

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Lékařská fakulta
Ústav lékařské biofyziky



Fotodynamicky aktivní látky a jejich použití pro fotodynamickou terapii

Mgr. Ludmila Žárská

Studijní program: Lékařská biofyzika

Olomouc 2022

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Hana Kolářová, CSc.

Děkuji vedoucí disertační práce Prof. RNDr. Haně Kolářové, CSc. za odborné vedení, veškerou odbornou pomoc a za věnovaný čas v průběhu studia. Dále děkuji za vytvoření zázemí pro studium a experimentální i teoretickou práci. Děkuji také celému kolektivu Ústavu lékařské biofyziky za cenné rady a příjemné podmínky k práci.

Tato práce vznikla za podpory grantových projektů: Czech-BioImaging No. LM2015062, ENOCH (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000868), LF_2017_021.

Prohlašuji, že jsem tuto disertační práci vypracovala samostatně pod vedením Prof. RNDr. Hany Kolářové, CSc. s použitím uvedených literárních zdrojů.

Olomouc 2022

Mgr. Ludmila Žárská

SOUHRN

Tato disertační práce se zabývá především hodnocením fotodynamického efektu způsobeného porfyrinovými fotosenzitizéry v *in vitro* podmínkách na buněčných liniích.

Rakovina zůstává celosvětovým zdravotním problémem a je nemocí s největším dopadem na globální zdraví. I přes všechna nedávná technologická vylepšení jsou recidivy a metastázy stále hlavní příčinou smrti. Vzhledem k tomu, že fotodynamická terapie (PDT) neohrožuje ostatní léčebné možnosti a ve srovnání s chemoterapií nebo radioterapií představuje sníženou dlouhodobou morbiditu, jeví se jako slibná alternativní léčba pro některá nádorová onemocnění. Fotodynamická terapie je založena na příjmu molekuly fotosenzitizéru (PS), která po excitaci světlem o specifické vlnové délce reaguje s kyslíkem (O_2) a vytváří reaktivní formy kyslíku (ROS) v cílových tkáních, což vede k buněčné smrti.

Disertační práce je složena ze tří experimentálních částí. První část je zaměřena na evaluaci fotodynamického efektu dvou porfyrinových PS, konkrétně TMPyP a ZnTPPS₄. Protinádorová aktivita byla ověřována na nádorových liniích – HeLa (karcinom děložního hrdla) a G361 (maligní melanom kůže), k aktivaci bylo použito světlo o vlnové délce 414 nm s plošnou hustotou energie 5 a 25 J/cm². Na základě získaných výsledků, lze konstatovat, že u obou buněčných linií výraznější fotodynamický efekt byl pozorován po aplikaci TMPyP a současně citlivější linií vůči TMPyP byly HeLa buňky. Vyšší fototoxicita u obou buněčných linií a testovaných PS byla zjištěna po ozáření s plošnou hustotou energie 25 J/cm².

Druhá část hodnotila fotodynamický efekt sulfonovaných polystyrenových nanočástic (NP) se zapouzdřeným fotosenzitizérem TPP (TPP-NP) na nenádorové NIH3T3 (myší fibroblasty) a dvou nádorových buněčných liniích HeLa a G361. Účinnost byla ověřována v šesti koncentracích v kombinaci se čtyřmi různými časy ozáření LED diodovým zářičem s vlnovou délkou 414 nm. Větší fototoxický účinek byl dosažen

u nádorových linií v porovnání s nenádorovou NIH3T3 linií. Na liniích HeLa a G361 byla zjištěna téměř identická účinnost TPP-NP, která byla nezávislá na koncentraci a plošné hustotě energie (platí pro 5 a 10 min, respektive 16,2 a 32,4 J/cm²), jež také způsobily největší fotodynamickou účinnost.

Třetí část se věnuje výsledkům, které byly získány v průběhu šestiměsíční stáže na univerzitě v Miláně. Práce se zaměřuje na přípravu mikročástic (MP) na bázi kyseliny poly (mléčné – co – glykolové) (PLGA MP), charakterizaci a následnou funkcionalizací třemi polymery. Mikročástice PLGA s modifikovaným zeta potenciálem byly použity pro antibakteriální studii vlivu povrchového náboje na gram-pozitivní (G⁺) a gram-negativní (G⁻) bakterie. Antibakteriální efekt PLGA MP se lišil v závislosti na použitém typu polymeru a bakteriálním kmenu. Nejvýznamnější antibakteriální efekt byl zaznamenán u PLGA MP modifikovaných chitosanem u bakteriálního kmene *Staphylococcus aureus*. Mechanismus antibakteriálního účinku PLGA MP může být výsledkem vlivu použitých polymerů nebo zeta potenciálu na povrchu PLGA MP, avšak nelze vyloučit ani synergický účinek zmíněného zeta potenciálu a použitých polymerů. Pro jednoznačné objasnění podstaty antibakteriálního efektu PLGA MP je potřeba provést další testy.

SUMMARY

The dissertation mainly deals with the evaluation of the photodynamic effect caused by porphyrin photosensitizers in *in vitro* conditions on cell lines.

Cancer remains a worldwide health problem and is the disease with the greatest impact on global health. Despite all recent technological improvements, recurrence and metastasis are still the leading cause of death. Since photodynamic therapy (PDT) does not threaten other treatment options and presents reduced long-term morbidity compared to chemotherapy or radiotherapy, it appears to be a promising alternative treatment for some cancers. Photodynamic therapy is based on the uptake of a photosensitizer (PS) molecule, which, upon excitation by light of a specific wavelength, reacts with oxygen (O_2) and generates reactive oxygen species (ROS) in target tissues, leading to cell death.

The dissertation consists of three experimental parts.

The first part is focused on evaluating the photodynamic effect of two porphyrin PSs, namely TMPyP and ZnTPPS₄. The antitumor activity was tested on tumor lines – HeLa (cervical cancer) and G361 (skin cancer - melanoma), for activation, light with a wavelength of 414 nm with a surface energy density of 5 and 25 J/cm² was used. Based on the obtained results, it can be stated that for both cell lines a more pronounced photodynamic effect was observed after the application of TMPyP and at the same time the more sensitive line to TMPyP was HeLa cells. Higher phototoxicity in both cell lines and tested PSs was found after irradiation with a surface energy density of 25 J/cm².

The second part evaluated the photodynamic effect of sulfonated polystyrene nanoparticles (NPs) encapsulated with TPP photosensitizer (TPP-NPs) on non-tumor NIH3T3 (mouse fibroblasts) and two tumor cell lines HeLa and G361. The effectiveness was verified in six concentrations in combination with four different irradiation times with an LED diode emitter with a wavelength of 414 nm. A greater phototoxic effect was

achieved in tumor lines compared to the non-tumor NIH3T3 line. When testing HeLa and G361, an almost identical efficiency of TPP-NP was found, which was independent of concentration and areal energy density (valid for 5 and 10 min, respectively 16,2 and 32,4 J/cm²), which also caused the greatest photodynamic efficiency.

The third part is devoted to the results obtained during a six-month internship at the University of Milan. The work focuses on the preparation of microparticles (MP) based on poly (lactic – co – glycolic acid) (PLGA MP), characterization and subsequent functionalization with three polymers. PLGA microparticles with modified zeta potential were used for an antibacterial study of the effect of surface charge on gram-positive (G⁺) and gram-negative (G⁻) bacteria. The antibacterial effect of PLGA MP varied depending on the type of polymer and bacterial strain used. The most significant antibacterial effect was recorded for PLGA MPs modified with chitosan against the bacterial strain *Staphylococcus aureus*. The mechanism of the antibacterial effect of PLGA MP may be the result of the influence of the used polymers or the zeta potential on the PLGA MP surface, but a synergistic effect of the mentioned zeta potential and the used polymers cannot be excluded either. In order to clearly identify the nature of the antibacterial effect of PLGA MP, further tests need to be carried out.

SEZNAM ZKRATEK A POJMŮ

- aPDT – antibakteriální fotodynamická terapie
- CM-H₂DCFDA – chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát
- CO₂ – oxid uhličitý
- DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium (kultivační médium)
- DMSO – dimethylsulfoxid
- EPR efekt – enhanced permeability and retention effect (zvýšená propustnost a retenční efekt)
- ER – endoplazmatické retikulum
- FDA – Food and Drug Administration (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv USA)
- G⁺ – grampozitivní bakterie
- G⁻ – gramnegativní bakterie
- G361 – maligní melanom kůže
- H₂O₂ – peroxid vodíku
- HeLa – karcinom děložního hrdla
- HpD – deriváty hematoporfyrínu
- JC-1 – jodid 5,5,6,6'-tetrachlor-1,1', 3,3'-tetraethylbenzimidazolylkarbocyaninu
- LED – light emitting diode (elektroluminiscenční dioda)
- LPS – lipopolysacharidy
- LTA – kyselina lipoteichoová
- mABs – monoklonální protilátky
- mPDT – metronomická fotodynamická terapie
- mTHPC – temeporfín
- MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl tetrazolium bromid
- MP – mikročástice
- NIH3T3 – myší fibroblasty
- NP – nanočástice
- NPe6 – talaporfín
- O₂ – kyslík
- ¹O₂ – singletový kyslík

- $O_2^{\cdot-}$ – superoxidový anion
- OH^{\cdot} – hydroxylový radikál
- PBS – Phosphate Buffered Saline (fosfátový pufr)
- PDT – fotodynamická terapie
- PLGA – kyselina poly (mléčná – co – glykolová)
- PEG – polyethylen glykol
- PLL – poly-L-lysin
- polyDDA – polydiallyldimethylamonium chlorid
- PVA – polyvinyl alkohol
- PS – fotosenzitizér
- ROS – reaktivní formy kyslíku
- S_0 – základní stav
- S_1 – singletní stav
- T_1 – tripletní stav
- TMPyP – ($\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -Tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl)porfyrin
- TPP – (5,10,15,20-tetrafenylporfyrin)
- TPP-NP – sulfonované polystyrenové nanočástice se zapouzdřeným fotosenzitizérem TPP
- WTA – kyselina teichoová
- ZnTPPS₄ – zinc-5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatofenyl)

OBSAH

1	ÚVOD	13
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	14
2.1	FOTODYNAMICKÁ TERAPIE	14
2.1.1	HISTORICKÝ VÝVOJ	14
2.1.2	POJEM FOTODYNAMICKÁ TERAPIE	15
2.1.3	PRINCIP FOTODYNAMICKÉ TERAPIE.....	15
2.1.4	MECHANISMUS	17
2.1.4.1	REAKCE TYPU I.....	17
2.1.4.2	REAKCE TYPU II.....	18
2.1.5	FOTOSENZITIZÉRY	19
2.1.5.1	IDEÁLNÍ FOTOSENZITIZÉR	20
2.1.5.2	KLASIFIKACE FOTOSENZITIZÉRŮ.....	21
2.1.5.3	CÍLENÍ.....	21
2.1.5.4	SYNTETICKÁ ČISTOTA.....	21
2.1.5.5	GENERACE FOTOSENZITIZÉRŮ	21
2.1.5.5.1	PRVNÍ GENERACE.....	22
2.1.5.5.2	DRUHÁ GENERACE.....	22
2.1.5.5.3	TŘETÍ GENERACE	23
2.1.6	SVĚTLO	24
2.1.6.1	ZDROJE SVĚTLA.....	25
2.1.6.1.1	LASEROVÉ SYSTÉMY.....	25
2.1.6.1.2	LED DIODOVÉ ZDROJE	26
2.1.6.1.3	OPTICKÁ VLÁKNA.....	26
2.1.7	MECHANISMY CYTOTOXICITY ZPROSTŘEDKOVANÉ PDT	26
2.1.7.1	APOPTÓZA.....	28
2.1.7.2	NEKRÓZA.....	28
2.1.7.3	AUTOFÁGIE.....	29
2.1.8	KOMBINACE PDT S JINÝMI TERAPIEMI.....	29
2.1.9	NOVÉ STRATEGIE PDT	30
2.1.9.1	DVOJFOTONOVÁ FOTODYNAMICKÁ TERAPIE.....	30
2.1.9.2	METRONOMICKÁ FOTODYNAMICKÁ TERAPIE.....	30
2.1.9.3	NANOTECHNOLOGIE V PDT.....	31
2.1.10	VÝHODY A NEVÝHODY PDT	34

2.2	BIODEGRADABILNÍ POLYMERY	35
2.2.1	KYSELINA POLY (MLÉČNÁ – CO – GLYKOLOVÁ).....	36
2.2.1.1	SYNTÉZA.....	37
2.2.1.2	DEGRADACE	38
2.2.1.3	TOXICITA POLYMERU PLGA	41
3	CÍLE PRÁCE	42
4	MATERIÁL A METODY	43
4.1	BUNĚČNÉ KULTURY	43
4.1.1	NIH3T3 (myší fibroblasty)	43
4.1.2	HeLa (karcinom děložního hrdla).....	44
4.1.3	G361 (maligní melanom kůže)	44
4.2	BAKTERIÁLNÍ KMENY	45
4.3	SENZITIZÉRY A NANOČÁSTICE	47
4.4	ZDROJ SVĚTLA	49
4.5	POUŽITÉ METODY	49
4.5.1	MTT TEST	49
4.5.2	PRODUKCE ROS	51
4.5.3	MITOCHONDRIÁLNÍ MEMBRÁNOVÝ POTENCIÁL.....	53
4.6	ZOBRAZENÍ MIKROSKOPIÍ ATOMÁRNÍCH SIL	54
4.6.1	PŘIPRAVA VZORKU S TMPyP A ZnTPPS ₄	54
4.6.2	PŘIPRAVA VZORKU S TPP-NP	55
4.6.3	AFM ZOBRAZENÍ	55
4.7	MIKROČÁSTICE PLGA.....	55
4.7.1	SYNTÉZA MIKROČÁSTIC PLGA	55
4.7.2	POVRCHOVÁ ÚPRAVA MIKROČÁSTIC PLGA	56
4.7.3	CHARAKTERIZACE MIKROČÁSTIC PLGA	57
4.7.4	ANTIBAKTERIÁLNÍ TESTY.....	57
4.8	STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT.....	57
4.9	OSTATNÍ MATERIÁL	58
4.9.1	ROZTOKY A MÉDIA	58
4.9.2	KOMERČNÍ KITY.....	58
4.9.3	LABORATORNÍ PŘÍSTROJE + PROGRAMY	58
5	VÝSLEDKY	59
5.1	IN VITRO STUDIE FOTODYNAMICKÉHO EFEKTU PORFYRINOVÝCH FOTOSENZITIZÉRŮ TMPyP A ZnTPPS ₄ NA NÁDOROVÉ LINIE	59

5.1.1	CYTOTOXICITA.....	59
5.1.2	MTT TEST	59
5.1.3	PRODUKCE ROS	61
5.1.4	MITOCHONDRIÁLNÍ MEMBRÁNOVÝ POTENCIÁL.....	62
5.1.5	AFM ZOBRAZENÍ.....	63
5.2	BIOLOGICKÉ HODNOCENÍ FOTODYNAMICKÉHO ÚČINKU ZPROSTŘEDKOVANÉHO TPP-NP	65
5.2.1	CYTOTOXICITA.....	65
5.2.2	MTT TEST	65
5.2.3	PRODUKCE ROS	68
5.2.4	MITOCHONDRIÁLNÍ MEMBRÁNOVÝ POTENCIÁL.....	70
5.2.5	AFM ZOBRAZENÍ.....	72
5.3	MIKROČÁSTICE PLGA.....	74
5.3.1	ZMĚNA POVRCHOVÉHO NÁBOJE PLGA MP	75
5.3.2	ANTIBAKTERIÁLNÍ ÚČINEK PLGA MIKROČÁSTIC	77
6	DISKUZE.....	79
6.1	<i>IN VITRO</i> STUDIE FOTODYNAMICKÉHO EFEKTU DVOU PORFYRINOVÝCH FOTOTENZITIZÉRŮ TmPyP A ZnTPPS ₄ NA NÁDOROVÉ LINIE.....	79
6.2	BIOLOGICKÉ HODNOCENÍ FOTODYNAMICKÉHO ÚČINKU ZPROSTŘEDKOVANÉHO TPP-NP	80
6.3	MIKROČÁSTICE PLGA.....	83
7	ZÁVĚR.....	87
8	SEZNAM LITERATURY	89
9	PUBLIKAČNÍ ČINNOST AUTORA.....	108

1 ÚVOD

Fotodynamická terapie je klinicky schválený, minimálně invazivní terapeutický postup, který uplatňuje selektivní cytotoxickou aktivitu vůči maligním buňkám. Fotodynamická terapie využívá tři základní komponenty: PS, světlo a O₂. Jednotlivé složky nejsou samy o sobě toxické, avšak společně iniciují fotochemickou reakci, která vrcholí v generaci vysoce reaktivních produktů nazývaných ROS, především však singletního kyslíku (¹O₂). Ten může rychle způsobit významnou cytotoxicitu vedoucí k buněčné smrti prostřednictvím apoptózy, nekrózy a/nebo fagocytózy. Protinádorové účinky PDT pocházejí ze tří vzájemně souvisejících mechanismů: přímé cytotoxické účinky na nádorové buňky, poškození vaskulatury tumoru a indukce robustní zánětlivé reakce, která může vést k rozvoji systémové imunity.

Klinické studie odhalily, že PDT je úspěšná zejména v časných stádiích nádorů. Může prodloužit přežití u pacientů s inoperabilními typy rakoviny a významně zlepšuje kvalitu života. Minimální cytotoxicita u normálních tkání, zanedbatelné systémové účinky, výrazně snížená dlouhodobá nemocnost, nedostatek vlastních nebo získaných mechanismů rezistence a vynikající kosmetické a orgánově šetrné účinky této léčby, z ní činí cennou terapeutickou metodu.

Disertační práce se zaměřuje na studium a ověřování účinnosti fotosenzitizérů druhé (TMPyP a ZnTPPS₄) a třetí (TPP-NP) generace na nádorových (HeLa – karcinom děložního hrdla; G361 – maligní melanom kůže) a nenádorových (NIH3T3 – myší fibroblasty) buněčných liniích. V další části práce je popsána syntéza, modifikace a charakterizace PLGA MP a jejich antibakteriální efekt na bakteriálních kmenech *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 FOTODYNAMICKÁ TERAPIE

2.1.1 HISTORICKÝ VÝVOJ

Použití světla pro terapeutické účely lze v lidské historii pozorovat po tisíce let. Světlo bylo využíváno již ve starověkém Egyptě, Indii a Číně k léčbě kožních onemocnění jako je psoriáza, vitiligo a rakovina, stejně jako křivice a dokonce i při psychóze (Allison *et al.*, 2004; Abdel-kader, 2016). Starověcí Řekové využívali celotělové ozáření sluncem, neboli helioterapii, taktéž k léčbě nemocí. Slavný řecký lékař Herodotus, který byl považován za otce helioterapie, zdůraznil význam slunečního záření pro zdraví. Avšak až donedávna nebyly léčebné účinky slunečního světla v medicíně široce využívány. V 18. a 19. století bylo ve Francii světlo použito při léčbě tuberkulózy, křivice, kurdějí, revmatismu, ochrnutí, otoků a svalové slabosti. Fototerapie byla vyvinuta dánským lékařem Nielsem Finsenem, který na přelomu minulého století popsal úspěšnou léčbu neštovic pomocí červeného světla, které bránilo hnisání pustuly (Abdel-kader, 2016; Boschi *et Spinelli*, 2020; Correia *et al.*, 2021). Poté pokračoval v léčbě kožní tuberkulózy ultrafialovým zářením, při které došlo k vývoji fototerapie s použitím uhlíkového oblouku, za tento objev získal v roce 1903 Nobelovu cenu (Chroukroun *et Geoffroy*, 2019; Lipko, 2022).

Často dochází k záměně termínu fototerapie a fotochemoterapie, fototerapie popisuje použití světla při léčbě nemocí. Na druhé straně fotochemoterapie, představuje kombinaci aplikace fotocitlivé látky do tkáně, která je následně vystavena působení světla. Tato forma terapie byla známa již před 3000 lety. Indiáni používali psoraleny při léčbě vitiliga, taktéž Egypťané ve 12. století aplikovali různé psoraleny pro léčbu leucodermy (Alam *et al.*, 2018). V roce 1834 se Kalbrunnerovi podařilo vyizolovat chemikálii bergapten (5-methoxypsoralen) z bergamotového oleje. Avšak až v 70. letech našel bergapten

uplatnění v medicíně, aktivovaný ultrafialovým zářením, byl používán pro léčbu psoriázy. Později byl klinicky použit pro vitiligo a imunoterapii (Midden, 2018).

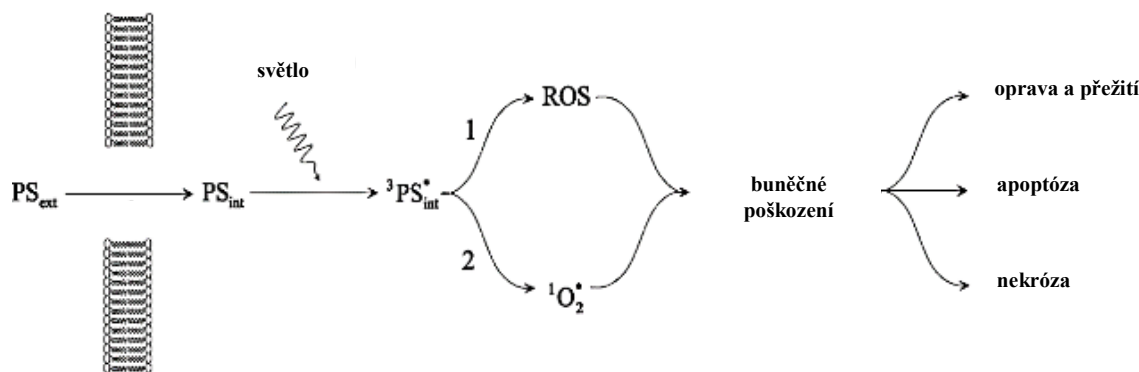
2.1.2 POJEM FOTODYNAMICKÁ TERAPIE

Koncept buněčné smrti indukované interakcí světla a fotosenzitivní látky byl definován před více než 100 lety (Mishchenko *et al.*, 2022). Jako první o něm informoval student medicíny Oscar Raab ve spolupráci s profesorem Hermanem von Tappeinerem v Mnichově. V průběhu své studie o účincích akridinu na protozoa způsobující malárii objevil tuto kombinaci akridinové červeně a světla, která měla smrtící účinek pro Infusoria z rodu paramecium. Předpokládali, že tento účinek byl způsoben přenosem energie ze světla na chemickou látku. Krátce na to von Tappeiner predikoval budoucí aplikaci této fluorescenční látky v medicíně (Misba *et Khan*, 2019; Choudharz *et al.*, 2022). Z roku 1900 pochází první zpráva o parenterálním podání PS u lidí, které provedl francouzský neurolog Prime. Při léčbě epilepsie orálně aplikoval eosin, v důsledku čehož u pacientů, jejichž kůže byla následně vystavena slunečním paprskům, došlo k vyvolání dermatitidy. Tento objev vedl k prvnímu lékařskému použití interakce mezi fluorescenční směsí a světlem, von Tappeiner spolu s dermatologem Jesionekem použili kombinaci povrchově aplikovaného eosinu a bílého světla k léčbě nádorů kůže. Spolu s Jodlbauerem, von Tappeiner pokračoval v experimentech, které prokázaly důležitost O_2 při těchto reakcích a v roce 1907 představili termín “fotodynamický“ k popisu tohoto jevu (Hamblin, 2020).

2.1.3 PRINCIP FOTODYNAMICKÉ TERAPIE

Fotodynamická terapie představuje diagnostickou a léčebnou metodu využívanou především při léčbě nádorových onemocnění. Terapie je založena na indukci buněčné smrti kombinovaným účinkem viditelného záření, sloučeniny s fotosenzitivními vlastnostmi, tzv. fotosenzitizer a O_2 . Léčba spočívá v použití selektivně se hromadícího PS v nejrychleji

proliferujících (tedy nádorových) buňkách a po ozáření světlem specifické vlnové délky (obecně v červené spektrální oblasti, $\lambda \geq 600$ nm, kdy červené světlo proniká hlouběji do tkání). Energie ze světlem excitovaného PS se přenáší na O_2 , čímž následně vzniká 1O_2 a další ROS. Tyto cytotoxické fotoprodukty, generované při osvětlení, začínají kaskádu biochemických reakcí, které způsobují poškození a smrt nádorových buněk (Obr 1) (Van Straten *et al.*, 2017; Correia *et al.*, 2021). Hlavní výhody PDT oproti jiným konvenčním léčbám rakoviny jsou: (i) její velmi nízká systémová toxicita (která je způsobena skutečností, že PS jsou aktivovány pouze v přítomnosti světla), (ii) její schopnost ničit nádory selektivně a fakt (iii), že PDT lze použít samostatně nebo v kombinaci s jinými terapeutickými způsoby, jako je chemoterapie, chirurgie, radioterapie nebo imunoterapie. Aplikace PS je možná dvojím způsobem. První možností je topická aplikace masti, která obsahuje fotosenzitivní látku. Druhou možností pak představuje injekční podání a to buď intravenózně (nitrožilně) či intralezionálně (přímo do místa novotvaru), v závislosti na typu nádoru a/nebo lokalizaci. K akumulaci PS v cílových buňkách dochází v různých časech, od 5 min až po 72 h v závislosti na druhu použité látky a způsobu aplikace. Výsledky PDT jsou různé, od zpoždění růstu u pokročilých metastáz se zlepšením kvality a délky života pacientů až po úplnou regresi nádoru (Dolmans *et al.*, 2003; Pervaiz *et al.*, 2006; Luo *et al.*, 2016; Pucelik *et al.*, 2019).



Obr 1.: Schematické znázornění principu PDT. Fotodynamická terapie zahrnuje selektivní absorpci fotocitlivého PS z extracelulárního prostoru (PS_{ext}) do cytoplazmy (PS_{int}) cílových buněk a následnou aktivaci světlem. U aktivovaného fotosenzitizéru (${}^3PS_{int}^*$) dochází k výměně elektronu nebo atomu vodíku s blízkou molekulou za vzniku ROS (fotochemická reakce typu I, „1“) nebo přenosu energie na sousední molekuly poskytující 1O_2 (fotochemická reakce typu II, „2“). Poškození buněk vyvolané těmito reaktivními druhy může vést k buněčné smrti prostřednictvím apoptózy/nekrózy a nebo může dojít k opravě a přežití.

2.1.4 MECHANISMUS

Základní cesty, kterými kombinace PS, světla a O_2 vede k buněčné smrti v důsledku PDT, jsou ukázány na Obr 2. Fotosenzitizér, který je v základním stavu (S_0), může absorbovat světlo (fotony) a dochází k přechodu do singletního stavu (S_1). Excitovaný PS se může vrátit zpět do S_0 , v důsledku čehož vzniká fluorescence. Pokud nedojde k tomuto přechodu, pak v důsledku vnitřního přeuspořádání PS přechází do tripletového stavu (T_1) s relativně dlouhou dobou přežití. Z T_1 se PS vrací do základního stavu dvěma typy reakce (Mroz *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2022).

2.1.4.1 REAKCE TYPU I

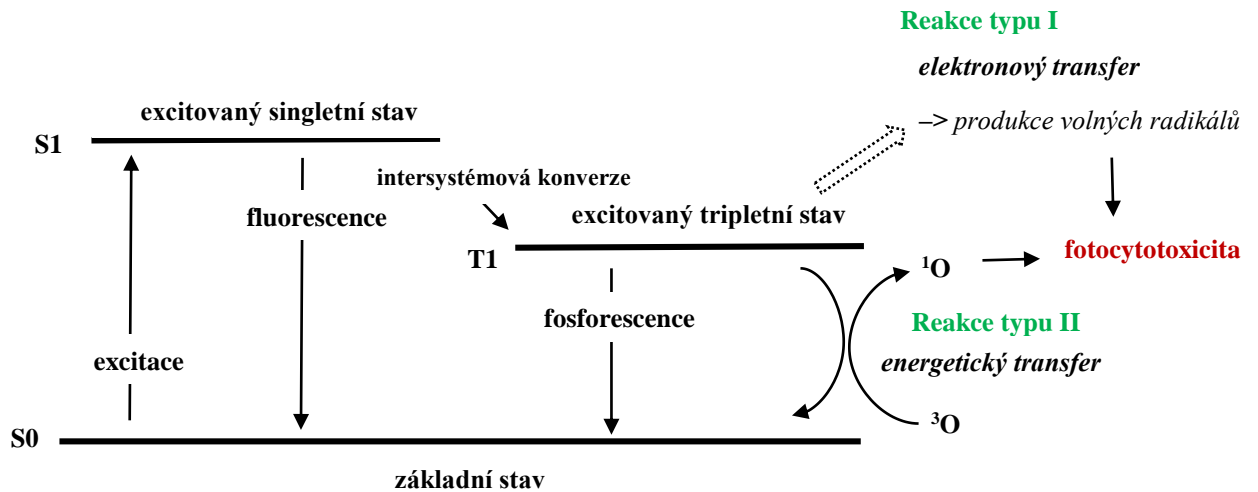
Atom vodíku nebo elektron mohou být přeneseny z PS v T_1 na biomolekuly (lipidy, proteiny, nukleové kyseliny atd.) nebo dochází ke generování radikálů, které interagují s O_2

a následně se vytvářejí ROS produkty, jako je superoxidový anion ($O_2^{\cdot-}$), hydroxylový radikál (OH^{\cdot}) a peroxid vodíku (H_2O_2), které zapříčiní destrukci buněk (Kudinova *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2022).

2.1.4.2 REAKCE TYPU II

Kromě toho může být energie z PS v T1 přenesena přímo do molekulárního kyslíku v základním stavu, což vede ke vzniku neradikálního, ale vysoce reaktivního 1O_2 (Sun *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2022).

