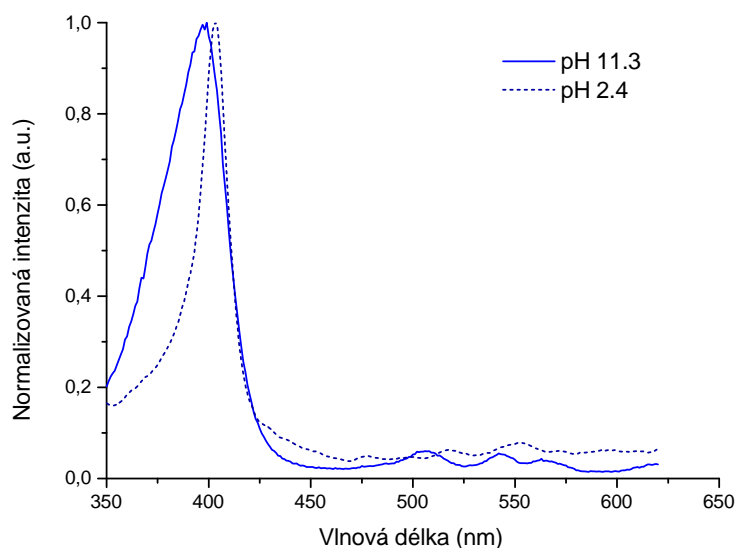
Obrázek 4.2: Celkové srovnání normalizovaných emisních spekter ( $\lambda_{ex} = 405$  nm) PpIX-demineralizovaná voda, PpIX-agaróza, PpIX-ethanol, PpIX-demineralizovaná voda + Tween (0.1%) a PpIX-tkáňový model (agaróza, intralipid 1%, inkoust 0.2%).

Molekula PpIX se v roztoku chová jako amfoterní elektrolyt, to znamená, že může vystupovat jako donor i akceptor protonů. Zásadité vlastnosti propůjčuje molekule přítomnost dvou atomů dusíku v pyrrolových cyklech, které mohou akceptovat protony. Vlastnosti kyseliny jsou zajištěny dvěma propionovými rezidui, která naopak fungují jako protonové donory. [55] Díky amfifilnímu charakteru je molekula schopna vytvářet mnohočetná seskupení. Tvorba agregátů ve vodných roztocích PpIX je silně závislá na pH prostředí. Převaha monomerních forem byla prokázána v roztocích, jejichž pH se nachází v rozsahu 0 – 3 (některé zdroje uvádí monomerní formu PpIX ve vodném roztoku pro pH pod 1 [56]), dimery se vyskytují při pH > 8 a při pH v rozsahu 3 – 7 dochází k tvorbě vyšších agregátů typu porfyrinových dvojvrstev, viz obrázek 4.3. Supramolekulární struktury se mohou formovat díky tvorbě vodíkových vazeb mezi částečně neutralizovanými karboxylovými postranními řetězci molekuly PpIX ve středních hodnotách pH roztoků. [57] Schopnost samozhášení vytvořených agregátů vede ke snížení kvantového výtěžku delta kyslíku, ke zvýšení fotostability fotosenzitivního komplexu a k snížení schopnosti detekce fluorescenčního signálu PpIX v roztoku. [58]



Obrázek 4.3: Počítačové modely struktur agregujících molekul Protoporfyrinu IX v závislosti na pH vodného roztoku. a), b) – dimer molekuly PpIX, c) – úsek protoporfyrinové dvojvrstvy tvořící 24-merní strukturu. [57]

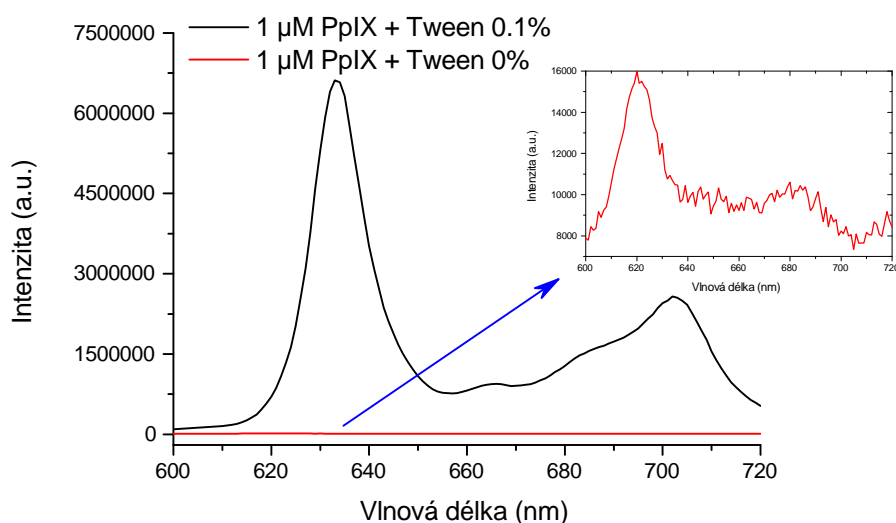
Díky disociační schopnosti PpIX v kyselém a zásaditém vodném prostředí je možné v absorpčních spektrech pozorovat nárůst intenzity v oblasti Soretova pásu v pořadí od pH 3 až 8, pH 12 a pH 1. Tento jev podporuje předpoklad existence monomerní formy PpIX v kyselém roztoku, agregované formy v neutrálním vodném prostředí a dimerní struktury v zásaditých roztocích. Ačkoli má molekula schopnost disociovat jak v zásaditém, tak v kyselém prostředí, je výskyt monomerní formy potvrzen v kyselých roztocích. [56] Protonizace dvou dusíků v pyrrolových cyklech, které jsou součástí porfyrinového makrocyklu, účinněji inhibuje vznik dimerní formy v kyselém prostředí, než protonizace dvou propionových řetězců v zásaditém prostředí. Změna monomerní formy na dimerní strukturu je spektrálně charakterizována jako modrý posun Soretova pásu, viz obrázek 4.4. [55, 59]



Obrázek 4.4: Normalizovaná excitační spektra 5  $\mu\text{M}$  roztoků PpIX (DMSO < 0.5 %, destilovaná voda)  $\lambda_{em} = 630$  nm. Hodnoty emisních maxim jsou 399 nm pro pH = 11.3 a 403 nm pro pH = 2.4.

V experimentech začleňujících PpIX do vodných roztoků, jsou pro zamezení agregace používány surfaktanty typu polyethylene glycol sorbitan esters (Tween). Minimální signální odezva PpIX v roztoku bez přídavku protiagregační složky je demonstrována na spektrech obrázku 4.5, kde při 1  $\mu\text{M}$  koncentraci PpIX je emisní spektrum téměř nedetekovatelné. Protiagregační schopnost vykazují i fosfolipidy vaječného žloutku, které jsou součástí Intralipidu, využívaného jako rozptylová složka tkáňových modelů obsahujících fotosenzitivní látku. [60, 58] Na základě solvofobní teorie, v návaznosti na asociační schopnost PpIX ve vodě, lze vysvětlit pozici emisního maxima na 634 nm v roztocích obsahujících buňky nebo Intralipid. [61] V roztoku s obsahem protiagregační složky (surfaktant), kde je vyšší zastoupení monomerních forem PpIX, lze pozorovat červený spektrální posun (634 nm) oproti prostředí s vyšším podílem agregovaných forem (620 nm). Agregované formy PpIX jsou vždy zastoupeny v roztocích, přičemž míra a typ agregace (monomer/dimer/vyšší polymerní struktura), se odvíjí od pH a koncentrace PpIX, případně dalších makromolekul. [58] Jelikož jsou biologické systémy převážně na bázi vodného prostředí, jsou vlastnosti protoporphyrinu ve vodě důležitou charakteristikou.





Obrázek 4.5: Fluorescenční spektra 1  $\mu\text{M}$  roztoků protoporphyrinu IX (PpIX) s přidavkem Tween (0.1%) a bez přidaného Tween (0%),  $\lambda_{ex} = 405 \text{ nm}$ .

#### 4.1.2 Dihydroethidium (DHE, Hydroethidium, HE)

Dihydroethidium (DHE), jinak označované jako hydroethidium (HE), je fluorescenční značka využívaná k detekci reaktivních kyslíkových forem, se zaměřením na molekulu superoxidu (tripletní molekula kyslíku s nepárovým elektronem,  $\text{O}_2^-$ ), ačkoliv některé studie hovoří o DHE jako o nescifické značce. [62] V buněčných systémech (buněčný cytosol) je DHE charakterizováno modrou fluorescencí kdy poté, co je oxidováno, navazuje se na DNA a propůjčuje buněčnému jádru červené emisní vlastnosti. V kontaktu s molekulou superoxidu je DHE oxidováno na 2-hydroxyethidium ( $2\text{-OH-E}^+$ , EOH, červená spektrální oblast), čehož je využíváno k detekci mitochondriálních superoxidů. [63] Emise v červené spektrální oblasti je vlastní oběma produktům oxidace hydroethidia,  $\text{E}^+$  a  $2\text{-OH-E}^+$  (ethidium a 2-hydroxyethidium), díky čemuž dochází k vzájemnému spektrálnímu překryvu. Specifická fluorescenční detekce je díky tomuto fenoménu obtížně proveditelná, jak je blíže rozvedeno v kapitole 4.1.3. DHE je možné pro svou vysokou fotocitlivost oxidovat fotolyticky při ozáření UV světlem za vzniku  $2\text{-OH-E}^+$  a při osvětlení ve VIS za vzniku  $\text{E}^+$ . Obě reakce jsou podmíněny přítomností kyslíku a posledně zmiňovaná, dále přítomností  $2\text{-OH-E}^+$ , viz reakční schéma 4.1. [64]

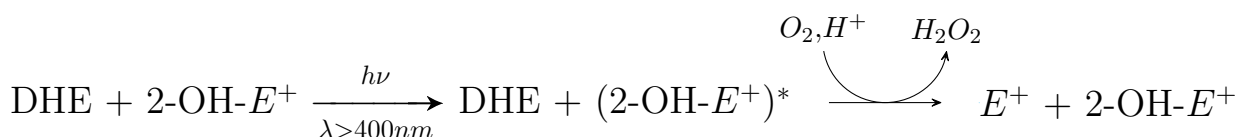
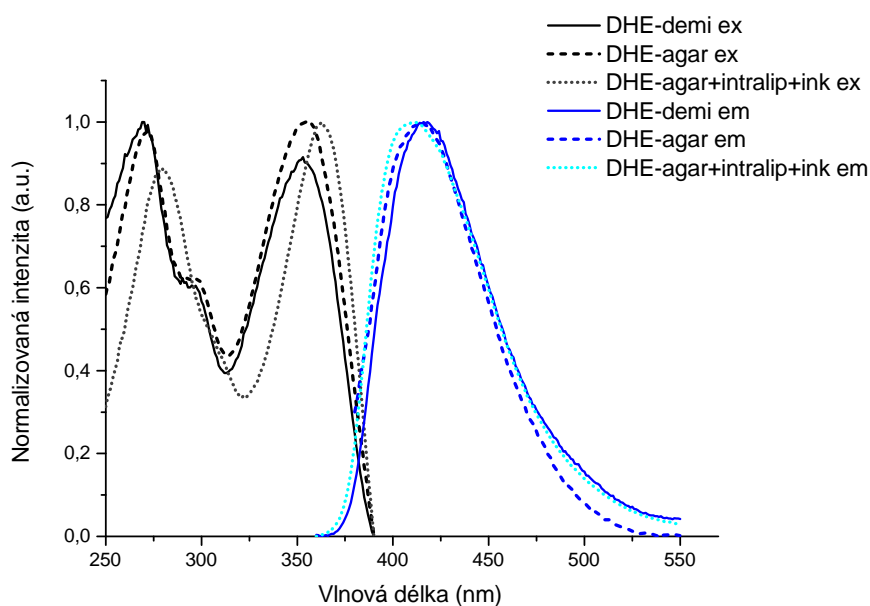


Schéma 4.1. Mechanismus fotochemické oxidace dihydroethidia (DHE) na ethidiový kationt ( $\text{E}^+$ ) za přispění 2-hydroxyethidia ( $2\text{-OH-E}^+$ ). [64]

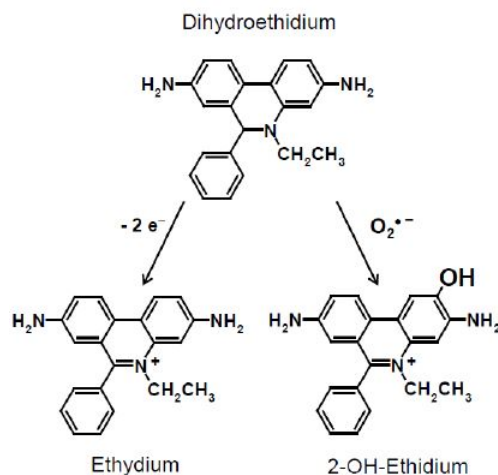
Je-li tedy využito DHE, jako ukazatele generace ROS, v ozařovaném systému (světelný zdroj 405 nm) obsahujícím fotosenzitivní látku (PpIX), a v němž dochází k tvorbě superoxidu, reagujícího s DHE za vzniku  $2-OH-E^+$ , je současně produkováno i ethidium. Fluorescenční vlastnosti samotného neoxidovaného dihydroethidia, excitační vlnová délka 350 nm a emisní vlnová délka 400 nm, jsou využívány při studiu intracelulárního prostoru. Absorpční pás DHE (pH neutrální vodní roztok) leží v oblasti 200 – 400 nm s maximy při 224, 265 a 345 nm. [62] Ačkoliv jsou některé experimenty prováděny v režimu spojujícím kontinuální osvit vzorku se spektrální akvizicí hodnot odpovídajících molekule fotoproduktu ( $\lambda_{ex} = 480$  nm,  $\lambda_{em} = 580$  nm – hodnoty vlnových délek používané pro analýzu EOH [53, 65]), je možné provést detekci fotoproduktu i po ukončení osvitové procedury. [66]



Obrázek 4.6: Srovnání normalizovaných excitačních – ex ( $\lambda_{em} = 400$  nm) a emisních – em spekter ( $\lambda_{ex} = 350$  nm) DHE-demineralizovaná voda, DHE-agaróza a DHE-tkáňový model (agaróza, intralipid 1%, inkoust 0.2%).

### 4.1.3 Ethidium vs. hydroxyethidium

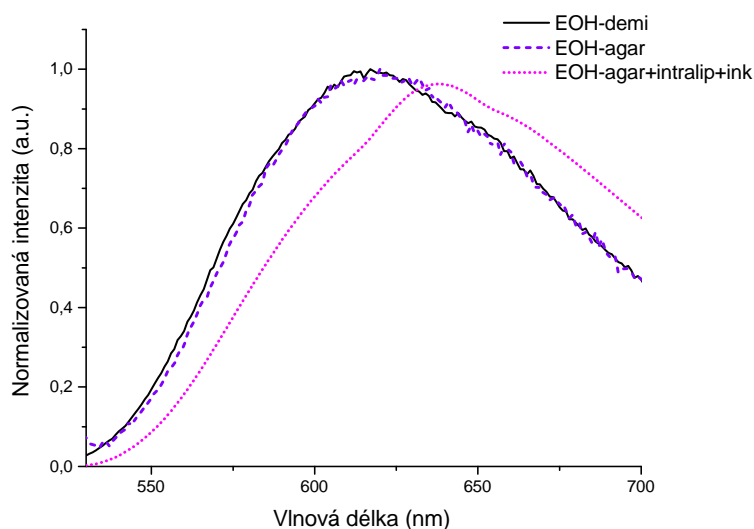
Jak bylo zmíněno výše, oxidativní proces molekuly dihydroethidia vede ke vzniku dvou produktů (E a EOH – ethidium a 2 – hydroxyethidium), viz obrázek 4.7, přičemž obě molekuly vykazují fluorescenční vlastnosti (emisní maxima EOH = 567 nm a E = 610 nm).



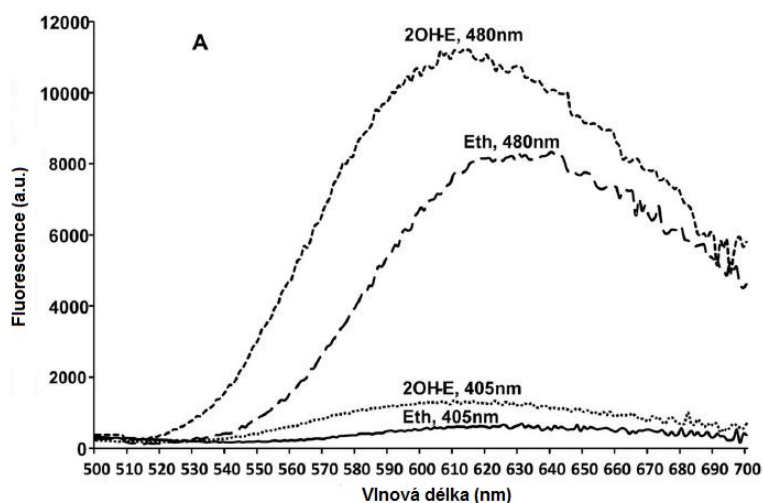
Obrázek 4.7: Reakce molekuly dihydroethidia (DHE) s molekulou superoxidu ( $O_2^{\cdot-}$ ) za vzniku fluorescenčního produktu 2 – hydroxyethidia (2-OH-Ethidium) a dvou elektronová oxidace DHE za vzniku ethidia (Ethidium). [67]

Vznik molekuly ethidia v návaznosti na oxidaci dihydroethidia byl zpochybněn ve studii [68], kde hlavním výchozím produktem reakce DHE se superoxidy byla molekula 2 – hydroxyethidia, jejíž spektrální vlastnosti jsou  $\lambda_{ex(max)} = 480$  nm a  $\lambda_{em(max)} = 567$  nm. [65] Není-li vliv překryvu fluorescenčních spekter EOH a E redukován, není využití fluorescence v červené spektrální oblasti zreagované formy DHE pro kvantitativní určení formace molekuly superoxidu nejvhodnějším přístupem. [67] Problém spektrálního překryvu obou oxidačních produktů lze částečně eliminovat zapojením selektivního emisního filtru nebo použitím excitační vlnové délky charakteristické pro daný reakční produkt. Druhý přístup detekce je demonstrován na obrázku 4.9. Fluorescenční vlastnosti ethidia (E) využívané k jeho detekci leží v rozsahu excitačních vlnových délek 500 – 530 nm a s emisním rozsahem v 600 – 620 nm. [69] Z tohoto důvodu je například emisní spektrum snímané pro molekulu EOH při excitaci 510 nm značně ovlivněno příspěvkem molekuly ethidia, která vzniká jako produkt dvou elektronové oxidace DHE. Optimální excitační vlnová délka zvolená pro detekci samotného EOH je 480 nm, přičemž emise je snímána na vlnové délce okolo 580 nm (některé zdroje uvádí 567 nm [65, 69]). Tyto hodnoty vlnových délek byly použity i pro studium generace ROS v systémech PpIX-DHE-demineralizovaná voda a PpIX-DHE-agaróza. Snaha spektrálně rozlišit podíl EOH na celkovém fluorescenčním signálu je důležitá zejména proto, že jde o specifický produkt reakce DHE s molekulou superoxidu, jakožto zástupcem reaktivní kyslíkové molekuly. Molekula 2 – hydroxyethidia vznikající interakcí s molekulou superoxidu v ozařovaném prostředí obsahujícím PpIX, vystupuje jako katalyzátor fotochemické konverze DHE na ethidium, jak je uvedeno na reakčním schématu 4.1. Tudíž potřeba odlišit spektrální příspěvky obou molekul není v této studii klíčová, neboť množství generovaného ethidia se odvíjí od koncentračního zastoupení 2 – OH – E<sup>+</sup>. Naopak zvýšení degradace DHE v ozařovaném roztoku obsahujícím PpIX je výrazně podpořeno jak tvorbou 2 – OH – E<sup>+</sup>, tak její následnou katalytickou funkcí při fotochemické konverzi DHE na E<sup>+</sup>. Ve srovnání

časových vývoji fluorescence ozařovaných a neozařovaných systémů, obsahujících samostatné DHE a DHE s PpIX, je tento efekt dobře patrný, jak je doloženo v sekci 4.5.1. Z těchto důvodů je také možné pozorovat rychlý dekompoziční proces DHE, který je významný pro nízké koncentrace DHE a vysoké optické výkony, jak se ukázalo v provedených experimentech. Fotolýza DHE a nárůst koncentrace ethidia v ozařovaných vzorcích ( $22 \text{ mW/cm}^2$ , bílé světlo  $\lambda \geq 400 \text{ nm}$ ) byla v přítomnosti  $2 - OH - E^+$  rychlejší, než v systému s absencí  $2 -$  hydroxyethidia, jak dokládají experimenty provedené v [64]. Z výše uvedeného plyne, že ačkoliv je detekce fotoproduktu molekuly DHE možná i v ozařovaných roztocích neobsahujících fotosenzitivní látku (PpIX), je fotodynamický příspěvek PpIX na tvorbu fotoproduktu  $2 -$  hydroxiethidia/ethidia výrazně vyšší.



Obrázek 4.8: Srovnání normalizovaných emisních spekter EOH-agaróza, EOH-demineralizovaná voda a EOH-tkáňový model (agaróza, intralipid 1%, inkoust 0.2%) při excitaci 480 nm po odečtu spektra samotné agarózy a demineralizované vody.



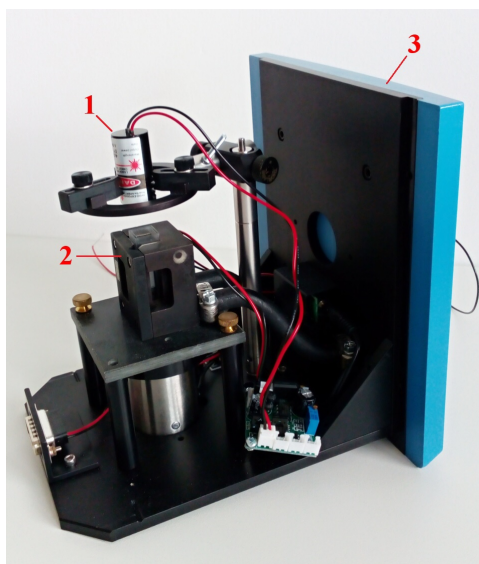
Obrázek 4.9: Fluorescenční spektra  $10 \mu\text{M}$  ethidia (Eth) a  $10 \mu\text{M}$  2-hydroxiethidia (2OHE) v  $100 \mu\text{l}$  PBS pH 7.4 měřená při excitaci 405 nm a 480 nm. Převzato z [67].

## 4.2 Přístrojové vybavení

Měření spektrálních charakteristik všech vzorků a následná studie generace reaktivních kyslíkových forem v ozařovaných systémech byla provedena na fluorescenčním spektrometru FluoroMax-4 (Horiba, Japonsko). Excitačním zdrojem spektrometru je xenonová výbojka (150 W). Přístroj je vybaven dvěma detektory, referenční detektor, kterým je křemíková fotodioda, monitoruje signál z xenonové výbojky. Signálním detektorem snímajícím signál ze vzorku je fotonásobič (R928P), zjednodušené schéma fluorescenčního spektrometru je na obrázku 5.1. Korekce měřeného signálu ze vzorku (S1) se provádí z důvodu omezení vlivu časové nestability excitačního zdroje, kdy referenční detektor snímá signál ze zdroje (R1) a před akvizicí je zadána matematická operace pro korekci –  $S1/R1$  (tzv. korekce prvního řádu). Další možností je využití korekčních souborů, kterými je násoben snímáný signál ze vzorku (S1c), kdy při podílu  $S1c/R1$  je provedena korekce tzv. druhého řádu – “celková” korekce. Tato korekce zajišťuje kompenzaci snímaného signálu vůči součástem detekčního systému (excitační zdroj, mřížky v monochromátorech, detektory signálů), které mohou ovlivňovat spektrální měření. Celková spektrální korekce dat, snímaných systémem FluoroMax a dále pak MicroMax, byla použita u všech provedených měření.

Absorpční spektra roztoků byla měřena pomocí laboratorního spektrofotometru UV-3600 (Shimadzu, Japonsko).

Roztoky v kyvetě byly nejprve ozařovány pomocí laserové diody (100 mW, 405 nm, Blue Violet Purple Laser Diode Module 12VDC TTL Stage Lighting), která byla uchycena součástkami od firmy Thorlabs nad stojanem pro kyvetu uvnitř spektrometru, viz fotografie sestavy na obrázku 4.10. Optický výkon světelných zdrojů použitých pro osvit vodných a agarózových vzorků byl měřen pomocí wattmetru (PM100D, ThorLabs, Velká Británie).



Obrázek 4.10: Fotografie sestavy používané pro osvit vodných vzorků v křemenné kyvetě. 1 – laserová dioda, 2 – stojan pro kyvetu, 3 – vyměnitelný nástavec ze spektrometru FluoroMax-4 (Horiba, Japonsko).

## 4.3 Použité roztoky

Pro přípravu zásobních roztoků dihydroethidia (DHE, Sigma-Aldrich, USA) a protoporfyrinu IX (PpIX, Sigma-Aldrich, USA) o přibližných koncentracích 1 mM, byl použit dimethyl sulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich, USA). Následným ředěním zásobních roztoků demineralizovanou vodou a fosfátovým pufrům obsahující chlorid hořečnatý a chlorid vápenatý (PBS, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma Aldrich, USA) byly zhotoveny pracovní roztoky s proměnnou koncentrací PpIX a DHE. Pro odečet pozadí v absorpčních a fluorescenčních spektrech byl připraven roztok demineralizované vody a dimethylsulfoxidu, kde obsah DMSO v slepém vzorku byl 1 % výsledného objemu. Příprava vzorků a následná experimentální měření byla prováděna při omezených světelných podmínkách. Jako protiagregační složka byl do vodných roztoků přidán 0.1 % Tween<sup>®</sup> 20 (Sigma-Aldrich, USA).

## 4.4 Průběh experimentů

V experimentální fázi byla provedena série měření na vodných roztocích obsahujících fotosenzitivní látku PpIX a fluorescenční značku DHE. První měření bylo provedeno na roztocích obsahujících pouze dihydroethidium (bez přítomnosti PpIX), kdy byla měřena emisní spektra DHE ( $\lambda_{ex} = 350$  nm) a EOH ( $\lambda_{ex} = 480$  nm) před a v průběhu osvitů roztoku v kyvetě. Pro posouzení chování obou složek roztoků byl před zahájením osvitů pracovní roztok rozdělen do dvou křemenných kyvet, kdy první sloužila jako referenční (neozářovaný roztok) a druhá byla vystavena osvitů (ozářovaný roztok). Světelný zdroj (laserová dioda) použitý pro osvit byl umístěn nad kyvetu do prostoru fluorescenčního spektrometru. Optický výkon naměřený na vstupu do prostoru kyvety byl 12 mW.

V druhé fázi bylo provedeno měření na roztocích obsahujících obě složky (PpIX, DHE), přičemž koncentrace PpIX v pracovních roztocích byla konstantní (5  $\mu$ M) a koncentrace DHE byla v rozsahu 10 – 30  $\mu$ M. Stejně jako v případě roztoku obsahujícího pouze DHE (bez PpIX), bylo provedeno měření emisních spekter pro jednotlivé součásti roztoku – DHE ( $\lambda_{ex} = 350$  nm), EOH ( $\lambda_{ex} = 480$  nm) a PpIX ( $\lambda_{ex} = 405$  nm) – před a v průběhu osvitů. Pro osvit byla využita laserová dioda umístěná nad kyvetu do prostoru fluorescenčního spektrometru. Optický výkon naměřený na vstupu do prostoru kyvety byl 12 mW.

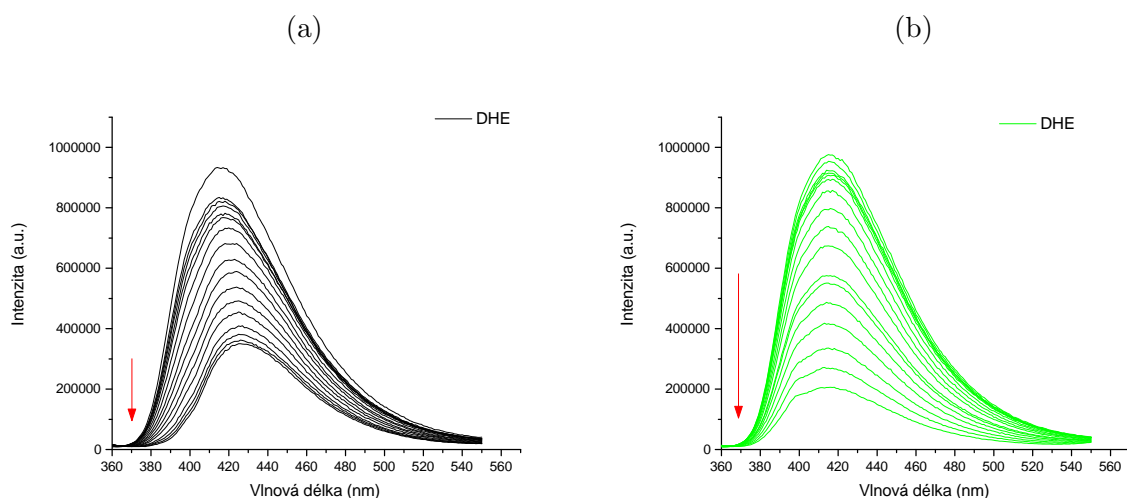
Ve třetím kroku byla měřena spektrální odezva jednotlivých součástí roztoků (PpIX, DHE, EOH) na osvitové podmínky, kdy každý roztok obsahoval konstantní podíl DHE (20  $\mu$ M) a PpIX v koncentračním rozsahu 1 – 10  $\mu$ M. Excitační vlnové délky pro měření emisních spekter sledovaných součástí roztoků a osvitové podmínky byly totožné s předchozím krokem. Emisní spektra byla měřena v minutových intervalech při celkové době osvitů 6 minut. Výběr doby osvitů byl ovlivněn vývojem signálu PpIX, který po 6 minutovém osvitů klesl na minimální hodnotu v případě 1  $\mu$ M roztoku. Pro ověření vývoje signálu jednotlivých složek roztoků byla emisní spektra změřena i v časovém odstupu od ukončení osvitů.

## 4.5 Výsledky měření

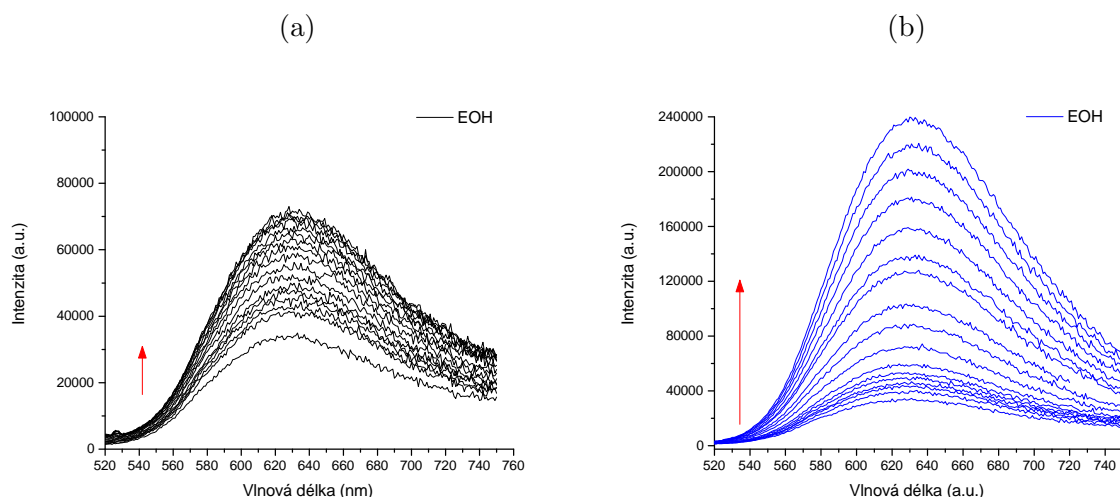
Fluorescenční spektra PpIX zobrazená na obrázku 4.2 vykazují očekávané chování z hlediska pozice emisních maxim v závislosti na typu prostředí. [56] Začlenění PpIX do vodného a agarózového prostředí, v nichž dochází k tvorbě agregovaných forem vedlo k posunu emisního maxima na 622 nm oproti emisním maximům na 632 nm (PpIX v ethanolu), 633 nm (PpIX v demineralizované vodě s příměsí 0.1 % Tween) a 635 nm (PpIX v tkáňovém modelu). Jak bylo zmíněno v kapitole 4.1.1, je jedním z parametrů ovlivňujícím fyzikochemikální stav PpIX v daném systému pH prostředí. Pro rozmezí pH hodnot 3 až 11.5 byly zaznamenány dva stavy, jejichž emisní maxima odpovídala 620 nm pro zásadité prostředí a 634 nm pro kyselé prostředí. [56] Stejně tak byla preferenčně detekována přítomnost PpIX s maximální emisní vlnovou délkou na 634 nm v roztocích obsahujících makromolekuly (albuminy a lipidy). [70] Fluorescenční spektra dihydroethidina a jeho fotoproduktu, která jsou zobrazena na obrázcích 4.6 a 4.8 vykazují taktéž mírný posun. Emisní maximum pro prostředí DHE-demineralizovaná voda a DHE-agaróza leží na 415 nm a v případě DHE-tkáňový model (agaróza, intralipid 1%, inkoust 0.2%) se nachází na 410 nm.

### 4.5.1 Fluorescenční odezva roztoků DHE

Měření bylo provedeno na dvou roztocích obsahujících DHE o koncentraci  $20 \mu\text{M}$ , kdy byla snímána fluorescenční spektra DHE ( $\lambda_{ex} = 350 \text{ nm}$ ) a jeho reakčního fotoproduktu EOH ( $\lambda_{ex} = 480 \text{ nm}$ ) v minutových a následně pěti minutových intervalech při celkové době osvitů 60 minut. Paralelně byla měřena spektra pro neozařovaný (referenční) roztok. Účelem měření bylo vyloučit možné působení jiných vlivů, než produkci ROS v návaznosti na osvitové a bez osvitové podmínky systémů DHE-PpIX a následně DHE-PpIX-tkáňový model, které by mohly přispívat k nárůstu signální odezvy DHE-fotoproduktu v ozařovaných vzorcích. Současně bylo nutné porovnat signální odezvu generovaného fotoproduktu v systémech DHE-PpIX-demineralizovaná voda a DHE-demineralizovaná voda.



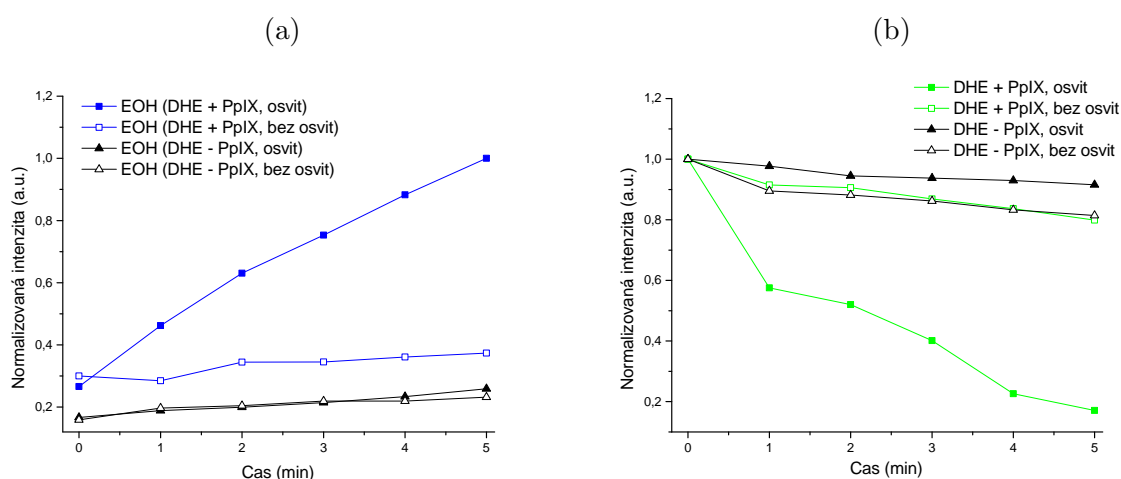
Obrázek 4.11: Emisní spektra neozařovaného (a) a ozařovaného (b) roztoku dihydroethidia (DHE,  $\lambda_{ex} = 350 \text{ nm}$ ).



Obrázek 4.12: Emisní spektra 2 – hydroxyethidia (EOH,  $\lambda_{ex} = 480 \text{ nm}$ ) v neozařovaném (a) a ozařovaném (b) roztoku dihydroethidia.

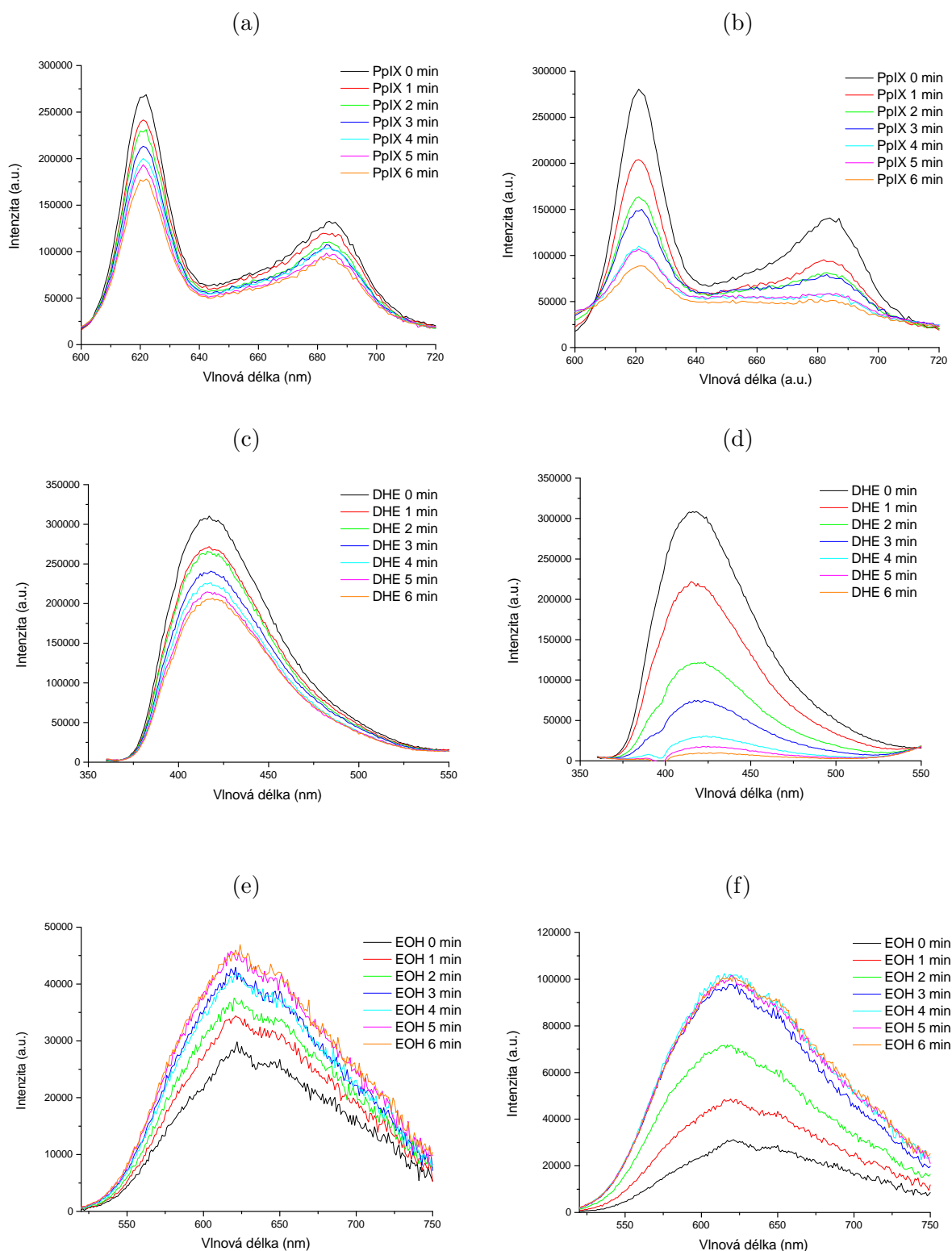


Výsledky ukazují, že při kontinuálním osvětlení roztoků obsahujících pouze dihydroethidium světlem o vlnové délce 405 nm dochází k foto-oxidaci DHE za vzniku fotoproduktů. Míra růstu signální odezvy generovaných fotoproduktů je však v tomto případě (roztoky DHE bez PpIX) několikanásobně nižší, než odezva v ozařovaných roztocích DHE s obsahem PpIX. Z celkového srovnání časového vývoje intenzit 2 – hydroxyethidia (EOH) v grafu (a) obrázku 4.13 je patrný až pětinašobně vyšší nárůst v intenzitě vznikajících reakčních produktů v ozařovaných roztocích s obsahem PpIX, oproti referenčním (neozářovaným) roztokům a roztokům bez obsahu PpIX. Jak bylo doloženo v [64] je mechanismus foto-oxidace DHE při osvětlení ve viditelné oblasti spektra výrazně podpořen přítomností EOH, které plní katalytickou funkci při dekompozici DHE, viz kapitola 4.1.3. Přítomnost EOH jakožto reakčního produktu DHE s molekulou superoxidu, která vzniká redukcí singletového kyslíku, podmiňuje vznik ethidiového kationtu a přispívá k degradaci DHE. V systémech, kde nedochází k zvýšené produkci reaktivních kyslíkových forem (zde roztoky bez fotosenzitivní látky) je tudíž pokles intenzity DHE nižší, jak je vidět v grafu (b) obrázku 4.13. Vyšší citlivost dihydroethidia ve spojitosti s fotolytickou oxidací v UV oblasti (excitační vlnová délka 350 nm) podporuje trend poklesu signálu DHE v neozařovaném, referenčním vzorku, který je dobře pozorovatelný v grafu (a) obrázku 4.11.