Ačkoli přesné mechanismy PDT nejsou dosud zcela pochopeny, obecně se uznává, že reakce vyvolaná 1O_2 prostřednictvím reakce typu II je primárně odpovědná za buněčnou smrt. Příspěvek reakce typu I i typu II k buněčné smrti závisí na několika faktorech včetně PS, subcelulární lokalizace, substrátu a přítomnosti O_2 . Za hypoxických podmínek jsou za senzibilizaci primárně odpovědné radikály vznikající z fotoreakce některých PS typu I. V okysličeném médiu je fotosenzitivita zprostředkována 1O_2 , ale významná je také doplňková role H_2O_2 , OH^{\cdot} a $O_2^{\cdot-}$. Je třeba poznamenat, že ROS jsou vysoce reaktivní a vykazují velmi krátký poločas přežití. Z tohoto důvodu budou fotodynamicky ovlivněny pouze substráty umístěné velmi blízko k místům generování ROS (Mroz *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2022).



Obr 2.: Fotosenzitizér v excitovaném tripletním stavu může přímo reagovat s redukčním činidlem, např. s organickou molekulou v buněčném mikroprostředí, čímž dochází k výměně elektronu nebo atomu vodíku za vzniku radikálů ($O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , H_2O_2). Tento typ reakce označujeme jako reakci typu I, více pravděpodobná je však reakce typu II., kdy dochází k energetickému transferu za vzniku 1O_2 .

2.1.5 FOTOSENZITIZÉRY

Fotosenzitivní látky ve PDT umožňují přenos a přeměnu světelné energie do fotochemické reakce II. typu, jejíž konečné produkty vedou k rychlé buněčné a vaskulární toxicitě. Všechny klinicky úspěšné PS mají schopnost specificky cílit tkáň nebo jejich vaskulární systém k dosažení ablace. Každý PS je nezbytně nutné aktivovat světlem o specifické vlnové délce, která je charakteristická pro daný PS. Jsou známy stovky přírodních i syntetických barviv, která lze využít jako PS. Patří sem celá řada sloučenin od přírodních rostlinných produktů až po komplexní syntetické makrocykly. Většina dnes používaných PS při léčbě rakoviny je založena na tetrapyrrolové struktuře, podobné protoporphyrinu obsaženému v hemoglobinu (Li *et al.*, 2020; Lin *et al.*, 2021; Plekhova *et al.*, 2022).

Fluorescenčně detekovatelné PS mohou být také použity při definování a nastavení parametrů během léčby PDT. Mnohé PS obsahují fluorofory, které emitují záření v části

spektra blízké infračervené oblasti, což je užitečné pro jejich detekci *in vivo* (Lovell *et al.*, 2010).

2.1.5.1 IDEÁLNÍ FOTOSENZITIZÉR

Ideální fotosenzitizér by měl splňovat následující kritéria:

- Fotosenzitizér by měl vykazovat minimální cytotoxicitu ve tmě a během metabolismus PS by neměly vznikat nové cytotoxické vedlejší produkty.
- Použitím PS nesmí docházet k další mutagenезi/karcinogenезi.
- Mělo by docházet k selektivní akumulaci PS v tkáni, která je následně podrobena PDT.
- Fotosenzitizér by měl být stabilní a chemicky čistá látka s jasně definovanou strukturou.
- Eliminace PS z těla pacientů by měla být po terapii co nejrychlejší, pro zamezení vzniku vedlejší účinků jako je fotosenzitivita. Rychlé odstranění PS (řádově hodiny či maximálně dny) z těla umožňuje opakovanou aplikaci.
- Fotosenzitizér by měl mít vysoký kvantový výtěžek $^1\text{O}_2$.
- Ideální PS by měl vykazovat vyšší absorpci v oblasti tzv. terapeutického okna (600-850 nm) a naopak nízkou absorpci v oblasti spektrálního maxima denního světla (400-600nm) z důvodu možné fotosenzitizace kůže.
- Absorpční pás PS by se neměl překrývat s absorpčními pásy chromoforů přítomných ve tkáni.
- Ideální PS umožňuje současné použití i s jinými typy léčby/základů (chemoterapie, resekce, radioterapie, atd.).
- PS by měl být komerčně dostupný a s možnou přípravou i v lokálních lékárnách, tedy nejen ve specializovaných laboratořích.

(Lange et Bednarski, 2016; Brilkina *et al.*, 2019; Martins *et al.*, 2020)

2.1.5.2 KLASIFIKACE FOTOSENZITIZÉRŮ

Fotosenzitizéry lze klasifikovat různými způsoby, všechny však s omezeními. Je známa celá řada klasifikačních schémat s dalšími rozdílnostmi mezi vědci, kliniky a farmaceuty. Dělit je můžeme podle chemické struktury, syntetické čistoty, cílení nebo generace. Dalším důležitým kritériem je jejich toxicita před aktivací a komerční dostupnost. V klinické praxi se setkáme s rozdělením do tří rodin - porfyriny, chlorofyly a barviva. Avšak nejlepší klasifikace klinicky používaných PS je podle účinnosti (Allison *et al.*, 2010; Verger *et al.*, 2021).

2.1.5.3 CÍLENÍ

U některých typů PS dochází k přednostní akumulaci v určitých typech tkání, zatímco jiné zůstávají v cévním systému. Fotosenzitizéry můžeme také rozdělit podle cílení na buněčné organely, jako jsou buněčné membrány, mitochondrie, lysozomy, apod. (Allison *et al.*, 2010).

2.1.5.4 SYNTETICKÁ ČISTOTA

Toto kritérium nám přináší pohled na kvalitu PS z pozice syntetických chemiků a farmaceutů, kteří se snaží vyrábět čisté a jasně definované látky. Tato klasifikace naznačuje, že PS složené z více komponent jsou méně kvalitní než čisté látky, nedá se však říci, že by se jednalo o klinicky méně účinné PS (Allison *et al.*, 2010).

2.1.5.5 GENERACE FOTOSENZITIZÉRŮ

Fotosenzitizéry je možné rozdělit do tří generací. První generace PS je vyvozena od porfyrinu a zahrnuje hematoporfyrin a jeho deriváty označované jako HpD. Druhá generace vznikla na základě nedostatků PS první generace. Fotosenzitizéry této generace mají různé struktury včetně porfyrinů, rozšířených porfyrinů, derivátů chlorofylu a jiných barviv. Třetí generace představuje jakousi modifikaci PS první a druhé generace konjugované spolu

s cílicími strukturami, jako jsou protilátky, nosiče nebo micely (O'Connor *et al.*, 2009; Allison *et al.*, 2010; Lan *et al.*, 2019) (Obr 3 a Obr 4).

2.1.5.5.1 PRVNÍ GENERACE

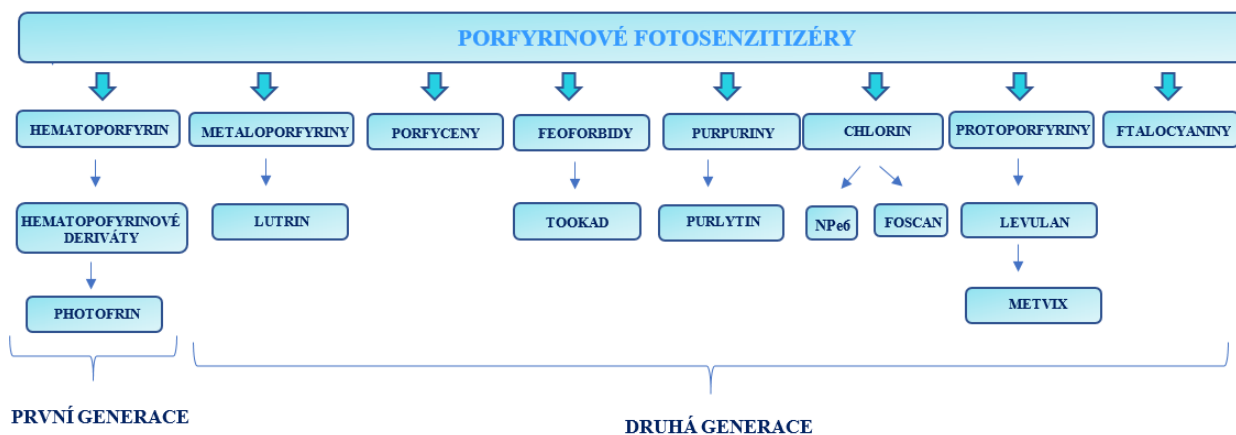
První generace PS byla vyvinuta v 70. letech 20. století. Radíme do ní deriváty hematoporfyrinu a jeho analogy – Photofrin®, Photosan, Protocan. Hematoporfyrin je nejčastěji a nejdéle používaný PS v klinické praxi (Allison *et Moghissi*, 2013; Mfouo-Tynga *et al.*, 2021). Nicméně při použití existuje velké riziko nežádoucích účinků v podobě dlouhodobě zvýšené fotosenzitivity, jelikož se hromadí kromě nádorů i v kůži v důsledku nízké selektivity. Největší úskalí pro klinické použití představuje jejich absorpční maximum (400-630 nm). Světlo s touto vlnovou délkou nedokáže pronikat hluboko do tkání (Nyman *et Hynninen*, 2004; Li *et al.*, 2019).

2.1.5.5.2 DRUHÁ GENERACE

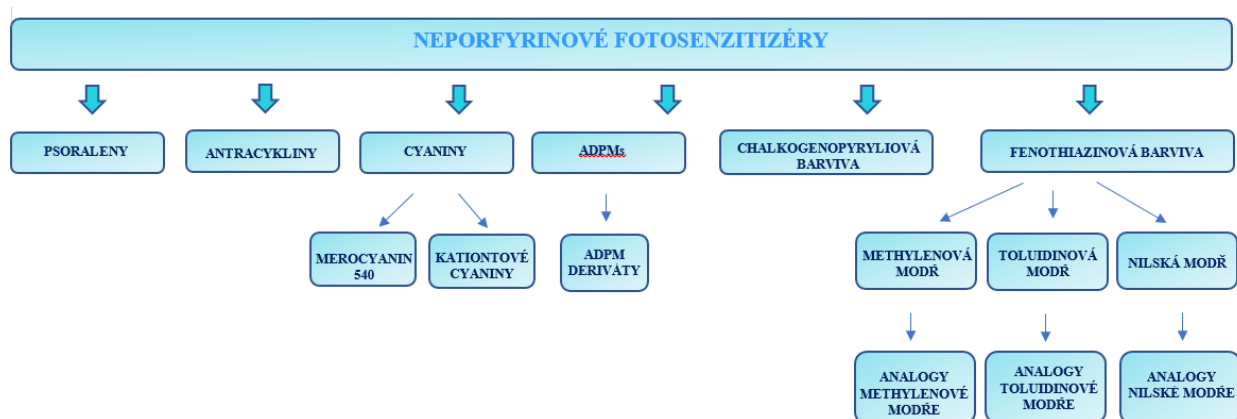
Ačkoli u PS první generace byly zjištěny vhodné vlastnosti pro použití při PDT, po jejich aplikaci se projevovaly mnohé vedlejší účinky, pro které nebylo možné s nimi dále pracovat. Brzy byly objeveny další látky jako porfyriny, chloriny, bakteriochloriny, purpuriny, texafrininy a příbuzné sloučeniny, které měly fotosenzitivní vlastnosti. Absorpční maximum těchto fotosenzitizérů se nachází v rozmezí 660 - 800 nm. Světlo s krátkou vlnovou délkou je tkání snadno rozptýleno a jen slabě proniká, na rozdíl od světla v blízkosti IR, které může pronikat tkáněmi do hloubky 1 cm. Další důležité vylepšení představuje schopnost snadného a rychlého vyloučení z krevního oběhu a kůže, stabilita, nízká cytotoxicita ve tmě a vysoký kvantový výtěžek $^1\text{O}_2$. Mnoho PS druhé generace již bylo studováno v klinických studiích I, II nebo III fáze pro různé indikace (Kessel, 2004; Nyman *et Hynninen*, 2004; D'Alessandro *et Priefer*, 2020).

2.1.5.5.3 TŘETÍ GENERACE

Tato generace fotosenzitivních látek představuje nově vznikající třídu. Některé PS druhé generace byly konjugovány nebo zabaleny do nosných molekul, které specificky dodávají PS do nádorových tkání. Nosné biomolekuly zahrnují monoklonální protilátky, liposomy, polymery a nanočástice (Chilakamarthi *et* Giribabu, 2017; Naidoo *et al.*, 2018). Nádorové buňky mají antigeny buněčného povrchu, které se velmi liší od normálních buněk, což umožňuje využití monoklonálních protilátek jako účinných dodávacích biomolekul PS. Konjugát monoklonálních protilátek a PS se selektivně váže na nádorové buňky, což usnadňuje fotosenzitizaci nádorové tkáně a ponechání normální tkáně nepoškozené (Sorrin *et al.*, 2020). V poslední době je v zájmu mnoha studií systém složený z PS třetí generace a micely, obsahující polyethylenglykol (PEG)-b-P (Asp) a dendrimery porfyrinů. U těchto systémů pozorujeme dramatické zkrácení času mezi administrací PS a ozářením. Obecně tyto systémy vykazují zlepšení selektivity, vyšší účinnost a sníženou cytotoxicitu ve tmě oproti jiným generacím (O'Conner *et al.*, 2009; Amreddy *et al.*, 2020).



Obr 3.: Schéma znázorňuje základní rozdělení porfyrinových fotosenzitizérů na první a druhou generaci.



Obr 4.: Základní rozdělení neporfyrinových fotosenzitizérů.

2.1.6 SVĚTLO

Léčiva PDT se obvykle podávají systémově, proto velkou roli hraje přesné cílení použitého světla – obvykle z laserového zdroje, jehož účinek je především lokální než systémový. Kláden je velký důraz na lokální účinnost PDT, což přispívá k účinnosti léčby a minimalizuje vedlejší projevy. Omezení PDT spočívá v tom, že nelze vyléčit pokročilé diseminované onemocnění ozářením celého těla s příslušnými plošnými hustotami energie. Nicméně pro pokročilé onemocnění může PDT zlepšit kvalitu života a prodloužit přežití. Fotodynamická terapie využívá energii světla k poškození nebo zničení cílové tkáně. Fotosenzitizér absorbuje energii přímo ze světelného zdroje, kterou následně převede na molekulární kyslík k vytvoření $^1\text{O}_2$. Tato aktivovaná forma kyslíku je skutečným cytotoxickým činidlem, které rychle reaguje s buněčnými komponentami a způsobuje poškození, což v konečném důsledku vede k buněčné smrti a zničení nádoru. Světlo reprezentuje jednu z nejdůležitějších komponent PDT a správný výběr zdroje světla je pro maximální účinnost této terapie zásadní (Star *et al.*, 2020).

2.1.6.1 ZDROJE SVĚTLA

Výběr vhodného zdroje světla je určen typem použitého PS, lokalizací a velikostí nádorového onemocnění a v neposlední řadě také cenovou dostupností. Mezi nejčastěji používané zdroje patří laserové systémy, diodové zdroje a optická vlákna (Mang, 2004).

2.1.6.1.1 LASEROVÉ SYSTÉMY

Při léčbě nemocí PDT bylo dříve používáno mnoho laserových systémů. Jeden z nejvíce používaných systémů i v klinické PDT byl argon/barvivo laser. Laserové systémy argon/barvivo byly obvykle schopny dodávat kontinuální záření 1 – 7 W, s vlnovou délkou 630 nm (Mang, 2004; Yang *et al.*, 2019). Dalšími hojně používanými variacemi laserového systému argon/barvivo byly zlaté nebo měděné parní lasery. Laser se zlatou parou generoval vlnovou délkou 627,8 nm a měl pulzním výstup s opakovací frekvencí 5–15 kHz (Panjehpour *et al.*, 2000; Ozog *et al.*, 2016). Tento systém nabídl některé výhody oproti systému argon/barvivo, jako snazší přenositelnost, nebylo potřeba specializovaného elektrického napájení nebo chlazení vodou. Nicméně náklady spojené s údržbou laserů s parami zlata byly velmi vysoké a proto se začaly více využívat páry mědi. Laser s měděnou parou však generoval záření s vlnovou délkou ve viditelné oblasti (511 a 578 nm). Hlavní nevýhodou laserů s kovovými parami byla dlouhá doba zahřívání a ochlazování, která byla pro klinické využití nevhodná. Dalším problémem byla pulzní povaha těchto systémů, protože dynamika dodávání světla z pulsního a kontinuálního zdroje je zcela odlišná (Star *et al.*, 2020). V roce 2000 získala společnost Diomed Inc. souhlas pro použití jejich 630 nm diodového laseru pro aktivaci Photofrin při aplikaci u maligních onemocnění jícnu a plic. Tento systém měl vlastnosti nové generace laserových systémů vstupujících do oblasti medicíny a představoval obrovský pokrok v technologii zdrojů záření pro PDT. Diodové lasery jsou polovodičové zdroje světla, které nevyžadují optické konfigurace standardně používaných laserových systémů v PDT (Mang, 2004; Park *et al.*, 2016).

2.1.6.1.2 LED DIODOVÉ ZDROJE

Světelné zdroje na bázi elektroluminiscenční diody - light emitting diode (LED) představují směrový zdroj světla různých vlnových délek, s maximem vyzařované energie ve směru kolmém na emisní plochu. Systémy jsou kompaktní, výhodou využití je výkon 120 V a systém chlazení vzduchem (Kim *et Darafsheh*, 2020). LED diody jsou lehké a vyžadují výrazně méně energie k vytvoření požadovaných vlnových délek světla. Tyto systémy jsou schopné výstupních výkonů až do 150 mW/cm² na ploše 3x3 cm. Snadné ošetření velkých ploch, jako je např. léčba kožních onemocnění, je efektivně využito u topicky podávaných PS (Marcus *et McIntyre*, 2002; Yang *et al.*, 2019).

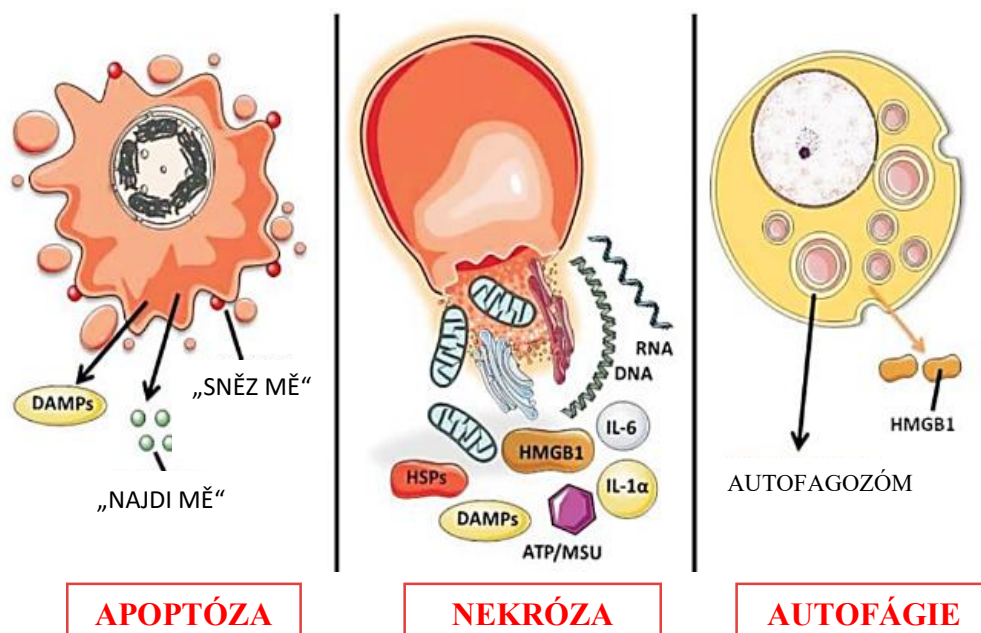
2.1.6.1.3 OPTICKÁ VLÁKNA

Primární požadavek na světelný zdroj pro PDT je dosáhnout přiměřeného osvětlení v celém cílovém objemu tkáně. Jednou z výrazných výhod použití laserů pro dodávání světla pro fotoaktivaci PS, je možnost snadno spojit toto světlo k vláknové optice. To umožňuje dodání aktivačního světla přímo do cílového místa, tedy optimalizovat specifickou terapii (Star *et al.*, 2020). Obecně je známo, že účinnost a toxicita spojená s PDT jsou neoddelitelně spojeny s množstvím světla dodávaného/absorbovaného fotocitlivým ložiskem tkáně. Proto, aby byla PDT účinná, světlo musí být dostatečně homogenní v celém cílovém objemu tkáně k indukci požadovaného terapeutického účinku. Existuje mnoho modifikací optických vláken, jako například: cylindrická vlákna, balonkové katetry, optická čočková vlákna a další. Výběr vhodného ozařovacího systému závisí na konkrétní aplikaci a také na typu, umístění, geometrii a rozsahu nádoru (Mang, 2004).

2.1.7 MECHANISMY CYTOTOXICITY ZPROSTŘEDKOVANÉ PDT

Životnost ¹O₂ je velmi krátká (přibližně 10-320 ns), což omezuje jeho difúzi v buňkách (pouze 10-55 nm) (Dysart *et Patterson*, 2005). Fotodynamické poškození tedy

nastane velmi těsně po intracelulárním umístění PS (Moan *et al.*, 1989). Cílení používaných PS se může lišit, např.: komplexní směs porfyrinových etherů se akumuluje přednostně v lipidových membránách, mono-L-aspartylchlorin e6 (NPe6, talaporfin) cílí na lysozomy, derivát benzoporfyrinu se hromadí v mitochondriích, m-tetrahydroxyfenylchlorin (mTHPC, temeporfin) cílí na mitochondrie a/nebo endoplazmatické retikulum (ER) a ftalocyanin Pc4 má široké spektrum zacílení, nicméně primárním cílem jsou mitochondrie (Allison *et Sibata*, 2010). Spousta PS je vyvinuta tak, aby byla schopna zasáhnout více cílů najednou. Charakteristické vzorce lokalizace se mohou lišit také v závislosti na typu buněk. Fotodynamická terapie může vyvolat 3 hlavní cesty buněčné smrti: apoptóza, nekróza a autofagie (Obr 5) (Buytaert *et al.*, 2007; Mishchenko *et al.*, 2022).



Obr 5.: Tři hlavní morfortypy buněčné smrti a jejich imunologické profily. Apoptóza je morfoloicky charakterizována kondenzací chromatinu, štěpením chromozomální DNA, smrštěním buňky a tvorbou apoptotických tělísek. Apoptotické buňky obvykle uvolňují signály „najdi mě“ a „sněž mě“ potřebné pro odstranění zbývajících mrtvol pomocí fagocytů. Na biochemické úrovni zahrnuje apoptóza aktivaci kaspáz, (skupina cysteinproteáz), aspartát - specifické proteázy. Nekróza je morfoloicky charakterizována vakuolizací cytoplazmy, otokem a rozpadem plazmatické membrány, což má za následek zánětlivou reakci způsobenou uvolňování buněčného obsahu a prozánětlivých

molekul. Biochemie nekrózy je většinou charakterizována neaktivací kaspázy, uvolňováním cytochromu c a fragmentací DNA oligonukleozomů. Autofagii charakterizuje masivní vakuolizace cytoplazmy. Autofagická cytoplazmatická degradace vyžaduje vytvoření autofagozómů. DAMP (alarminy) jsou molekuly, které iniciují a zároveň udržují neinfekční zánětlivou odpověď; HSP jsou proteiny tepelného šoku; HMGB1 - protein s vysokou mobilitou ze skupiny B1; IL - interleukin; ATP/MSU - adenosin trifosfát/monosodný urát (převzato a upraveno, Agostinis *et al.*, 2011).

2.1.7.1 APOPTÓZA

Obecně pojem apoptóza označuje programovanou buněčnou smrt, ke které dochází v důsledku aktivace cysteinových proteáz (konkrétně kaspáz) a následně pak jaderných endonukleáz. V důsledku poškození jaderné DNA dochází k zástavě všech biosyntetických pochodů v buňce. Během apoptózy nedochází (na rozdíl od nekrózy) k bobtnání, prasknutí a vylití obsahu buňky, které by způsobilo zánětlivou reakci. Kondenzací a fragmentací buňky dochází ke vzniku apoptotických tělísek (fragments rozpadlé buňky obalené membránou) (Agostinis *et al.*, 2011). Poškození, které následně u buněk vyvolá apoptózu, může být způsobeno chemickými látkami, zářením, teplem nebo jiným stresem. Buňky podrobené PDT podléhají především apoptotickému typu smrti. Existují čtyři mechanismy, které vedou k apoptóze v důsledku PDT: a) role kaspáz, b) mechanismy iniciované na buněčném povrchu, c) role mitochondrie a d) role členů rodiny Bcl-2 (Oleinick *et al.* 2002; Donohoe *et al.*, 2019).

2.1.7.2 NEKRÓZA

Jedná se o intravitální smrt buněk a tkání. Nekróza postihuje skupiny na sebe navzájem naléhajících buněk a vzniká jako následek nevratného poškození buněk. Charakteristickými rysy nekrózy je bobtnání cytoplazmy, zničení organel a vylití obsahu buňky do extracelulárního prostoru, které vede ke vzniku zánětlivé reakce. Při nekróze velkého rozsahu životně důležitých orgánů může dojít ke smrti. Při zachování života vzniká reparační zánětlivá reakce. Nekrotické procesy mohou mít několik příčin: mechanické,

termické (spálení, omrznutí), rentgenové nebo ionizační záření, elektrické, chemické, mikrobiální, virové, hormonální, zvýšení koncentrace ROS a vápníku v cytoplazmě, pokles hladiny ATP, atd. Obecně se předpokládá, že po PDT s nižšími hodnotami plošné hustoty energie dochází přednostně k apoptóze a vyšší hodnoty plošné hustoty energie vedou k nekróze (Agostinis *et al.*, 2004; Buytaert *et al.*, 2007; Rocha *et al.*, 2020).

2.1.7.3 AUTOFÁGIE

Autofagie v doslovném překladu znamená “jíst sám sebe” a představuje jeden z mechanismů udržení buněčné homeostázy. V nejobecnějším slova smyslu se jedná o lyzozomální rozklad proteinů. Autofagii charakterizuje masivní vakuolizace cytoplazmy. Autofagická cytoplazmatická degradace vyžaduje vytvoření struktury s dvojitou membránou, tzv. autofagozóm, který sekvestruje cytoplazmatické složky, jakož i organely a převádí je do lyzozomů. Fúze autofagozóm-lyzozom vede k degradaci cytoplazmatických komponent skze lyzozomální hydrolázy. U dospělých organismů funguje autofagie jako cesta samovolného trávení při přežití buněk v nepříznivém prostředí. Důležitou roli hraje také při odstranění poškozených organel, toxických metabolitů nebo intracelulárních patogenů. Funkcí autofagie je i ochrana před stresem a mobilizace interních zdrojů, má roli v imunitě, vývoji a diferenciaci (Agostinis *et al.*, 2004; Martins *et al.*, 2021).

2.1.8 KOMBINACE PDT S JINÝMI TERAPIEMI

Kombinace různých terapeutických modalit s překrývající se toxicitou patří mezi běžně používané strategie ke zlepšení terapeutického indexu ošetření v moderní onkologii. Fotodynamickou terapii lze použít v kombinaci s chirurgickými zákroky jako doplňkové ošetření. Úspěšně byla PDT použita v kombinaci s radioterapií i chemoterapií. Možnost kombinace PDT s jinými běžně používanými zákroky a terapiemi umožňuje zlepšit stav

pacientů s nádorovými onemocněními. Existující limitace PDT se snaží vyřešit mnohé nové strategie (Xu *et al.*, 2016; Hwang *et al.*, 2018; Kwon *et al.*, 2021).

2.1.9 NOVÉ STRATEGIE PDT

2.1.9.1 DVOJFOTONOVÁ FOTODYNAMICKÁ TERAPIE

Standardní metodou v PDT je použití PS, aktivovaného nepřetržitým světlem, většinou jednorázově ve vysokých dávkách. Existuje několik zásadně odlišných přístupů, které jsou v současné době v preklinické studii, zahrnující: různé fotofyzikální, chemické a/nebo fotobiologické mechanismy. Při dvojfotonové PDT jsou použity krátké (přibližně 100 fs) laserové pulzy s velmi vysokým výkonem, takže 2 fotony jsou PS absorbovány současně. Protože každý foton přispívá pouze polovinou excitační energie, na kterou lze použít infračervené záření, je možné dosáhnout hlubší penetrace tkání. Následující fotochemické a fotobiologické účinky jsou stejné jako u 1-fotonové PDT. Starkey a kol. (2008) informoval o hloubce penetrace 2 cm v nádorové tkáni, což představuje dvojnásobnou hloubku penetrace, které lze obvykle dosáhnout aktivací jedním fotonem (Starkey *et al.*, 2008). Alternativou může být silně zaostřený laserový paprsek, pak aktivační objem může být extrémně malý. Tento přístup může být využíván k zacílení na jednotlivé krevní cévy s minimálním poškozením sousedních tkání. Potenciálně obě strategie mohou překonat omezení útlumu světla, zejména u pigmentovaných nádorů, jako je melanom (Collins *et al.*, 2008; Starkey *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2019).

2.1.9.2 METRONOMICKÁ FOTODYNAMICKÁ TERAPIE

V metronomické PDT (mPDT) je fotosenzitizér i světlo dodáváno ve velmi nízkých dávkách v časově delším období (hodiny – dny). To může mít za následek především apoptózu s minimální nekrózou tkání (Lilge *et al.*, 2000). Hlavní důraz je kladen na minimalizaci přímého fotodynamického poškození sousedních normálních tkání

a sekundární poškození v důsledku zánětlivé odpovědi (Mathews *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2019). V *in vitro* studiích a na intrakraniálním modelu byly prokázány odezvy nádoru při použití ALA a ozáření prostřednictvím optických vláken (Davies *et al.*, 2007). Není však známo, zda se tento koncept vztahuje i na jiné PS. Existují důkazy, že molekulární dráhy mPDT se mohou lišit (Alqawi *et al.*, 2009; Kirino *et al.*, 2020).