Obrázek 4.13: Celkové srovnání časového průběhu signálu fluorescence (a) EOH pro vlnovou délku 590 nm v neozařovaném a ozařovaném roztoku DHE bez obsahu PpIX (DHE - PpIX) a s PpIX (DHE + PpIX), spolu s vývoji intenzit fluorescence (b) DHE pro vlnovou délku 415 nm v neozařovaném a ozařovaném roztoku DHE bez obsahu PpIX (DHE - PpIX) a s PpIX (DHE + PpIX). Normalizováno na maximum emise ozařovaného roztoku.

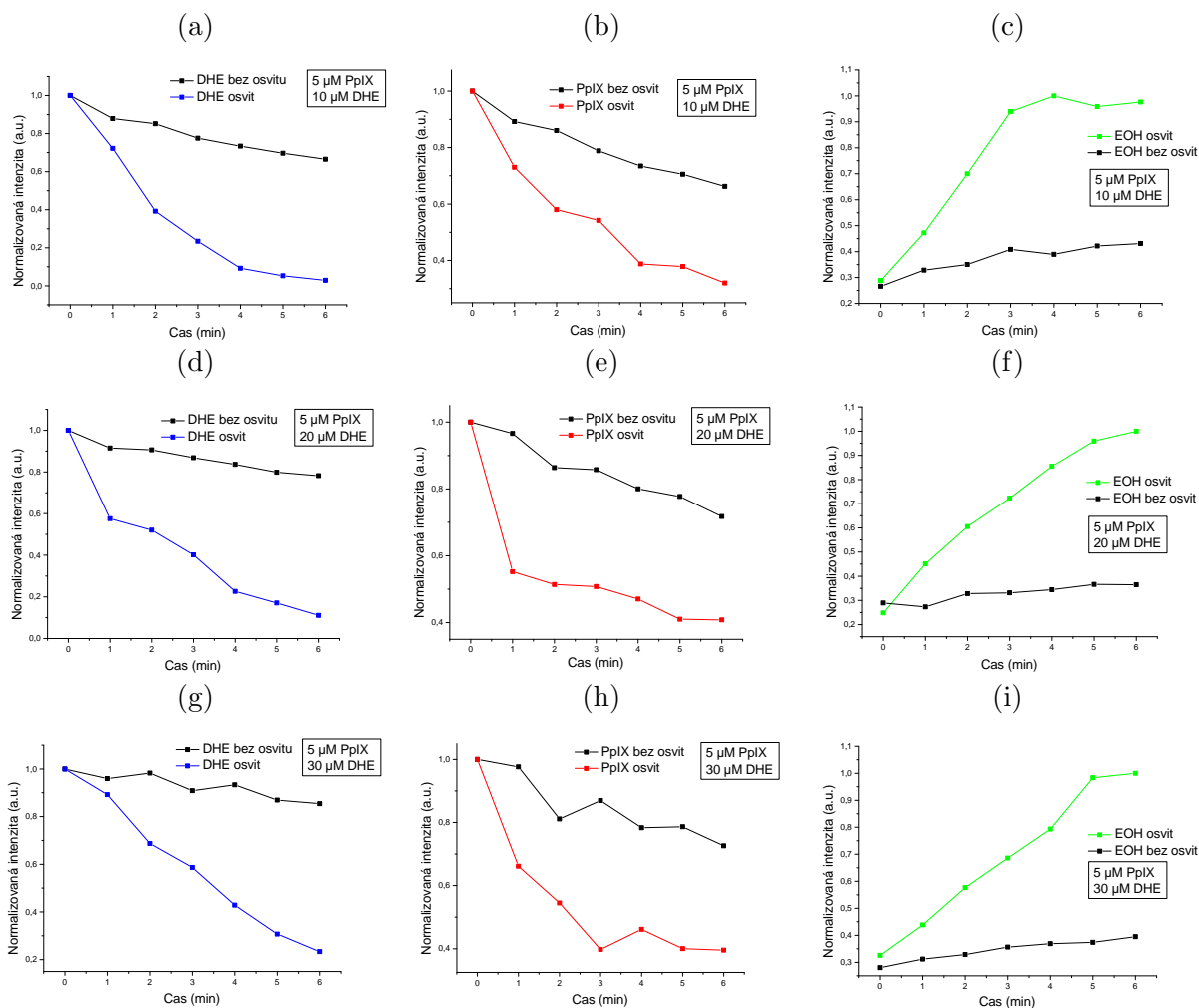
## 4.5.2 Vliv koncentrace DHE na vývoj signálu fotoproduktu



Obrázek 4.14: Emisní spektra jednotlivých součástí neozařovaného (a, c, e) a ozařovaného (b, d, f) roztoku ( $10 \mu\text{M}$  DHE +  $5 \mu\text{M}$  PpIX) – protoporphyrin IX (PpIX,  $\lambda_{ex} = 405 \text{ nm}$ ), dihydroethidium (DHE,  $\lambda_{ex} = 350 \text{ nm}$ ) a 2 – hydroxyethidium (EOH,  $\lambda_{ex} = 480 \text{ nm}$ ).

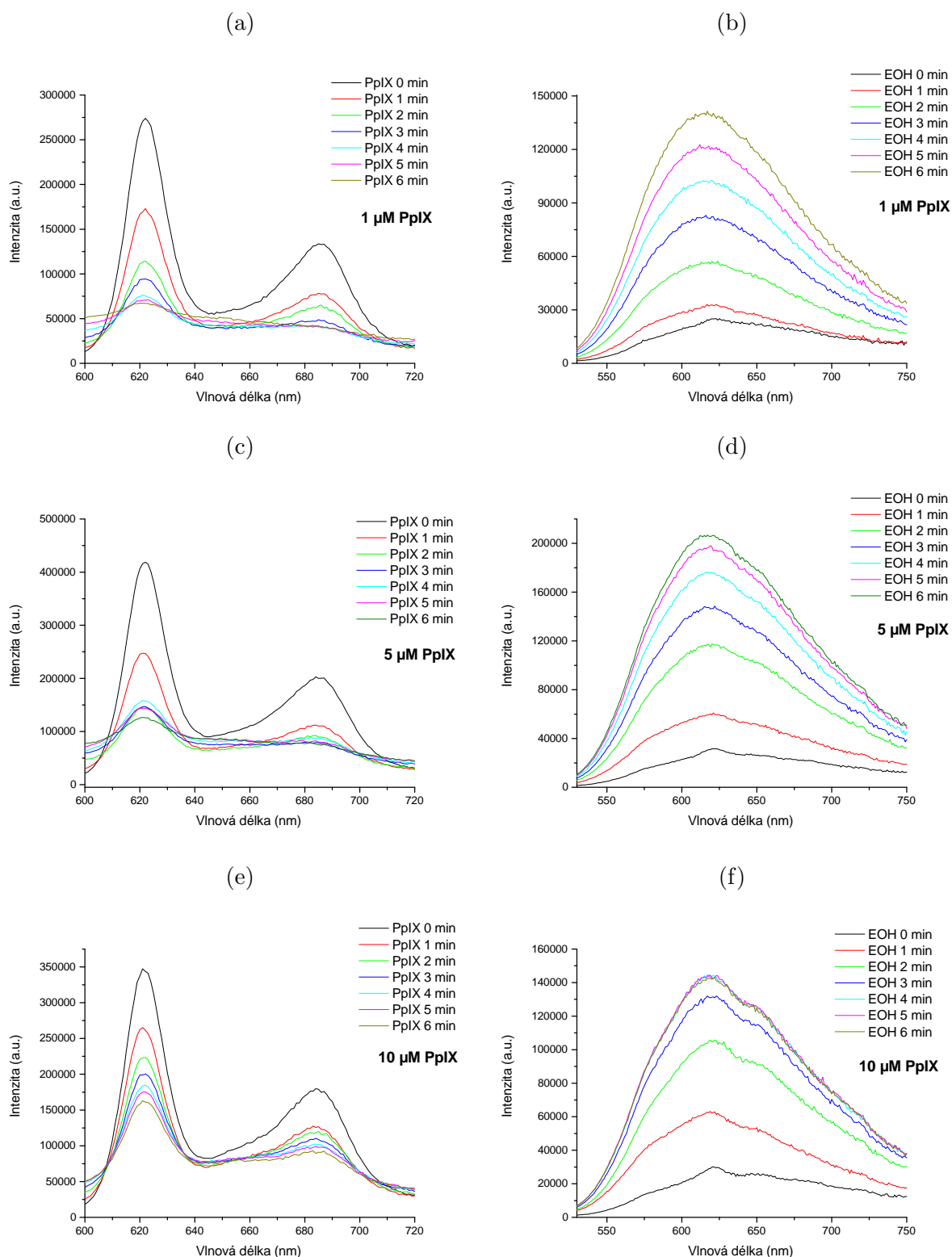
Cílem měření bylo zjistit, zda různé koncentrace dihydroethidia (DHE) v roztocích s konstantním podílem fotosenzitivní látky (PpIX) ovlivňují vývoj fluorescenčního signálu PpIX a DHE-fotoproduktu. Pro názornost je uvedeno pouze měření provedené na roztoku 10  $\mu\text{M}$  DHE + 5  $\mu\text{M}$  PpIX, časové vývoje intenzit fluorescence pro všechny tři roztoky jsou vyneseny v grafech obrázku 4.15.

Mírný nárůst intenzity emise 2 – hydroxyethidia (EOH) byl pozorován i v neozářovaných roztocích, viz obrázek 4.14 (e), kdy v porovnání s ozařovanými roztoky byl tento nárůst minimální, jak je vidět na celkovém srovnání všech tří roztoků v grafech c, f, i obrázku 4.15. Tento nárůst je v souladu s měřením provedeným v oddílu 4.5.1. Příčina spočívající v mírném poklesu intenzity fluorescence PpIX v neozářovaném roztoku, viz obrázek 4.14 (a), tkví pravděpodobně ve fotolytickém příspěvku zvolené excitační vlnové délky 405 nm. V celkovém srovnání všech tří roztoků byl průměrný pokles signálu PpIX v ozařovaném roztoku dvojnásobně vyšší než v referenčním, neozářovaném roztoku. Průměrná hodnota nárůstu intenzity signálu EOH v ozařovaném roztoku byla dvojnásobná vůči referenčnímu roztoku. Nárůst v intenzitě fluorescence EOH je tedy úměrný koncentraci fotosenzitivní látky (PpIX) a není ovlivněn rozdílným koncentračním zastoupením DHE v jednotlivých roztocích. Rozdílná koncentrace dihydroethidia v roztocích měla vliv zejména na rychlost poklesu intenzity fluorescence DHE. Ovlivnění průběhu fluorescence PpIX, u kterého byl ve všech roztocích pozorován obdobný vývoj měřeného signálu, bylo minimální. Stejně tak vývoj fluorescence EOH v jednotlivých roztocích nebyl rozdílnou koncentrací DHE ovlivněn. Charakteristickou vlastností ozařovaného roztoku PpIX je strmý pokles v intenzitě fluorescence PpIX v počáteční osvitové fázi, zde v první minutě osvitů. Tento jev je připisován počáteční koncentraci kyslíku v ozařovaném objemu, která však v průběhu osvitů klesá, čímž se snižuje možnost interakce fotosenzitivní látky s molekulou kyslíku. Obdobný trend je pozorovatelný i v případě fluorescenční značky, kde příčinou strmého poklesu v intenzitě fluorescence DHE je taktéž počáteční maximální koncentrace kyslíku v ozařovaném roztoku. Nárůst nebo pokles fluorescenčních signálů pro jednotlivé složky roztoků, u nichž byla snímána emisní spektra i po ukončení osvitů, nebyl pozorován.

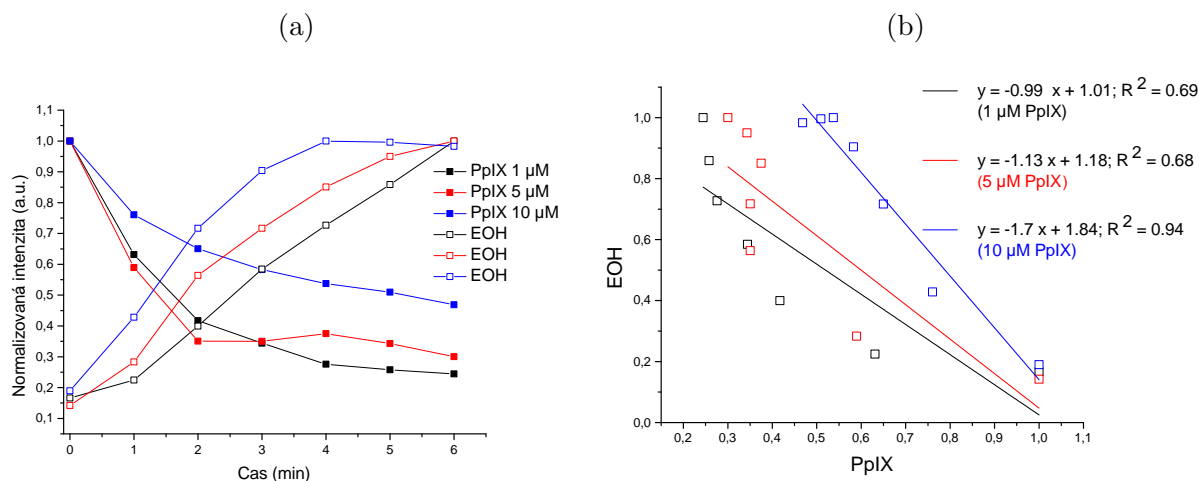


Obrázek 4.15: Časové vývoje intenzit fluorescence DHE (a, d, g), PpIX (b, e, h) a EOH (c, f, i) pro vlnové délky  $\lambda_{DHE} = 415$  nm,  $\lambda_{PpIX} = 622$  nm,  $\lambda_{EOH} = 590$  nm, v ozařovaných a neozařovaných roztocích PpIX ( $5 \mu\text{M}$ ) + DHE ( $10, 20$  a  $30 \mu\text{M}$ ). Normalizováno na maximum emise.

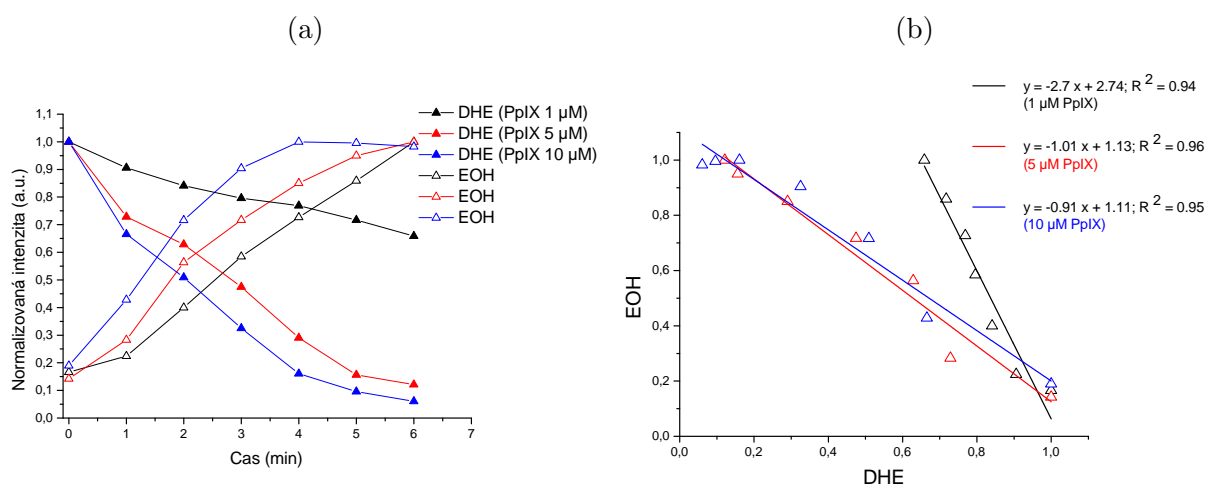
### 4.5.3 Vliv koncentrace PpIX na na vývoj signálu fotoproduktu



Obrázek 4.16: Emisní spektra (a, c, e) PpIX ( $\lambda_{ex} = 405 \text{ nm}$ ) a (b, d, f) DHE-fotoproduktu (EOH,  $\lambda_{ex} = 480 \text{ nm}$ ) v ozařovaných roztocích PpIX+DHE. Spektra byla snímána v minutových intervalech během 6 minutového osvětlení tří roztoků s proměnnou koncentrací PpIX (1, 5, 10  $\mu\text{M}$ ). Osvětlovací zdroj 12 mW.



Obrázek 4.17: (a) Časové vývoje intenzit fluorescence PpIX a EOH pro emisní vlnové délky ( $\lambda_{PpIX} = 622 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{EOH} = 590 \text{ nm}$ ) v ozařovaných roztocích PpIX (1, 5 a 10  $\mu\text{M}$ ) + DHE (20  $\mu\text{M}$ ). Normalizováno na maximum emise. (b) Vzájemná závislost signálů PpIX a EOH v ozařovaných roztocích PpIX (1, 5 a 10  $\mu\text{M}$ ) a DHE (20  $\mu\text{M}$ ).



Obrázek 4.18: (a) Časové vývoje intenzit fluorescence DHE a EOH pro emisní vlnové délky ( $\lambda_{DHE} = 415 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{EOH} = 590 \text{ nm}$ ) v ozařovaných roztocích PpIX (1, 5 a 10  $\mu\text{M}$ ) + DHE (20  $\mu\text{M}$ ). Normalizováno na maximum emise. (b) Vzájemná závislost signálů DHE a generovaného fotoproduktu (EOH) v ozařovaných roztocích PpIX (1, 5 a 10  $\mu\text{M}$ ) a DHE (20  $\mu\text{M}$ ).

V grafu (a) na obrázku 4.17, znázorňujícím celkový časový vývoj intenzity fluorescence fotoproduktu (EOH) a protoporfyrinu IX v ozařovaných roztocích obsahujících tři rozdílné koncentrace PpIX, je zřetelný nárůst v intenzitě fluorescence EOH, který je úměrný koncentraci fotosenzitivní látky (PpIX) v roztoku. Současně je patrný rychlejší pokles intenzity signálu PpIX v roztoku o nízké koncentraci PpIX. Výrazný nárůst v intenzitě fluorescence EOH nebyl u kontrolních neozařovaných roztoků obsahujících PpIX pozorován. Pokles v intenzitě fluorescence v důsledku osvitů byl zaznamenán u obou složek roztoku (DHE, PpIX). Z celkového srovnání vývoje intenzit jednotlivých složek plyne možnost korelovat nárůst intenzity EOH jak s poklesem intenzity PpIX, tak s poklesem fluorescence DHE, jak je demonstrováno v grafech (b) obrázků 4.17 a 4.18. Pro ověření korelace mezi oběma signály byla využita lineární regrese, kde vhodnost korelace určuje hodnota  $R^2$  (koeficient spolehlivosti). V grafu (b) obrázku 4.17 je vidět dobrá vzájemná korelace signálů pro roztok o vyšší koncentraci PpIX ( $10 \mu\text{M}$ ,  $R^2 = 0.94$ ) a naopak pro nižší koncentrace není lineární závislost optimální ( $1 \mu\text{M}$ ,  $R^2 = 0.69$ ;  $5 \mu\text{M}$ ,  $R^2 = 0.68$ ). Dekompoziční proces dihydroethidia v návaznosti na tvorbu fotoproduktů dokládá dobrá lineární korelace průběhů obou signálů (DHE, EOH) v grafu (b) obrázku 4.18, naměřená pro tři ozařované roztoky s proměnnou koncentrací PpIX ( $1 \mu\text{M}$ ,  $R^2 = 0.94$ ;  $5 \mu\text{M}$ ,  $R^2 = 0.96$  a  $10 \mu\text{M}$ ,  $R^2 = 0.95$ ). Tento trend podporuje mechanismus fotolytické transformace molekuly dihydroethidia a vylučuje bočné chemické procesy, které by mohly vést ke snížení koncentrace DHE v systému. Jak bylo uvedeno v oddílu 3.2, je pokles intenzity signálu fotosenzitivní látky v místě osvitů ovlivněn její koncentrací, která má vliv i na způsob fotodegradace. Vyšší koncentrace fotosenzitivní látky podmiňují fotochemickou degradaci vyvolanou působením delta kyslíku, naopak nižší koncentrace vedou k bleachingu interakcí tripletního stavu fotosenzitivní látky s okolím molekuly. [50] Pro většinu fotosenzitivních látek je rychlost poklesu intenzity silně závislá na počáteční koncentraci, kdy je proces degradace podpořen mimo jiné i nově vznikajícími fotoprodukty. K měření poklesu intenzity fluorescence fotosenzitivní látky v roztocích v odezvě na osvitové podmínky, jsou přednostně voleny vyšší koncentrace PS. Autoři studie [43] zvolili pro měření procesu photobleachingu v nebuněčném prostředí (vodné roztoky s obsahem PpIX) koncentrace fotosenzitivní látky  $\approx 50 \text{ mmol/l}$ .

# Kapitola 5

## Detekce ROS ve fluorescenčním tkáňovém modelu

Fluorescenční modely (fantomy) jsou využívány zejména ve vývoji spektroskopických detekčních systémů (nejčastěji optické vláknové detektory) pro oblast PDT nebo FGS (Fluorescence guided surgery – Fluorescenčně naváděná chirurgie). Studovanými parametry jsou detekční možnosti z hlediska geometrie osvitu, použité vlnové délky z pohledu hloubky průniku (modré a červené světlo) a vyhodnocení koncentrace fotosenzitivní látky v rámci její heterogenní místní a časové redistribuce. [1, 71, 60] Jelikož se jedná o prostředí postrádající živou buněčnou složku, u které by bylo možné sledovat odezvu na fotodynamický proces, plní model pouze optimalizační funkci z hlediska osvitových podmínek (aplikovaný optický výkon, celková světelná dávka, koncentrace fotosenzitivní látky).

### 5.1 Složení tkáňových modelů

Složení tkáňového fantomu je značně variabilní a odvíjí se od účelu použití. Jestliže je model určen ke kalibraci optických systémů a pro srovnání mezisystémového nastavení, jsou s výhodou využívány časově stabilní pevnolátkové polymerní modely, které nemusí odpovídat chemickému složení tkáně. Modely na bázi kapalin a gelů (želatina, agar) mají svou užitnou hodnotu časově omezenou, ale jejich přínos tkví v možnosti začlenit do jejich struktury tkáním podobné prvky. Model by měl ideálně splňovat některé z následujících charakteristik: absorpce a rozptyl odpovídají danému tkáňovému typu, optické vlastnosti odpovídají tkáni pro danou vlnovou délku, možnost začlenit specifické molekuly (například tkáňové fluorofory), stabilita v rámci doby použití a vlastností prostředí, možnost transportu, nenáročnost a nízké výrobní náklady. [2]

Prostředí fluorescenčního fantomu lze popsat jako čtyř složkový systém skládající se z nosného média, fluorescenčního prvku, rozptylové a absorbující složky. Nosné médium pokrývá škálu skupenství, od vodných prostředí, přes polotuhé hydrogely až po pevnolátkové struktury. Vodné modely jsou méně vhodnou volbou při začlenění hydrofobní látky jakou je například PpIX, která podléhá agregaci, nebo při studiu procesu photobleachingu. [71] Fantomy na bázi hydrogelů jsou vhodnou volbou zejména pro jejich mechanické vlastnosti. Běžně používanými zástupci hydrogelové třídy jsou agar a želatina. Nejčastěji využívanou složkou zajišťující rozptyl jsou lipidové mikročástice (intralipid), další možností jsou polymerní mikrosféry nebo prášek oxidu titaničitého a oxidu hlinitého. Rozptylující složka obvykle zaujímá méně než 1 % celkového objemu. Lipidové



mikročástice nejméně napodobují vlastnosti biologických membrán. Jako prvek imitující absorpční vlastnosti hemoglobinu a melaninu lze v nejjednodušším případě použít inkoust, potravinářské barvivo nebo bovinní krev.

Koncentrace fotosenzitivní látky (PpIX) v různých typech tkání, jejíž tvorba byla indukována vnějším podáním ALA, je značně variabilní. V provedené studii [72] byl zjištěn koncentrační rozsah PpIX 0 – 28  $\mu\text{M}$  z odebraných vzorků mozkové nádorové tkáně. Z tohoto důvodu a pro možnost srovnání vlivu koncentrace PpIX na tvorbu reaktivních kyslíkových forem, byl pro vytvořené modely zvolen koncentrační rozsah pokrývající širší škálu (5 - 30  $\mu\text{M}$ ). Fluorescenční tkáňový model vytvořený pro tuto práci plní účelově následující funkce. Hydrogelová struktura (agar) zajišťuje sníženou molekulární pohyblivost, a imituje tak lokalizovanou oblast, ve které došlo k akumulaci fotosenzitivní látky stejně jako v nádorovém ložisku. Tato vlastnost umožňuje při osvit daného místa pozorovat lokální změny v podobě snížení koncentrace fotosenzitivní látky a nárůstu signálu vznikajícího fotoproduktu v důsledku osvit a generace reaktivních kyslíkových forem. V experimentální rovině se jedná o mezikrok nacházející se mezi měřením provedeným na vodných roztocích fotosenzitivní látky a buněčném systému s akumulovanou fotosenzitivní látkou. Je tudíž možné, že fluorescenční odezva fotosenzitivní látky bude ovlivněna jiným mechanismem, než je tomu u dvou výše zmíněných prostředí. Tuto odezvu lze na základě srovnání jednotlivých systémů kvantitativně zhodnotit.

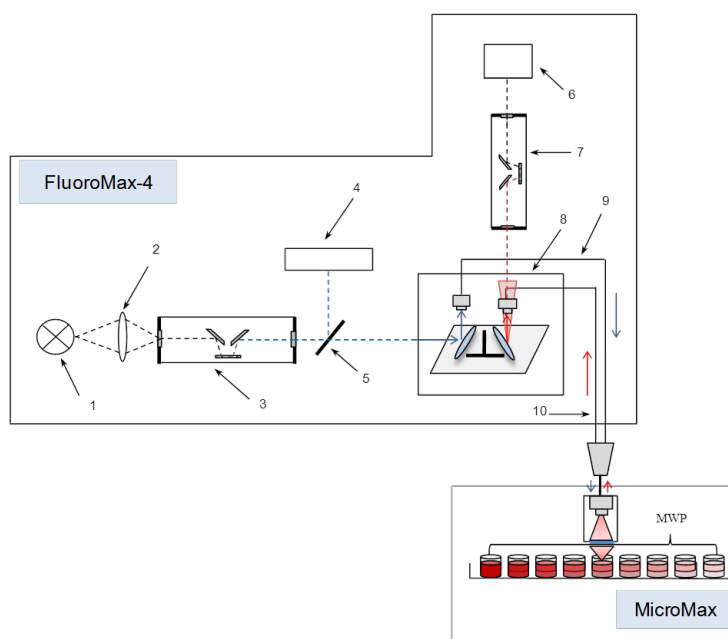
Následující část zahrnuje popis světelného zdroje použitého pro osvit agarózových modelů ve více jamkovém uspořádání (MWP, Multi Well Plate) a charakteristiku epi-iluminační spektrální akvizice pomocí přístrojového rozšíření k spektrofluorimetru FluoMax-4 (Horiba, Japonsko). Dále je uveden postup přípravy tkáňových modelů s proměnným zastoupením obsahových složek (PpIX a DHE). V závěru jsou zahrnuty výsledky prvotních měření provedených na agarózových modelech, které vedly k nalezení optimální koncentrace základních obsahových komponent v návaznosti na detekční schopnost fluorescenčního signálu a značnou citlivost DHE. Současně jsou prezentovány výsledky experimentálních částí sledujících vliv koncentrace PpIX na vývoj signálu fotoproduktu v ozařovaném modelu s konstantní koncentrací DHE a vliv intenzity světelného zdroje na odezvu generovaného fotoproduktu v rámci srovnání aplikovaného optického výkonu a celkové dávky.

## 5.2 Přístrojové vybavení

### 5.2.1 MicroMax 384 Microwell-Plate Reader

Měření emisních spekter agarózových modelů bylo provedeno s využitím MicroMax 384 Microwell-Plate Reader (Horiba, Japonsko) umožňujícího epi-iluminační spektrální akvizici ze vzorků umístěných ve více jamkové destičce (View Plate-96 Black, Thermo Scientific, USA). MicroMax jako doplňkové rozšíření spektrofluorimetru FluoroMax-4 (Horiba, Japonsko), jež byl krátce představen v kapitole 4.2, je se spektrofluorimetrem spojen vláknově optickým adaptérem (FM4-3000, Horiba, Japonsko). Excitační signál je ze zdroje (xenonová výbojka) veden optickým vláknem do prostoru destičkového stojanu a emisní signál ze vzorku je odváděn optickým vláknem zpět do prostoru výměnného stojanu (vláknově optický adaptér) v FluoroMax-4. Více jamková destička je pod pevně fixovaným vláknovým svazkem postupnými posuny skenována, přičemž určení konkrétních

jamek je prováděno v programovém nastavení. Výhodou destičkového spektrometru je rychlé vyčítání umožňující bodový sběr (Single-Point Analysis) pro 96 vzorků (viz 96-jamková destička). Jednotlivé jamky na vzorky jsou z černého, neprůhledného plastu, což odstraňuje nežádoucí excitaci navzájem sousedících vzorků, které nejsou v danou chvíli snímány. Průhledné dno MWP umožňuje zobrazení vzorků pomocí mikroskopu, případně sub iluminační režim při kontinuální spektrální akvizici. Pracovní objem jedné jamky je 50 – 200  $\mu\text{l}$ . Zjednodušené schéma měřící aparatury je zobrazeno na obrázku 5.1.



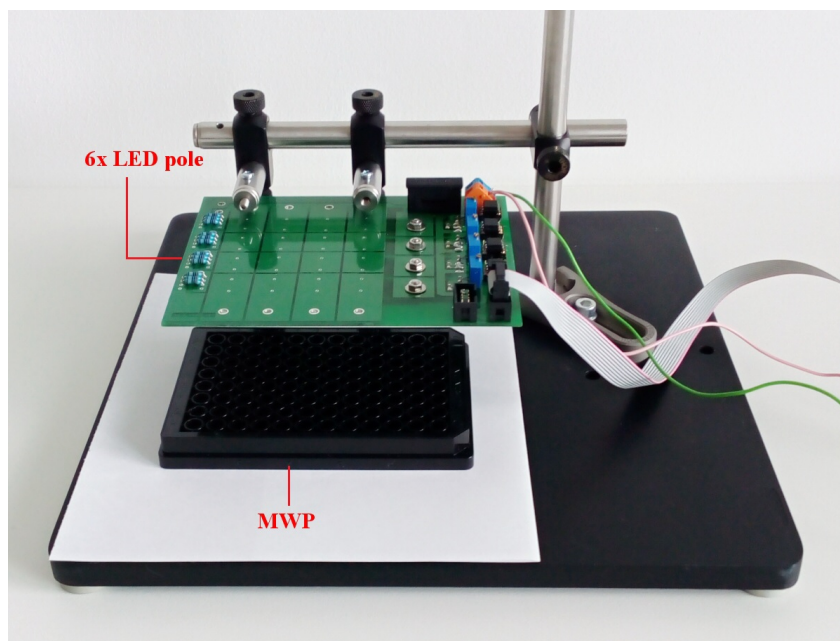
Obrázek 5.1: Epi-iluminační princip měření vzorků z více jamkové destičky v MicroMax 384 Microwell-Plate Reader, propojeného se spektrometrem Fluoromax-4; Horiba. 1 – excitační světlo (xenonová výbojka), 2 – fokusační čočka, 3 – excitační monochromátor, 4 – referenční detektor, 5 – dělič svazku excitačního záření, 6 – detektor (PMT), 7 – emisní monochromátor, 8 – vláknově-optický adaptér, 9 – excitační optické vlákno, 10 – emisní optické vlákno, MWP – více jamková destička se vzorky.

Pro jednotlivé objemy v jamkách je potřeba nastavit optimální vzdálenost vlákna pro získání co nejvyššího signálu. Vhodné nastavení vzdálenosti se provádí v režimu RTC (Real Time Control), kde se při zadaných parametrech vlnové délky excitace, emise a šířce excitační a emisní štěrby, pozoruje signál při vertikálním posunu vlákna nad jamkou se vzorkem. Nastavení je nutné provádět při každé změně objemu v jamce. Nastavení optimální vzdálenosti vlákno-vzorek (minimální vzdálenost je cca 3 cm) bylo provedeno na zkušebních vzorcích v jamkách, na kterých se dále měření neprovádělo. Objem jednotlivých měřených vzorků byl ve všech případech 200  $\mu\text{l}$ .

## 5.2.2 Osvitový zdroj

K osvitu vzorků ve více jamkové destičce (MWP) byl využit vícebodový zdroj sestávající z šesti diod (SMB1N-405V-02, Roithner LaserTechnik), které jsou součástí mini LED pole. Osvitová deska byla pomocí součástek firmy ThorLabs uchycena nad MWP, tak aby výstupní světelný svazek pokrýval celý objem jamky a optický výkon naměřený ve spodní

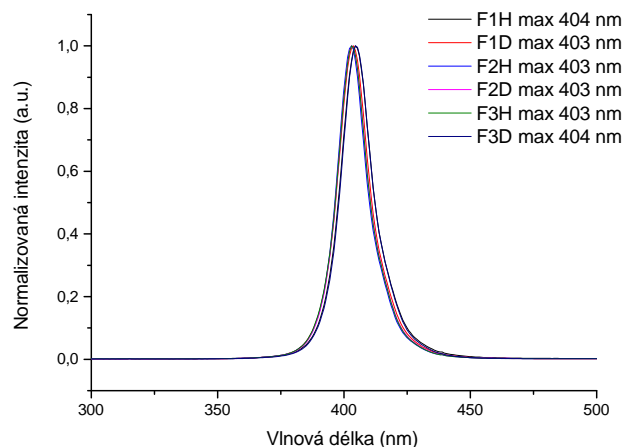
části průhledného dna MWP odpovídal požadované hodnotě. Zvolený světelný výkon byl pro daný diodový pár doladěn pomocí programového nastavení, které je blíže popsáno v následujícím oddílu. K měření optického výkonu světelného zdroje byl použit wattmetr (PM100D, ThorLabs, GB). Geometrické uspořádání diod na obvodové desce odpovídá rozestupům mezi jednotlivými otvory MWP, kdy každá dioda v případě potřeby zapadá do jamky. Bodové světelné zdroje v představeném uspořádání zajišťují homogenní osvit jamky, jejíž průměr (6.5 mm) a malá tloušťka vzorku (pracovní objem 200  $\mu$ l) umožňuje dodání světelné dávky do celého objemu. V experimentální rovině je možné propojit aplikovanou dávku s nárůstem fluorescenčního signálu fotoproduktu v systému PpIX-DHE-agaróza.



Obrázek 5.2: Fotografie sestavy používané pro osvit agarózových modelů.

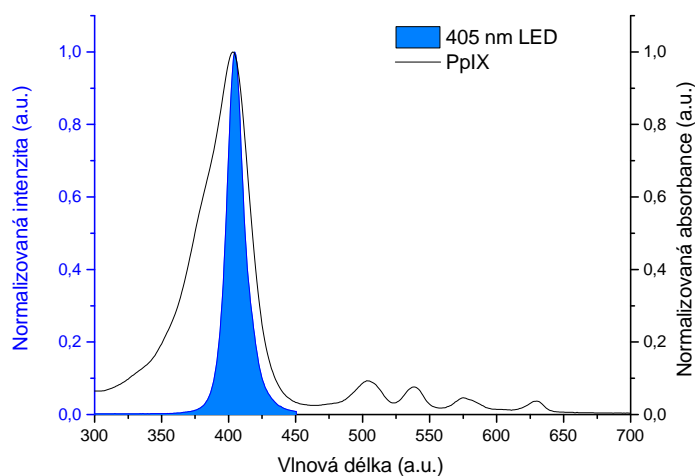
### 5.2.2.1 Charakteristika osvitového zdroje

Rozsah vyzařování zvolených diod udávaný výrobcem se pohybuje v rozmezí 400 – 410 nm, změřená emisní spektra pro jednotlivé diody jsou zobrazena na obrázku 5.3. Emisní spektra byla změřena pomocí vláknového spektrometru QE65000 (Ocean Optics) pro všech šest diod umístěných na PCB. Spektrální šíře vyzařování pro jednotlivé diody je 14 nm.



Obrázek 5.3: Normalizovaná emisní spektra SMD diod (F1H,D – F3H,D) umístěných na PCB s hodnotami maximální vlnové délky vyzařování.

Výběr diod emitujících v dané oblasti spektra odpovídá maximu absorpce použité fotosenzitivní látky PpIX, viz obrázek 5.4.



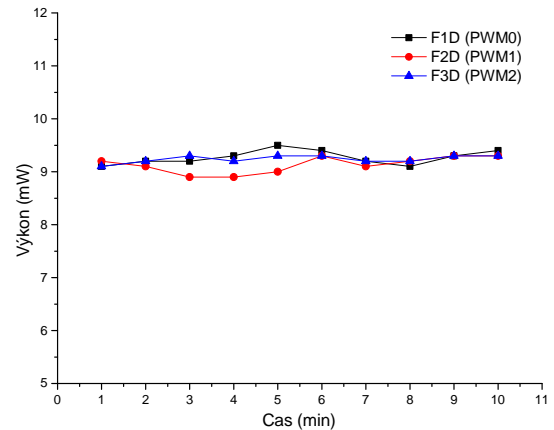
Obrázek 5.4: Normalizovaná absorpční spektra PpIX ve vodném roztoku (demineralizovaná voda + < 1 % DMSO) a normalizované emisní spektrum jedné SMD diody umístěné na PCB.

Pro měření optického výkonu všech diod byl wattmetr připevněn do spodní části více jamkové destičky (MWP), která díky průhlednému dnu toto měření umožňuje. Osvětová deska byla přiložena do kontaktu s MWP tak, že jednotlivé diody zapadaly do jamek a wattmetr snímal hodnoty pro danou diodu, poté byl přemístěn do další polohy. Stejný proces byl proveden u všech šesti diod. Proudové hodnoty byly nastaveny pomocí napěťového zdroje a doladěny pro každou větev pomocí odporového trimru na přibližně stejnou hodnotu. Kontrola proudových hodnot pro jednotlivé větve byla provedena pomocí multimetru. Ačkoli jsou proudové hodnoty pro dané větve diodových párů dobře nastavitelné, byla svítivost jednotlivých diod v páru mírně odlišná. Tuto nevýhodu lze dobře kompenzovat

nastavením střídavy v PWM módu jak je demonstrováno na obrázku 5.5 a 5.6, bližší popis je uveden v následující části. Modulace však neodstraní rozdíly ve svítivosti v rámci diod v jednotlivých párech, to znamená, že je potřeba s touto odchylkou při výpočtu dávkového schématu počítat, nebo použít k osvětlení trojici sousedících diod.

Parametr:	Value	Hx:	Result:
Obalka[2..254]:	100	64	625.0 Hz
PWM0 [2..Oba]:	50	32	50.0 %
PWM1 [2..Oba]:	48	30	48.0 %
PWM2 [2..Oba]:	40	28	40.0 %
PWM3 [2..Oba]:	0	00	0.0 %

Obrázek 5.5: Ukázka programového nastavení regulace výkonu jednotlivých párů diod.



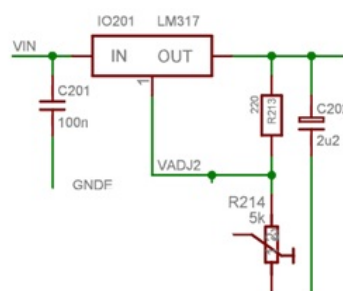
Obrázek 5.6: Průběhy optických výkonů tří sousedních diod (F1D, F2D a F3D) v čase.

### 5.2.2.2 Řídící software a regulace výstupního optického výkonu

Změnu výkonu jednotlivých dvojic diod zapojených v sérii lze provést analogově pomocí nastavitelných rezistorů nebo přes programové nastavení řídicího mikrokontroleru (ATmega32U4). Činnost mikrokontroleru, na který je napojena osvitová deska je řízena přes USB rozhraní. Změna optického výkonu v experimentálních aparaturách využívajících pro osvětlení MWP pole diod byla v řadě případů docílena zapojením optických filtrů umístěných mezi excitační zdroj a vzorek. [73, 74] Níže uvedené způsoby proudové regulace poskytují širší rozsah dosažitelných výkonových hodnot.

#### Analogová regulace – laditelné rezistory

Nastavení výstupního napětí pro jednotlivé páry diod lze provést pomocí odporového děliče, který se skládá ze dvou rezistorů a je napojen na napěťový stabilizátor (LM317, pouzdro TO-220). Odporová hodnota prvního rezistoru je konstantní, druhým rezistorem je odporový trimr, jehož manuálním laděním lze získat proměnné proudové hodnoty pro jednotlivé větve párů diod.



Obrázek 5.7: Zapojení napěťového stabilizátoru (LM317).