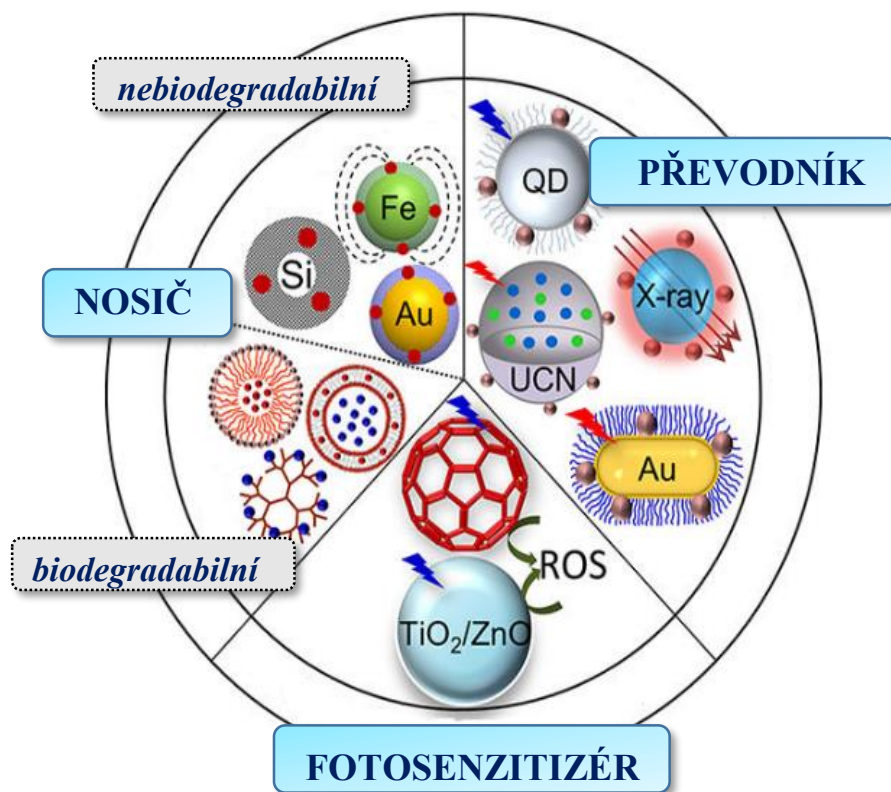
2.1.9.3 NANOTECHNOLOGIE V PDT

Nanočástice představují nové možnosti pro PDT, které dokáží překonat většinu omezení klasického PS. Obvykle jsou definovány jako submikroskopické částice v rozmezí 1-100 nm. Nanočástice jsou přirozeně se vyskytující nebo syntetické materiály, které nesou jedno nebo více činidel (Prasad, 2004; Jain, 2008; Chizenga *et al.*, 2020). V závislosti na typu nanonosiče a typu vazebného spojení nebo enkapsulizaci PS v něm, použití nanočástic ve spojení s PDT může mít některé z následujících výhod:

- Mají velké poměry povrchu k objemu (Davis *et al.*, 2008), což může efektivně zvýšit množství PS, které je doručeno do cílových buněk (Konan-Kouakou *et al.*, 2005).
- Nanočástice mohou zabránit předčasnému uvolňování PS a potenciální inaktivaci léčiva složkami plazmy, čímž se zabrání jeho nespecifické akumulaci v normálních tkáních a celkově se sníží fotocitlivost organismu po PDT (Master *et al.*, 2013).
- Přisuzují amfifilní charakter PS, ten dovoluje nanočásticím neomezeně cestovat v krevním oběhu s navázaným PS a selektivně se lokalizovat v nádorových tkáních (Allison *et al.*, 2010).
- Obvykle využívají zvýšené propustnosti a retence, což je způsobeno abnormální a netěsnou neovaskulaturou nádoru a také špatnou lymfatickou drenáží nádorové tkáně. To vše usnadňuje jak difúzi PS nosičů, tak i jejich retenci v nádorové tkáni (Maeda *et al.*, 2000; Chizenga *et al.*, 2020).

- Povrch nanočástic může být dále modifikován (funkčními skupinami nebo látkami, které zvyšují zacílení) za účelem změny jejich biologických nebo fyzikálních vlastností, čímž se zlepšuje biologická distribuce, farmakokinetika, absorpce buněk a schopnosti zacílení (Konan *et al.*, 2002; Chizenga *et Abrahamse*, 2020).
- Nanočástice mohou být navrženy jako multifunkční nanoplatformy které nesou více komponent, například: zobrazovací látky, chemoterapeutikum, cílicí ligandy a „maskovací“ látky (látky, které se vyhýbají interferenci s imunitním systémem) (Bechet *et al.*, 2008).

Nanočástice lze klasifikovat mnoha způsoby, obecně je rozdělujeme na pasivní a aktivní, v závislosti na přítomnosti cílicích skupin na jejich povrchu nebo na bázi jejich zapojení do buzení PS (Konan *et al.*, 2002). Klasifikovat nanočástice používané v PDT je možné také na základě funkcí nebo úkolů, které plní, do tří skupin: nosiče PS, samy o sobě jsou PS a převodníky energie PS (Obr. 6) (Bechet *et al.*, 2008; Chizenga *et Abrahamse*, 2020).



Obr 6.: Nanočástice používané v PDT lze klasifikovat na základě funkcí nebo úkolů, které vykonávají, do tří skupin: 1) nosiče PS, 2) samy o sobě jsou PS a 3) převodníky energie PS. Na rozdíl od chemoterapeutických léčiv, která musí být uvolněna z nosiče, aby účinkovala na cílové buňky, nemusí být PS uvolněn, pokud je molekulární kyslík a ¹O₂ schopen difundovat dovnitř a ven z nosiče. Kvůli této skutečnosti jsou přijímány různé strategie přípravy nosičů pro PDT: a) biologicky rozložitelné nanočástice (přírodní nebo syntetické polymerní nanočástice: poly (hydroxyalkanoáty) (PHA), poly (ortoestery), poly (p-aminoestery) (PbAE), poly (D, L laktid) (PLA), poly (glykolid) (PGA) a poly (ε-kaprolakton) (PCL)) nesoucí PS, které podléhají enzymatické nebo hydrolytické degradaci, čímž se minimalizuje dlouhodobá akumulace nosičů v biologickém systému; nebo b) nerozložitelné nanočástice (nanočástice na bázi keramiky nebo kovu: křemík, zlato, stříbro, železo), které se v biologickém systému nesnadno rozkládají, ale často nabízejí rozmanité funkce. 2) Některé materiály v nano rozměrech mají schopnost generovat ROS, díky svým jedinečným vlastnostem absorpce, což jim umožňuje chovat se jako PS. Do této skupiny zařazujeme fulereny, nanočástice oxidu titaničitého (TiO₂) a oxidu zinečnatého (ZnO). 3) Nanočástice nemusí sloužit pouze jen jako nosiče PS, ale také se mohou aktivně účastnit přenosu energie do navázaného PS. Toto spojení nabízí možnost nepřímé aktivace PS pomocí světla na vlnových délkách, které obvykle PS neabsorbuje. Nejčastěji se používají rentgenově aktivovatelné nanočástice, kvantové tečky, nanočástice absorbující dva fotony, rekonverzní nanočástice. (převzato a upraveno, Bechet et al., 2008)

2.1.10 VÝHODY A NEVÝHODY PDT

Podobně jako i jiné terapie, také i PDT se vyznačuje jistými výhodami, ale i nevýhodami. Mezi výhody PDT patří:

- Ve srovnání s jinými typy léčby (chemoterapií, radioterapií apod.) je PDT minimálně invazivní.
- PDT je zaměřena pouze na určitou část organismu/tkáň; neovlivňuje celý organismus.
- Vedlejší účinky nejsou tak intenzivní jako v případě jiných terapií, např. chemoterapie.
- Lze kombinovat s jinou léčbou, tj. s chirurgickými zákroky, chemoterapií.
- V případě rezistence nádorů na chemoterapii nebo radioterapii, lze PDT použít jako paliativní léčbu.
- Antibakteriální fotodynamická terapie (aPDT) účinně ničí bakteriální kmeny rezistentní na antibiotikum. Účinek aPDT na mikroorganismy je mnohem rychlejší ve srovnání s jinými antimikrobiálními činidly a neexistují důkazy vzniku rezistence na aPDT.
- Cílená cévní PDT je dominantní způsob léčby rakoviny prostaty, díky intravenóznímu podání, zůstává PS pouze v oběhu až do vyloučení z organismu.

Hlavní nevýhody jsou obecně spojeny s použitým PS a světelným zdrojem. Navzdory širokému spektru použitelných PS, ideální PS neexistuje a v praxi se specialisté potýkají s problémy jako:

- nedostatečná specifita
- nedostatek účinných PS pro aPDT, které jsou schváleny pro použití u pacientů

- léčebné režimy nejsou úplně standardizované a doposud u mnoha PS neproběhlo dlouhodobé sledování
- topická léčba může být spojena s bolestí, zčervenáním kůže, zvýšenou citlivostí na světlo, hyperpigmentací a vznikem puchýřků
- u některých aplikací může být problémem příliš vysoká cena

Výsledky dlouhodobých studií vedly k širokému využití PDT. K vytvoření optima jsou však nutné další studie a vytvoření protokolů pro používání této terapie. Fotodynamická terapie se úspěšně používá pro léčbu rakoviny, akné, onemocnění způsobeného mikroorganismy, lupénky apod (Agostinis *et al.*, 2011; Firczuk *et al.*, 2011, Zhou *et al.*, 2021).

2.2 BIODEGRADABILNÍ POLYMERY

Biodegradabilní materiály jsou přírodního nebo syntetického původu a jsou degradovány *in vivo* enzymaticky a/nebo neenzymaticky za účelem produkce biologicky kompatibilních, toxikologicky bezpečných vedlejších produktů, které jsou dále eliminovány běžnými metabolickými cestami. Počet takových materiálů, které se používají, jako doplňky v kontrolovaném dodávání léčiv se v posledním desetiletí dramaticky zvýšily. Základní kategorie biomateriálů používaných při dodávce léčiv lze široce klasifikovat jako:

1) syntetické, biologicky rozložitelné polymery, které zahrnují relativně hydrofobní materiály, jako jsou –hydroxy kyseliny (kyselina poly (mléčná – co – glykolová)), polyanhydridy a další.

2) Přirozeně se vyskytující polymery, jako jsou komplexní cukry (hyaluronan, chitosan) a anorganické látky (hydroxyapatit) (George *et al.*, 2019; Prajapati *et al.*, 2019; Rai *et al.*, 2021).

Druh použitého materiálu při dodávce léků vyplývá z typu onemocnění, rozsahu dávek a jiných specifických požadavků. Biokompatibilita je velmi důležitá, i když je důležité poznamenat, že biokompatibilita není vlastní vlastnost materiálu, ale závisí na biologickém prostředí a snášenlivosti, která se odvíjí od specifické interakce lék–polymer–tkáň (Arif *et al.*, 2019).

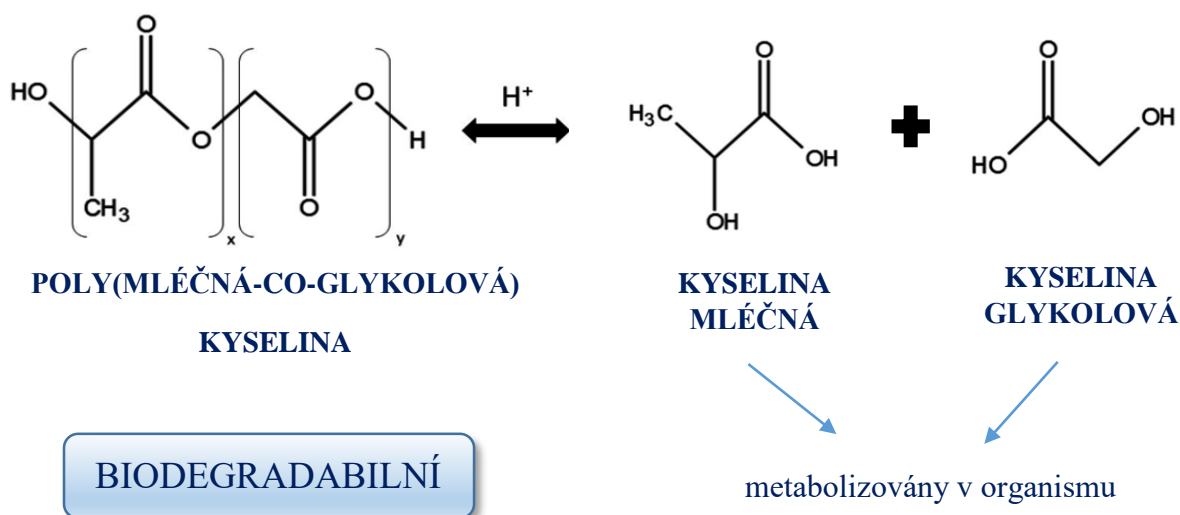
2.2.1 KYSELINA POLY (MLÉČNÁ – CO – GLYKOLOVÁ)

Jedná se o nejčastěji využívaný polymer, který je často označován jako „zlatý standard“ a má nejdelší historii jak ve veterinární, tak v humánní medicíně. Značné množství studií v oblasti dodávání léčiva biodegradabilními polymery ukázala, že aplikace polymeru PLGA má obrovský potenciál jako nosič léků a řešení pro tkáňové inženýrství. PLGA je kopolymer, jehož použití v mnoha potravinách a léčivech je schváleno FDA vzhledem ke své biologické odbouratelnosti a biokompatibilitě.

Velká rozmanitost formulací PLGA polymerů, které jsou používány pro specifické lékové aplikace, je určena dvěma hlavními parametry – molekulovou hmotností a vzájemným procentuálním podílem kyseliny mléčné a glykolové, který ovlivňuje převážně rychlost odbourávání daných polymerů. V závislosti na použitém poměru (kyselina mléčná : kyselina glykolová) při polymeraci, lze získat různé formy PLGA: ty jsou obvykle identifikovány s ohledem na molární poměr použitých monomerů (např. PLGA 75:25 označuje kopolymer, jehož složení je: 75 % kyselina mléčná a 25 % kyselina glykolová) (Tinsley-Bown *et al.*, 2000; Astete *et Sabliov*, 2006).

2.2.1.1 SYNTÉZA

PLGA je syntetizován kopolymerací s otevřením kruhu dvou různých monomerů, cyklických dimerů (1,4-dioxan-2,5-dionů) kyseliny glykolové a kyseliny mléčné. Polymery mohou být syntetizovány jako náhodné nebo blokové kopolymery, čímž se získají další polymerní vlastnosti. Mezi běžné katalyzátory používané při přípravě tohoto polymeru patří 2-ethylhexanoát cínu (II), alkoxyd cínu (II) nebo isopropoxid hlinitý. V průběhu polymerace jsou po sobě jdoucí monomerní jednotky (kyseliny glykolové nebo kyseliny mléčné) spojeny v PLGA esterovými vazbami, čímž se získá lineární alifatický polyester (Obr 7) (Astete *et Sabliov*, 2006).



Obr 7.: Schématické znázornění syntézy PLGA, polymer vzniká kopolymerací kyseliny mléčné a kyseliny glykolové. Obě tyto kyseliny jsou odbouratelné. X = počet jednotek kyseliny mléčné, Y = počet jednotek kyseliny glykolové.

2.2.1.2 DEGRADACE

PLGA degraduje hydrolýzou esterových vazeb v přítomnosti vody. Ukázalo se, že čas potřebný k degradaci PLGA souvisí s poměrem monomerů použitých při výrobě; čím vyšší je obsah glykolidových jednotek, tím nižší je čas potřebný k degradaci ve srovnání s převážně laktidovými materiály. Výjimkou je kopolymer s poměrem monomerů 50:50, který vykazuje rychlejší degradaci (přibližně dva měsíce). Kromě toho polymery, které jsou zakončeny estery (na rozdíl od volné karboxylové kyseliny), vykazují delší poločasy degradace (Samadi *et al.*, 2013). Díky této flexibilitě při degradaci jsou PLGA polymery vhodné pro výrobu mnoha zdravotnických prostředků, jako jsou štěpy, stehy, implantáty, protetické přístroje, chirurgické tmely, MP a NP (Pavot *et al.*, 2014).

PLGA podléhá v těle hydrolýze za vzniku původních monomerů: kyseliny mléčné a kyseliny glykolové. Tyto dva monomery jsou za normálních fyziologických podmínek vedlejšími produkty různých metabolických cest v těle. Kyselina mléčná je metabolizována v cyklu kyseliny trikarboxylové a je vylučována s oxidem uhličitým a vodou. Kyselina glykolová je metabolizována stejným způsobem a je vylučována také ledvinami (Machatschek *et al.*, 2018; Lagreca *et al.*, 2020). Protože tělo může metabolizovat oba dva monomery, existuje minimální systémová toxicita spojená s použitím PLGA pro medicínské aplikace.

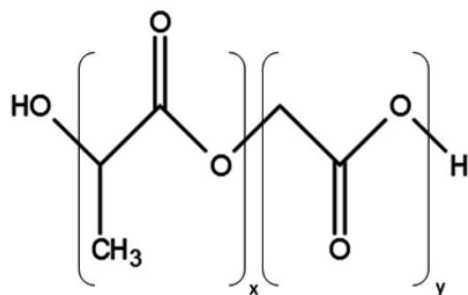
Obecně v případě hydrolýzy polymerů má velký vliv na rychlost degradace struktura polymeru, protože molekuly vody musí mít přístup k labilním vazbám (vazby esterů, ortoesterů, anhydridů, karbonátů, amidů, aj.).

Rychlost hydrolýzy ovlivňuje řada faktorů jako např.:

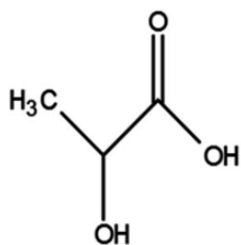
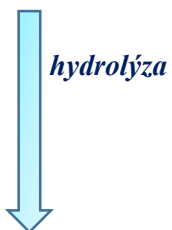
- relativní stabilita vazby
- hydrofobní/hydrofilní vlastnosti

- sterické efekty
- tvorba produktů autokatalýzy
- difúzní koeficienty fragmentů
- mikrostruktura (fázová separace)
- krystalinita
- příprava
- velikost a tvar předmětu
- teplota a pH
- autokatalýza
- délka vytvářejícího se oligomeru
- základní vlastnosti polymeru

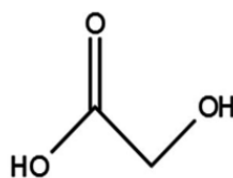
(Forcino *et* Jonnalagadda, 2007; Li *et al.*, 2011).



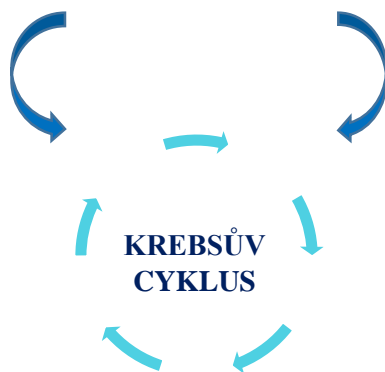
POLY(MLÉČNÁ-CO-GLYKOLOVÁ KYSELINA)



KYSELINA MLÉČNÁ



KYSELINA GLYKOLOVÁ



Obr 8.: Degradace PLGA polymeru.

2.2.1.3 TOXICITA POLYMERU PLGA

Biodegradace PLGA produktů je velmi pomalá, a proto má minimální vliv na normální buněčnou funkci. Bylo provedeno mnoho dlouhodobých a rozsáhlých studií PLGA polymerů na zvířatech. Testovány byly preparáty, které jsou v současnosti používány u lidí, jako jsou vstřebávací materiály používané k šití, šrouby, kostní implantáty a antikoncepční implantáty. Studovány byly také polymery, které jsou používány jako štěpovací materiál pro umělé orgány a v poslední době našly své uplatnění také jako podpůrná výztuha v tkáňovém inženýrství (Bala *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2019). Obecně lze říci, že PLGA biomateriály prokázaly velmi dobrou biokompatibilitu a vykazovaly jen minimální toxicitu. U některých buněčných kultur byla zaznamenána snížení buněčné proliferace (Mir *et al.*, 2017).

3 CÍLE PRÁCE

- *In vitro* ověření fotodynamické aktivity porfyrinových fotosenzitizerů TMPyP a ZnTPPS₄ na nádorových liniích HeLa a G361.
- *In vitro* studium fotodynamické aktivity TPP-NP na třech buněčných liniích (NIH3T3, HeLa a G631).
- Syntéza a charakterizace PLGA MP.
- Funkcionalizace PLGA MP.
- Ověrování antibakteriální aktivity modifikovaných PLGA MP.

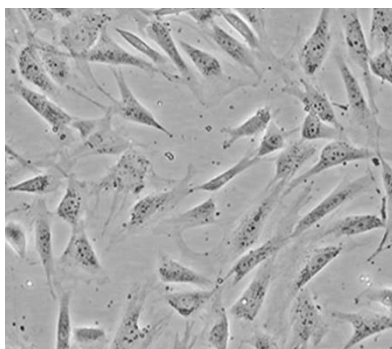
4 MATERIÁL A METODY

4.1 BUNĚČNÉ KULTURY

Pro studium fotodynamických vlastností PS byly použity buněčné kultury NIH3T3, HeLa a G361. Tyto buněčné linie pocházejí z americké sbírky buněčných kultur ATCC. Buňky byly vysazeny v počtu 10^4 /jamka v 96-jamkové destičce a následně 24 h inkubovány s PS v kultivačním médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) při 37 °C a 5 % CO₂.

4.1.1 NIH3T3 (myší fibroblasty)

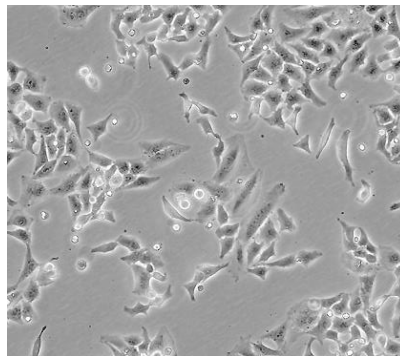
Fibroblasty jsou typem buněk, které syntetizují extracelulární matici a kolagen, jež tvoří základní strukturu biologické pojivové tkáně u zvířat a hrají důležitou roli při opravě tkáně. Kromě toho, že jsou přítomny jako fibroblasty, tyto buňky existují v alternativním stavu, jako fibrocyty. Fibroblast je termín používaný k popisu těchto buněk, když jsou v aktivovaném stavu. Fibrocyty označuje stav, ve kterém jsou buňky méně aktivní. Morfologie fibroblastů závisí na jejich funkci a místě působení. Fibroblasty extrahované z konkrétního místa si "mohou pamatovat" své původní umístění a funkci, i když jsou transplantovány na jiné místo v těle (Obr 9) (Leibiger et al., 2013; <https://www.nih3t3.com/>).



Obr 9.: Buněčná kultura NIH3T3 ([https://www.asbmb.org/asbmb today /people /010115/generating-the-3t3-cell-line](https://www.asbmb.org/asbmb%20today/people/010115/generating-the-3t3-cell-line)).

4.1.2 HeLa (karcinom děložního hrdla)

Buněčná linie lidských epiteliálních buněk, které byly vyizolovány v roce 1951, pocházejí z nádoru děložního hrdla Henrietty Lacksové (z prvních dvou písmen jména a příjmení této ženy pochází i název této buněčné linie). Buňky HeLa lze označit jako nesmrtelnou buněčnou linii, vzhledem k tomu, že je možné jejich neomezené neustálé množení. Nepodléhají Hayflickovu limitu, který způsobí po několika desítkách dělení odumření buněk z důvodu zkrácených telomer. Tento limit HeLa buňky obcházejí aktivací telomeráz, enzymů, které jsou schopné zpětně prodloužit telomery (<https://www.immunology.org/hela-cells-1951>). Dnes se HeLa buňky kultivují v laboratořích takřka po celém světě a využívají se ve výzkumu v různých cytologických a molekulárně biologických oborech, jako je například imunologie či onkologie. Byly využity při studiu buněčného cyklu nebo při studiích zkoumajících vliv vesmírného prostředí na lidské buňky. Dokonce byly použity k tisku na 3D tiskárně k vytištění nádoru (Obr 10).



Obr 10.: Buněčná kultura HeLa (www.atcc.org).

4.1.3 G361 (maligní melanom kůže)

Maligní melanom kůže vzniká nekontrolovatelným růstem pigmentových buněk, které se nazývají melanocyty. Na jeho vzniku se podílí ultrafialové záření, a to především

složka UVB. Maligní melanom se vyskytuje především v bílé populaci. Nejvíce ohroženi jsou lidé se světlou kůží a sklonem k tvorbě pih. Lidský kožní maligní melanom představuje nejsmrtelejší formu rakoviny kůže, která je zodpovědná za 75,2% úmrtí souvisejících s rakovinou kůže. Buňky G361 v laboratorních podmínkách produkují melanin až do 50 zdvojnásobení populace (Obr 11)

(https://www.culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=88030401&collection=ecacc_gc., <https://www.atcc.org/products/crl-1424>).



Obr 11.: Buněčná kultura G361 (Roberts *et al.*, 1987).

4.2 BAKTERIÁLNÍ KMENY

Po mnoho desetiletí jsou mikroorganismy intenzivně zkoumány v souvislosti s jejich schopností kolonizovat povrch, což vede k tvorbě biofilmů a s tím spojenému nebezpečí infekce (Donlan *et Costerton*, 2002). V poslední době roste zájem o výzkum interakcí mezi bakteriemi a NP různé chemické povahy (kovové, oxidy, sírany atd.) (Barnes *et al.*, 2013; von Moos *et al.*, 2014). Tyto studie přinášejí nové poznatky do oblastí nanověd, včetně toxikologie, farmakologie, nanomedicíny, biotechnologie, environmentálních věd, chemie a dokonce i geologie (Rai *et al.*, 2009; Nath *et Banerjee*, 2013; Judy *et Bertsch*, 2014; Wadhvani *et al.*, 2016).

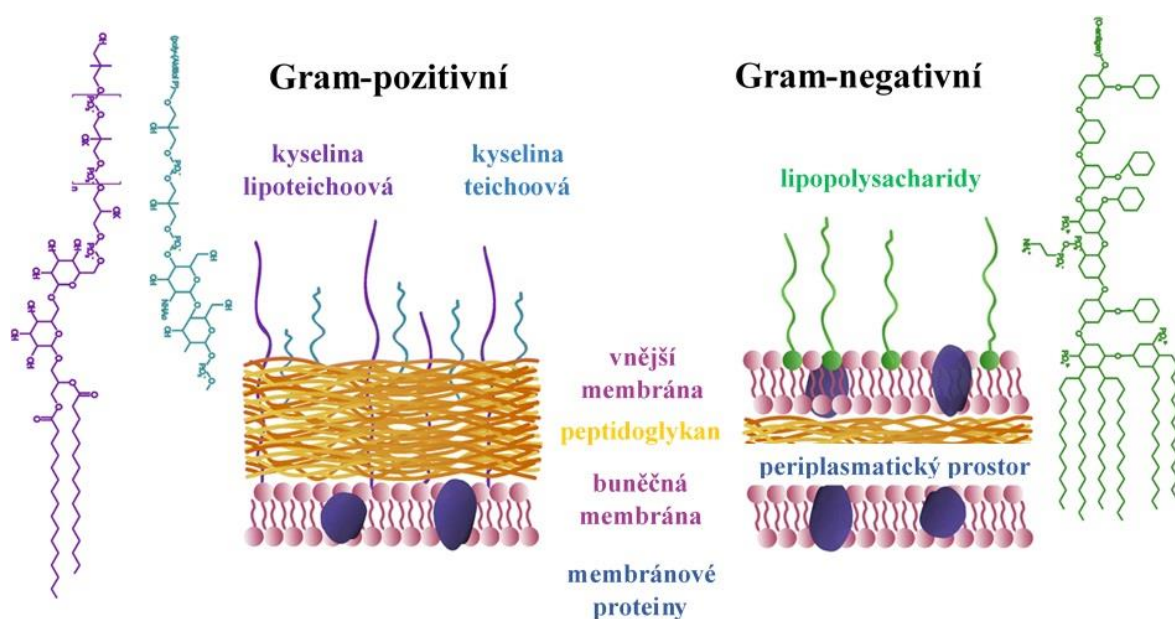
Bakterie jsou jednobuněčné prokaryotické organismy obklopené buněčnou membránou, buněčnou stěnou a v některých případech i buněčným obalem (Silhavy *et al.*,

2010). Obecně lze rozlišit tři hlavní morfologické typy bakteriálních buněk: kulovité (koky), tyčinkovité (bacily) a spirálky (spirily) (Young *et al.*, 2006). Podle složení buněčných stěn se bakterie dělí do dvou hlavních kategorií: gram-negativní a gram-positivní. Na Obr 12 jsou znázorněny rozdíly ve struktuře buněčné stěny těchto dvou skupin.