## PWM regulace

Pro změnu a řízení intenzity vyzařování tří párů diod umístěných na PCB je využito pulzní šířkové modulace (PWM, Pulse Width Modulation). Výhodou této metody je snížení spektrálního posunu vyzařování diod proudovými změnami a možnost přesnějšího nastavení optického výkonu (intenzity) v rámci jednotlivých párů diod i celého LED pole. Po seřízení proudové hodnoty pro danou diodovou větev je prostřednictvím řídicího mikrokontroleru a programového nastavení regulována intenzita vyzařování diod nastavením poměru délky trvání signální hodnoty zapnuto vůči signálu vypnuto při daném proudu (tzv. nastavením střídny). Poměr délky trvání zapnutého stavu vůči vypnutému určují zadané hodnoty PWM0 – 3 a hodnota obálky (2 - 254). Jako příklad změny vyzařování prvního diodového páru, který je označen jako PWM0 (další diodový pár PWM1 a třetí diodový pár PWM2), lze uvést následující nastavení. Při hodnotě obálky 100 a parametru PWM0 50 je výsledný poměr délky trvání signálu zapnuto/vypnuto 1:1, to znamená, že intenzita vyzařování diodového páru je 50 % z maximální vyzařovací hodnoty při daném proudovém zatížení. Čím vyšší je poměr signálu zapnuto/vypnuto, tím je intenzita vyzařování a tedy i optický výkon vyšší. Délka cyklu (perioda) je ovlivněna nastavením časové báze, která pokrývá škálu 16  $\mu$ s – 16.4 ms. Při nastavení nejdelší časové báze (16.4 ms) je možné nastavené hodnoty pro PWM0 – 3 vizuálně porovnávat. Ačkoliv se v případě PWM jedná o pulzní světelný tok, tzn. osvit vzorků neprobíhá v kontinuálním režimu, je možné v programovém nastavení zvolit osvitový režim odpovídající vysoké frekvenci spínaného módu, aniž by docházelo k pozorovatelnému přerušování osvitu. Softwarové řízení LED diod bylo vytvořeno v programovém prostředí Assembler. Uživatelské rozhraní pro řízení optického výkonu je uvedeno v příloze A.2, fotografie osvitové sestavy je na obrázku 5.2.

## 5.3 Konstrukční provedení tkáňových modelů

Pro vyhodnocení schopnosti detekce reaktivních kyslíkových forem (ROS) v agarózovém základu, to znamená v systému, který imituje pevnolátkové prostředí lidské tkáně, byla vytvořena série modelů s obsahem fotosenzitivní látky (Protoporfyrin IX, PpIX) a fluorescenční značky (Dihydroethidium, DHE). Pro splnění požadavků na optické tkáňové vlastnosti byla do modelů zakomponována rozptylová a absorbující složka v podobě Intralipidu (1%) a inkoustu (0.2%), jakožto nejběžněji využívaných součástí tkáňových modelů.[71, 60, 1, 75]

V pilotní studii byly připraveny agaróзовые základy bez obsahu absorbující (inkoust) a rozptylové složky (Intralipid), kdy bylo na analytických vahách odváženo 0.3 g agarózy (Agarose A9539, Sigma-Aldrich, USA), které bylo následně smícháno s 50 ml destilované vody. Vzniklá směs byla v kádince umístěna na magnetické míchadlo s varnou plotýnkou, kde byl roztok vystaven po dobu 1 minuty varu. Po zchladnutí agaróзовého gelu na teplotu 60 °C bylo odebráno dané množství do mikrozkuhavky (Eppendorf), do které byly předem odměřeny odpovídající objemy dihydroethidia a PpIX odebrané ze zásobních roztoků PpIX+DMSO a DHE+DMSO (Sigma-Aldrich, USA). Koncentrace PpIX v jednotlivých jamkách byla v rozsahu 15 až 50  $\mu$ M. Směs ve zkuhavce byla opatrně promíchána, aby se předešlo tvorbě bublin, a mikropipetou rozdělena do více jamkové destičky (View Plate-96 Black, Thermo Scientific, USA) v objemech 200  $\mu$ l na jamku. Stejně bylo postupováno i

při výrobě agarózového základu obsahujícího DHE bez fotosenzitivní látky, přičemž koncentrace DHE v jednotlivých jamkách byla v rozsahu 20 až 200  $\mu\text{M}$ . Jako slepý vzorek, sloužící pro odečet spektra samotné agarózy, byly vybrané jamky naplněny agarózovým gelem bez přídavku fotosenzitivní látky (PpIX) a fluorescenční značky (DHE).

V samotné experimentální fázi byly vytvořeny tkáňové modely obsahující rozptylovou a absorbující složku. Postup přípravy agarózového základu byl stejný jako v pilotní studii. Nejprve byly zhotoveny nízko koncentrované zásobní roztoky černého inkoustu (KOH-I-NOOR Hardtmuth, Česká republika) a Intralipidu 20% (Sigma-Aldrich, USA) v demineralizované vodě. K odměřenému množství DHE (200  $\mu\text{M}$ ) a PpIX, jehož koncentrace byla v rozsahu 5 - 30  $\mu\text{M}$ , bylo přidáno odpovídající množství zásobního roztoku černého inkoustu, tak aby byl jeho objemový podíl ve výsledném modelu 0.2 %. Stejně bylo postupováno i u rozptylové složky, kde odměřené množství zásobního roztoku Intralipidu ve výsledném modelu bylo 1 % celkového objemu.

Před osvitovou procedurou a vlastním měřením emisních spekter byly vzorky pod neprůhledným krytem ponechány dvacet minut při pokojové teplotě, aby bylo zajištěno úplné ztuhnutí směsi. Měření bylo provedeno vždy pro tři vzorky dané koncentrace.

## 5.4 Průběh experimentů

V pilotní studii, jejímž cílem bylo zhodnotit možnost detekce fluorescenčního signálu PpIX a DHE začleněného do agarózového základu pomocí systému MicroMax, byl vytvořen agarózový základ obsahující protoporfyrin IX (PpIX) bez dihydroethidia (DHE) a agarózový základ obsahující DHE bez PpIX. Na základě naměřených spekter byla určena optimální koncentrace použitých složek pro následující experimenty s tkáňovými modely. Emisní spektra DHE byla snímána v rozsahu 360 - 550 nm při excitační vlnové délce 350 nm a fluorescence PpIX byla měřena v rozsahu 600 - 720 nm při excitaci 405 nm. Fluorescenční charakteristika EOH v prostředí DHE-agaróza byla v druhé části pilotní studie měřena v rozsahu vlnových délek 530 - 700 nm při excitaci 480 nm.

V druhé fázi bylo provedeno měření spektrální odezvy jednotlivých součástí tkáňových modelů (PpIX, DHE, EOH) na osvitové podmínky, kdy byl hodnocen vliv tří optických výkonů (0.5, 1 a 4 mW) použitých pro osvit modelů na vývoj signálu generovaného DHE-fotoproduktu. Ozařované modely obsahovaly DHE o koncentraci 200  $\mu\text{M}$  a PpIX o koncentraci 10  $\mu\text{M}$ . Světelný zdroj (LED pole) použitý pro osvit byl pomocí součástek od firmy Thorlabs uchycen nad více jamkovou destičku (MWP), která byla pod diody umístěna tak, aby byl zajištěn osvit cele jamky se vzorkem. Hodnoty nastavené pro bodový sběr intenzity fluorescence byly pro PpIX 405 nm (excitace) - 635 nm (emise), pro DHE 350 nm (excitace) - 415 nm (emise) a pro EOH 480 nm (excitace) - 600 nm (emise). Integrační čas detekce byl 0.3 s. Celková doba osvitu byla ovlivněna vývojem signálu EOH, respektive DHE, kdy v případě nejnižší intenzity 0.5 mW byl celkový osvitový čas 15 minut a pro hodnoty výkonů 1 a 4 mW byl zajištěn osvit v délce 10 minut. Emisní spektra byla měřena v časových rozestupech pouze pro ozařovaný model.

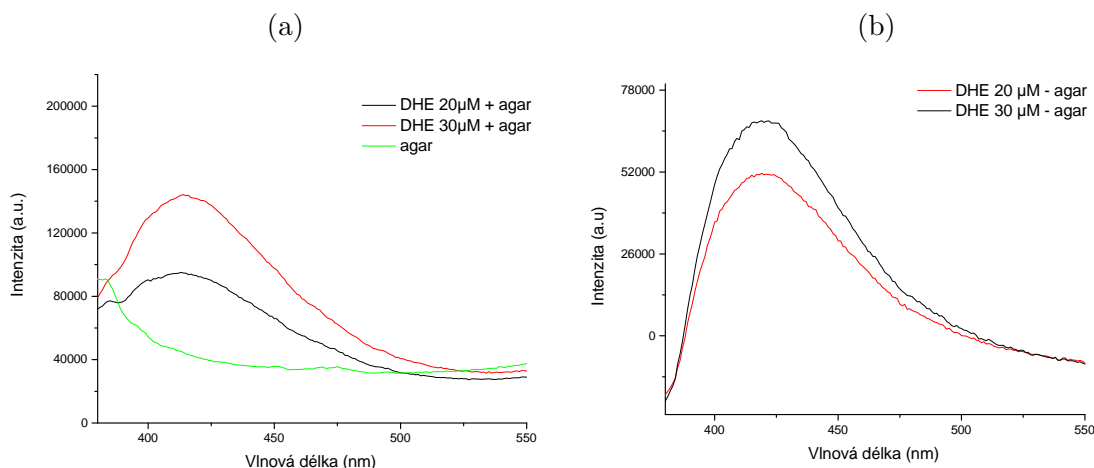
V závěrečné experimentální fázi byla měřena odezva jednotlivých složek ve tkáňových modelech (PpIX, DHE a EOH) za osvitových podmínek, kdy byl hodnocen vliv koncentrace PpIX na vývoj signálu generovaného DHE-fotoproduktu. Každý model obsahoval

konstantní podíl DHE (200  $\mu\text{M}$ ) a PpIX v koncentračním rozsahu 5 – 30  $\mu\text{M}$ . Stejně jako v případě prvotního měření na agarózových základech, obsahujících samostatně DHE a PpIX, bylo provedeno měření emisních spekter pro jednotlivé součásti tkáňových modelů s nastavením spektrálních akvizčních hodnot jako v případě pilotní studie. Osvit byl zajištěn trojicí diod umístěných na osvitové desce uchycené nad MWP, stejně jako v předchozím kroku. Optický výkon naměřený před začátkem osvitů pro tři sousedící diody byl nastaven na hodnotu 1 mW, přičemž přesnější nastavení optického výkonu sousedících diod na požadovanou hodnotu 1 mW bylo provedeno v programovém prostředí. Emisní spektra byla změřena pro referenční (neozářovaný) model před a v čase na konci osvitů ozářovaného modelu. Emisní spektra ozářovaného modelu byla snímána stejně jako v případě neozářovaného modelu, kdy byla navíc změřena v i půlce osvitové procedury. Během osvitů byla každou půl minutu bodově snímána intenzita fluorescence (režim Single point measurement) pro tři vzorky. Nastavení spektrálních akvizčních hodnot a hodnot pro jednobodový sběr intenzity fluorescence bylo totožné s předchozím měřením. Celková doba osvitů byla 10 minut.

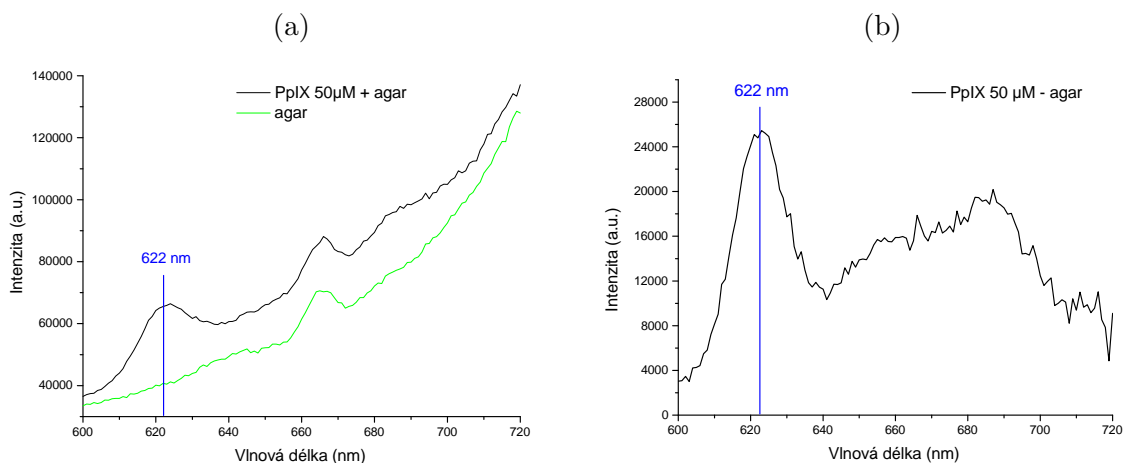


## 5.5 Výsledky měření

### 5.5.1 Pilotní studie



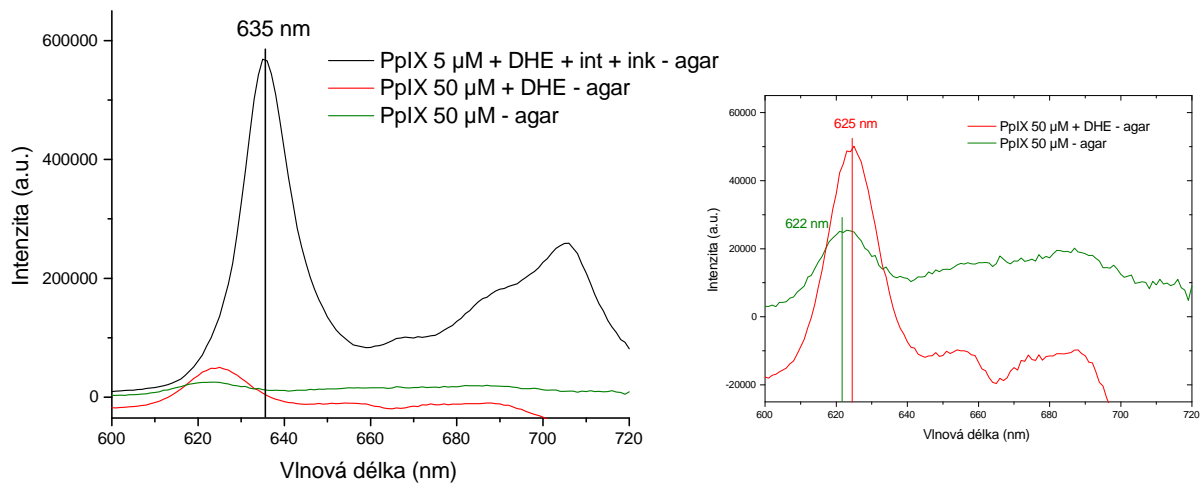
Obrázek 5.8: Srovnání emisních spekter (a) DHE (20, 30  $\mu\text{M}$ ) bez odečtu agarózy ( $\lambda_{ex} = 350 \text{ nm}$ ) a (b) po odečtu slepého vzorku (čistá agaróza).



Obrázek 5.9: Srovnání emisních spekter (a) PpIX (50  $\mu\text{M}$ ) bez odečtu agarózy ( $\lambda_{ex} = 405 \text{ nm}$ ) a (b) po odečtu slepého vzorku (čistá agaróza).

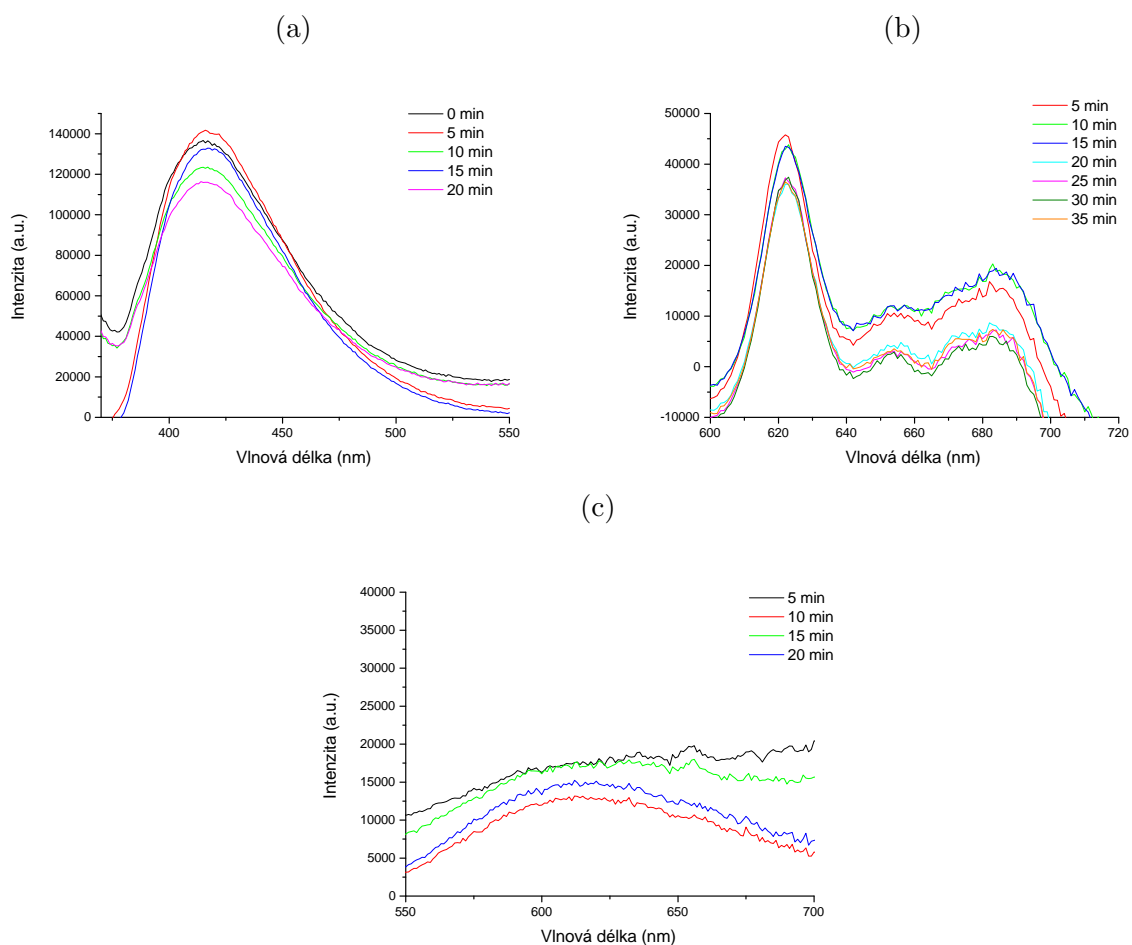
Značnou nevýhodou, která byla z počátku přisuzována nízké účinnosti kolekce fluorescenčního signálu, byla v prvotní fázi experimentu agregační schopnost PpIX a to jak v agarózovém základu, tak ve vodném roztoku. Tímto byla znemožněna detekce nízko koncentrovaných vzorků. Pozorovaný jev byl v přítomnosti Intralipidu potlačen, jak je ilustrováno na obrázku 5.10 a blíže rozebráno v oddílu 4.1.1. Výše uvedená fluorescenční spektra PpIX-agaróza a DHE-agaróza ve dvojitých koncentračním zastoupení, a zejména pak spektra bez odečtu pozadí, vykazují značný signální příspěvek slepého vzorku (čistá agaróza), který znesnadňuje detekci nízko koncentrovaných vzorků ( $< 10 \mu\text{M}$ ). Z grafů u nichž byla provedena subtrakce pozadí, jsou tvary emisních spekter jednotlivých složek dobře rozlišitelné, jak je vidět na grafech (b) obrázků 5.8 a 5.9. Nicméně pozice emisního maxima PpIX na 622 nm a nízká fluorescenční intenzita poměrně vysoké koncentrace

PpIX ( $50 \mu\text{M}$ ) potvrzuje existenci vyššího podílu agregovaných molekul PpIX v agarózovém základu. Zlepšení detekce signálu PpIX nastalo v případě agarózového základu s obsahem obou složek (DHE+PpIX), kde byl peak na 625 nm výrazně vyšší, než v agarózovém základu bez DHE, jak je vidět na zvětšené oblasti emisních spekter v obrázku 5.10.



Obrázek 5.10: Srovnání fluorescenčních spekter PpIX ( $\lambda_{ex} = 405 \text{ nm}$ ) začleněného do agarózového základu po odečtu čisté agarózy. Graf v pravo představuje zvětšenou oblast emisních spekter PpIX v agarózovém základu s dihydroethidiem (DHE, červená křivka) a bez DHE (zelená křivka).