Hlavní složkou buněčných stěn bakterií G^+ i G^- je polymer peptidoglykan. Bakterie G^+ mají silné buněčné stěny, které se skládají z velké vícevrstvé oblasti peptidoglykanu se stěnovou kyselinou teichoovou (WTA) a kyselinou lipoteichoovou (LTA), připojenou k vrstvě peptidoglykanu, resp. k buněčné membráně. Bakterie G^- mají tenkou vrstvu peptidoglykanu, která se nachází mezi buněčnou a vnější membránou, v oblasti zvané periplazmatický prostor (specifický znak G^-), vyplněný gelovitou periplazmatikou. Místo kyseliny teichoové syntetizují G^- bakterie lipopolysacharidy (LPS), které tvoří odlišné domény (označené zeleně) ve vnější fosfolipidové dvojvrstvě (Malanovic *et Lohner*, 2016). Bakteriální buněčná stěna hraje klíčovou roli v ochraně buňky před negativním působením fyzikálních, chemických a biologických faktorů a řídí charakteristický tvar buněk. Další zásadní funkce buněčných stěn souvisí s adhezí k jakémukoli povrchu díky přítomnosti adhezínů, tj. specifických makromolekul zodpovědných za adhezivní interakce na rozhraní (Moriarty *et al.*, 2011). V procesu adheze mají zásadní význam molekulární vlastnosti povrchu bakteriálních buněk.

Vedle hydrofobicity definuje povrchový náboj primární proměnnou obvykle používanou pro hodnocení procesu bakteriální adheze (Spriano *et al.*, 2017). Bakterie obvykle vykazují celkový záporný náboj při měření ve vodní suspenzi při fyziologickém pH. V případě G^+ bakterií hrají fosforylové skupiny umístěné v ocáscích LTA a WTA důležitou roli při vytváření záporného náboje buněk. U G^- bakterií je záporný náboj výsledkem ionizace fosforylových a 2-keto-3-deoxyoktonátových karboxylátových skupin přítomných v řetězcích LPS (Wilson *et al.*, 2001). Povrchový náboj měřený jako zeta potenciál, však

závisí na bakteriálním kmeni a jeho konkrétních povrchových vlastnostech (Kłodzińska *et al.*, 2010; Khelissa *et al.*, 2017). Elektrochemické chování povrchu bakteriálních buněk je důležité zejména pro použití NP jako antimikrobiálních látek (Mmola *et al.*, 2016; Ramasamy *et al.*, 2016), při detekci virů, bakterií a spor (Sajjanar *et al.*, 2015) nebo dokonce k produkci NP uvnitř mikroorganismu (Deplanche *et al.*, 2012; Srivastava *et al.*, 2013). Ke studii byli použiti typičtí zástupci G^+ a G^- kmene: *Staphylococcus aureus* (G^+) a *Escherichia coli* (G^-).

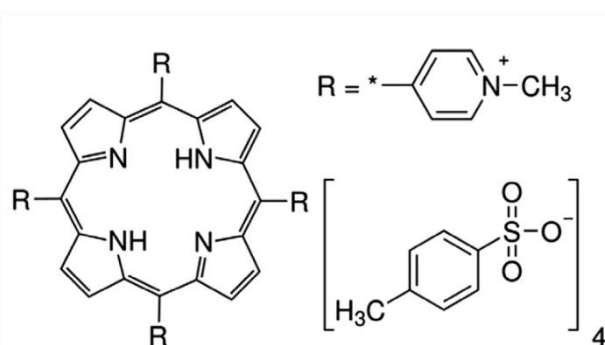


Obr 12.: Rozdíly mezi buněčnými stěnami gram-pozitivních a gram-negativních bakterií (převzato a upraveno Pajerski *et al.*, 2019).

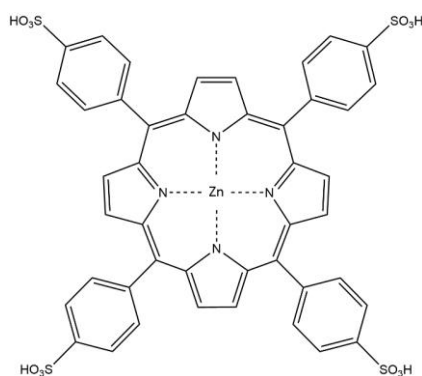
4.3 SENZITIZÉRY A NANOČÁSTICE

- TMPyP ($\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -Tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl)porfyrin p-toluenesulfonát, Sigma–Aldrich) (Obr 13)
- ZnTPPS₄ (zinc-5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatofenyl) porfyrin, připraven Prof. J. Mosingerem (Obr 14)

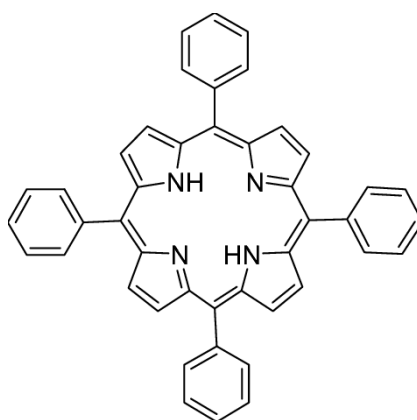
- TPP – NP (sulfonované polystyrenové nanočástice s enkapsulovaným hydrofobním TPP (5,10,15,20-tetrafenylporfyrin), připravil P. Henke (Obr 15)



Obr 13.: $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -Tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl)porphyrin *p*-toluenesulfonate (TMPyP); (<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/87639?lang=en®ion=CZ>).



Obr 14.: Strukturní vzorec zine-5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatofenyl) porfyrin (ZnTPPS₄).



Obr 15.: Strukturní vzorec 5,10,15,20-tetrafenylporfyrin (TPP); (https://www.researchgate.net/figure/Tetraphenylporphyrin-TPP_fig31_230773557)

4.4 ZDROJ SVĚTLA

Pro vyvolání fotodynamické reakce byl použit LED diodový zdroj světla, speciálně navržený pro ozařování experimentálních mikrodestiček. Vzorky byly ozářeny při vlnové délce 414 nm. Světelný zdroj je chráněn národním patentem CZ 302829 B6.

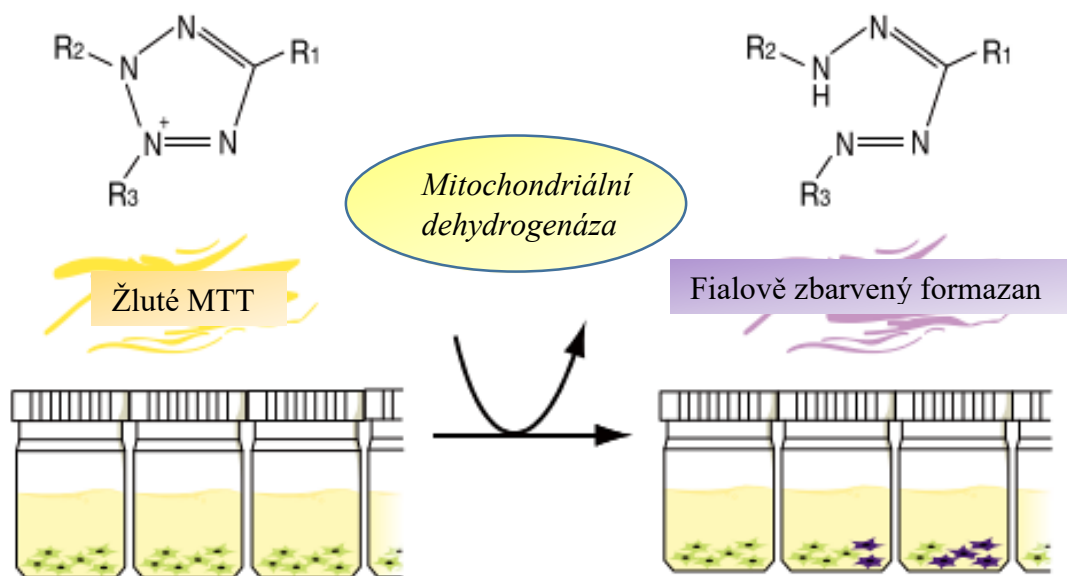
Buňky v 96-jamkové destičce s TMPyP a ZnTPPS₄ byly ozářeny světlem s plošnou hustotou energie 5 J/cm² (což odpovídá době ozáření: 1 min 33 s, intenzita světla 54 mW/cm²) a 25 J/cm² (doba ozáření: 7 min 43 s, intenzita světla 54 mW/cm²). U vzorku TPP-NP byly zvoleny čtyři ozařovací časy, konkrétně 0,5; 1; 5 a 10 min (intenzita světla 54 mW/cm²), což odpovídá plošné hustotě energie 1,6; 3,2; 16,2 a 32,4 J/cm².

4.5 POUŽITÉ METODY

4.5.1 MTT TEST

Test MTT je kolorimetrický test pro hodnocení metabolické aktivity buněk. NAD(P)H - dependentní buněčné oxidoreduktázové enzymy mohou za definovaných podmínek odrážet počet přítomných životaschopných buněk. Tyto enzymy jsou schopné redukovat tetrazoliové MTT 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5 difenyltetrazolium bromid na nerozpustný formazan, který má fialovou barvu. U živých buněk je žlutý tetrazol redukován na formazan. Tato redukce probíhá pomocí rozpouštědla (např. dimethylsuloxid – DMSO). Přidání rozpouštědla vede ke změně barevnosti roztoku v závislosti na množství nerozpustného formazanu. Absorbance tohoto zbarveného roztoku je kvantifikována pomocí spektrofotometru, měřením při vlnové délce 570 nm. Stupeň absorpce světla závisí na stupni koncentrace formazanu akumulovaného uvnitř a na povrchu buňky. Čím vyšší je koncentrace formazanu, tím tmavší je fialová barva

a tím vyšší je i absorbance. Testy MTT se obvykle provádějí ve tmě, protože činidlo MTT je citlivé na světlo (Obr 16).



Obr 16.: Princip MTT testu (převzato a upraveno Jethva et al., 2021).

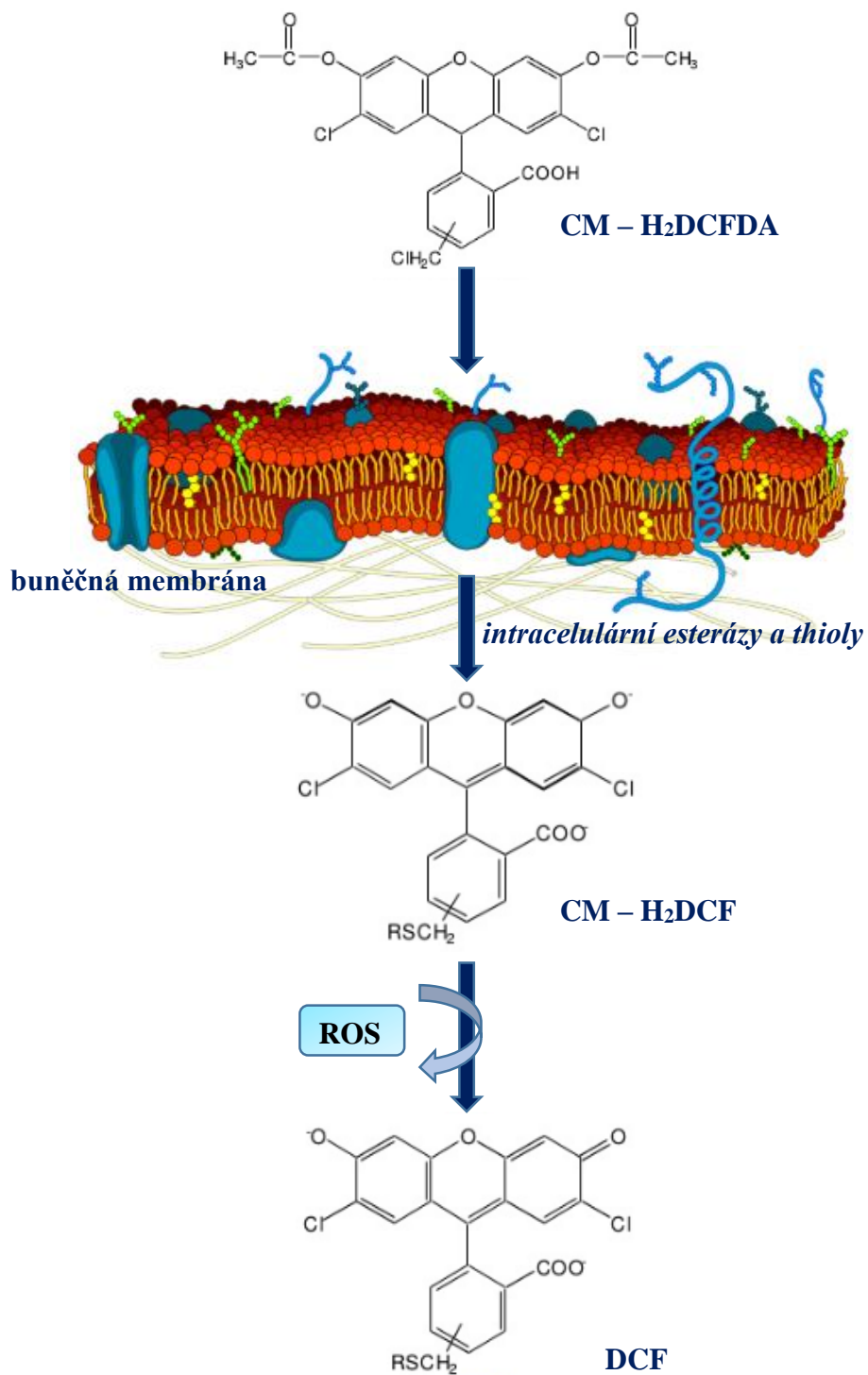
Buňky s PS/TPP-NP v příslušných koncentracích byly inkubovány v termoboxu při 37 °C a 5 % CO₂. Po 24 h inkubaci bylo DMEM nahrazeno fosfátovým pufrům - Phosphate Buffered Saline (PBS) a buňky byly ozářeny určenou plošnou hustotou energie LED zdrojem s vlnovou délkou 414 nm při pokojové teplotě. Po ozáření bylo PBS odstraněno a k buněčné kultuře přidáno čerstvé DMEM a 96-jamkové destičky byly inkubovány dalších 24 h v termoboxu. Médium bylo odstraněno a k buňkám bylo přidáno 50 µl 0,5 mg/ml MTT (rozpuštěno v PBS) a buňky byly inkubovány další 4 hod při 37 °C a 5 % CO₂. Následně bylo použito 100 µl DMSO k rozpuštění fialových krystalů formazanu. Absorbance roztoku byla určena měřením v 96-jamkové čtečce mikroděstiček (SYNERGY™ HT) při 570 nm. Jako negativní kontroly byly použity tři 96-jamkové destičky (ošetřené buňky PS/TPP-NP bez ozáření). Naměřená data byla vypočtena

pomocí softwaru Phototox verze 2.0. Tmavá fototoxicita byla naměřena paralelně za stejných podmínek bez ozáření.

4.5.2 PRODUKCE ROS

Detekce ROS byla zprostředkována fluorescenční sondou chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetátu (CM-H₂DCFDA). Po vstupu CM-H₂DCFDA do buňky dochází pomocí intracelulárních esteráz a thiolů k redukci na bezbarvý CM-H₂DCF. Ten je v důsledku přítomnosti ROS (vznikají po ozáření) oxidován za vzniku DCF (zelený fluorescenční chlorofor). Měření vzniklé fluorescence tedy současně měří i produkci ROS. Excitační vlnová délka CM-H₂DCFDA sondy je 495 nm a emisní vlnová délka 522 nm (Obr 17).

Studované buňky byly inkubovány s PS/TPP-NP při teplotě 37 °C a 5 % CO₂ v termoboxu. Po inkubaci (24 h) bylo DMEM nahrazeno roztokem 10 μM fluorescenční sondy CM-H₂DCFDA a následovala 30 min inkubace. Vznik ROS byl měřen pomocí mikrodestičkového spektrofluorimetru SYNERGY™ HT bezprostředně po ozáření.

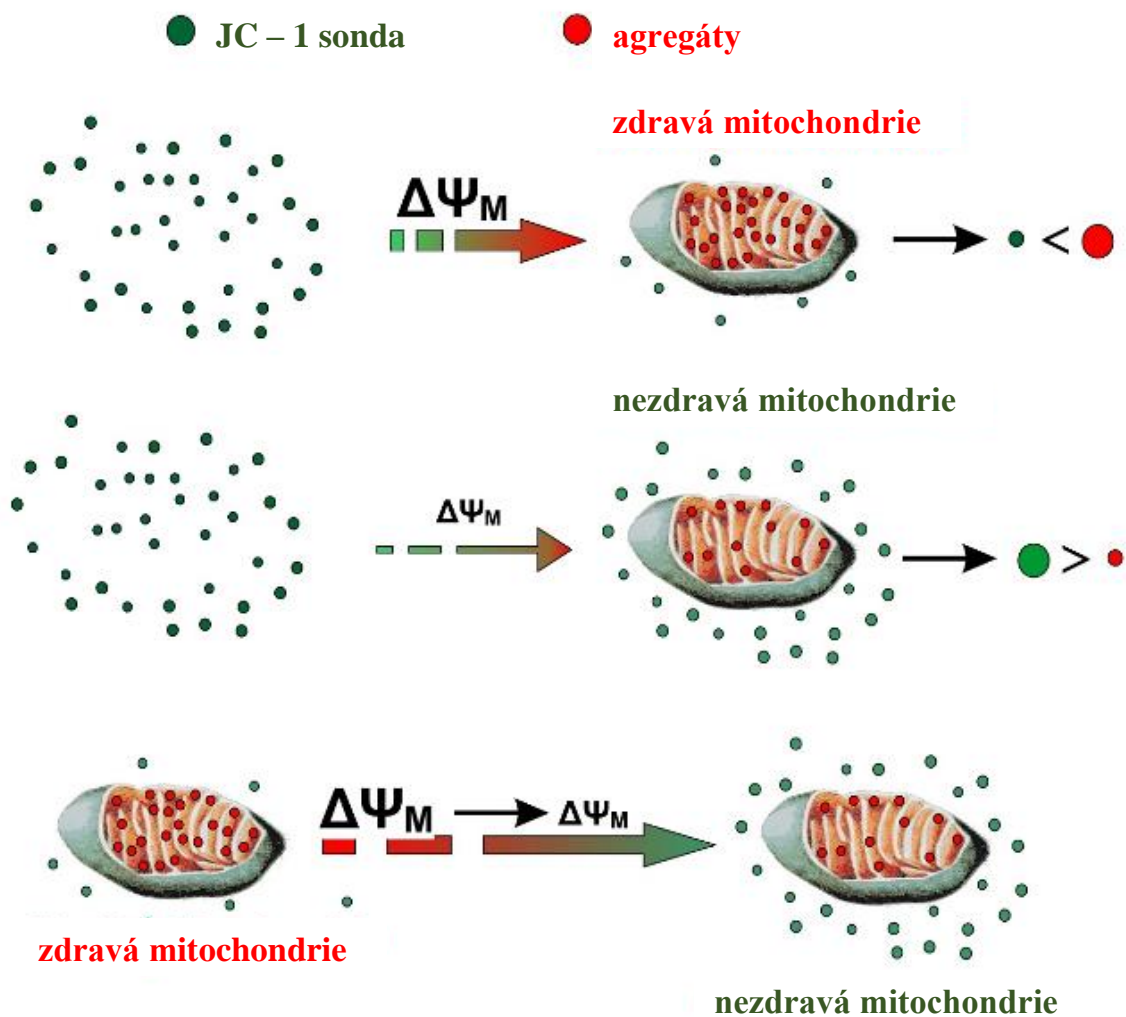


Obr 17.: Grafické znázornění ROS detekce (převzato a upraveno <https://www.biotek.com/resources/white-papers/an-introduction-to-reactive-oxygen-species-measurement-of-ros-in-cells/>).

4.5.3 MITOCHONDRIÁLNÍ MEMBRÁNOVÝ POTENCIÁL

K testování mitochondriálního membránového potenciálu se používá lipofilní kationtové fluorescenční barvivo jodid 5,5,6,6'-tetrachlor-1,1', 3,3'-tetraethylbenzimidazolylkarbocyaninu (JC-1). Ve zdravých buňkách JC-1 vstupuje do aktivovaných mitochondrií a vytváří agregáty, které mění fluorescenční vlastnost JC-1 barviva. Poškozené nebo apoptotické buňky mají nízký mitochondriální membránový potenciál. JC-1 nevytváří agregáty v mitochondriích s nízkým membránovým potenciálem a zůstává v monomerní formě a vykazuje zelenou fluorescenci, na rozdíl od agregátů produkujících intenzivní červenou fluorescenci. Čím vyšší je tedy poměr červené a zelené fluorescence, tím vyšší je polarizace mitochondriální membrány.

Změny mitochondriálního membránového potenciálu byly studovány pomocí fluorescenčního kationtového napětově závislého barviva JC-1. Po 24 h inkubaci, kdy byly buněčné linie vystaveny působení PS (TMPyP a ZnTPPS₄)/TPP-NP byly buňky ozářeny světelným zdrojem na bázi LED s vlnovou délkou 414 nm. Ihned po ozáření byly buňky inkubovány s JC-1 (2 µg/ml) po dobu 20 min v termoboxu a poté byly promyty PBS. Z následně naměřené fluorescence byl stanoven poměr zelená/červená fluorescence (Obr 18).



Obr 18.: Snížení aktivity a dysfunkce mitochondrií úzce souvisí s rakovinou, stárnutím a neurodegenerativními onemocněními. Tento fakt umožňuje použít mitochondriální membránový potenciál jako parametr k měření stavu mitochondrií (převzato a upraveno Sivandzade et al., 2019).

4.6 ZOBRAZENÍ MIKROSKOPIÍ ATOMÁRNÍCH SIL

4.6.1 PŘIPRAVA VZORKU S TMPyP A ZnTPPS₄

Buňky HeLa (2×10^5) byly vysety do Petriho misek o průměru 35 mm (Willco, Amsterdam, Nizozemsko) obsahující 2 ml kultivačního média DMEM. Buňky byly inkubovány s TMPyP/ZnTPPS₄ o koncentraci $5 \mu\text{M}$ po dobu 24 h. Poté byly buňky promyty PBS a ozářeny ve 2 ml PBS s plošnou hustotou energie 5 a 25 J/cm^2 . PBS pak

bylo nahrazeno 2 ml čerstvého DMEM a buňky byly uchovávány v termoboxu. Po 24 h bylo provedeno AFM zobrazení.

4.6.2 PŘIPRAVA VZORKU S TPP-NP

Do Petriho misek o průměru 35 mm s 2 ml DMEM byly vysety buňky HeLa a G361 (2×10^5). Nádorové buňky byly inkubovány 24 h s TPP-NP o koncentraci $0,09 \times 10^{13}$ NP/ml. Buňky s testovaným vzorkem byly nejprve promyty PBS a následně ozářeny po dobu 1 min ve 2 ml PBS. Petriho misky s buňkami v DMEM byly inkubovány dalších 24 h, poté byly buňky zobrazeny AFM.

4.6.3 AFM ZOBRAZENÍ

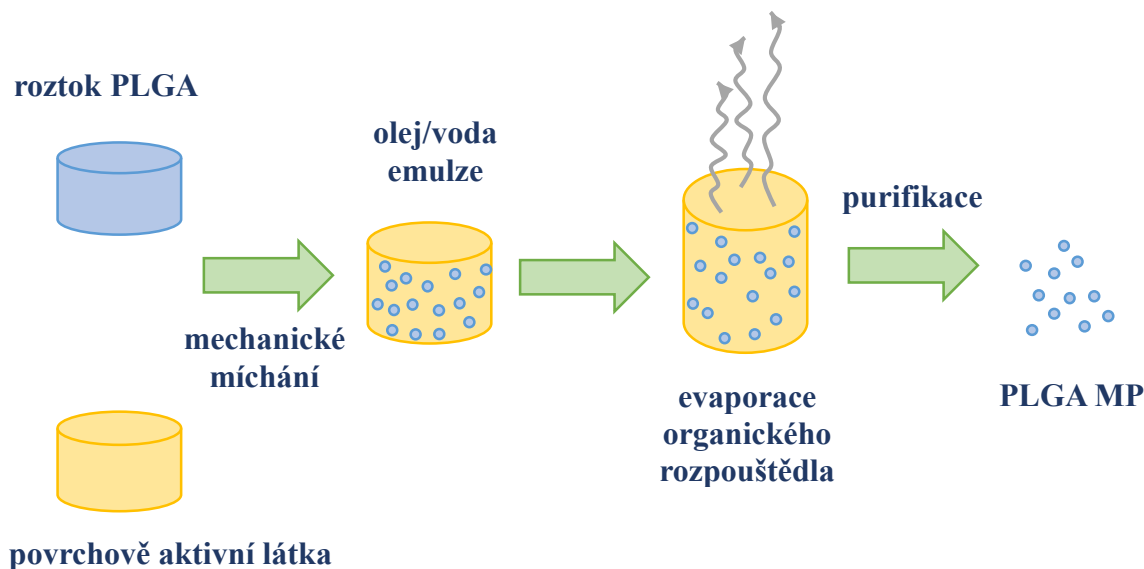
Mikroskop atomárních sil Bioscope Catalyst (Bruker, Karlsruhe, Německo) byl použit k zobrazení topografie povrchu sulfonovaného polystyrenu-NP s hydrofobním TPP a změn v topografii povrchu fotodynamicky ošetřených nádorových buněk linií. Buňky byly zobrazovány při frekvenci skenování 0,1 Hz s velikostí skenu $100 \times 100 \mu\text{m}$. Použili jsme ScanAssyst-FLUID + DNP-10-B hrot a pružinovou konstantu $0,12 \text{ Nm}^{-1}$ na nitridové páce. Snímky povrchu AFM byly získány v bezkontaktním režimu a následně byly skeny upraveny v programu Gwyddion 2.40.

4.7 MIKROČÁSTICE PLGA

4.7.1 SYNTÉZA MIKROČÁSTIC PLGA

Mikročástice PLGA 50:50 byly připraveny metodou dvojité emulze (olej/voda). Nejříve bylo 40 mg PLGA polymeru smícháno s 0,8 ml ethylacetátu a následně bylo přidáno 1,6 ml 1 % PVA (obsahující 139 μl ethylacetátu). Pro dosažení homogenní směsi byl pro smíchání použit vysokorychlostní homogenizátor (IKA T25 digital ULTRA TURRAX) po dobu 30 s při 3400 ot/min. Do získané mléčné emulze bylo přidáno 200 μl ethylacetátu a 8 ml destilované vody. Tato suspenze byla míchána na magnetické

míchače přes noc, čímž došlo k odpaření organického rozpouštědla. Vzniklé mikročástice byly druhý den třikrát promyty v destilované vodě pomocí centrifugace (5415R eppendorf) 10 min, 1000 ot/min (Obr 19).



Obr 19.: Grafické znázornění přípravy PLGA MP metodou dvojité emulze (olej/voda).

4.7.2 POVRCHOVÁ ÚPRAVA MIKROČÁSTIC PLGA

K úpravě povrchového náboje PLGA MP byly použity tři polymery: poly-L-lysin (PLL), chitosan a polydiallyldimethylamonium chlorid (polyDDA). Mikročástice PLGA byly rozsuspendovány do roztoků PLL, chitosanu a polyDDA a ponechány za stálého míchání v orbitálním inkubátoru 30 min při 25 °C (92 ot/min). Každý polymer byl testován při třech koncentracích: 0,005 %; 0,0025 % a 0,001 %). Poté byly PLGA MP odděleny centrifugací (4000 ot/min, 10 min, 22 °C) od nenávaného polymeru, který zůstal v supernatantu. Pelet obsahující modifikované PLGA MP byl rozsuspendován v Mili-Q vodě a uchován v lednici.

4.7.3 CHARAKTERIZACE MIKROČÁSTIC PLGA

Bezprostředně po syntéze byl stanoven povrchový náboj částic pomocí dynamického rozptylu světla (DLS, Zetasizer Nano ZS90). Za tímto účelem byl pelet PLGA MP zředěn 1:1000 v Milli-Q vodě. Měření byla prováděna ve skládacích kapilárních kyvetách (Zetasizer Nano, Malvern) za použití přístroje Malvern Zetasizer Nano ZS90 pracujícího s vlnovou délkou světla 633 nm a pevným úhlem rozptylu 90°.

4.7.4 ANTIBAKTERIÁLNÍ TESTY

Mikročástice PLGA 50:50 o koncentraci 1% byly smíchány s bakteriálním kmenem (10^3 CFU/ml) v poměru 1:1. Následně bylo 100 μ l vzorku umístěno na agarovou plotnu a rozetřeno L-kličkou. Destičky byly inkubovány po dobu 24 h ve tmě při 37°C, aby mohly jednotlivé bakterie růst a tvořit kolonie, poté byla provedena kvantitativní analýza. Počet vyrostlých bakterií na jednotlivých plotnách byl spočítán, finální počet bakterií byl vztažen ke kontrole a byl procentuálně vyjádřen

4.8 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT

Každý vzorek byl testován devětkrát (TMPyP a ZnTPPS₄)/dvanáctkrát (TPP-NP), hodnoty představují průměr \pm standardní odchylku (SD) z 9/12 opakování. Ke zjištění rozdílu v účinnosti PS a TPP-NP byl proveden t-test na hladině statistické významnosti 0,05. Pro statistické zpracování byla použita Statistika SPSS pro Windows verze 23.0 (Armonk, NY, USA: IBM Corp). Hladina významnosti testu je označena hvězdičkami: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0.001$.