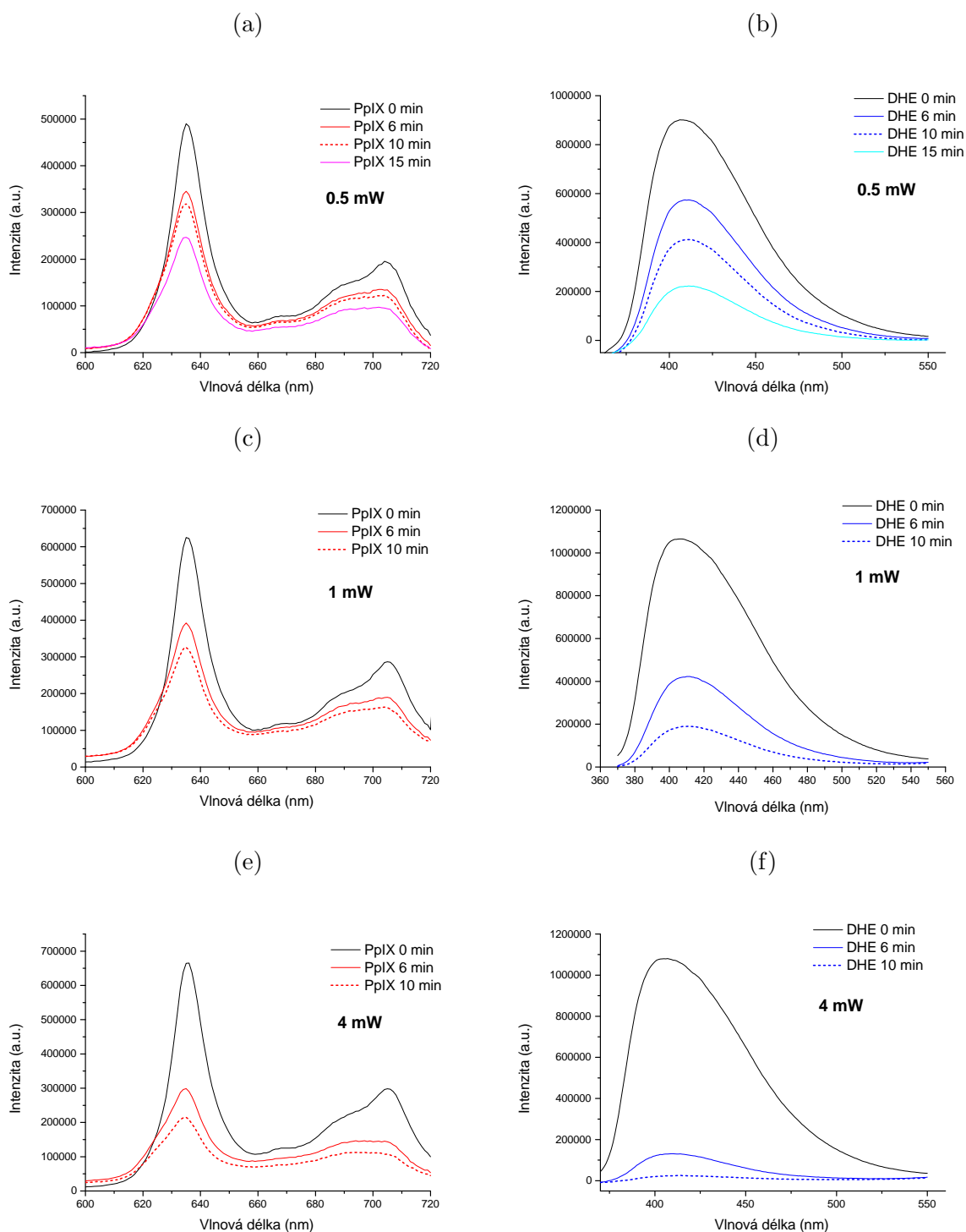
V druhé fázi pilotní studie byla hodnocena časová stabilita jednotlivých složek pro bez osvitové podmínky, kdy byla v časových intervalech 5 minut snímána emisní spektra pro každou složku samostatně začleněnou do agarózového základu (PpIX-agaróza, DHE-agaróza) a současně měřena spektrální odezva EOH v systému DHE-agaróza. Bezosvitová spektrální charakteristika použitých sloučenin umožňuje vyloučit působení jiných vlivů, než produkci reaktivních kyslíkových forem v návaznosti na osvit fluorescenčního modelu (DHE-PpIX), které by mohly přispívat k signálním změnám v ozařovaných vzorcích. Celý experiment byl zopakován i pro agarózový základ obsahující obě komponenty (PpIX-DHE-agaróza).



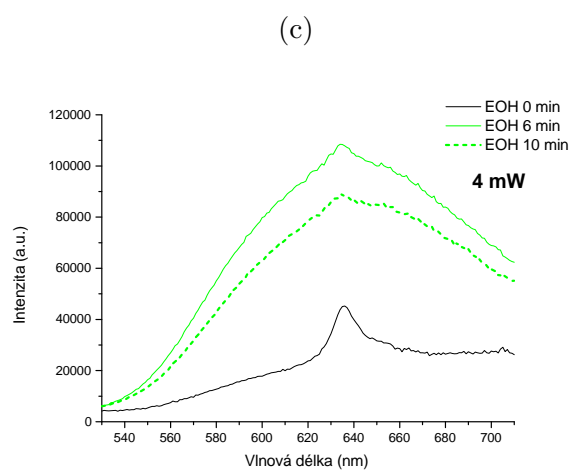
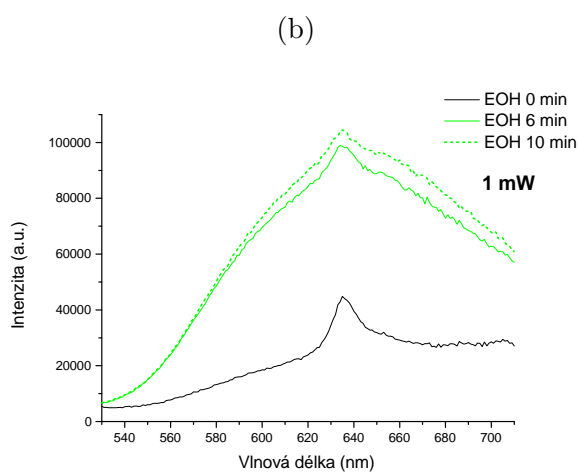
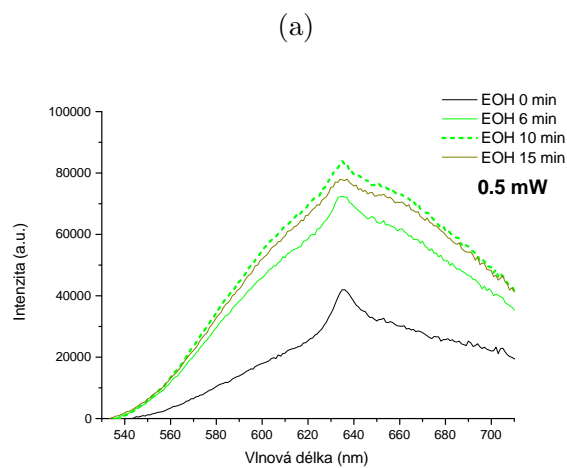
Obrázek 5.11: Emisní spektra referenčních (neozařovaných) vzorků (a) DHE-agaróza ( $\lambda_{ex} = 350$  nm), (b) PpIX-agaróza ( $\lambda_{ex} = 405$  nm) a (c) EOH ( $\lambda_{ex} = 480$  nm, měřeno v DHE-agaróza) snímána v časových intervalech. Koncentrace DHE a PpIX byla  $50 \mu\text{M}$ .

Výše uvedená fluorescenční spektra referenčních (neozářovaných) vzorků, měřená v čase po přípravě ( $t=0$  min) a v časovém odstupu od přípravy, prokázala minimální pokles v intenzitě fluorescence dihydroethidia a protoporfyrinu IX. Naopak vyšší úbytek intenzity signálu DHE byl pozorován v systému PpIX-DHE-agaróza (koncentrace DHE –  $20 \mu\text{M}$ ), kde po jedné hodině bez osvitů nebyl signál DHE detekovatelný. Naopak samotné DHE v agaróze, tzn. bez přítomnosti PpIX, vykazovalo vyšší stabilitu, jak je patrné z grafu (a) obrázku 5.11, kdy signální odezva byla měřitelná i po jedné hodině bez osvitů. S pozorovanými změnami souvisí i detekovatelnost signálu EOH, reakčního produktu DHE, kdy v případě absence mateřské molekuly (DHE) není možné měřit nárůst signálu generovaného EOH v odezvě na osvit, i když je fotosenzitivní látka stále přítomná. Na druhou stranu nebyl úbytek signálu DHE v bez osvitových podmínkách spojen s nárůstem signálu EOH, jak dokládá graf (c) obrázku 5.11, což je pro detekci tohoto fotoproduktu v systému DHE-PpIX důležitá charakteristika. Na základě zmíněné charakteristiky lze propojit osvitové podmínky s poklesem intenzity PpIX a nárůstem signálu EOH, jak dokládají oddíly 5.5.2 a 5.5.3. Snahou výše provedeného měření bylo mimo jiné i určení optimální koncentrace DHE pro následná měření, která by poskytovala odezvu na osvit vzorků obsahujících kombinaci všech tří složek (PpIX-DHE-agaróza). Jelikož je dihydroethidium fotocitlivá látka, podléhající oxidativním změnám, je vhodné volit pro experimenty vyšší koncentrační zastoupení ( $> 100 \mu\text{M}$ ) a dbát na snížené světelné podmínky při přípravě zásobních roztoků. Fotochemická degradace DHE je taktéž podpořena v průběhu samotné spektrální akvizice, proto bylo pro další měření využito převážně bodové snímání intenzity signálu. Na základě získaných charakteristik jednotlivých látek, byla v následujících experimentech s tkáňovým modelem použita koncentrace DHE  $200 \mu\text{M}$ . Tuto volbu současně podpořil i rychlý úbytek DHE v ozařovaném prostředí, který by znemožnil detekci fotoproduktu v delším časovém úseku. Naopak díky přítomnosti Intralipidu, který významně podpořil detekovatelnost signálu PpIX (viz obrázek 5.10) i v nízkém koncentračním zastoupení, byl v experimentech s tkáňovým modelem zvolen koncentrační rozsah PpIX  $5 - 30 \mu\text{M}$ .

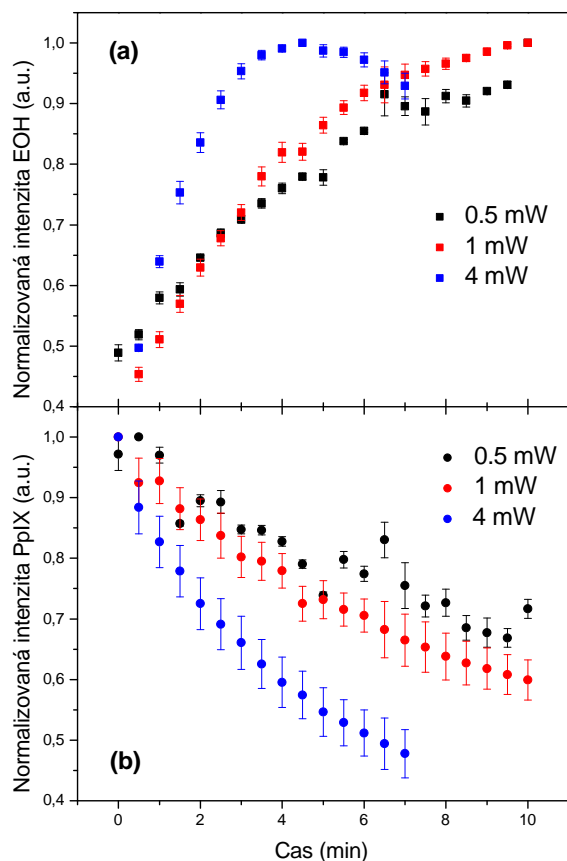
## 5.5.2 Vliv optického výkonu na vývoj signálu fotoproduktu



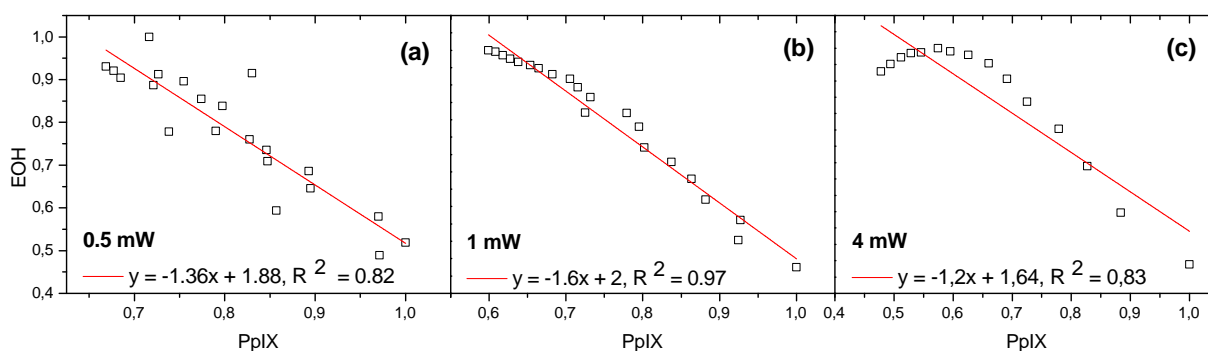
Obrázek 5.12: Emisní spektra protoporfyrinu IX (PpIX,  $\lambda_{ex} = 405$  nm) a dihydroethidia (DHE,  $\lambda_{ex} = 350$  nm) v ozařovaných tkáňových modelech. Osvitový zdroj 0.5, 1 a 4 mW, koncentrace PpIX  $10 \mu\text{M}$  a DHE  $200 \mu\text{M}$ .



Obrázek 5.13: Emisní spektra DHE-fotoproduktu (EOH,  $\lambda_{ex} = 480$  nm) v ozařovaných tkáňových modelech. Osvětový zdroj 0.5, 1 a 4 mW, koncentrace PpIX  $10 \mu\text{M}$  a DHE  $200 \mu\text{M}$ .



Obrázek 5.14: Časový průběh fluorescence (a) EOH a (b) PpIX měřené bodově na vlnových délkách  $\lambda_{ex}(PpIX) = 635 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{ex}(EOH) = 600 \text{ nm}$  v ozařovaných tkáňových modelech pro optické výkony osvitového zdroje 0.5, 1 a 4 mW. Koncentrace PpIX  $10 \mu\text{M}$  a DHE  $200 \mu\text{M}$ . Normalizováno na maximum emise, data pro tři vzorky s průměrnými hodnotami  $\pm \text{SD}$ .



Obrázek 5.15: Vzájemná závislost signálů PpIX a EOH v ozařovaných tkáňových modelech s koncentrací PpIX  $10 \mu\text{M}$  a DHE  $200 \mu\text{M}$  pro tři optické výkony (a) 0.5 mW, (b) 1 mW a (c) 4 mW. Vynesená data jsou průměrnou hodnotou tří měření.

Z grafů obrázku 5.12, kde jsou zachycena emisní spektra protoporfyrinu IX ( $10 \mu\text{M}$ ) a dihydroethidia ( $200 \mu\text{M}$ ) začleněných do tkáňového modelu (agaróza + Intralipid 1 % + inkoust 0.2 %), který byl ozařován světelným zdrojem (405 nm) s proměnným optickým výkonem (0.5, 1 a 4 mW), je zřetelný strmý pokles intenzity fluorescence v prvních čtyřech minutách osvitů pro všechny tři osvitové podmínky. Tento trend je možné pozorovat i v případě vodných roztoků obsahujících PpIX. Strmý pokles v intenzitě fluorescence v prvních fázích osvitů je přisuzován počáteční koncentraci kyslíku v ozařované oblasti, která v důsledku kontinuálního osvitů v návaznosti na tvorbu reaktivních kyslíkových forem klesá. [44] Následné prodloužení délky osvitů nevedlo k tak výrazné změně. Strmý pokles byl zaznamenán i v případě DHE, u kterého byl signál na konci osvitů (10. minuta) zdrojem o výkonu 4 mW minimální. Na grafech obrázku 5.13 zobrazujících emisní spektra DHE-fotoproduktu (EOH) snímaná při excitaci 480 nm, je zřetelný peak na 635 nm v počátcích osvitů, náležící pravděpodobně PpIX.

V grafech časových průběhů vývoje intenzity fluorescence PpIX a DHE-fotoproduktu (EOH) na obrázku 5.14 při osvitů různými optickými výkony je viditelný rychlejší pokles pro 4 mW zdroj oproti nižším optickým výkonům (0.5 a 1 mW). Současně je možné pozorovat rychlejší nárůst signální odezvy generovaného fotoproduktu (graf (a) obrázku 5.14), který je úměrný použitému optickému výkonu. Na vývoji signálu EOH v témže grafu pro 4 mW světelný zdroj je dále možné vidět zastavení růstu odezvy EOH kolem páté minuty osvitů, která je spojena se značným úbytkem DHE v ozařovaném modelu, viz graf (f) obrázku 5.12. Na vzájemném srovnání poklesů intenzity PpIX v grafu (b) obrázku 5.14 s ohledem na výkon světelného zdroje, je vidět výrazně vyšší pokles v případě 4 mW zdroje oproti 0.5 a 1 mW optickým výkonům.

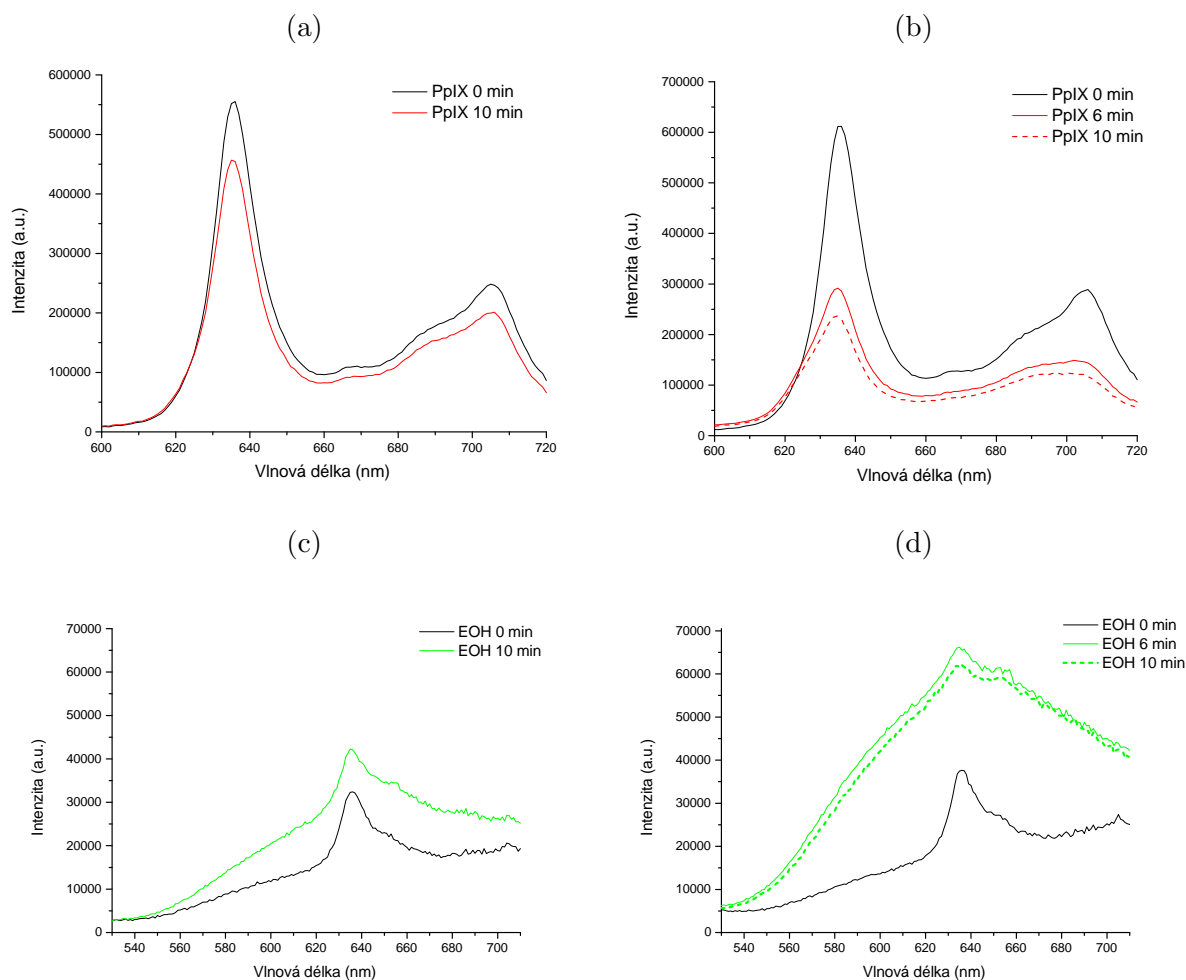
Grafy obrázku 5.15 zobrazující vzájemnou korelaci průběhů fluorescenčních signálů PpIX a EOH, to znamená nárůst intenzity signálu EOH ve vztahu k poklesu intenzity signálu PpIX, vykazují dobrou korelaci v případě nižšího optického výkonu (1 mW,  $R^2 = 0.97$ ). Photobleaching PpIX a nárůst odezvy EOH nebyl v případě vyššího (4 mW) a nejnižšího (0.5 mW) použitého výkonu lineární, jak dokládají grafy (a) a (c) v 5.15. Zapojení nižších optických výkonů pro osvit sledované oblasti, ve které je měřen pokles intenzity fotosenzitivní látky a nárůst intenzity fluorescenční značky, byl potvrzen i ve studii [37]. Co je však v rozporu s pozorovanými změnami ve zmíněné studii, je rychlejší pokles intenzity fluorescence fotosenzitivní látky (PpIX) v případě vyššího optického výkonu, který je dobře vidět v grafu (b) obrázku 5.14. Předpokládaným jevem, ke kterému dochází v ozařované oblasti při zapojení nižších optických výkonů je pomalejší spotřeba kyslíku v základním stavu, tudíž i vyšší možnost interakce přítomného kyslíku s fotosenzitivní látkou.

Na základě naměřených časových hodnot průběhů fluorescence jednotlivých složek ozařovaných tkáňových modelů, a zejména díky dobré korelaci poklesu intenzity PpIX a nárůstu fluorescenčního signálu fotoproduktu, byl pro následující měření zvolen světelný optický výkon 1 mW.

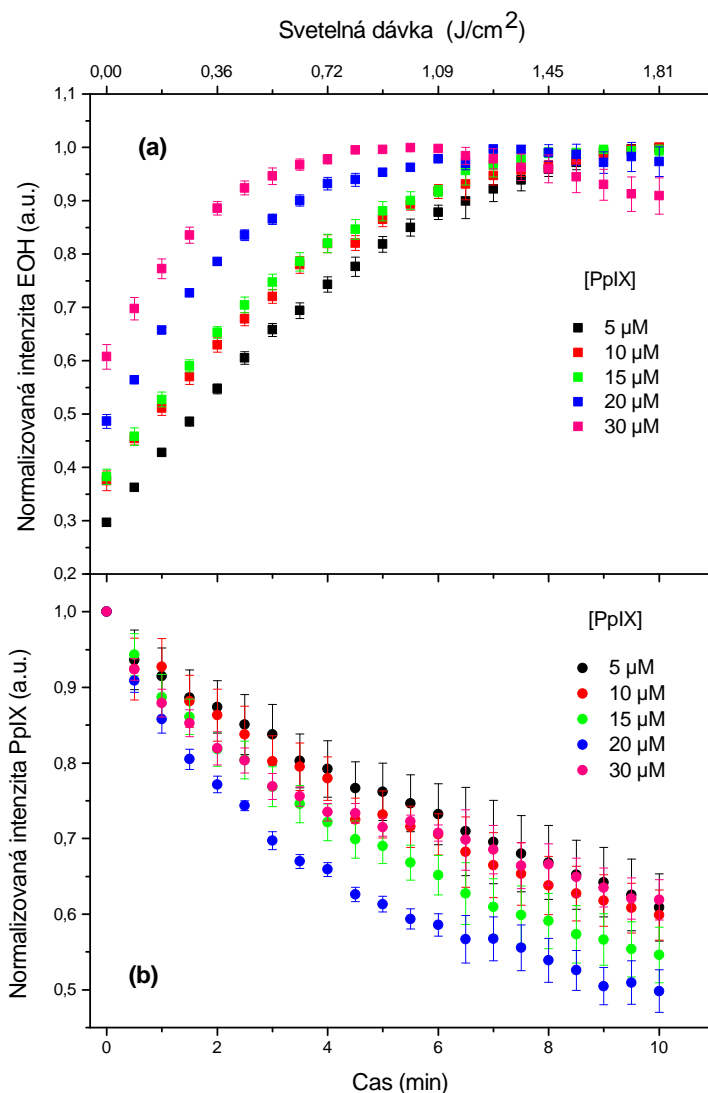


### 5.5.3 Vliv koncentrace PpIX na vývoj signálu fotoproduktu

Fluorescenční spektra pěti ozařovaných vzorků byla měřena v časových intervalech při excitaci 350 nm (DHE), 405 nm (PpIX) a 480 nm (EOH) před a po ukončení osvit. Vybraná spektra jednoho vzorku, respektive jednotlivých součástí reprezentativního vzorku, jsou zobrazena na obrázku 5.16. Současně bylo provedeno měření i pro referenční vzorky bez osvit. Během osvitu byla bodově měřena intenzita fluorescence na vlnových délkách 415 nm (DHE), 635 nm (PpIX) a 600 nm (EOH), naměřené hodnoty pro PpIX a EOH jsou vyneseny v grafech (a) a (b) obrázku 5.17.



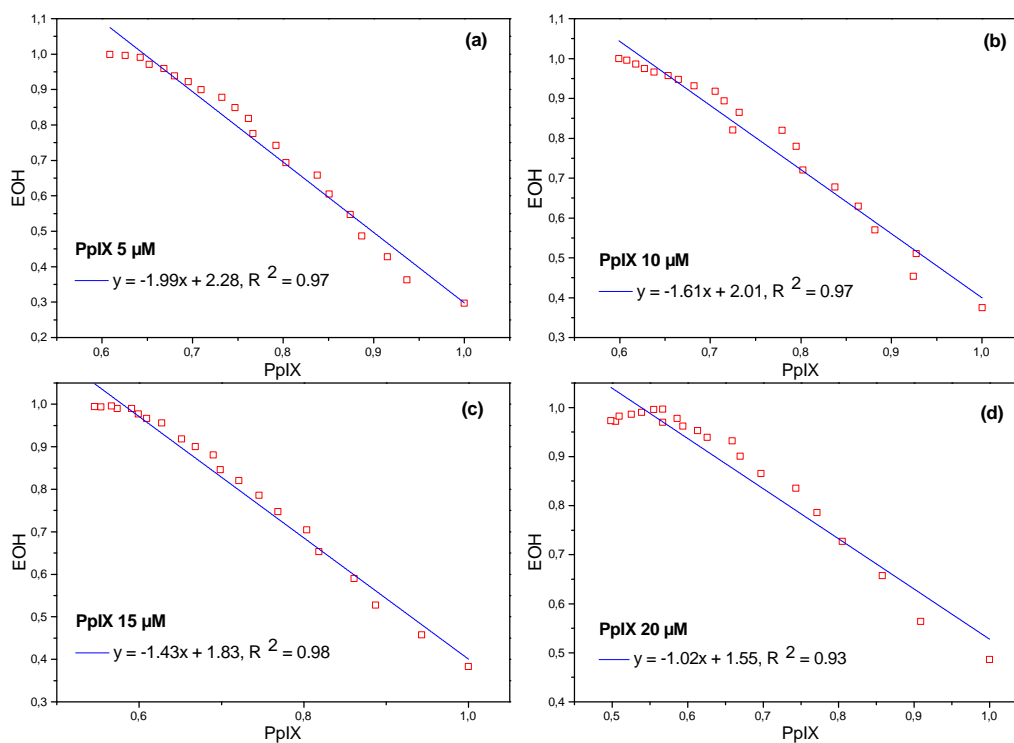
Obrázek 5.16: Emisní spektra DHE-fotoproduktu (EOH,  $\lambda_{ex} = 480$  nm) a protoporphyrinu IX (PpIX,  $\lambda_{ex} = 405$  nm) v neozařovaných (a, c,) a ozařovaných (b, d) tkáňových modelech. Osvitový zdroj 1 mW, koncentrace PpIX 20  $\mu$ M a DHE 200  $\mu$ M.



Obrázek 5.17: Časový průběh fluorescence (a) EOH a (b) PpIX měřené bodově na vlnových délkách 635 nm (PpIX), 600 nm (EOH) v ozařovaných tkáňových modelech s koncentrací PpIX 5, 10, 15, 20, 30 µM a DHE 200 µM. Optický výkon 1 mW. Normalizováno na maximum emise, data pro tři vzorky s průměrnými hodnotami  $\pm$  SD.

Díky vysoké koncentraci dihydroethidia začleněného do tkáňového modelu, která byla zvolena z důvodu značné citlivosti DHE na osvitové podmínky, bylo možné hodnotit nárůst intenzity signálu DHE-fotoproduktu v odezvě na osvit i v delších časových intervalech. Vyšší citlivost DHE na osvitové podmínky v porovnání s PpIX je dobře pozorovatelná ve všech grafech zachycujících emisní spektra DHE snímaná v časových rozestupech, viz grafy (b, d, f) obrázku 5.12. Stejně jako v případě PpIX je i u DHE viditelný strmý pokles intenzity v počátcích osvitů. Na bodových průbězích intenzit fluorescence měřených během osvitů vzorku na obrázku 5.17 (b) je zřejmý rychlejší intenzitní pokles fluorescence PpIX, který je úměrný koncentraci PpIX. Tento jev je v souladu s měřením provedeným na modelu mozkové nádorové tkáně ve studii [71]. Pro různé koncentrační zastoupení PpIX v agarózovém základu s konstantním podílem DHE, dále platí rychlejší nárůst intenzity signálu EOH v odezvě na osvit v modelech s vyšší koncentrací PpIX, jak je vidět na obrázku 5.17 (a). Současně je možné pozorovat, že doba, za kterou dosáhne intenzita fluorescenčního signálu EOH svého maxima je pro modely s vyšší koncentrací PpIX kratší,

než pro vzorky s nižší koncentrací PpIX. Dobrá korelace vývoju obou signálů (PpIX a EOH), která je patrná z grafů obrázku 5.18, byla zaznamenána pro všechny čtyři vzorky s koncentrací PpIX 5, 10, 15 a 20  $\mu\text{M}$ , ozařované světelným zdrojem o výkonu 1 mW.



Obrázek 5.18: Vzájemná závislost signálů PpIX a EOH v ozařovaných tkáňových modelech s koncentrací PpIX 5, 10, 15 a 20  $\mu\text{M}$  a DHE 200  $\mu\text{M}$ . Vynesená data jsou průměrnou hodnotou tří měření.

# Kapitola 6

## Diskuze

Vodné roztoky obsahující fotosenzitivní látku (PS) jsou prostředím, kde není molekulární pohyblivost omezena, což znesnadňuje měření procesu photobleachingu jako průvodního jevu generace reaktivních kyslíkových forem. [71] Jestliže je snahou studovat a vyhodnocovat proces degradace fotosenzitivní látky, je s výhodou využíváno hydrogelové prostředí obsahující fotosenzitivní složku. Spektroskopická studie fotosenzitivních látek zaměřená na popis tohoto jevu, a zejména pak UV – VIS fluorescenční spektroskopie, je v případě vodných roztoků PS ovlivněna molekulárními pohyby v roztocích. Excitační paprsek interaguje pouze s omezeným objemem roztoku v kyvetě, tudíž může docházet k excitaci molekul fotosenzitivní látky, která nebyla vystavena působení reaktivních forem kyslíku. Tento fakt je podpořen i nehomogenním osvitem vodného roztoku, čímž dochází ke generaci singletního kyslíku pouze v omezeném objemu. Tkáň nebo v tomto případě modelové tkáňové prostředí umožňuje fotodynamicky působit na lokalizovanou oblast, v níž se nachází fotosenzitivní látka, a kde nedochází k výrazným změnám v lokalizaci fotosenzitivních molekul. V ideálním případě se v dráze excitačního paprsku nacházejí pouze molekuly, které byly vystaveny světelnému zdroji, a poskytují tak přesnější výpovědní hodnotu, než je tomu ve vodném prostředí. Proces degradace PpIX v měřených vodných roztocích byl obtížně proveditelný i z důvodu chemické povahy PpIX, díky které docházelo k tvorbě agregovaných forem, jejichž přítomnost byla doložena nízkou detekční schopností, vyšší fotostabilitou systému a pozicí emisního peaku PpIX v oblasti okolo 622 nm. [58, 59] Možnost detekce poklesu intenzity PpIX v ozařovaných roztocích byla pravděpodobně umožněna díky nízkému podílu agregovaných forem a v některých případech i použitím vyšších koncentrací PpIX. [43] V oddílech 4.5.2 a 4.5.3, kde byl pokles intenzity PpIX v návaznosti na osvit vodného roztoku pozorován i pro nižší koncentrace PpIX (1, 5, 10  $\mu\text{M}$ ) a kde nebyl použit antiagregant, hrála pravděpodobně roli přítomnost DHE v roztoku. Tato domněnka vychází z pozorovaného mírného nárůstu signálu PpIX v přítomnosti DHE doloženého v grafu obrázku 5.10 a z pozice emisního maxima, které je vůči prostředí bez DHE posunuto do červené oblasti spektra.

Fluorescenční měření provedená na roztocích dále prokázala nižší časovou stabilitu PpIX v neozařovaném prostředí a vysokou stabilitu PpIX v neozařovaném agarózovém základu. Naopak bylo možné pozorovat výrazně rychlejší pokles v intenzitě signálu DHE, a to zejména v kombinaci DHE-PpIX-agaróza, oproti intenzitě signálu DHE-vodné prostředí, ve kterém byly využity i nižší koncentrace DHE ( $\sim 20 \mu\text{M}$ ). Z tohoto důvodu a pro možnost detekovat nárůst fluorescenčního signálu generovaného fotoproduktu v delším časovém úseku ( $\sim 10 \text{ min}$ ), byly pro měření ve fantomu použity vysoké koncentrace DHE

(200  $\mu\text{M}$ ). Použití takto vysoké koncentrace v buněčném systému by nebylo možné, neboť cytotoxický účinek dihydroethidia je uváděn pro koncentrace nad 45  $\mu\text{M}$ . [62] Na druhou stranu, je-li primárním cílem prokázat v modelovém systému produkci reaktivních kyslíkových forem, není volba vyšší koncentrace DHE špatná. Obecně lze říct, že stabilita použitých sloučenin (PpIX a DHE) byla výrazně vyšší v hydrogelovém prostředí, než v roztocích za bez osvitových podmínek, což může být přičteno nižší difúzní schopnosti kyslíku do agarózového základu. [76] Naopak fotodegradace byla v agarózovém ozařovaném prostředí vyšší, než v roztocích, a to pravděpodobně v důsledku omezené molekulární pohyblivosti jednotlivých složek v tomto prostředí.

Propojení fluorescenčního signálu PpIX při osvitu modelu s odezvou fluorescenční sondy (DHE) potvrdilo proveditelnost tohoto typu měření v laboratorních podmínkách, kdy zejména pro nízké optické výkony (1 mW) bylo dosaženo lineární korelace obou signálů. Na druhou stranu je potřeba zvážit podíl příspěvku ROS na pokles intenzity fluorescence PpIX a odpovídající nárůst intenzity fluorescence značky. [47, 48] Jak bylo doloženo ve studii [37] je možné propojením signální odezvy fotosenzitivní značky s odezvou buněčného systému určit minimální světelnou dávku potřebnou k usmrcení daného populačního rozsahu. Jak autoři doplňují, je pro využití tohoto přístupu v praxi potřeba zajistit shodnou lokalizaci obou sloučenin (fotosenzitivní látky a fluorescenční sondy) v buňce a ověřit podíl reaktivních kyslíkových forem na aktivaci fluorescenční sondy a následné buněčné smrti.

Vzhledem k tomu, že jsou fotochemické vlastnosti protoporphyrinu IX závislé na pH prostředí, jehož hodnota nebyla při experimentech na agarózových modelech stanovena, lze na podobné chemické vlastnosti nádorové tkáně a agarózového modelu usuzovat z fluorescenčního spektra PpIX. Pozice emisního maxima PpIX na 635 nm začleněného do agarózového modelu odpovídá hodnotě získané z mozkové nádorové tkáně. [71] Pro budoucí měření by však bylo vhodné provést stanovení pH agarózového základu, například pomocí fluorescenčních pH senzorů.

# Závěr

Jedním z hlavních cílů práce bylo navrhnout model lokalizované nádorové tkáně, na němž by bylo možné sledovat produkci reaktivních kyslíkových forem (ROS) během osvitů. Pro tento účel byly vytvořeny fluorescenční modely sestávající z agarózového základu s obsahem rozptylové a absorbující složky. Do vytvořených modelů byla začleněna fluorescenční značka dihydroethidium (DHE) spolu s fotosenzitivní látkou (PpIX). Pomocí metod fluorescenční spektroskopie byla provedena charakterizace obsahových složek nejprve vodného, a následně modelového systému. Na základě provedených charakteristik bylo potvrzeno rozdílné chování PpIX v jednotlivých prostředích v rámci jeho fluorescenčních vlastností. Detekce reaktivních kyslíkových forem byla provedena s využitím fluorescenční sondy dihydroethidia, reagujícího s ROS za vzniku specifického fluorescenčního fotoproduktu. Ve spojitosti se vznikem fotoproduktu byla současně měřena degradace fotosenzitivní látky v ozařovaném prostředí. Trend nárůstu fluorescenční odezvy generovaného fotoproduktu v návaznosti na produkci reaktivních kyslíkových forem, byl zaznamenán v obou ozařovaných systémech obsahujících PpIX a DHE.

Navržený model lze v budoucnu využít pro studium vlivu různých osvitových schémat v návaznosti na zvolený typ fotosenzitivní látky, případně fluorescenční značky. Pomocí získaných charakteristik je následně možné stanovit optimální osvitové a detekční podmínky pro vývoj technik selektivního ozařování tkáně. Využití dozimetrického přístupu zapojujícího fluorescenční signální sloučeniny ve fotodynamické terapii, které by poskytovaly měřitelnou odezvu na osvit tkáně, je perspektivní alternativou k již existujícím dozimetrickým postupům. Data získaná z modelového systému lze přenést na buněčné nebo tkáňové vzorky, u nichž by odezva na aplikovanou dávku, kvantifikovaná v podobě počtu usmrcených buněk, odpovídala množství vyprodukovaných kyslíkových forem.

# Literatura

- [1] Barbara Leh, Rainer Siebert, Hussein Hamzeh, Laurent Menard, Marie-Alix Duval, Yves Charon, and Darine Abi Haidar. Optical phantoms with variable properties and geometries for diffuse and fluorescence optical spectroscopy. *Journal of biomedical optics*, 17(10):108001–108001, 2012.
- [2] Brian W Pogue and Michael S Patterson. Review of tissue simulating phantoms for optical spectroscopy, imaging and dosimetry. *Journal of biomedical optics*, 11(4):041102–041102, 2006.
- [3] John D Spikes. Photodynamic action: From paramecium to photochemotherapy\*. *Photochemistry and Photobiology*, 65(S1):142S–147S, 1997.
- [4] Dennis EJGJ Dolmans, Dai Fukumura, and Rakesh K Jain. Photodynamic therapy for cancer. *Nature reviews cancer*, 3(5):380–387, 2003.
- [5] Ana P Castano, Tatiana N Demidova, and Michael R Hamblin. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 1(4):279–293, 2004.
- [6] Kamil Lang, Jiřè Mosinger, and Dana M WAGNEROVÁ. Pokroky ve fotochemii singletovéhoho kyslíku. *Chem. listy*, 99:211–221, 2005.
- [7] Y Shen, HY Lin, ZF Huang, DF Chen, BH Li, and SS Xie. Indirect imaging of singlet oxygen generation from a single cell. *Laser Physics Letters*, 8(3):232, 2011.
- [8] Pawel Mroz, Anastasia Yaroslavsky, Gitika B Kharkwal, and Michael R Hamblin. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers*, 3(2):2516–2539, 2011.
- [9] Esther Buytaert, Michael Dewaele, and Patrizia Agostinis. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1776(1):86–107, 2007.
- [10] Ana P Castano, Tatiana N Demidova, and Michael R Hamblin. Mechanisms in photodynamic therapy: part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2(1):1–23, 2005.
- [11] Linda Helander, Hans E Krokan, Anders Johnsson, Odrun A Gederaas, and Kristjan Plaetzer. Red versus blue light illumination in hexyl 5-aminolevulinate photodynamic therapy: the influence of light color and irradiance on the treatment outcome in vitro. *Journal of biomedical optics*, 19(8):088002–088002, 2014.