4.9 OSTATNÍ MATERIÁL

4.9.1 ROZTOKY A MÉDIA

- kultivační médium DMEM = práškové DMEM - (D 5523-10L, Sigma); 500 ml 10% fetálního séra - (F 7524, Sigma); 100 ml 1% penicilin/streptomycin - (P 4333, Sigma); 100 ml 1% glutaminu - (G 7513, Sigma)
- PBS 10×, pH 7,4 = 80 g NaCl; 2 g KCl; 14,4 g Na₂HPO₄; 2,4 g KH₂PO₄; destilovaná voda do 1 litru + HCl k úpravě pH
- DMSO

4.9.2 KOMERČNÍ KITY

- MTT - (M5655, Sigma Aldrich)
- CM-H₂DCFDA - (C6827, Invitrogen)
- JC – 1 - (Sigma Aldrich)

4.9.3 LABORATORNÍ PŘÍSTROJE + PROGRAMY

- CO₂ inkubátor (BioTek, USA)
- LED diodový zářič (národní patent CZ 302829 B6)
- Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (BioTek, USA)
- Phototox Version 2.0 software (ZEBET, Germany)
- AFM - Bioscope Catalyst (Bruker, Karlsruhe, Německo)
- Program Gwydion 2.40
- Laboratorní váhy
- DLS, Zetasizer Nano ZS90
- vysokorychlostní homogenizátor (IKA T25 digital ULTRA TURRAX)
- centrifuga (5415R Eppendorf)

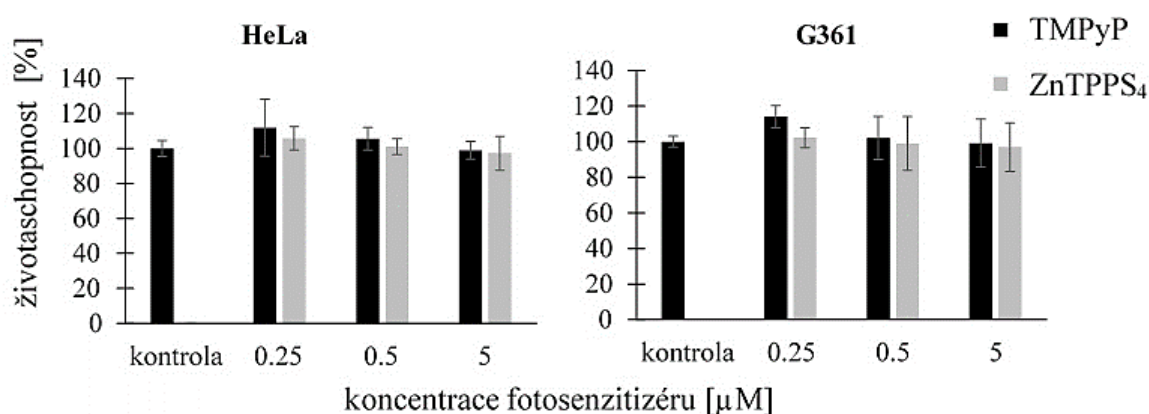
- optický mikroskop (Leica micro systém, Německo) s digitální kamerou Leica DFC 295

5 VÝSLEDKY

5.1 *IN VITRO* STUDIE FOTODYNAMICKÉHO EFEKTU PORFYRINOVÝCH FOTOTSENZITIZÉRŮ TMPyP A ZnTPPS₄ NA NÁDOROVÉ LINIE

5.1.1 CYTOTOXICITA

Cytotoxicita bez přístupu světla porfyriinových PS byla hodnocena na HeLa a G361 buňkách za použití tří koncentrací PS 0.25, 0.5 a 5 μM . Ani u jednoho z testovaných PS nebyly zaznamenány signifikantní změny buněčné viability. Naměřené hodnoty životaschopnosti se pohybovaly v rozmezí 97-114%. Výsledky jsou zobrazeny na Obr 20.

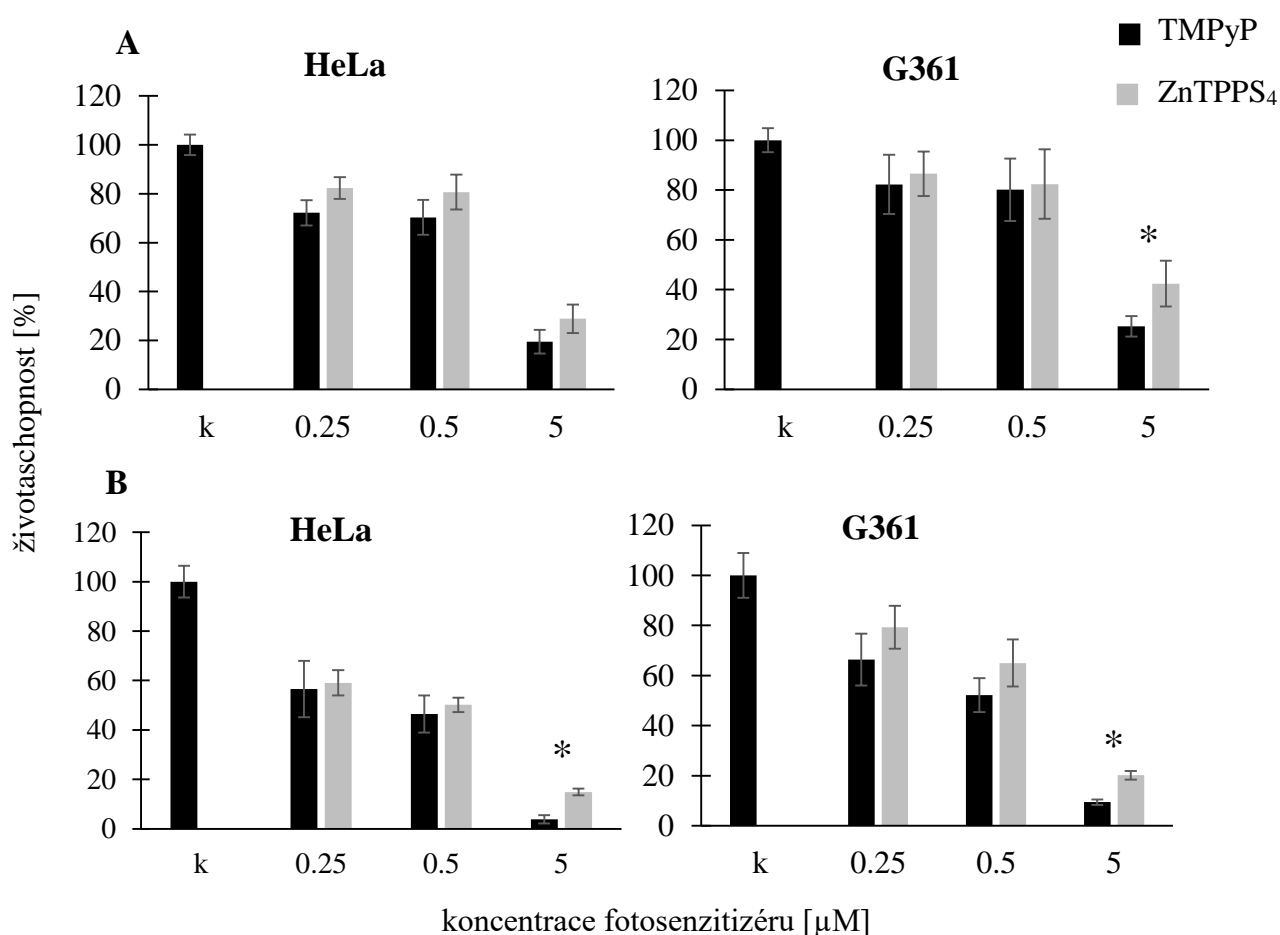


Obr 20.: Vyhodnocení tmavé cytotoxicity. Každý sloupec v grafu představuje průměrnou hodnotu vypočtenou z devíti různých měření se stejnou koncentrací PS.

5.1.2 MTT TEST

Životaschopnost buněk po ošetření TMPyP a ZnTPPS₄ v kombinaci s ozářením byla stanovena testem MTT. Nejvyšší účinnost obou PS byla pozorována u buněk HeLa

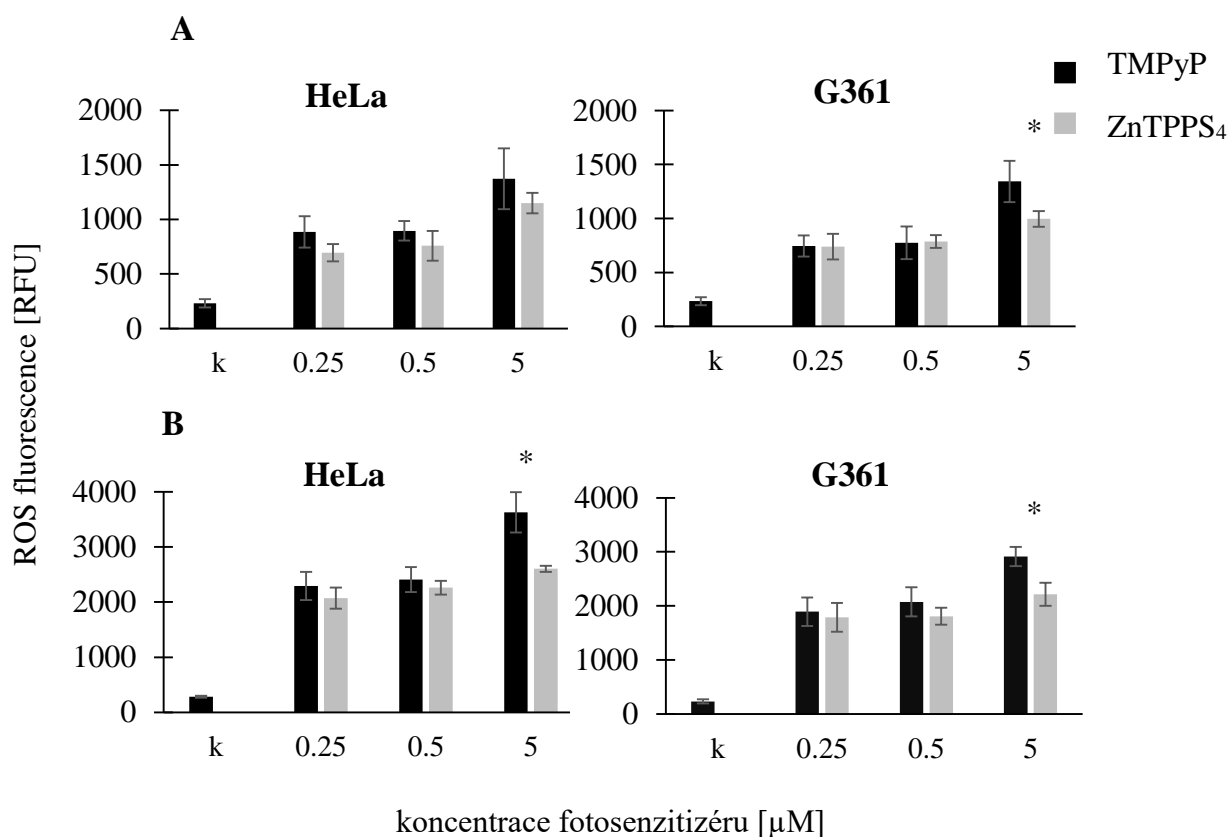
a G361 po použití koncentrace 5 μM a plošné hustoty energie 25 J/cm^2 . Životaschopnost buněk HeLa se snížila na 3,8% po ošetření TMPyP a na 15% u ZnTPPS₄. Po aplikaci TMPyP na buňky G361 bylo zaznamenána 9,4% viabilita a 20% po aplikaci ZnTPPS₄. Obecně platí, že čím vyšší koncentrace PS, tím nižší životaschopnost buněk. Nižší životaschopnost buněk HeLa ve srovnání s G361 byla pozorována při všech testovaných koncentracích pro oba použité PS. Výsledky jsou uvedeny na Obr 21A (po ozáření plošnou hustotou energie 5 J/cm^2) a 21B (s plošnou hustotou energie 25 J/cm^2).



Obr 21.: Závislost životaschopnosti buněk HeLa a G361 na koncentraci TMPyP a ZnTPPS₄ byla stanovena MTT testem. Použitá plošná hustota energie byla 5 J/cm^2 (A) a 25 J/cm^2 (B). Kontrola představuje buňky ozářené bez PS (negativní kontrola). Každý sloupec v grafu reprezentuje průměrnou hodnotu vypočtenou z devíti různých vzorků ošetřených stejnou koncentrací PS a plošnou hustotou energie. Statisticky významné výsledky jsou označeny hvězdičkou * ($p < 0,05$).

5.1.3 PRODUKCE ROS

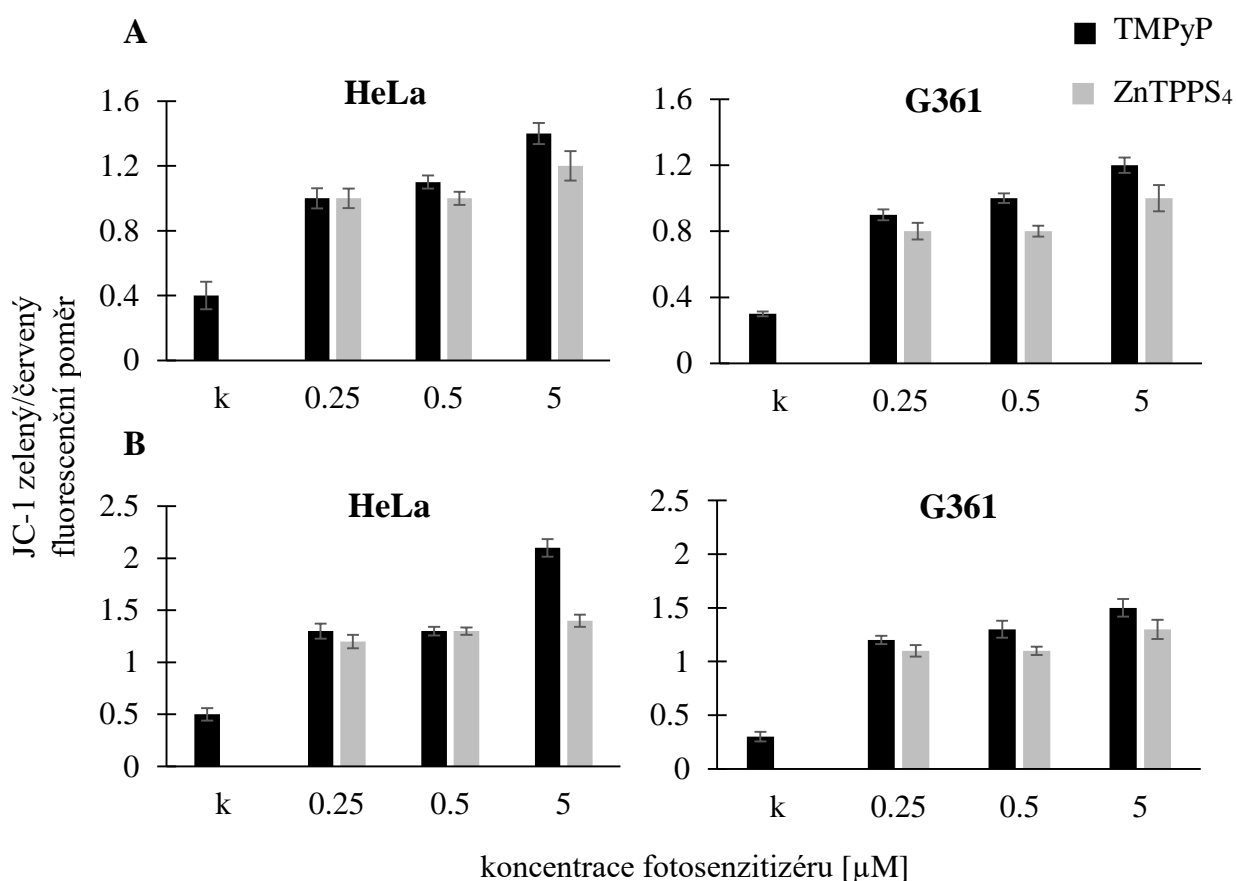
Produkce ROS u fotosenzitizérů TMPyP a ZnTPPS₄ byla stanovena pomocí fluorescenční sondy CM-H₂DCFDA. Nejvyšší produkce ROS nastala u obou testovaných buněčných linií při plošné hustotě energie 25 J/cm² a koncentraci 5 μM. Produkce ROS v buňkách HeLa a G361 indukovaná oběma PS je znázorněna na Obr 22A (s plošnou hustotou energie 5 J/cm²) a 22B (s plošnou hustotou energie 25 J/cm²).



Obr 22.: Závislost produkce ROS u HeLa a G361 buněk na koncentraci TMPyP a ZnTPPS₄. Měření ROS bylo provedeno bezprostředně po ozáření s plošnou hustotou energie 5 J/cm² (A) a 25 J/cm² (B). Kontrola představuje buňky ozářené bez PS (negativní kontrola). Data jsou uvedena jako průměr ± SD z devíti nezávislých měření. Statisticky významné výsledky jsou označeny hvězdičkou * ($p < 0,05$).

5.1.4 MITOCHONDRIÁLNÍ MEMBRÁNOVÝ POTENCIÁL

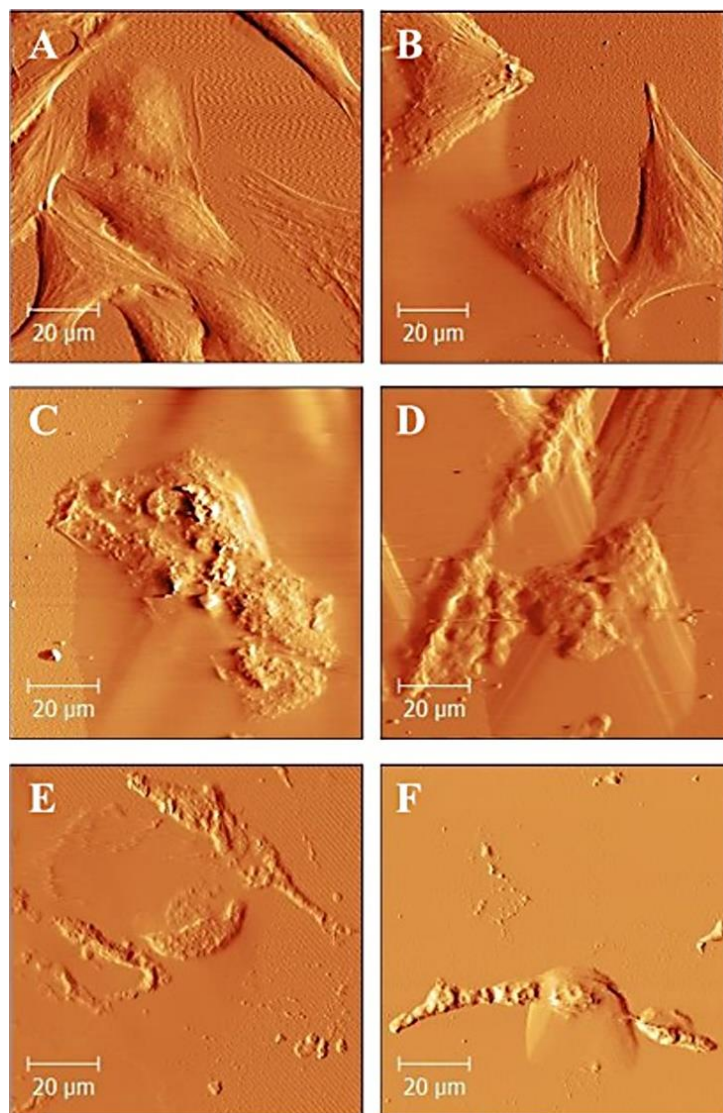
Změny mitochondriálního membránového potenciálu byly stanoveny fluorescenční sondou JC-1. Výsledky jsou vyjádřeny jako poměr fluorescence zelená/červená. Čím vyšší je fluorescenční poměr JC-1, tím vyšší je poškození buněk. Výsledky ukázaly rostoucí hodnoty poměru fluorescence zelená/červená v závislosti na rostoucí koncentraci PS u obou buněčných linií. Výsledky jsou uvedeny na Obr 23A (po ozáření plošnou hustotou energie 5 J/cm²) a 23B (po ozáření plošnou hustotou energie 25 J/cm²).



Obr 23.: Vliv porfyrinových PS na mitochondriální membránový potenciál u HeLa a G361 buněk. Použitá plošná hustota energie byla 5 J/cm² (A) a 25 J/cm² (B). Kontrola představuje ozáření buňky v nepřítomnosti PS (negativní kontrola). Data jsou uvedena jako ± SD devíti nezávislých měření. Statisticky významné výsledky jsou označeny hvězdičkou * ($p < 0,05$).

5.1.5 AFM ZOBRAZENÍ

Na základě výše uvedených výsledků testů (MTT, ROS a MMP) jsme pro zobrazení topografických změn před a po PDT (5 a 25 J/cm^2) vybrali buněčnou kulturu HeLa a koncentraci $5 \mu\text{M}$ u obou PS. Obrázek 24A představuje HeLa buňky s fotosenzitizérem TMPyP bez ozáření, obrázek 24B zobrazuje buňky s ZnTPPS₄ bez ozáření. V obou případech pozorujeme neporušené buňky s typicky protaženým tvarem. Obrázky 24C (TMPyP) a 24D (ZnTPPS₄) znázorňují buňky po 5 J/cm^2 PDT. V obou případech došlo k rozrušení buněčné stěny a buňky ztrácí svůj původní tvar. Buňky HeLa po 25 J/cm^2 PDT jsou zobrazeny na obrázcích 24E (TMPyP) a 24F (ZnTPPS₄). Na základě AFM snímků je vidět, že po ozáření plošnou hustotou energie 25 J/cm^2 dochází k úplné destrukci buněk.

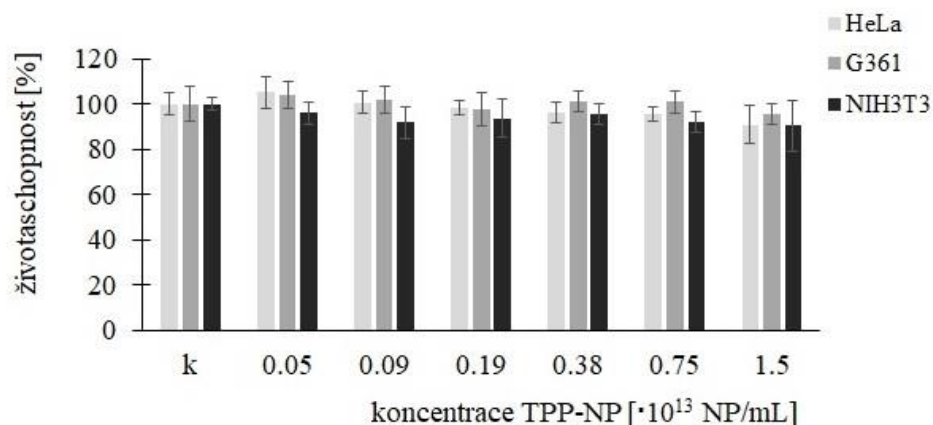


Obr 24.: *Nádorové buněčné linie byly analyzovány pomocí AFM 2D topografie. HeLa buňky s TMPyP (A), ZnTPPS₄ (B) byly zobrazeny před terapií. Sken buněk po ošetření TMPyP (C), ZnTPPS₄ (D) byl pořízen s koncentrací 5 μM a plošnou hustotou energie 5 J/cm². Taktéž byla zobrazena buněčná linie HeLa po ošetření TMPyP (E), ZnTPPS₄ (F) o koncentraci 5 μM a plošnou hustotou energie 25 J/cm². Všechny snímky byly pořízeny se skenovanou oblastí: 100x100 μm. Obrázky byly zpracovány v programu Gwydion 2.40.*

5.2 BIOLOGICKÉ HODNOCENÍ FOTODYNAMICKÉHO ÚČINKU ZPROSTŘEDKOVANÉHO TPP-NP

5.2.1 CYTOTOXICITA

Cytotoxicita TPP-NP bez přístupu světla (Obr 25) byla hodnocena na buňkách NIH3T3, HeLa a G361. Použité koncentrace vzorků byly 0,05; 0,09; 0,19; 0,38; 0,75 a $1,5 \times 10^{13}$ NP/ml. U žádné z testovaných koncentrací nebyly pozorovány významné změny životaschopnosti. Naměřená viabilita po aplikaci TPP-NP se u všech použitých buněčných kultur pohybovala v rozmezí 90-105%.

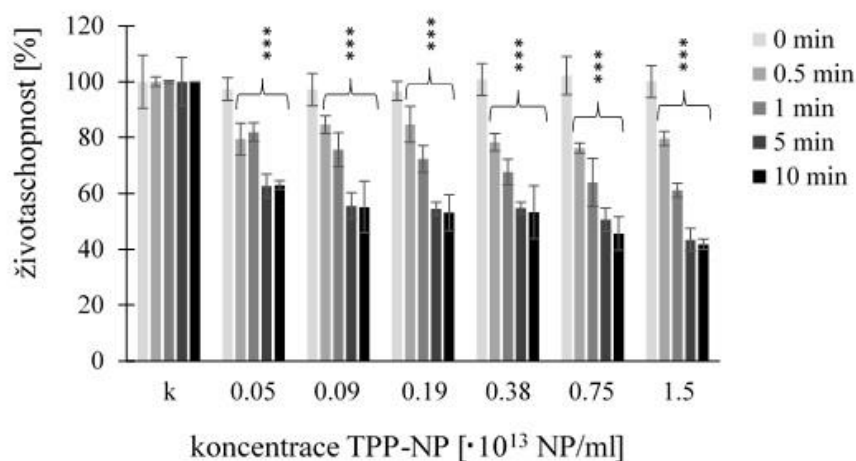


Obr 25.: Měření TPP-NP tmavé cytotoxicity. Každý sloupec v grafu představuje průměr \pm SD hodnota vypočítaná z dvanácti opakování (triplety čtyř nezávislých měření) ošetřených stejnou koncentrací TPP-NP a dobu ozařování. Kontrola K představuje buňky bez aplikace TPP-NP.

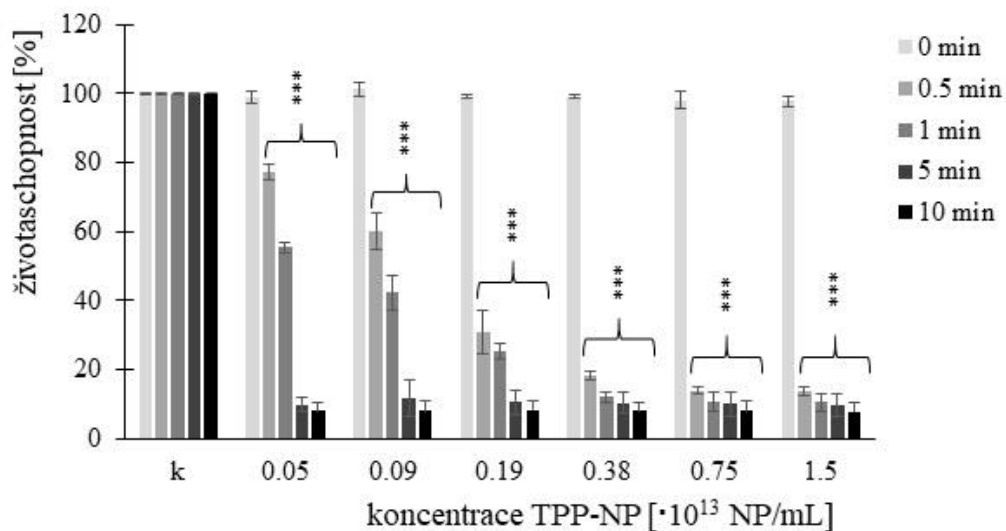
5.2.2 MTT TEST

Obecně lze říci, že u všech vybraných buněčných linií a testovaných kombinací koncentrace vzorku a plošné hustoty energie byly pozorovány signifikantní změny viability. U NIH3T3 (Obr 26) jsme pozorovali postupný pokles životaschopnosti se zvyšující se koncentrací, viabilita po 5 a 10 min (respektive $16,2$ a $32,4$ J/cm²) ozařování při stejné koncentraci byla srovnatelná. Podobně tomu bylo i v případě buněk HeLa (Obr 27), po ozáření 0,5 a 1 min při koncentracích $0,05$ - $0,75 \times 10^{13}$ NP/ml klesala

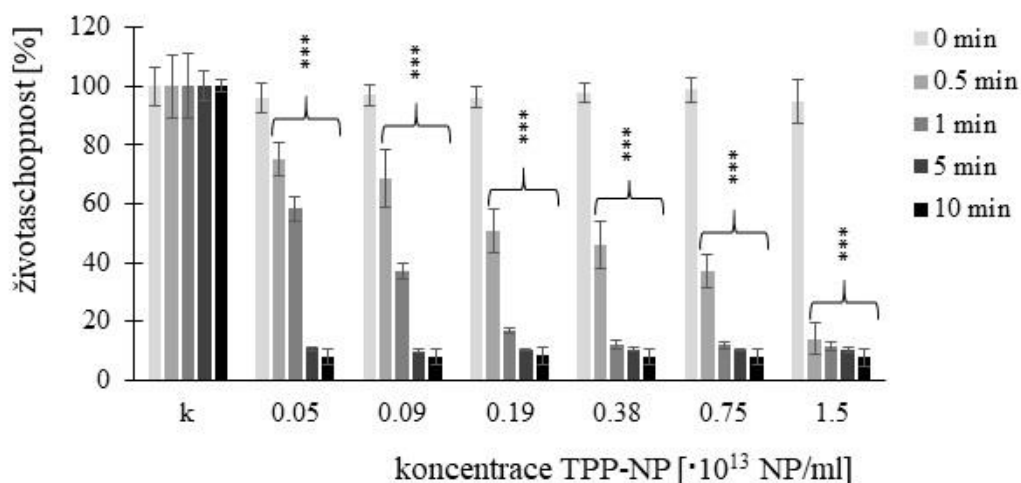
životaschopnost buněk s rostoucí koncentrací TPP-NP. Oproti tomu, tento trend nebyl pozorován při vyšších ozařovacích časech 5 a 10 min. Cytotoxicita u buněk G361 (Obr 28) se zvyšovala s rostoucí koncentrací TPP-NP po 0,5 min (respektive 1,6 J/cm²) ozáření a stejný trend byl pozorován po 1 min (respektive 3,2 J/cm²) ozařování pro koncentrace v rozmezí 0,05-0,38×10¹³ NP/ml. Po 5 a 10 min ozařování nebyl tento trend pozorován vůbec, podobně jako u buněk HeLa. Nejméně citlivou buněčnou linií vůči TPP-NP byla nenádorová NIH3T3 v porovnání s oběma testovanými nádorovými liniemi.