- [12] Yuanfang Liu, Wei Chen, Shaopeng Wang, and Alan G Joly. Investigation of water-soluble x-ray luminescence nanoparticles for photodynamic activation. *Applied Physics Letters*, 92(4):043901, 2008.
- [13] Petr Bruza, Vlastimil Fidler, and Martin Nikl. Table-top instrumentation for time-resolved luminescence spectroscopy of solids excited by nanosecond pulse of soft x-ray source and/or uv laser. *Journal of Instrumentation*, 6(09):P09007, 2011.
- [14] Petras Juzenas, Wei Chen, Ya-Ping Sun, Manuel Alvaro Neto Coelho, Roman Generalov, Natalia Generalova, and Ingeborg Lie Christensen. Quantum dots and nanoparticles for photodynamic and radiation therapies of cancer. *Advanced drug delivery reviews*, 60(15):1600–1614, 2008.
- [15] Anna Samia, Smita Dayal, and Clemens Burda. Quantum dot-based energy transfer: Perspectives and potential for applications in photodynamic therapy. *Photochemistry and photobiology*, 82(3):617–625, 2006.
- [16] Tomohiro Ikehata, Yuji Onodera, Takashi Nunokawa, Tomohisa Hirano, Shun-ichiro Ogura, Toshiaki Kamachi, Osamu Odawara, and Hiroyuki Wada. Photodynamic therapy using upconversion nanoparticles prepared by laser ablation in liquid. *Applied Surface Science*, 2014.
- [17] Jun Liu, Xiumei Tian, Hongpeng Chen, Yuanzhi Shao, Guowei Yang, and Dihu Chen. Near-infrared to visible and near-infrared upconversion of monoclinic  $\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$  nanoparticles prepared by laser ablation in liquid for fluorescence imaging. *Applied Surface Science*, 2014.
- [18] Dev Kumar Chatterjee, Li Shan Fong, and Yong Zhang. Nanoparticles in photodynamic therapy: an emerging paradigm. *Advanced drug delivery reviews*, 60(15):1627–1637, 2008.
- [19] Hazel A Collins, Mamta Khurana, Eduardo H Moriyama, Adrian Mariampillai, Emma Dahlstedt, Milan Balaz, Marina K Kuimova, Mikhail Drobizhev, Victor XD Yang, David Phillips, et al. Blood-vessel closure using photosensitizers engineered for two-photon excitation. *Nature Photonics*, 2(7):420–424, 2008.
- [20] Anna CS Samia, Xiaobo Chen, and Clemens Burda. Semiconductor quantum dots for photodynamic therapy. *Journal of the American Chemical Society*, 125(51):15736–15737, 2003.
- [21] Buhong Li, Eduardo H Moriyama, Fugang Li, Mark T Jarvi, Christine Allen, and Brian C Wilson. Diblock copolymer micelles deliver hydrophobic protoporphyrin ix for photodynamic therapy. *Photochemistry and photobiology*, 83(6):1505–1512, 2007.
- [22] Li Li and Kang Moo Huh. Polymeric nanocarrier systems for photodynamic therapy. *Biomaterials Research*, 18(1):19, 2014.
- [23] So Jin Lee, Heebeom Koo, Dong-Eun Lee, Solki Min, Seulki Lee, Xiaoyuan Chen, Yongseok Choi, James F Leary, Kinam Park, Seo Young Jeong, et al. Tumor-homing photosensitizer-conjugated glycol chitosan nanoparticles for synchronous photodynamic imaging and therapy based on cellular on/off system. *Biomaterials*, 32(16):4021–4029, 2011.



- [24] Jonathan F Lovell, Tracy WB Liu, Juan Chen, and Gang Zheng. Activatable photosensitizers for imaging and therapy. *Chemical reviews*, 110(5):2839–2857, 2010.
- [25] Marian Valko, Dieter Leibfritz, Jan Moncol, Mark TD Cronin, Milan Mazur, and Joshua Telser. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1):44–84, 2007.
- [26] K Plaetzer, B Krammer, J Berlanda, F Berr, and T Kiesslich. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers in medical science*, 24(2):259–268, 2009.
- [27] Yahel Vakrat-Haglili, Lev Weiner, Vlad Brumfeld, Alexander Brandis, Yoram Salomon, Brian McIlroy, Brian C Wilson, Anna Pawlak, Malgorzata Rozanowska, Tadeusz Sarna, et al. The microenvironment effect on the generation of reactive oxygen species by pd-bacteriopheophorbide. *Journal of the American Chemical Society*, 127(17):6487–6497, 2005.
- [28] Marc Verhille, Pierre Couleaud, R Vanderess, Daniel Brault, Muriel Barberi-Heyob, and Céline Frochot. Modulation of photosensitization processes for an improved targeted photodynamic therapy. *Current medicinal chemistry*, 17(32):3925–3943, 2010.
- [29] Tebello Nyokong and Vefa Ahsen. *Photosensitizers in medicine, environment, and security*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [30] SG Sokolovski, SA Zolotovskaya, Alexey Goltsov, C Poureyyron, AP South, and EU Rafailov. Infrared laser pulse triggers increased singlet oxygen production in tumour cells. *Scientific reports*, 3, 2013.
- [31] Marina K Kuimova, Gokhan Yahioğlu, and Peter R Ogilby. Singlet oxygen in a cell: spatially dependent lifetimes and quenching rate constants. *Journal of the American Chemical Society*, 131(1):332–340, 2008.
- [32] Thomas J Dougherty, Charles J Gomer, Barbara W Henderson, Giulio Jori, David Kessel, Mladen Korbelik, Johan Moan, and Qian Peng. Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 90(12):889–905, 1998.
- [33] Nicole Y Morgan, Gabriela Kramer-Marek, Paul D Smith, Kevin Camphausen, and Jacek Capala. Nanoscintillator conjugates as photodynamic therapy-based radiosensitizers: calculation of required physical parameters. *Radiation research*, 171(2):236–244, 2009.
- [34] Stephen J Andrasik. *Singlet oxygen generation using new fluorene-based photosensitizers under one-and two-photon excitation*. PhD thesis, University of Central Florida Orlando, Florida, 2007.
- [35] Soumya Mitra and Thomas H Foster. Carbogen breathing significantly enhances the penetration of red light in murine tumours in vivo. *Physics in medicine and biology*, 49(10):1891, 2004.
- [36] Ann Johansson. *Spectroscopic techniques for photodynamic therapy dosimetry*. Lund University, 2007.

- [37] Laurent Vaucher, Patrice Jichlinski, Norbert Lange, Céline Ritter-Schenk, Hubert van den Bergh, and Pavel Kucera. Hexyl-aminolevulinate-mediated photodynamic therapy: How to spare normal urothelium. an in vitro approach. *Lasers in surgery and medicine*, 39(1):67–75, 2007.
- [38] Mark J Niedre, Andrea J Secord, Michael S Patterson, and Brian C Wilson. In vitro tests of the validity of singlet oxygen luminescence measurements as a dose metric in photodynamic therapy. *Cancer research*, 63(22):7986–7994, 2003.
- [39] MJ Niedre, CS Yu, MS Patterson, and BC Wilson. Singlet oxygen luminescence as an in vivo photodynamic therapy dose metric: validation in normal mouse skin with topical amino-levulinic acid. *British journal of cancer*, 92(2):298–304, 2005.
- [40] Dean Weldor, Tina D Poulsen, Kurt V Mikkelsen, and Peter R Ogilby. Singlet sigma: the other singlet oxygen in solution. *Photochemistry and photobiology*, 70(4):369–379, 1999.
- [41] R Rotomskis, S Bagdonas, and G Streckyte. Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of porphyrins used in tumour therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 33(1):61–67, 1996.
- [42] EF Gudgin Dickson and RH Pottier. On the role of protoporphyrin ix photoproducts in photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 29(1):91–93, 1995.
- [43] Marica B Ericson, S Grapengiesser, F Gudmundson, Ann-Marie Wennberg, Olle Larkö, J Moan, and A Rosen. A spectroscopic study of the photobleaching of protoporphyrin ix in solution. *Lasers in medical science*, 18(1):56–62, 2003.
- [44] Nadia Naghavi, Mohammad Hossein Miranbaygi, and Ameneh Sazgarnia. Simulation of fractionated and continuous irradiation in photodynamic therapy: study the differences between photobleaching and singlet oxygen dose deposition. *Australasian Physical & Engineering Sciences in Medicine*, 34(2):203–211, 2011.
- [45] Brian W Pogue, Chao Sheng, Juan Benevides, David Forcione, Bill Puricelli, Norm Nishioka, and Tayyaba Hasan. Protoporphyrin ix fluorescence photobleaching increases with the use of fractionated irradiation in the esophagus. *Journal of biomedical optics*, 13(3):034009–034009, 2008.
- [46] Ruth B Veenhuizen and FA Stewart. The importance of fluence rate in photodynamic therapy: is there a parallel with ionizing radiation dose-rate effects? *Radiotherapy and Oncology*, 37(2):131–135, 1995.
- [47] Irene Georgakoudi and Thomas H Foster. Singlet oxygen-versus nonsinglet oxygen-mediated mechanisms of sensitizer photobleaching and their effects on photodynamic dosimetry. *Photochemistry and photobiology*, 67(6):612–625, 1998.
- [48] BC Wilson, MS Patterson, and L Lilge. Implicit and explicit dosimetry in photodynamic therapy: a new paradigm. *Lasers in medical science*, 12(3):182–199, 1997.
- [49] Raymond Bonnett and Gabriel Martinez. Photobleaching of sensitisers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron*, 57(47):9513–9547, 2001.

- [50] Jarod C Finlay, Soumya Mitra, Michael S Patterson, and Thomas H Foster. Photo-bleaching kinetics of photofrin in vivo and in multicell tumour spheroids indicate two simultaneous bleaching mechanisms. *Physics in medicine and biology*, 49(21):4837, 2004.
- [51] Brian W Pogue, Jonathan D Pitts, Mary-Ann Mycek, Roger D Sloboda, Carmen M Wilmot, John F Brandsema, and Julia A O’Hara. In vivo nadh fluorescence monitoring as an assay for cellular damage in photodynamic therapy. *Photochemistry and photobiology*, 74(6):817–824, 2001.
- [52] Guoqiang Yu, Turgut Durduran, Chao Zhou, Hsing-Wen Wang, Mary E Putt, H Mark Saunders, Chandra M Sehgal, Eli Glatstein, Arjun G Yodh, and Theresa M Busch. Noninvasive monitoring of murine tumor blood flow during and after photodynamic therapy provides early assessment of therapeutic efficacy. *Clinical cancer research*, 11(9):3543–3552, 2005.
- [53] Jan Karolin and Chris D Geddes. Metal-enhanced fluorescence based excitation volumetric effect of plasmon-enhanced singlet oxygen and super oxide generation. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15(38):15740–15745, 2013.
- [54] Y Gilaberte, D Pereboom, FJ Carapeto, and JO Alda. Flow cytometry study of the role of superoxide anion and hydrogen peroxide in cellular photodestruction with 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin ix. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*, 13(1-2):43–49, 1997.
- [55] Isamu Inamura and Kazutomo Uchida. Association behavior of protoporphyrin ix in water and aqueous poly (n-vinylpyrrolidone) solutions. interaction between protoporphyrin ix and poly (n-vinylpyrrolidone). *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 64(6):2005–2007, 1991.
- [56] Thor B Melø and Gro Reisæter. The physicochemical state of protoporphyrin ix in aqueous solution investigated by fluorescence and light scattering. *Biophysical chemistry*, 25(1):99–104, 1986.
- [57] Luigi Monsù Scolaro, Mariangela Castriciano, Andrea Romeo, Salvatore Patane, Eugenio Cefalì, and Maria Allegrini. Aggregation behavior of protoporphyrin ix in aqueous solutions: clear evidence of vesicle formation. *The Journal of Physical Chemistry B*, 106(10):2453–2459, 2002.
- [58] Mikael Marois, Jaime Bravo, Scott C Davis, and Stephen Chad Kanick. Characterization and standardization of tissue-simulating protoporphyrin ix optical phantoms. *Journal of biomedical optics*, 21(3):035003–035003, 2016.
- [59] R Margalit, N Shaklai, and S Cohen. Fluorimetric studies on the dimerization equilibrium of protoporphyrin ix and its haemato derivative. *Biochemical Journal*, 209(2):547–552, 1983.
- [60] Stephen Chad Kanick, Scott C Davis, Yan Zhao, Tayyaba Hasan, Edward V Maytin, Brian W Pogue, and M Shane Chapman. Dual-channel red/blue fluorescence dosimetry with broadband reflectance spectroscopic correction measures protoporphyrin ix production during photodynamic therapy of actinic keratosis. *Journal of biomedical optics*, 19(7):075002–075002, 2014.

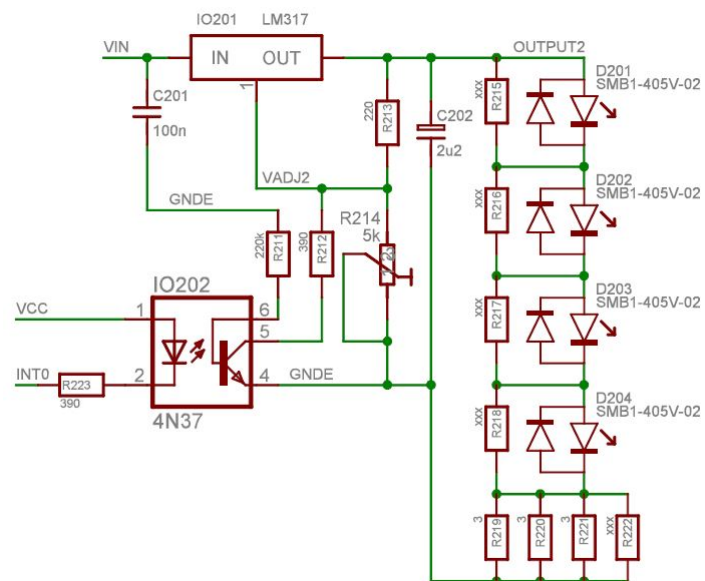
- [61] Rimona Margalit and Michal Rotenberg. Thermodynamics of porphyrin dimerization in aqueous solutions. *Biochemical Journal*, 219(2):445–450, 1984.
- [62] Jacek Zielonka and B Kalyanaraman. Hydroethidine-and mitosox-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: another inconvenient truth. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(8):983–1001, 2010.
- [63] I Johnson and MTZ Spence. The molecular probes handbook: A guide to fluorescent probes and labeling technologies, life technologies, 11. Aufl., *Life Technologies Corp. USA*, 2010.
- [64] Jacek Zielonka, Jeannette Vasquez-Vivar, and B Kalyanaraman. The confounding effects of light, sonication, and mn (iii) tbatp on quantitation of superoxide using hydroethidine. *Free Radical Biology and Medicine*, 41(7):1050–1057, 2006.
- [65] Juan Chen, Steven C Rogers, and Mahendra Kavdia. Analysis of kinetics of dihydroethidium fluorescence with superoxide using xanthine oxidase and hypoxanthine assay. *Annals of biomedical engineering*, 41(2):327–337, 2013.
- [66] Junko Takahashi and Masaki Misawa. Analysis of potential radiosensitizing materials for x-ray-induced photodynamic therapy. *NanoBiotechnology*, 3(2):116–126, 2007.
- [67] Rafal R Nazarewicz, Alfiya Bikineyeva, and Sergey I Dikalov. Rapid and specific measurements of superoxide using fluorescence spectroscopy. *Journal of biomolecular screening*, page 1087057112468765, 2012.
- [68] Radoslaw Michalski, Bartosz Michalowski, Adam Sikora, Jacek Zielonka, and Balaraman Kalyanaraman. On the use of fluorescence lifetime imaging and dihydroethidium to detect superoxide in intact animals and ex vivo tissues: a reassessment. *Free Radical Biology and Medicine*, 67:278–284, 2014.
- [69] Hongtao Zhao, Shasi Kalivendi, Hao Zhang, Joy Joseph, Kasem Nithipatikom, Jeannette Vásquez-Vivar, and B Kalyanaraman. Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(11):1359–1368, 2003.
- [70] Bruno Montcel, Laurent Mahieu-William, Xavier Armoiry, David Meyronet, and Jacques Guyotat. Two-peaked 5-ala-induced ppix fluorescence emission spectrum distinguishes glioblastomas from low grade gliomas and infiltrative component of glioblastomas. *Biomedical optics express*, 4(4):548–558, 2013.
- [71] Neda Haj-Hosseini, Benjamin Kistler, and Karin Wårdell. Development and characterization of a brain tumor mimicking fluorescence phantom. In *SPIE BiOS*, pages 894505–894505. International Society for Optics and Photonics, 2014.
- [72] Ann Johansson, Gesa Palte, Oliver Schnell, Jörg-Christian Tonn, Jochen Herms, and Herbert Stepp. 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin ix levels in tissue of human malignant brain tumors. *Photochemistry and photobiology*, 86(6):1373–1378, 2010.

- [73] Tomoya Hatakeyama, Yasutoshi Murayama, Shuhei Komatsu, Atsushi Shiozaki, Yoshiaki Kuriu, Hisashi Ikoma, Masayoshi Nakanishi, Daisuke Ichikawa, Hitoshi Fujiwara, Kazuma Okamoto, et al. Efficacy of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy using light-emitting diodes in human colon cancer cells. *Oncology reports*, 29(3):911–916, 2013.
- [74] Defu Chen, Huifen Zheng, Zhiyong Huang, Huiyun Lin, Zhidong Ke, Shusen Xie, and Buhong Li. Light-emitting diode-based illumination system for in vitro photodynamic therapy. *International Journal of Photoenergy*, 2012, 2012.
- [75] Haiyan Xie, Zhiyuan Xie, Monirehalsadat Mousavi, Niels Bendsoe, Mikkel Brydegaard, Johan Axelsson, and Stefan Andersson-Engels. Design and validation of a fiber optic point probe instrument for therapy guidance and monitoring. *Journal of biomedical optics*, 19(7):071408–071408, 2014.
- [76] AC Hulst, HJH Hens, RM Buitelaar, and J Tramper. Determination of the effective diffusion coefficient of oxygen in gel materials in relation to gel concentration. *Bio-technology techniques*, 3(3):199–204, 1989.

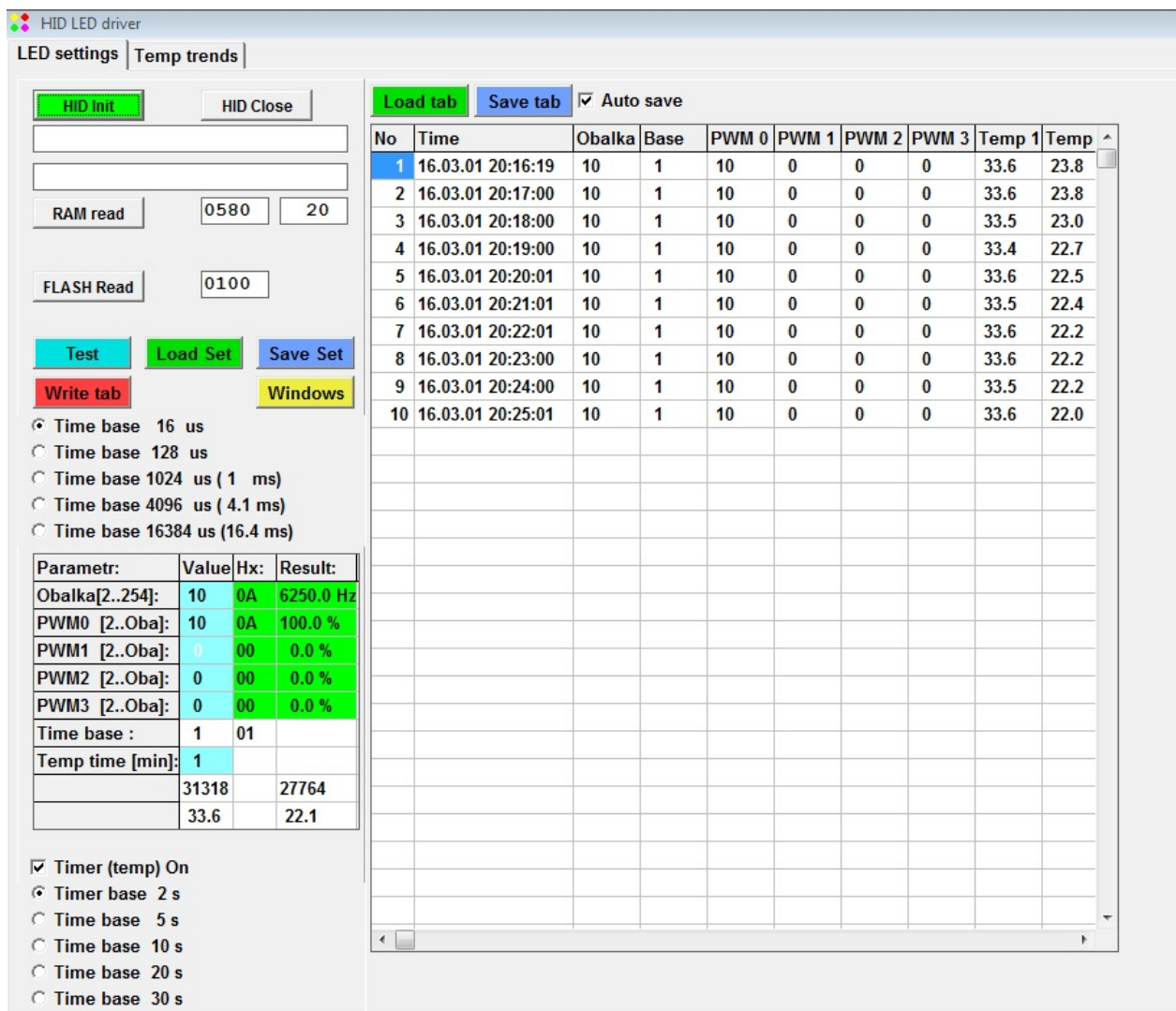
# Příloha A

## Obsah CD

- ▶ Anotace.pdf
- ▶ Annotation.pdf
- ▶ Klíčová slova.pdf
- ▶ Keywords.pdf
- ▶ Diplomová práce.pdf
- ▶ Zadání DP.pdf



Obrázek A.1: Elektronické schéma obvodu jedné větve LED diod.



Obrázek A.2: Uživatelské rozhraní pro řízení optického výkonu čtyř párů LED diod, spolu s tabulkou pro záznam teplotních trendů snímaných pomocí dvou teplotních čidel.