Obr 26.: Závislost životaschopnosti buněk NIH3T3 na koncentraci TPP-NP. Závislost buněk na koncentraci TPP-NP byla stanovena pomocí MTT testu. Každý sloupec v grafu představuje průměrnou hodnotu \pm SD vypočtenou z dvanácti opakování (trojice čtyř nezávislých měření) ošetřených stejnou koncentrací TPP-NP a stejnou dobou ozařování. Kontrola představuje buňky ozařované bez TPP-NP (negativní kontrola) a její hodnota byla stanovena jako 100 %. TPP-NP byly porovnány s kontrolou; statisticky významné výsledky jsou označeny hvězdičkou a hladina významnosti testu je označena jako, *** $p < 0,001$.



Obr 27.: Životaschopnost nádorové buněčné linie HeLa ošetřené šesti různými koncentracemi TPP-NP s dobou ozařování 0,5, 1, 5 a 10 min. Každý sloupec v grafu představuje průměrnou hodnotu \pm SD vypočtenou z dvanácti opakování (trojice čtyř nezávislých měření) se stejnou koncentrací TPP-NP a stejnou dobou ozařování. Kontrola představuje negativní kontrolu (ozařené buňky bez TPP-NP) a její hodnota byla stanovena jako 100%. TPP-NP byly porovnávány s kontrolou; statisticky významné výsledky jsou označeny hvězdičkou a hladinou významnosti testu je označena jako *** $p < 0,001$.

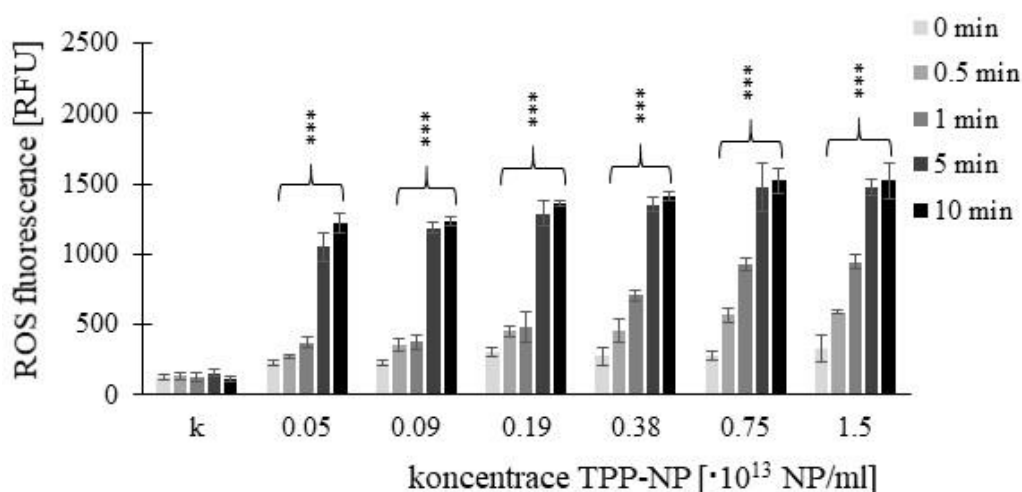


Obr 28.: U nádorové buněčné linie G361 byla hodnocena životaschopnost. Buňky byly ošetřeny šesti různými TPP-NP a ozařovány po dobu 0,5, 1, 5 a 10 min. Každý sloupec v grafu představuje průměrnou hodnotu \pm SD vypočtenou z dvanácti opakování (trojice opakování čtyř nezávislých měření) ošetřených stejnou koncentrací TPP-NP a délkou ozařování. Kontrola představuje negativní kontrolu (ozařované buňky bez TPP-NP) a její hodnota byla stanovena 100%. TPP-NP

byly porovnávány s kontrolou; statisticky významné výsledky jsou označeny hvězdičkou a hladina významnosti testu je označena jako *** $p < 0,001$.

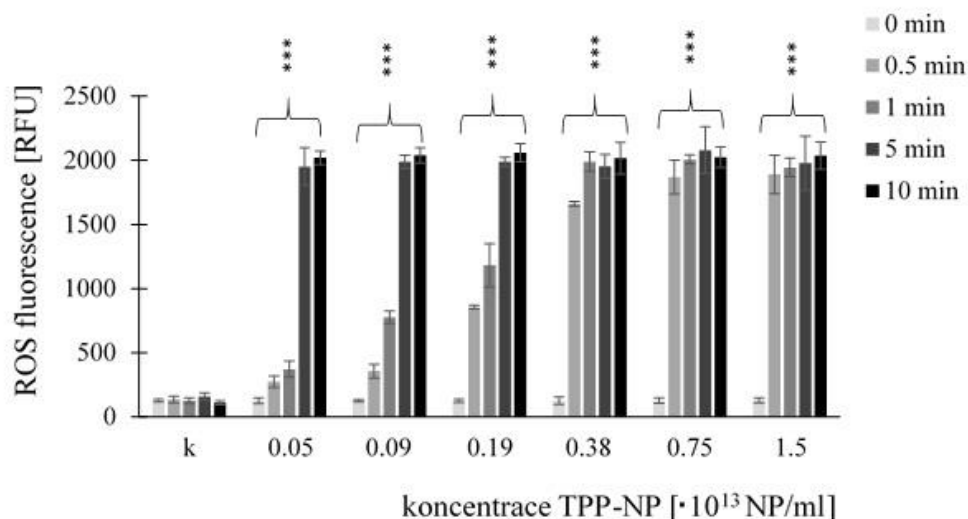
5.2.3 PRODUKCE ROS

Produkce ROS TPP-NP byla ověřována pomocí fluorescenční sondy CM-H₂DCFDA (obecný indikátor oxidačního stresu). U všech buněčných kultur byly pozorovány významné změny v produkci ROS po ozáření. Trend zvyšující se produkce ROS s rostoucí koncentrací a dobou ozařování byl pozorován u všech pozorovaných kombinací koncentrace a časů ozařování pouze u nenádorové linie NIH3T3 (Obr 29). U nádorové linie HeLa (Obr 30) byl tento trend pozorován po ozáření v časech 0,5 a 1 min při koncentracích v rozmezí $0,05-0,75 \times 10^{13}$ NP/ml, resp. $0,05-0,38 \times 10^{13}$ NP/ml. U buněk G361 (Obr 31) se po ozařování po dobu 0,5 min jsme pozorovali rostoucí produkci ROS při všech testovaných koncentracích; po ozařování po dobu 1 min byl trend pozorován v rozmezí $0,05-0,38 \times 10^{13}$ NP/ml. U obou nádorových linií jsme tento trend již nepozorovali po 5 a 10 min ozáření. Nejvyšší produkce ROS byla pozorována u nádorové linie HeLa po 10 min ozařování.

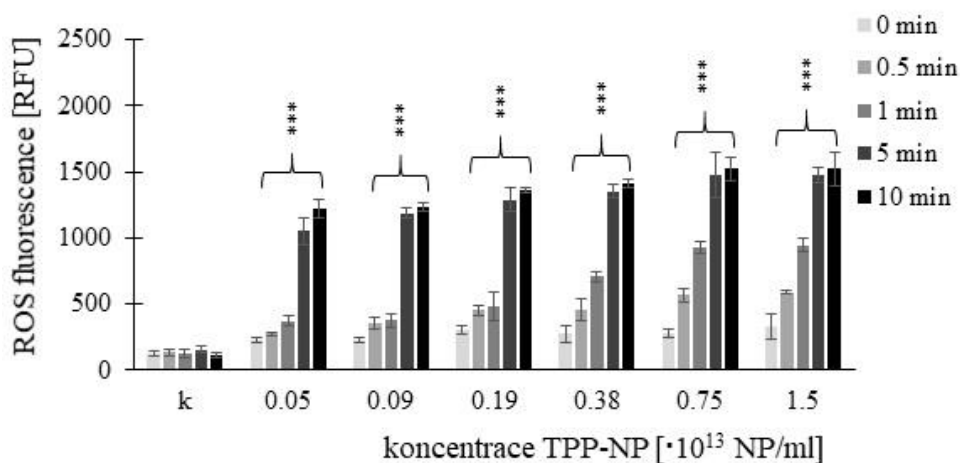


Obr 29.: Závislost produkce ROS v buňkách NIH3T3 na koncentraci TPP-NP byla měřena bezprostředně po ozáření. Kontrola představuje buňky ozářené bez TPP-NP (negativní kontrola).

Údaje jsou prezentovány jako průměr \pm SD z dvanácti opakování. (trojice čtyř nezávislých měření). TPP-NP byly porovnávány s kontrolou; statisticky významné výsledky jsou označeny hvězdičkou a hladina významnosti testu je označena jako *** $p < 0.001$



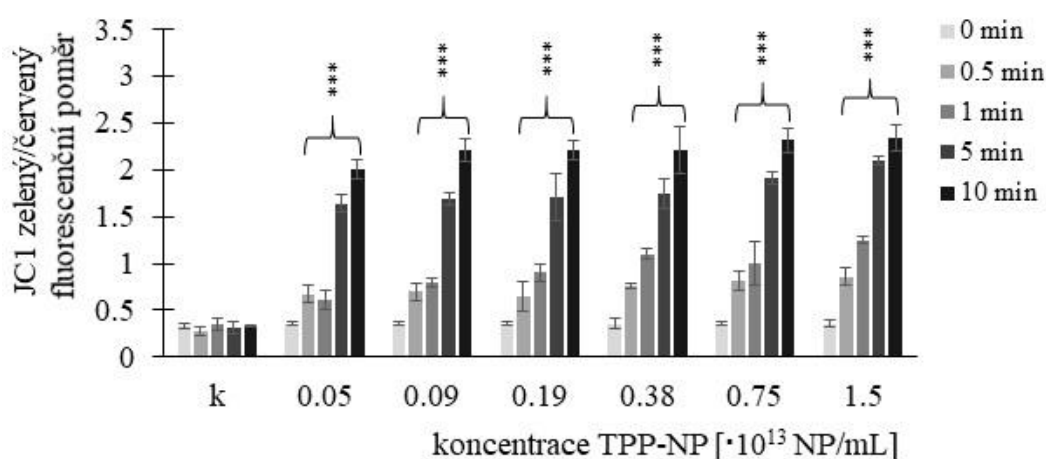
Obr 30.: Hodnota ROS fluorescence byla stanovena u nádorové buněčné linie HeLa. Buňky byly ošetřeny vysoce sulfonovaným polystyrenovým NP s enkapsulovaným TPP. Měření ROS bylo provedeno bezprostředně po ozáření. Kontrola představuje negativní kontrolu (ozářené buňky bez TPP-NP) a její hodnota byla stanovena jako 100 %. Výsledky jsou prezentovány jako průměr \pm SD z dvanácti opakování (trojic čtyř nezávislých měření). TPP-NP byly porovnávány s kontrolou; statisticky významné výsledky jsou označeny hvězdičkou a hladina významnosti testu je označena jako *** $p < 0,001$.



Obr 31.: Fluorescence ROS buněk G361 ošetřených TPP-NP a ozářených po dobu 0,5, 1, 5 a 10 min. Měření ROS bylo provedeno bezprostředně po ozáření. Kontrola představuje buňky ozářené bez TPP-NP (negativní kontrola). Údaje jsou prezentovány jako průměr ± SD z dvanácti opakování (trojice čtyř nezávislých měření). TPP-NP byly porovnány s kontrolou; statisticky významné výsledky jsou označeny hvězdičkou a úroveň významnosti testu je označena jako *** $p < 0,001$.

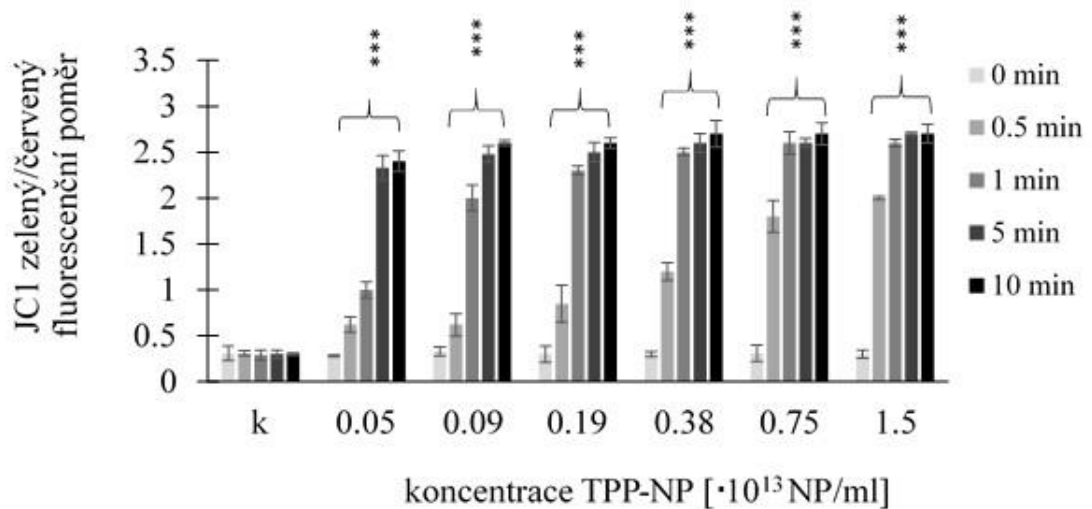
5.2.4 MITOCHONDRIÁLNÍ MEMBRÁNOVÝ POTENCIÁL

Byl zjištěn zvyšující se poměr zelené/červené fluorescence v závislosti na rostoucí koncentraci TPP-NP při všech ozařovacích časech a testovaných koncentracích v nenádorové linii NIH3T3 (Obr 32). Tento trend byl pozorován u buněk HeLa (Obr 33) pouze po ozáření 0,5 a 1 min při koncentracích $0,05-0,38 \times 10^{13}$ NP/ml, resp. $0,05-0,75 \times 10^{13}$ NP/ml. U buněk G361 (Obr 34) po ozáření 0,5 min se hodnota poměru zelené/červené fluorescence zvýšila u všech testovaných koncentrací, zatímco po 1 min byl tento trend pozorován v rozmezí $0,05-0,75 \times 10^{13}$ NP/ml. Po ozáření 5 a 10 min nebyla pozorována koncentrační závislost, tj poměr zelené/červené fluorescence byl téměř totožný pro všechny testované koncentrace.

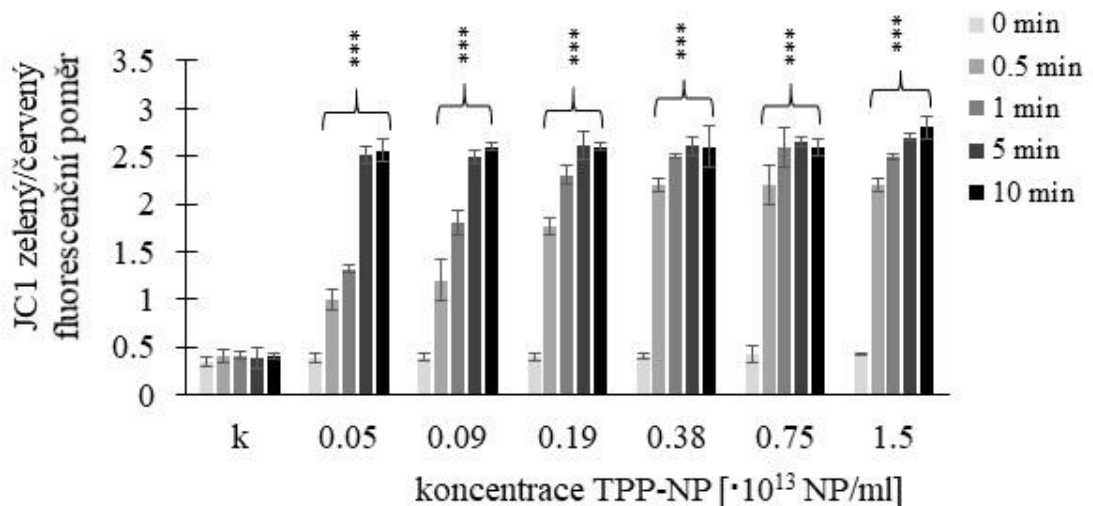


Obr 32.: Vliv TPP-NP na mitochondriální membránový potenciál buněk NIH3T3 byl měřen po inkubaci se šesti různými koncentracemi TPP-NP. Čím vyšší je poměr zelené/červené fluorescence JC-1, tím větší je poškození buněk. Kontrola představuje ozářené buňky v nepřítomnosti TPP-NP (negativní kontrola). Výsledky jsou prezentovány jako průměr ± SD

z dvanácti opakování (trojice čtyř nezávislých měření). TPP-NP byly porovnávány s kontrolou; statisticky významné výsledky jsou označeny hvězdičkou a hladina významnosti testu je označena jako *** $p < 0,001$



Obr 33.: Poměr zelené/červené fluorescence u nádorové buněčné linie HeLa byl měřen po inkubaci s šesti koncentracemi TPP-NP a ozařováním 0,5, 1, 5 a 10 min. Kontrola představuje ozařované buňky v nepřítomnosti TPP-NP (negativní kontrola). Údaje jsou uvedeny jako průměr \pm SD dvanácti opakování (trojice čtyř nezávislých měření). TPP-NP byly porovnávány s kontrolou; statisticky významné výsledky jsou označeny hvězdičkou a hladina významnosti testu je označena jako *** $p < 0,001$.

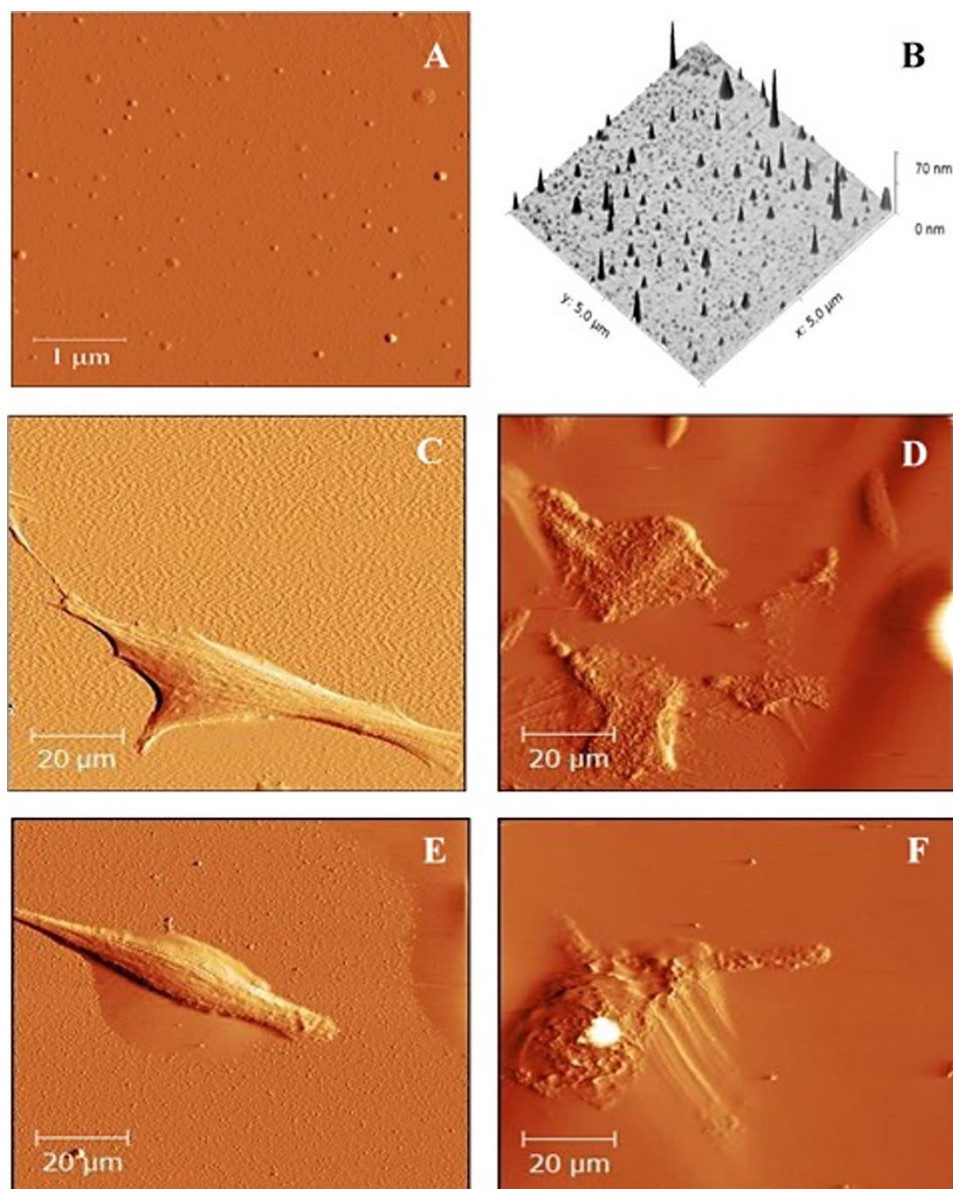


Obr 34.: Mitochondriální membránový potenciál byl stanoven u nádorových buněk G361 s šesti různými koncentracemi TPP-NP. Kontrola představuje ozářené buňky v nepřítomnosti TPP-NP (negativní kontrola). Údaje jsou uvedeny jako průměr \pm SD dvanácti opakování (trojice čtyř

*nezávislých měření). TPP-NP byly porovnávány s kontrolou; statisticky významné výsledky jsou označeny hvězdičkou a hladina významnosti testu je označena jako *** $p < 0,001$.*

5.2.5 AFM ZOBRAZENÍ

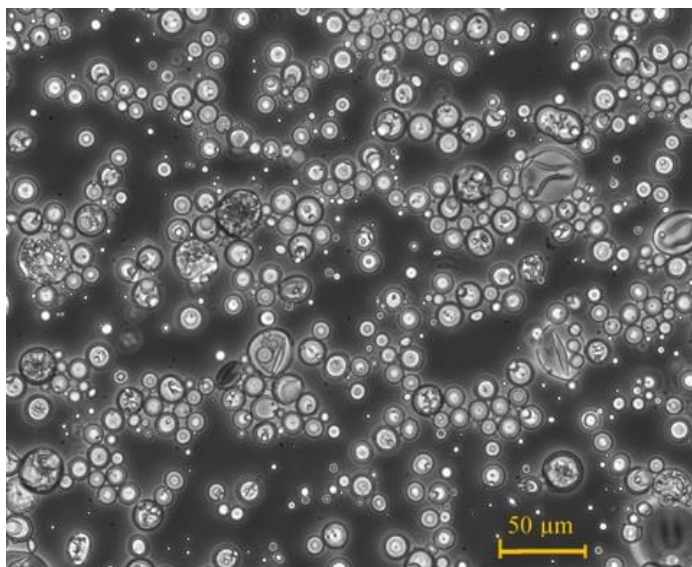
Nanočástice s navázaným TPP byly zobrazeny ve 2D (obr. 35A) a 3D (obr. 35B) pomocí AFM. Na základě výše uvedených výsledků testů (MTT, ROS, MMP), byly pro topografickou vizualizaci změn před a po PDT vybrány nádorové linie (HeLa a G361) a pouze jedna koncentrace TPP-NP a ozařovací čas. Na obrázku 35C jsou zobrazeny buňky HeLa a na obrázku 35E buňky G361 před ozářením. V obou jsme pozorovali neporušené buňky typického tvaru. Buňky HeLa po ozáření době ozařování 1 min a při použití koncentrace TPP-NP $0,09 \times 10^{13}$ NP/ml jsou na obrázku 35D. Na obrázku 35F jsou zobrazeny buňky G361 s koncentrací TPP-NP $0,09 \times 10^{13}$ NP/ml a ozařováním s dobou ozařování 1 min. V obou případech jsme pozorovali destrukci a změnu jinak typicky protáhlého tvaru buněk.



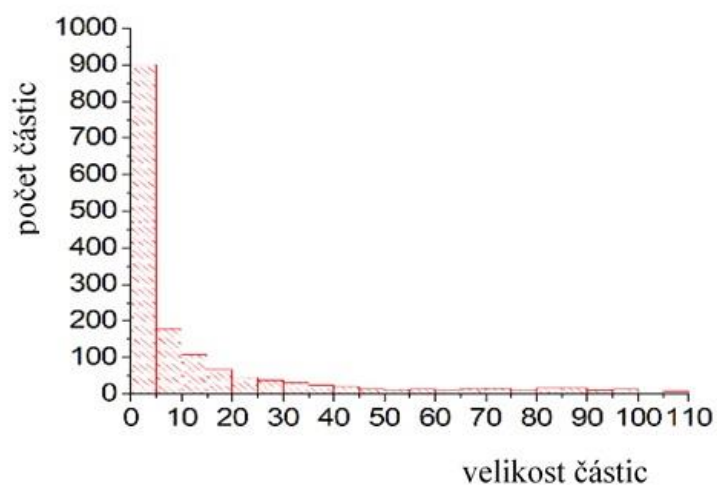
Obr 35.: 2D topografie (A) a odpovídající 3D rekonstrukce (B) TPP-NP. Oblast skenování: $5 \times 5 \mu\text{m}$. Zobrazené buňky HeLa (C) a G361 (E) před terapií. Obrázky HeLa buněk po ošetření TPP-NP (D) byly pořízeny při koncentraci $0,09 \times 10^{13}$ NP/ml a dobou ozařování 1 min. Buňky G361 po ošetření TPP-NP (F) s koncentrací $0,09 \times 10^{13}$ NP/ml a dobou ozařování 1 min. Snímky (C-F) byly pořízeny se skenovanou oblastí: $100 \times 100 \mu\text{m}$ a následně byly zpracovány v programu Gwydion 2.40.

5.3 MIKROČÁSTICE PLGA

Připravené PLGA MP byly zobrazeny optickým mikroskopem (Leica micro systém, Německo) s digitální kamerou Leica DFC 295 (Obr 36). Pro PLGA MP je typický sférický tvar a hladký povrch. Pro vyhodnocení velikostní distribuce částic bylo použito 1600 PLGA MP, z nichž 75% bylo menší než 15 μm (Obr 37).



Obr 36.: Charakterizace PLGA MP provedená optickým mikroskopem Leica se zvětšením 20x.



Obr 37.: Graf velikostní distribuce PLGA MP.

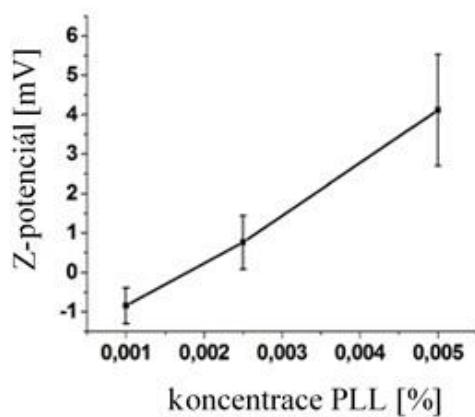
5.3.1 ZMĚNA POVRCHOVÉHO NÁBOJE PLGA MP

Modifikace PLGA MP pomocí tří polymerů: PLL (PLL@PLGA), chitosanu (chitosan@PLGA) a polyDDA (polyDDA@PLGA) významně ovlivnila jejich povrchový náboj. Nemodifikované PLGA MP po zředění 1:1000 v Milli-Q vodě měly negativní povrchový náboj ($-6,81 \pm 3,34$ mV). Pro dosažení kompletního potažení byly použity tři různé koncentrace polymerů a byl stanoven zeta potenciál.

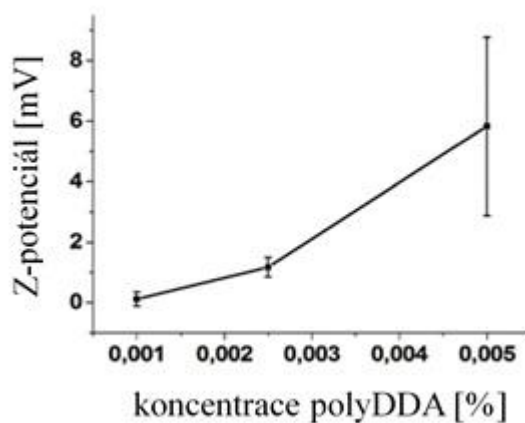
Úpravou PLGA MP pomocí PLL došlo ke změnám náboje na povrchu mikročástic. Po aplikaci nejnižší koncentrace PLL 0,001% byla hodnota zeta potenciálu záporná, tj. $-0,84 \pm 0,45$ mV, nicméně u vyšších testovaných koncentrací, tedy 0,0025% a 0,005% dosahoval zeta potenciál již kladných hodnot $0,77 \pm 0,68$ mV a $4,12 \pm 1,41$ mV (Obr 38).

Povrchový náboj modifikovaných mikročástic polyDDA@PLGA se zvyšoval s rostoucí koncentrací použitého polymeru polyDDA. Zeta potenciál pro testovanou koncentraci 0,001% byl $0,12 \pm 0,23$ mV, pro 0,0025% byla naměřena hodnota $1,18 \pm 0,32$ mV a pro nejvyšší použitou koncentraci polyDDA 0,005% dosahoval hodnoty $5,83 \pm 2,95$ mV (Obr 39).

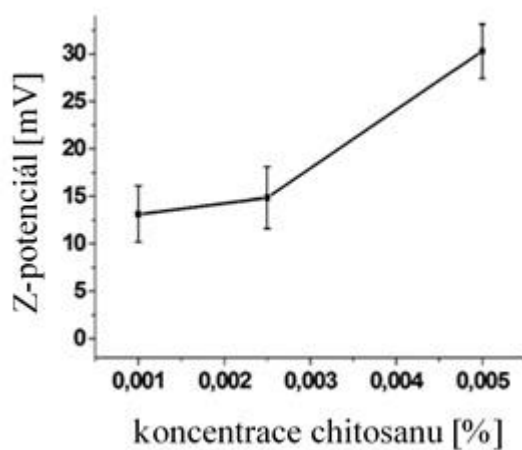
Potažení PLGA MP chitosanem vedlo u všech použitých koncentrací tohoto polymeru k okamžité inverzi původně negativního zeta potenciálu na kladný. Konkrétně při koncentraci 0,005% dosahoval zeta potenciál hodnoty $30,3 \pm 2,87$ mV, po použití koncentrace 0,0025% byl zjištěný povrchový náboj $14,87 \pm 3,24$ mV a u koncentrace 0,001% nabýval hodnoty $13,5 \pm 2,96$ mV (Obr 40).



Obr 38.: Změna zeta potenciálu PLGA MP v závislosti na použité koncentraci PLL.

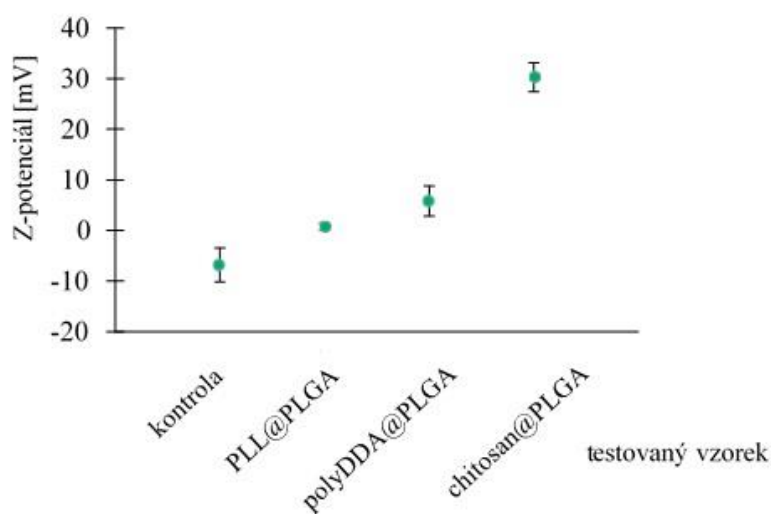


Obr 39.: Zeta potenciál polyDDA@PLGA



Obr 40.: Zeta potenciál u PLGA MP, jejichž povrch byl modifikován chitosanem o různých koncentracích.

Pro experimenty s bakteriálními kmeny byly vybrány následující PLGA MP: PLL@PLGA (0,0025%), jež prezentovaly částice s neutrálním povrchovým nábojem ($0,77 \pm 0,68$ mV), kladně nabitě částice polyDDA@PLGA (0,005%) se zeta potenciálem $5,83 \pm 2,95$ mV a chitosan@PLGA (0,005%) s největším kladným nábojem $30,3 \pm 2,87$ mV. Kontrolní vzorek představovaly nemodifikované PLGA MP s negativním nábojem $-6,81 \pm 3,34$ mV (Obr 41).



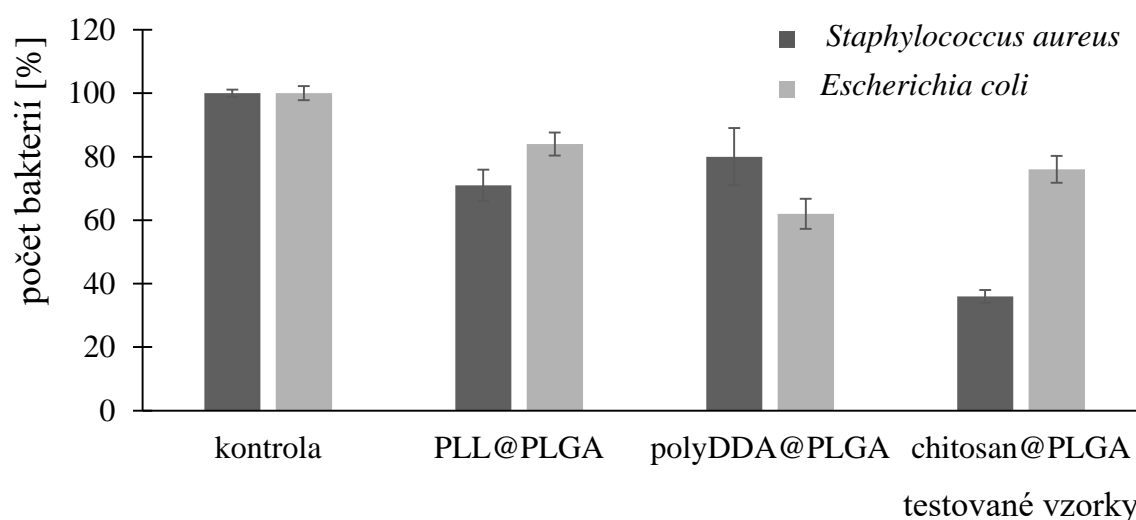
Obr 41.: Vybrané vzorky o příslušné koncentraci polymeru a rozdílných hodnotách zeta potenciálu na povrchu PLGA MP, které byly použity pro antibakteriální studii.

5.3.2 ANTIBAKTERIÁLNÍ ÚČINEK PLGA MIKROČÁSTIC

U tří typů modifikovaných PLGA MP byla hodnocena antibakteriální aktivita na G^+ a G^- bakteriálním kmenu. Vzorky PLL@PLGA (0,0025%), polyDDA@PLGA (0,005%), chitosan@PLGA (0,005%) a kontrola byly studovány se *Staphylococcus aureus* (G^+) a *Escherichia coli* (G^-).

Antibakteriální účinek na oba bakteriální kmeny byl pozorován u všech studovaných vzorků ve srovnání s kontrolou. Bakteriální kmen *Staphylococcus aureus*

byl nejméně senzitivní vůči polyDDA@PLGA, počet bakterií klesl pouze o 20%. Lepší výsledky jsme získali po aplikaci PLL@PLGA, kde počet bakterií dosahoval hodnoty 71%, avšak signifikantně nejlepší výsledky jsme získali pro mikročástice modifikované chitosanem, konkrétně 36%. U *Escherichia coli* byly pozorovány nejlepší antibakteriální účinky pro polyDDA@PLGA. V tomto případě byl počet bakterií snížen o 38% v porovnání s kontrolou. Po aplikaci chitosan@PLGA zůstalo živých 76% bakterií. Nejmenší účinek byl pozorován pro mikročástice PLL@PLGA, 84% bakterií přežilo (Obr 42).



Obr 42.: Antibakteriální aktivita modifikovaných PLGA MP s různými hodnotami zeta potenciálu.

6 DISKUZE

6.1 *IN VITRO* STUDIE FOTODYNAMICKÉHO EFEKTU DVOU PORFYRINOVÝCH FOTOSENZITIZÉRŮ TMPyP A ZnTPPS₄ NA NÁDOROVÉ LINIE

Pro tuto *in vitro* studii byly vybrány PS, které prokázaly nejvýznamnější fotodynamický účinek v práci Pížová a kol. (Pížová *et al.*, 2015) a Malina a kol. (Malina *et al.*, 2016). Předchozí studie byly rozšířeny o nádorovou linii HeLa a byla porovnána fototoxicita porfyrinových fotosenzitizérů TMPyP a ZnTPPS₄ při různých koncentracích.

Bylo zjištěno, že TMPyP indukuje významnější cytotoxický účinek v buňkách HeLa i G361 při všech aplikovaných koncentracích a plošných hustotách energie ve srovnání se ZnTPPS₄, zatímco aplikace obou PS bez přístupu světla měla zanedbatelný vliv na buněčnou viabilitu. Získaná data jsou v souladu s předchozími studiemi, které ukazují, že vyšší koncentrace PS vedou k vyšší produkci ROS a nižší životaschopnosti buněk (Kolářová *et al.*, 2009; Hanáková *et al.*, 2014; Pížová *et al.*, 2015). Porovnáním použitých PS pozorujeme, že TMPyP je účinnější, vyvíjí vyšší produkci ROS a tím i vyšší toxicitu po ozáření než ZnTPPS₄ u obou studovaných nádorových buněčných linií. Buňky HeLa i G361 vykazují významně rostoucí trend produkce volných radikálů se zvyšující se koncentrací a plošnou hustotou energie. Tato zjištění korespondují s výsledky předchozích studií Pížová a kol. (Pížová *et al.*, 2015), Malina a kol. (Malina *et al.*, 2016), kteří taktéž pozorovali závislost produkce ROS u TMPyP i ZnTPPS₄ na koncentraci a plošné hustotě energie u G361. U HeLa buněk byla ve srovnání s buňkami G361 pozorována vyšší citlivost na ROS a tedy výrazně vyšší fototoxický účinek obou použitých PS. Stejnou skutečnost, tj. zvýšenou citlivost buněk HeLa na oxidační stres, pozorovali již dříve Gille a kol. (Gille *et al.*, 1988), Porta a kol. (Porta *et al.*, 1996); Chernyak a kol. (Chernyak *et al.*, 2006).

Vysoké hladiny ROS způsobují oxidační poškození mitochondrií a narušují dýchací řetězec a energetický metabolismus buňky. Obecně platí, že čím vyšší je hodnota membránového potenciálu, tím vyšší je pravděpodobnost apoptózy (Castano *et al.*, 2004; Benov, 2015). Získané výsledky prokázaly zvýšení mitochondriálního membránového potenciálu v závislosti na koncentraci PS a plošné hustotě energie, což koreluje s výsledky testu MTT a ROS. Naše údaje jsou v souladu se studií Malina a kol. (Malina *et al.*, 2016), kde bylo pozorováno, že čím vyšší je koncentrace porfyrinového PS v buňce G361, tím vyšší je poměr fluorescence zelená/červená.

Změny topografie buněk byly zobrazeny pomocí AFM před a po fotodynamickém ošetření. Je známo, že tvar buněk závisí nejen na typu, ale také na stavu buňky. Protáhlý tvar je charakteristický pro nepoškozené živé buňky (Baugh *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2003), po PDT pozorujeme narušení buněčné membrány a rozlití buněčného obsahu.

Obecně byl TMPyP v této *in vitro* studii u obou buněčných kultur účinnějším PS a vykazuje vysoký potenciál pro další studie. Jak již bylo výše zmíněno, dosažené výsledky rozšiřují předchozí experimentálně získané informace o TMPyP a ZnTPPS₄ a mohou efektivně přispět k vytvoření komplexního pohledu na možnosti použití porfyrinových PS pro PDT.

6.2 BIOLOGICKÉ HODNOCENÍ FOTODYNAMICKÉHO ÚČINKU ZPROSTŘEDKOVANÉHO TPP-NP

Dodání hydrofobních porfyrinů do cílových míst je jednou z hlavních výzev v PDT, kterou je třeba překonat. Nanočástice jsou schopny se spontánně hromadit v solidních nádorech prostřednictvím zvýšené propustnosti a retenčního efektu (EPR efekt - enhanced permeability and retention effect) v důsledku kombinace špatné lymfatické drenáže a zvýšené propustnosti cév (Sledge *et Miller*, 2003; Zhou *et al.*, 2016).

Zapouzdřením nebo připojením fotosenzitizérů k NP lze vytvořit strategicky vhodnější komponentu pro doručování PS do buněk či tkání. Samotné NP mají mnoho zajímavých vlastností, jako např. specifické zacílení, kinetika vychytávání, imunitní tolerance, povrchový náboj, atd a mohou tedy efektivně eliminovat nedostatky samotného PS (Sueki *et al.*, 2019).

V naší studii jsme se zaměřili na biologické *in vitro* hodnocení vodné disperze stabilních vysoce sulfonovaných polystyrenových NP s enkapsulovaným hydrofobním fotosenzitizérem TPP. Zapouzdření poskytlo TPP dostatečnou ochranu před vnějšími zhášeči a agregací díky polystyrenovému obalu s vysokou propustností pro O₂, která umožňovala zhášení tripletových stavů TPP výhradně pomocí O₂ a transportu ¹O₂ a/nebo dalších ROS k biologickým cílům.

Bylo zjištěno, že TPP-NP vyvolávají výraznější cytotoxické účinky u nádorových buněk (HeLa i G361) v porovnání s nenádorovou buněčnou linií NIH3T3, a to při všech použitých koncentracích a plošných hustotách energie. Oproti tomu aplikace TPP-NP bez přístupu světla měla na viabilitu testovaných buněk zanedbatelný vliv.

V této studii byl tento trend pozorován u nenádorové linie NIH3T3 při všech sledovaných parametrech koncentrací a dobách ozařování, na rozdíl od nádorových buněčných linií HeLa a G361 u nichž se tento trend objevil až po ozařování po dobu 0,5 a 1 min při koncentracích v oblasti 0,05-0,75×10¹³ NP/ml a 0,05-0,75×10¹³ NP/ml. Při ozařování delším než 1 min nebyla produkce ROS závislá na koncentraci. Získané údaje ukazují, že vyšší koncentrace PS zvýšila produkci ROS a snížila životaschopnost buněk. Tento trend však již nebyl pozorován u nádorových buněčných linií při vyšších dobách ozařování, ať už byla použita jakákoli koncentrace TPP-NP. Podobný výsledek naznačující nezávislost na koncentraci byl publikován v předchozí studii (Hanáková *et*

al., 2014), kde životaschopnost buněk NIH3T3 po aplikaci porfyrinových PS (bez vazby na nanočástice) dosahovala stejné hodnoty při všech testovaných koncentracích.

Porovnáním účinku TPP-NP na životaschopnost buněk HeLa a G361 byla zjištěna větší cytotoxicita u HeLa buněk. Tyto výsledky byly podpořeny testem ROS, který sleduje produkci ROS v buňkách. Závislost produkce ROS na koncentraci TPP-NP a době ozařování 0,5 a 1 min byla pozorována pouze u zmíněných nádorových buněčných linií.

Naopak, u buněk NIH3T3 byla ROS produkce závislá na koncentraci pozorována při všech použitých dobách ozařování. Vyšší fotogenerace ROS po aktivaci TPP-NP byla zjištěna u buněk HeLa. Stejná skutečnost, tj. zvýšená citlivost buněk HeLa k oxidačnímu stresu, byla zjištěna již v předchozích studiích (Gille *et al.*, 1988; Porta *et al.*, 1996; Žárská *et al.*, 2021). Možným vysvětlením je snížené množství glutathionu v HeLa buňkách a zároveň konstantní hladina glutathionu během hyperoxie, která způsobuje zvýšenou citlivost HeLa buněk, čímž dochází ke zničení ROS (Gille *et al.*, 1988; Timalsina *et al.*, 2018).

Obecně platí, že vysoké množství ROS může zvýšit propustnost lysozomálních membrán, což vede k uvolnění lysozomálních proteáz, to má za následek změny mitochondriálního membránového potenciálu a buněčnou smrt (Kim *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2007). Tento trend byl pozorován pomocí MMP, který ukázal větší změny membránového potenciálu u nádorových buněk HeLa a G361 než u NIH3T3. Získané údaje z testu MMP byly v souladu s výsledky MTT testu a produkce ROS (Žárská *et al.*, 2022).

Buňky byly zobrazeny pomocí AFM před a po PDT, aby bylo možné stanovit změny na povrchu buněk. Jak již bylo dříve zmíněno, tvar buněk závisí na typu a také na stavu buňky. Živé nepoškozené buňky mají typický protáhlý tvar ve srovnání

s fotodynamicky poškozenými buňkami (Baugh *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2003; Žárská *et al.*, 2022).

Závěrem lze říci, že PDT zprostředkovaná TPP-NP měla minimální fototoxické účinky na nenádorovou buněčnou linii NIH3T3, na rozdíl od signifikantních účinků na nádorové buňky HeLa a G361 (Žárská *et al.*, 2022).

6.3 MIKROČÁSTICE PLGA

Bakteriální rezistence vůči antibiotikům se stává největší hrozbou pro veřejné zdraví v 21. století. Rezistence v současné době představuje jednu z nejčastějších příčin úmrtí na světě, každý den umírá přibližně tři a půl tisíce lidí. Antibiotika, která byla dříve v léčbě považována za jistotu, přestávají fungovat a důvodem je především nezodpovědný přístup k užívání antibiotik. Řešení tohoto problému se mnozí vědci snaží najít právě v použití NP/MP (Elshamy *et Aboshanab*, 2020; Abo-zeid *et al.*, 2021).

Rychlý rozvoj nanotechnologií nabízí široké využití v různých biomedicínských a farmaceutických oblastech (Sahoo *et al.*, 2007; Patra *et al.*, 2018). Částice o rozměrech nano i mikrometrů mohou interagovat s buněčnou membránou, proteiny i DNA. Dochází k vytváření tzv. nano-bio rozhraní a funkční aspekty rozhraní závisí na koloidních silách a také na fyzikálně-chemických interakcích (Tay *et al.*, 2014). Mechanismus interakce je založen na fyzikálně-chemických vlastnostech rozhraní; například povrchový potenciál NP/MP indukuje kolem sebe elektrostatické pole, které následně přeorientuje okolní vodné prostředí až do určité hloubky objemu, v závislosti na intenzitě elektrostatického pole (Dewan *et al.*, 2014). V důsledku čehož má následně takto přeorientované vodné prostředí potenciál pozměnit biologické mechanismy, jako je skládání proteinů, membránová dynamika, enzymová katalýza atd. Kromě toho interakce na nano-bio

rozhraní definuje disperzitu a kompatibilitu NP/MP v médiu (uvnitř nebo vně buňky) (Burello *et* Worth, 2011; Elsaesser *et* Howard, 2012; Monopoli *et al.*, 2012). Na rozdíl od vody, uvnitř buňky nebo biologické tekutiny, není interakce NP/MP omezena pouze na elektrostatickou interakci, ale důležitou roli hrají také další interaktivní síly, jako jsou Van der Waalsovy, hydrofobní, hydrofilní síly atd. Mezifázový potenciál je výsledkem všech těchto sil přítomných mezi interagujícími povrchy nanočástic a biomolekul (Huang *et al.*, 2008).

Ačkoliv byly provedeny různé biologické studie k prokázání antimikrobiální aktivity různých typů NP/MP proti G^+ a G^- bakteriím, stále je mechanismus, který je základem konceptu, záležitostí intenzivního výzkumu bezpečného použití NP/MP jako moderních antibiotik. Jak uvádí literatura, různé navrhované mechanismy antimikrobiální aktivity NP/MP zahrnují generování ROS, poškození buněčné stěny v důsledku uvolňování iontů či pronikání do membrány atd. (Abdal Dayem *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017).

V pilotní části výzkumu jsme se zaměřili na studium vlivu povrchového náboje Hpolymery modifikovaných PLGA MP, pro evaluaci jsme vybrali dva bakteriální kmeny s různým povrchovým nábojem. Rozdílná stavba G^+ a G^- bakteriálních kmenů má totiž za následek i rozdílné hodnoty zeta potenciálu membrán. Obecně všechny bakterie vykazují záporný zeta potenciál, nicméně hodnoty nábojů se mohou výrazně lišit. Platí, že G^- bakterie vykazují vyšší negativní potenciál v porovnání s G^+ bakteriemi, a to díky přítomnosti další vrstvy negativně nabitého LPS ve srovnání s G^+ bakteriemi. Halder a kol. experimentálně stanovili konkrétní hodnoty zeta potenciálu pro *Staphylococcus aureus* (-35,6 mV) a takéž pro *Escherichia coli* (-44,2 mV) (Halder *et al.*, 2015).

Jak bylo zmíněno výše, konkrétní mechanismy nebyly plně vysvětleny a existují spíše modely, které popisují možné působení NP/MP, závisící na konkrétním typu NP/MP. Obecně platí, že G^+ bakterie jsou méně citlivé na NP/MP ve srovnání s G^- bakteriemi kvůli přítomnosti silnější peptidoglykanové vrstvy (Birk *et al.*, 2021). Toto tvrzení v naší studii bylo potvrzeno pouze pro vzorek polyDDA@PLGA MPs, kde pokles počtu bakterií byl větší u G^- *Escherichia coli*. Naopak pro vzorky funkcionalizované PLL a chitosanem jsme pozorovali úplně opačný efekt, tj. větší účinnost u G^+ *Staphylococcus aureus*.

Je však nezbytné zmínit, že pro funkcionalizaci PLGA MP byly použity 3 polymery, jež se samy o sobě vyznačují antibakteriálními vlastnostmi. Antimikrobiální peptid PLL, který produkuje *Streptomyces albulus* jako hlavní producent, se vyznačuje kladně nabitými aminoskupinami, což se projevuje antimikrobiálními účinky na kvasinky, houby, grampozitivní a gramnegativní bakterie (Pandey *et Kumar*, 2014; Prasad *et al.*, 2020). Mezi kationtovými antimikrobiálními polymery také polyDDA má ve své chemické struktuře kvartérní amoniovou skupinu a vykazuje vynikající antimikrobiální aktivitu (Zhao *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2018). Nejvíce prozkoumaným polymerem použitým v této studii je chitosan. Polykationtová struktura chitosanu je předpokladem antibakteriální aktivity, která je založená primárně na elektrostatické interakci mezi polykationtovou strukturou chitosanu a převážně aniontovými složkami povrchu mikroorganismů (jako je G^- lipopolysacharid a povrchové proteiny buněk) (Kong *et al.*, 2010). Polykationtová struktura vzniká ve velmi kyselých podmínkách, protože naroubované skupiny specifických derivátů mohou způsobovat protonizaci při vyšší hodnotě pH (Yang *et al.*, 2005). Posílením hustoty kladného náboje chitosanu, se následně zvýší i antibakteriální vlastnost (Xie *et al.*, 2007). Přesný mechanismus antibakteriální aktivity však není dosud zcela objasněn. Nejrozšířenější navrhovaný

mechanismus antibakteriální aktivity chitosanu spočívá ve vazbě na záporně nabitou buněčnou stěnu bakterií, která způsobuje narušení buňky, a tím změnu propustnosti membrány, následuje vazba na DNA, která způsobuje inhibici replikace DNA a následně buněčnou smrt (Nagy *et al.*, 2022). Dalším možným mechanismem je, že chitosan působí jako chelatační činidlo, které se elektivně váže na stopové prvky kovů, což způsobuje produkci toxinů a inhibici mikrobiálního růstu (Divya *et al.*, 2017).

Nicméně nelze vyloučit, že získané výsledky testování antibakteriálního vlivu modifikovaných PLGA MP odrážejí synergický účinek mezi změněným povrchovým potenciálem PLGA MP a jednotlivými polymery, jež samy o sobě vykazují antibakteriální aktivitu. Vzhledem k omezenému času zahraniční stáže, bohužel nebylo možné v této studii dále pokračovat a zaměřit se více na pochopení mechanismu účinku.

7 ZÁVĚR

První studie hodnotila fotodynamický účinek porfyrinových PS (TMPyP a ZnTPPS₄) na vybraných buněčných liniích (HeLa a G361). Výraznější fotodynamický efekt byl dosažen u obou buněčných linií po aplikaci TMPyP v porovnání se ZnTPPS₄, zároveň citlivější linií vůči TMPyP byly HeLa buňky. V rámci testovaných plošných hustot energie lze konstatovat, že vyšší fototoxicita u obou buněčných linií a testovaných PS byla pozorována po ozáření 25J/cm².

Výsledky získané v *in vitro* studii ukazují, že TPP-NP nezpůsobuje cytotoxicitu bez ozáření v žádné ze studovaných buněčných linií. Sulfonované polystyrenové NP se zapouzdřeným TPP měly cytotoxický efekt na nádorové HeLa a G361 buňky. U buněčných linií HeLa a G361 byla zjištěna téměř identická účinnost TPP-NP, která byla nezávislá na koncentraci a plošné hustotě energie (platí pro 5 a 10 min ozařování, respektive 16,2 a 32,4 J/cm²) a také způsobily největší cytotoxicitu. Výrazně nižší cytotoxický účinek TPP-NP zprostředkovaného PDT byl pozorován u nenádorové buněčné linie NIH3T3. Nejvýraznější cytotoxicita u NIH3T3 byla pozorována při koncentraci TPP-NP 1,5x10¹³ NP/ml a době ozařování 10 min. Měření AFM také ukázalo podstatné morfologické a tvarové změny spojené s buněčnou smrtí po PDT. Lze předpokládat, že fotosenzitivní TPP-NP může najít úspěšné uplatnění ve fotodynamické terapii.

Poslední část disertační práce prezentuje výsledky získané v průběhu zahraniční stáže na univerzitě v Miláně, která byla věnována přípravě PLGA MP. Mikročástice PLGA připravené emulsí, byly následně zcharakterizovány pomocí optického mikroskopu a byla stanovena velikostní distribuce MP ve vzorku. Modifikované PLGA MP s různou velikostí povrchového náboje měly i rozdílný vliv na G⁺ a G⁻ bakterie.

Největší antibakteriální efekt byl pozorován po aplikaci chitosan@PLGA u *Staphylococcus aureus*. Antibakteriální účinek může být výsledkem vlivu zeta potenciálu PLGA MP nebo použitých polymerů (PLL, polyDDA, chitosanu), nicméně nemůžeme vyloučit ani synergický účinek obou zmíněných možností. Pro úplné vysvětlení podstaty antibakteriálního efektu testovaných PLGA MP je nezbytně nutné provést další testy.

8 SEZNAM LITERATURY

1. Abdal Dayem A, Hossain MK, Lee SB, Kim K, Saha SK, Yang G-M, Choi HY, Cho S-G. The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017; 18(1):120.
2. Abdel-kader MH. The journey of PDT throughout history: PDT from Pharos to present. *Photodynamic Medicine: From Bench to Clinic*, 2016; 1-21.
3. Abo-zeid Y, Amer A, El-Houssieny B, Mahmoud M, Sakran W. Overview on bacterial resistance and nanoparticles to overcome bacterial resistance. *Journal of Advanced Pharmacy Research*, 2021; 5(3) 312-326.
4. Acroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M. The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 2001; 74(5): 656–669.
5. Agostinis P, Breysens H, Buytaert E, Hendrickx N. Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2004; 3(8): 721-729.
6. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, Hahn SM, Hamblin MR, Juzeniene A, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Mroz P, Nowis D, Piette J, Wilson BC, Golab J. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer Journal for Clinicians*, 2011; 61(4):250-281.
7. Alam, S, Anjum N, Akhtar J, Bashir F. Pharmacological investigation on Khella (Ammi vinaga L.). *World Journal of Pharmaceutical Research*, 2018; 7(13): 212-224.
8. Allison RR, Downie GH, Cuenca R, Hu X-H, Childs CJH, Sibata CH, Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2004; 1(1): 24 – 42.
9. Allison RR, Mota HC, Bagnato VS, Sibata CH. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2008; 5(1): 19-28.

10. Allison RR, Bagnato VS, Sibata CH. Future of oncologic photodynamic therapy. *Future Oncology*, 2010; 6(6): 929-940.
11. Allison RR, Moghissi K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clinical Endoscopy*, 2013; 46(1): 24-29.
12. Alqawi O, Espiritu M, Singh G. Molecular mechanisms associated with ALA-PDT of brain tumor cells. *Photodynamic Therapy: Back to the Future*, 2009; 7380: 1075-1085.
13. Amreddy N, Babu A, Munshi A, Ramesh R. Dendrimers as Drug Carriers for Cancer Therapy. *Nanopharmaceuticals: Principles and Applications*. Springer, 2020; 3, 245-269.
14. Arif U, Haider S, Haider A, Khan N, Alghyamah AA, Jamila N, Khan MI, Almasry WA, Kang I-K. Biocompatible polymers and their potential biomedical applications: A review. *Current pharmaceutical design*, 2019; 25(34), 3608-3619.
15. Astete CE, Sabliov CM. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *Journal of biomaterials science, polymer edition*, 2006; 17(3): 247-289.
16. Bala I, Hariharan S, Kumar MR. PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art. *Critical Review. Therapeutic Drug Carrier Systems*, 2004; 21(5).
17. Barnes RJ, Molina R, Xu J, Dobson PJ, Thompson IP. Comparison of TiO₂ and ZnO nanoparticles for photocatalytic degradation of methylene blue and the correlated inactivation of gram-positive and gram-negative bacteria. *Journal of nanoparticle research*, 2013; 15(2): 1-11.
18. Baugh SDP, Yang Z, Leung DK, Wilson DM, Breslow R. Cyclodextrin dimers as cleavable carriers of photodynamic sensitizers, *Journal of the American Chemical Society*, 2001; 123(50): 12488–12494.
19. Bechet D, Couleaud P, Frochot C, Viriot ML, Guillemin F, Barberi-Heyob M. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. *Trends in Biotechnology*, 2008; 26: 612-621.

20. Benov L. Photodynamic therapy: current status and future directions. *Medical principles and practice*, 2015;24(1): 14-28.
21. Birk SE, Boisen A, Nielsen LH. Polymeric nano-and microparticulate drug delivery systems for treatment of biofilms. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2021; 174, 30-52.
22. Boschi F, Spinelli AE. Nanoparticles for cerenkov and radioluminescent light enhancement for imaging and radiotherapy. *Nanomaterials*, 2020; 10(9): 1771.
23. Brilkina AA, Dubasova LV, Sergeeva EA, Pospelov AJ, Shilyagina NY, Shakhova NM, Balalaeva IV. Photobiological properties of phthalocyanine photosensitizers Photosens, Holosens and Phthalosens: A comparative *in vitro* analysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2019; 191, 128-134.
24. Burello E, Worth A. Computational nanotoxicology: Predicting toxicity of nanoparticles. *Nature Nanotechnology*, 2011; 6(3): 138–139.
25. Buytaert E, Dewaele M, Agostinis P, Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 2007; 1776(1): 86-107.
26. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one - photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 2004; 1(4): 279-293.
27. Collins HA, Khurana M, Moriyama EH, Mariampillai A, Dahlstedt E, Balaz M, Kuimova MK, Drobizhev M, Yang VXD, Philips D, Rebane A, Wilson BC, Anderson HL. Blood-vessel closure using photosensitizers engineered for two-photon excitation. *Nature Photonics*, 2008; 2(7): 420-424.
28. Correia JH, Rodrigues JA, Pimentaa S, Dong T, Yang Z. Photodynamic therapy review: Principles, photosensitizers, applications, and future directions. *Pharmaceutics*, 2021; 13(9): 1332.

29. Davies N, Wilson BC. Interstitial in vivo ALA-PpIX mediated metronomic photodynamic therapy (mPDT) using the CNS-1 astrocytoma with bioluminescence monitoring. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2007; 4: 202-212
30. Davis ME, Chen Z, Shin DM. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nanoscience and Technology*, 2009; 239-235.
31. D'Alessandro S, Priefer R. Non-porphyrin dyes used as photosensitizers in photodynamic therapy. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2020; 60, 101979.
32. Deplanche K, Merroun ML, Casadesus M, Tran DT, Mikheenko IP, Bennett JA, Zhu J, Jones IP, Attard GA, Wood J, Selenska-Pobell S, Macaskie LE. Microbial synthesis of core/shell gold/palladium nanoparticles for applications in green chemistry. *Journal of the Royal Society Interface*, 2012; 9(72): 1705-1712.
33. Dewan S, Carnevale V, Bankura A, Eftekhari-Bafrooei A, Fiorin G, Klein ML, Borguet E. Structure of water at charged interfaces: A molecular dynamics study. *Langmuir*, 2014; 30(27): 8056-8065.
34. Divya K, Vijayan S, George TK, Jisha MS. Antimicrobial properties of chitosan nanoparticles: Mode of action and factors affecting activity. *Fibers and polymers*, 2017; 18(2): 221-230.
35. Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nature Review Cancer*, 2003; 3:380-3872.
36. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 2002; 15(2): 167-193.
37. Donohoe C, Senge MO, Arnaut LG, Gomes-da-Silva LC. Cell death in photodynamic therapy: From oxidative stress to anti-tumor immunity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 2019; 1872(2): 188308.

38. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Peng Q. Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 1998; 90(12): 889-905.
39. Dysart JS, Patterson MS. Characterization of Photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MLL cells *in vitro*. *Physics in Medicine and Biology*, 2005; 50: 2597-2616.
40. Elsaesser A, Howard CV. Toxicology of nanoparticles. *Advanced drug delivery reviews*, 2012; 64, 129-137.
41. Elshamy AA, Aboshanab KM. A review on bacterial resistance to carbapenems: epidemiology, detection and treatment options. *Future science OA*, 2020; 6(3), FSO438.
42. Firczuk M, Winiarska M, Szokalska A, Jodlowska M, Swiech M, Bojarczuk K, Salwa P, Nowis D. Approaches to improve photodynamic therapy of cancer. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 2011; 16(1): 208-224.
43. Forcino RG, Jonnalagadda S. The effect of fabrication methods on the mechanical and thermal properties of poly (lactide-co-glycolide) scaffolds. *Journal of applied polymer science*, 2007; 104(2): 944-949.
44. George A, Shah PA, Shrivastav PS. Natural biodegradable polymers based nano-formulations for drug delivery: A review. *International journal of pharmaceutics*, 2019; 561, 244-264.
45. Gille JJ, Wotelboer HM, Joenje H. Effect of normobaric hyperoxia on antioxidant defenses of HeLa and CHO cells, *Free radical biology and medicine*, 1988; 4 (2): 85-91.
46. Gomer CJ, Ferrario A, Luna M, Rucker N, Wong S. Photodynamic therapy: combined modality approaches targeting the tumor microenvironment. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2006; 38: 516-521.

47. Halder S, Yadav KK, Sarkar R, Mukherjee S, Saha P, Haldar S, Karmakar S, Sen T. Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents. *SpringerPlus*, 2015;4(1): 1-14.
48. Hamblin MR. Photodynamic therapy for cancer: what's past is prologue. *Photochemistry and photobiology*, 2020; 96(3): 506-516.
49. Han R, Zhao M, Wang Z, Liu H, Zhu S, Huang L, Wang Y, Wang L, Hong Y, Sha Y, Jiang Y. Super-efficient in vivo two-photon photodynamic therapy with a gold nanocluster as a type I photosensitizer. *ACS nano*, 2019; 14(8): 9532-9544.
50. Hanakova A, Bogdanova K, Tomankova K, Binder S, Bajgar R, Langova K, Kolar M, Mosinger J, Kolarova H. Study of photodynamic effects on NIH3T3 cell line and bacteria. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*, 2014; 158(2):201-207.
51. Huang Z, Zheng X, Yan D, Yin G, Liao X, Kang Y, Yao Y, Huang D, Hao B. Toxicological effect of ZnO nanoparticles based on bacteria. *Langmuir*, 2008; 24(8): 4140-4144.
52. Hwang HS, Shin H, Han J, Na K. Combination of photodynamic therapy (PDT) and anti-tumor immunity in cancer therapy. *Journal of pharmaceutical investigation*, 2018; 48(2): 143-151.
53. Chang MC, Chan CP, Wang YJ, Lee PH, Chen LI, Tsai YL, Lin BR, Wang YL, Jeng JH. Induction of necrosis and apoptosis to KB cancer cells by sanguinarine is associated with reactive oxygen species production and mitochondrial membrane depolarization. *Toxicology and applied pharmacology*, 2007; 218, 143-151.
54. Chernyak BV, Izyumov DS, Lyamzaev KG, Pashkovskaya AA, Pletjushkina OY, Antonenko YN, Sakharov DV, Wirtz KWA, Skulachev VP. Production of reactive oxygen species in mitochondria of HeLa cells under oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2006; 1757(5-6): 525-534.

55. Chilakamarthi U, Giribabu L. Photodynamic therapy: past, present and future. *The Chemical Record*, 2017; 17(8): 775-802.
56. Chizenga E P, Abrahamse H. Nanotechnology in modern photodynamic therapy of cancer: A review of cellular resistance patterns affecting the therapeutic response. *Pharmaceutics*, 2020; 12(7): 632.
57. Choudhary R., Reddy SS, Nagi R, Nagaraju R, Kunjumon SP, Sen R. The Effect of Photodynamic Therapy on Oral-Premalignant Lesions: A Systematic Review. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 2022; 14(3):, e285.
58. Choukroun J, Geoffroy PA. Light therapy in mood disorders: a brief history with physiological insights. *Chronobiology in Medicine*, 2019; 1(1): 3-8.
59. Jain KK. Recent advances in nanooncology. *Technology in cancer research & treatment*, 2008; 7(1): 1-13.
60. Jethva K, Bhatt D, Zaveri M. Phytopharmacognostical study of some selected antituberculosis plants and study of its cytotoxicity screening using vero cell line. *International journal of pharmaceutical sciences and research*, 2021; 12(3): 1685-1698.
61. Judy JD, Bertsch PM. Bioavailability, toxicity, and fate of manufactured nanomaterials in terrestrial ecosystems. *Advances in agronomy*, 2014; 123, 1-64.
62. Kessel D. Photodynamic therapy: from the beginning. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2004; 1, 3-7.
63. Khelissa SO, Abdallah M, Jama C, Faille C, Chihib NE. Bacterial contamination and biofilm formation on abiotic surfaces and strategies to overcome their persistence. *Journal of materials and Environmental Sciences*, 2017; 8(9): 3326-3346.
64. Kim R, Emi M, Tanabe K, Murakami S, Uchida Y, Arihiro K. Regulation and interplay of apoptotic and non-apoptotic cell death. *A Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 2006; 208, 319-326.

65. Kim D, Song J, Won J. Structural effects of anion exchange composite membranes in non-aqueous redox flow batteries. *Journal of Membrane Science*, 2018; 564, 523-531.
66. Kim MM, Darafsheh A. Light Sources and Dosimetry Techniques for Photodynamic Therapy. *Photochemistry and photobiology*, 2020; 96(2): 280-294.
67. Kirino I, Fujita K, Sakanoue K, Sugita R, Yamagishi K, Takeoka S, Fujie T, Uemoto S, Morimoto, Y. Metronomic photodynamic therapy using an implantable LED device and orally administered 5-aminolevulinic acid. *Scientific reports*, 2020; 10(1): 1-10.
68. Kłodzińska E, Szumski M, Dziubakiewicz E, Hryniewicz K, Skwarek E, Janusz W, Buszewski B. Effect of zeta potential value on bacterial behavior during electrophoretic separation. *Electrophoresis*, 2010; 31(9): 1590-1596
69. Kolarova H, Tomankova K, Bajgar R, Kolar P, Kubinek R. Photodynamic and sonodynamic treatment by phthalocyanine on cancer cell lines. *Ultrasound in medicine & biology*, 2009; 35(8): 1397-1404.
70. Konan-Kouakou YN, Boch R, Gurny R, Allemann E. *In vitro* and *in vivo* activities of verteporfin-loaded nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 2005; 103(1): 83-91.
71. Konan YN, Gurny R, Allémann E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2002; 66(2): 89-106.
72. Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International journal of food microbiology*, 2010; 144(1): 51-63.
73. Kudinova NV, Berezov TT. Photodynamic therapy: search for ideal photosensitizer. *Biomeditsinskaia Khimiia*, 2009; 55(5): 558-569.

74. Kuimova MK, Drobizhev M, Yang VXD, Phillips D, Rebane A, Wilson BC, Anderson HL. Blood vessel closure using photosensitisers engineered for two-photon excitation. *Nature Photonics*, 2008; 2: 420-424.
75. Kwon N, Kim H, Li X, Yoon J. Supramolecular agents for combination of photodynamic therapy and other treatments. *Chemical Science*, 2021; 12(21): 7248-7268.
76. Lagreca E, Onesto V, Di Natale C, La Manna S, Netti PA, Vecchione R. Recent advances in the formulation of PLGA microparticles for controlled drug delivery. *Progress in biomaterials*, 2020; 9(4): 153-174.
77. Lan M, Zhao S, Liu W, Lee CS, Zhang W, Wang P. Photosensitizers for photodynamic therapy. *Advanced healthcare materials*, 2019; 8(13): 1900132.
78. Lange C, Bednarski JP. Photosensitizers for photodynamic therapy: Photochemistry in the service of oncology. *Current pharmaceutical design*, 2016; 22(46): 6956-6974.
79. Lee Y, Kim DH. Wireless metronomic photodynamic therapy. *Nature Biomedical Engineering*, 2019; 3(1): 5-6.
80. Lee D, Kwon S, Jang SY, Park E, Lee Y, Koo H. Overcoming the obstacles of current photodynamic therapy in tumors using nanoparticles. *Bioactive Materials*, 2022; 8, 20-34.
81. Leibiger Ch, Kosyakova N, Mlkrtyan H, Gleib M, Trifonov V, Liehr T. First Molecular Cytogenetic High Resolution Characterization of the NIH 3T3 Cell Line by Murine Multicolor Banding. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2013; 61(4):306-312.
82. Li J, Stayshich RM, Meyer TY. Exploiting sequence to control the hydrolysis behavior of biodegradable PLGA copolymers. *Journal of the American Chemical Society*, 2011; 133(18): 6910-6913.
83. Li X, Huang W, Zheng X, Chang S, Liu C, Cheng Q, Zhu S. Synergistic *in vitro* effects of indocyanine green and ethylenediamine tetraacetate-mediated

- antimicrobial photodynamic therapy combined with antibiotics for resistant bacterial biofilms in diabetic foot infection. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2019; 25: 300-308.
84. Li X, Lovell JF, Yoon J, Chen X. Clinical development and potential of photothermal and photodynamic therapies for cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2020; 17(11), 657-674.
 85. Lilge L, Portnoy M, Wilson BC. Apoptosis induced in vivo by photodynamic therapy in normal brain and intracranial tumour tissue. *British Journal of Cancer*, 2000; 83: 1110-1117.
 86. Lim CK, Heo J, Shin S, Jeong K, Seo YH, Jang WD, Park CR, Park SY, Kim S, Kwon IC. Nanophotosensitizers toward advanced photodynamic therapy of Cancer. *Cancer letters*, 2013; 334(2): 176-187.
 87. Lin L, Song X, Dong X, Li B. Nano-photosensitizers for enhanced photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2021; 36, 102597.
 88. Lipko NB. Photobiomodulation: Evolution and Adaptation. *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery*, 2022; 40(4): 213-233.
 89. Lovell JF, Liu TW, Chen J, Zheng G. Activatable photosensitizers for imaging and therapy. *Chemical reviews*, 2010; 110(5): 2839-2857.
 90. Luo S, Tan X, Fang S, Wang Y, Liu T, Wang X, Yuan Y, Sun H, Qi Q, Shi C. Mitochondria-targeted small-molecule fluorophores for dual modal cancer phototherapy. *Advanced Functional Materials*, 2016; 26(17): 2826-2835.
 91. Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori KJ. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of controlled release*, 2000; 65(1-2): 271-284.
 92. Machatschek R, Schulz B, Lendlein A. The influence of pH on the molecular degradation mechanism of PLGA. *MRS Advances*, 2018; 3(63): 3883-3889.

93. Malanovic N, Lohner K. Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2016; 1858(5): 936-946.
94. Malina L, Barton Tomankova K, Malohlava J, Jiravova J, Manisova B, Zapletalova J, Kolarova H. The *in vitro* cytotoxicity of metal-complexes of porphyrin sensitizer intended for photodynamic therapy. *Toxicology in vitro*, 2016; 34, 246-256.
95. Mang TS. Lasers and light sources for PDT: past, present and future. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2004; 1, 43-48.
96. Marcus SL, McIntyre WR. Photodynamic therapy systems and applications. *Expert Opin Emerging Drugs*, 2002; 7, 321-334.
97. Martins TD, Lima E, Boto RE, Ferreira D, Fernandes JR, Almeida P, Ferreira LFV, Silva AM, Reis LV. Red and near-infrared absorbing dicyanomethylene squaraine cyanine dyes: photophysical properties and anti-tumor photosensitizing effects. *Materials*, 2020, 13(9): 2083.
98. Martins WK, Belotto R, Silva MN, Grasso D, Suriani MD, Lavor TS, Itri R, Baptista MS, Tsubone TM. Autophagy regulation and photodynamic therapy: insights to improve outcomes of cancer treatment. *Frontiers in oncology*, 2021; 10, 610472.
99. Master A, Livingston M, Gupta AS. Photodynamic nanomedicine in the treatment of solid tumors: perspectives and challenges. *Journal of controlled release*, 2013; 168(1): 88-102.
100. Mathews MS, Angell-Petersen E, Sanchez R, Sun CH, Vo V, Hirschberg H, Madsen SJ. The effects of ultra low fluence rate single and repetitive photodynamic therapy on glioma spheroids. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2009; 41: 578-584.
101. Mfouo-Tynga IS, Dias LD, Inada NM, Kurachi C. Features of third generation photosensitizers used in anticancer photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2021; 34, 102091.

102. Midden WR. Chemical mechanisms of the bioeffects of furocoumarins: the role of reactions with proteins, lipids, and other cellular constituents. *Psoralen DNA photobiology*. CRC Press, 2018; 1-49.
103. Misba L, Khan AU. Photodynamic Therapy Against Bacterial Biofilm: Role of Reactive Oxygen Species. *Oxidative Stress in Microbial Diseases*. Springer, 2019; 477-488.
104. Mishchenko T, Balalaeva I, Gorokhova A, Vedunova M, Krysko DV. Which cell death modality wins the contest for photodynamic therapy of cancer?. *Cell Death & Disease*, 2022;13(5): 1-16.
105. Mmola M, Roes-Hill ML, Durrell K, Bolton JJ, Sibuyi N, Meyer ME, Beukes DR, Antunes E. Enhanced antimicrobial and anticancer activity of silver and gold nanoparticles synthesised using *Sargassum incisifolium* aqueous extracts. *Molecules*, 2016; 21(12): 1633.
106. Moan J, Berg K, Kvam E, Western A, Malik Z, Ruck A, Schneckenburger H. Intracellular localization of photosensitizers. *Ciba Foundation Symposium*, 1989; 146: 95-107.
107. Monopoli MP, Åberg C, Salvati A, Dawson KA. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nature nanotechnology*, 2012; 7(12): 779-786.
108. Moriarty O, McGuire BE, Finn DP. The effect of pain on cognitive function: a review of clinical and preclinical research. *Progress in neurobiology*, 2011; 93(3): 385-404.
109. Mroz P, Yaroslavsky A, Kharkwal GB, Hamblin MR. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers (Basel)*, 2011; 3(2): 2516-2539.
110. Nagy V, Sahariah P, Hjálmsdóttir MÁ, Másson M. Chitosan-hydroxycinnamic acid conjugates: Optimization of the synthesis and investigation of the structure activity relationship. *Carbohydrate Polymers*, 2022; 277, 118896.

111. Naidoo C, Kruger CA, Abrahamse H. Photodynamic therapy for metastatic melanoma treatment: A review. *Technology in cancer research & treatment*, 2018; 17, 1533033818791795.
112. Nath D, Banerjee P. Green nanotechnology – a new hope for medical biology. *Environmental toxicology and pharmacology*, 2013; 36(3): 997-1014.
113. Nyman ES, Hynninen PH. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2004; 73(1-2): 1-28.
114. O'Connor AE, Gallagher WM, Byrne AT. Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 2009; 85: 1053-1074.
115. Oleinick NL, Morris RL, Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2002; 1(1): 1-21.
116. Ozog DM, Rkein AM, Fabi SG, Gold MH, Goldman MP, Lowe NJ, Martin GM, Munavalli, GS. Photodynamic therapy: a clinical consensus guide. *Dermatologic Surgery*, 2016; 42(7): 804-827.
117. Pajerski W, Ochonska D, Brzychczy-Wloch M, Indyka P, Jarosz M, Golda-Cepa M, Sojka Z, Kotarba A. Attachment efficiency of gold nanoparticles by Gram-positive and Gram-negative bacterial strains governed by surface charges. *Journal of Nanoparticle Research*, 2019; 21(8): 1-12.
118. Pandey AK, Kumar A. Improved microbial biosynthesis strategies and multifarious applications of the natural biopolymer epsilon-poly-l-lysine. *Process Biochemistry*, 2014; 49(3): 496-505.
119. Panjehpour M, Overholt BF, Haydek JM. Light sources and delivery devices for photodynamic therapy in the gastrointestinal tract. *Gastrointest Endoscopy Clinics of North America*, 2000; 10, 513-532.

120. Park YK, Park CH. Clinical efficacy of photodynamic therapy. *Obstetrics & gynecology science*, 2016; 59(6): 479-488.
121. Park JW, Hwang JU, Back JH, Jang SW, Kim HJ, Kim P-S, Shin S, Kim T. High strength PLGA/Hydroxyapatite composites with tunable surface structure using PLGA direct grafting method for orthopedic implants. *Composites Part B: Engineering*, 2019; 178, 107449.
122. Patra JK, Das G, Fraceto LF, Campos EVR, Rodriguez-Torres MDP, Acosta-Torres LS, Diaz-Torres LA, Grillo R, Swamy MK, Sharma S, Habtemariam S, Shin HS. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of nanobiotechnology*, 2018; 16(1): 1-33.
123. Pavot V, Berthet M, Resseguier J, Legaz S, Handké N, Gilbert SC, Stéphane P, Verrier B. Poly (lactic acid) and poly (lactic-co-glycolic acid) particles as versatile carrier platforms for vaccine delivery. *Nanomedicine*, 2014; 9(17): 2703-2718.
124. Pervaiz S, Olivo M. Art and science of photodynamic therapy. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2006; 33, 551-556.
125. Plekhova N, Shevchenko O, Korshunova O, Stepanyugina A, Tananaev I, Apanasevich V. Development of Novel Tetrapyrrole Structure Photosensitizers for Cancer Photodynamic Therapy. *Bioengineering*, 2022; 9(2): 82.
126. Pizova K, Bajgar R, Fillerova R, Kriegova E, Cenklova V, Langova K, Konecny P, Kolarova H. C – MYC and C- FOS expression changes and cellular aspects of the photodynamic reaction with photosensitizers TMPyP and CIAIPcS₂. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2015; 142,186–196.
127. Porta C, Moroni M, Guallini P, Torri C, Marzatico F. Antioxidant enzymatic system and free radicals pathway in two different human cancer cell lines. *Anticancer research*, 1996; 16(5A): 2741-2747.
128. Prajapati SK, Jain A, Jain A, Jain S. Biodegradable polymers and constructs: A novel approach in drug delivery. *European polymer journal*, 2019; 120, 109191.

129. Prasad PN. Polymer science and technology for new generation photonics and biophotonics. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 2004; 8(1): 11-19.
130. Prasad P, Singh R, Kamaraju S, Sritharan V, Gupta S. ϵ -Polylysine nanoconjugates: Value-added antimicrobials for drug-resistant bacteria. *ACS Applied Bio Materials*, 2020; 3(10): 6688-6696.
131. Rai MK, Deshmukh SD, Ingle AP, Gade AK. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *Journal of applied microbiology*, 2012; 112(5): 841-852.
132. Rai P, Mehrotra S, Priya S, Gnansounou E, Sharma SK. Recent advances in the sustainable design and applications of biodegradable polymers. *Bioresource technology*, 2021; 325, 124739.
133. Ramasamy M, Lee JH, Lee J. Potent antimicrobial and antibiofilm activities of bacteriogenically synthesized gold–silver nanoparticles against pathogenic bacteria and their physiochemical characterizations. *Journal of biomaterials applications*, 2016; 31(3): 366-378.
134. Roberts DD, Sherwood JA, Ginsburg V. Platelet thrombospondin mediates attachment and spreading of human melanoma cells. *The Journal of Cell Biology*, 1987; 104(1): 131-139.
135. Rocha LB, Soares HT, Mendes MIP, Cabrita A, Schaberle FA, Arnaut LG. Necrosis Depth and Photodynamic Threshold Dose with Redaporfin-PDT. *Photochemistry and photobiology*, 2020; 96(3): 692-698.
136. Sajjanar B, Kakodia B, Bisht D, Saxena S, Singh AK, Joshi V, Tiwari AK, Kumar S. Peptide-activated gold nanoparticles for selective visual sensing of virus. *Journal of Nanoparticle Research*, 2015; 17(5): 1-9.
137. Sahoo SK, Parveen S, Panda JJ. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine: Nanotechnology, biology and medicine*, 2007; 3(1): 20-31.

138. Samadi N, Abbadessa A, Di Stefano A, Van Nostrum CF, Vermonden T, Rahimian S, Teunissen EA, van Steenberg MJ, Amidi M, Hennink WE. The effect of lauryl capping group on protein release and degradation of poly (d, l-lactic-co-glycolic acid) particles. *Journal of controlled release*, 2013;172(2): 436-443.
139. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. *The bacterial cell envelope. Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2010; 2(5), a000414.
140. Sivandzade F, Bhalerao A, Cucullo L. Analysis of the mitochondrial membrane potential using the cationic JC-1 dye as a sensitive fluorescent probe. *Bio-protocol*, 2019; 9(1): e3128-e3128.
141. Sledge G, Miller K. Exploiting the hallmarks of cancer: The future conquest of breast cancer. *European Journal of Cancer*, 2003; 39, 1668-1675.
142. Sorrin AJ, Kemal Ruhi M, Ferlic NA, Karimnia V, Polacheck WJ, Celli JP, Huang H-C, Rizvi I. Photodynamic therapy and the biophysics of the tumor microenvironment. *Photochemistry and photobiology*, 2020; 96(2): 232-259.
143. Spikes JD. The historical development of ideas on applications of photosensitized reactions in health sciences. *Primary Photoprocesses in Biology and Medicine*, Springer, Boston, MA, 1985; 209-227.
144. Spriano S, Chandra VS, Cochis A, Uberti F, Rimondini L, Bertone E, Vitale A, Scolaro C, Ferrari M, Cirisano F, Gautier di Confienigo G, Ferraris S. How do wettability, zeta potential and hydroxylation degree affect the biological response of biomaterials? *Materials Science and Engineering: C*, 2017; 74, 542-555.
145. Srivastava SK, Yamada R, Ogino C, Kondo A. Biogenic synthesis and characterization of gold nanoparticles by *Escherichia coli* K12 and its heterogeneous catalysis in degradation of 4-nitrophenol. *Nanoscale research letters*, 2013; 8(1): 1-9.
146. Star WM, Wilson BC, Patterson MS. Light delivery and optical dosimetry in photodynamic therapy of solid tumors. *Photodynamic Therapy CRC Press*, 2020; 335-368.

147. Starkey JR, Rebane AK, Drobizhev MA, Meng F, Gong A, Elliott A, McInnerney K, Spangler CW. New two – photon activated photodynamic therapy sensitizers induce xenograft tumor regressions after near – IR laser treatment through the body of the host mouse. *Clinical Cancer Research*, 2008; 14, 6564-6573.
148. Sueki F, Ruhi MK, Gülsoy M. The effect of curcumin in antitumor photodynamic therapy: *In vitro* experiments with Caco-2 and PC-3 cancer lines. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2019; 27, 95-99.
149. Sun F, Hamagawa E, Tsutsui C, Sakaguchi N, Kakuta Y, Tokumaru S, Kojo S. Evaluation of oxidative stress during apoptosis and necrosis caused by Dgalactosamine in rat liver. *Biochemical pharmacology*, 2003; 65(1): 101-107.
150. Sun J, Du K, Diao J, Cai X, Feng F, Wang S. GSH and H₂O₂ Co-Activatable Mitochondria-Targeted Photodynamic Therapy under Normoxia and Hypoxia. *Angewandte Chemie*, 2020; 132(29): 12220-12226.
151. Tay CY, Setyawati MI, Xie J, Parak WJ, Leong DT. Back to basics: exploiting the innate physico-chemical characteristics of nanomaterials for biomedical applications. *Advanced functional materials*, 2014; 24(38): 5936-5955.
152. Timalisina S, Arimoto-Matsuzaki K, Kitamura M, Xu X, Wenzhe Q, Ishigami-Yuasa M, Kagechika H, Hata Y. Chemical compounds that suppress hypoxia-induced stress granule formation enhance cancer drug sensitivity of human cervical cancer HeLa cells. *The Journal of Biochemistry*, 2018; 164(5): 381-391.
153. Tinsley-Bown AM, Fretwell R, Dowsett AB, Davis SL, Farrar GH. Formulation of poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) microparticles for rapid plasmid DNA delivery. *Journal of Controlled Release*, 2000; 66(2-3): 229-241.
154. Van Straten D, Mashayekhi V, De Bruijn HS, Oliveira S, Robinson DJ. Oncologic photodynamic therapy: basic principles, current clinical status and future directions. *Cancers*, 2017; 9(2), 19.
155. Verger A, Brandhonneur N, Molard Y, Cordier S, Kowouvi K, Amela-Cortes M, Dollo G. From molecules to nanovectors: Current state of the art and

- applications of photosensitizers in photodynamic therapy. *International journal of pharmaceutics*, 2021; 604, 120763.
156. Von Moos N, Slaveykova VI. Oxidative stress induced by inorganic nanoparticles in bacteria and aquatic microalgae—state of the art and knowledge gaps. *Nanotoxicology*, 2014; 8(6): 605-630.
157. Wadhvani SA, Shedbalkar UU, Singh R, Chopade BA. Biogenic selenium nanoparticles: current status and future prospects. *Applied microbiology and biotechnology*, 2016;100(6): 2555-2566.
158. Wang L, Hu C, Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *International journal of nanomedicine*, 2017; 12: 1227-1249.
159. Wilson WW, Wade MM, Holman SC, Champlin FR. Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements. *Journal of microbiological methods*, 2001;43(3): 153-164.
160. Xie Y, Liu X, Chen Q. Synthesis and characterization of water-soluble chitosan derivate and its antibacterial activity. *Carbohydrate polymers*, 2007; 69(1): 142-147.
161. Xu J, Gao J, Wei Q. Combination of photodynamic therapy with radiotherapy for cancer treatment. *Journal of Nanomaterials*, 2016; 2016: 1-8.
162. Yang TC, Chou CC, Li CF. Antibacterial activity of N-alkylated disaccharide chitosan derivatives. *International journal of food microbiology*, 2005; 97(3): 237-245.
163. Yang M, Yang T, Mao C. Enhancement of photodynamic cancer therapy by physical and chemical factors. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019; 58(40): 14066-14080.
164. Young CC, Rekha PD, Lai WA, Arun AB. Encapsulation of plant growth-promoting bacteria in alginate beads enriched with humic acid. *Biotechnology and bioengineering*, 2006; 95(1): 76-83.

165. Zhao C, Li LY, Guo MM, Zheng J. Functional polymer thin films designed for antifouling materials and biosensors. *Chemical Papers*, 2012; 66(5): 323-339.
166. Zhou Y, Liang X; Dai Z. Porphyrin-loaded nanoparticles for cancer theranostics. *Nanoscale*, 2016; 8, 12394–12405.
167. Zhou Z, Zhang L, Zhang Z, Liu Z. Advances in photosensitizer-related design for photodynamic therapy. *Asian journal of pharmaceutical sciences*, 2021; 16(6): 668-686.
168. Žárská L, Malá Z, Langová K, Malina L, Binder S, Bajgar R, Kolářová H. The effect of two porphyrine photosensitizers TMPyP and ZnTPPS₄ for application in photodynamic therapy of cancer cells *in vitro*. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2021; 34, 102224.
169. Žárská L, Malá Z, Langová K, Malina L, Binder S, Bajgar R, Henke P, Mosinger J, Kolářová H. Biological Evaluation of Photodynamic Effect Mediated by Nanoparticles with Embedded Porphyrin Photosensitizer. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022; 23(7): 3588
170. <https://www.nih3t3.com/>
171. <https://www.immunology.org/hela-cells-1951>
172. https://www.culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=88030401&collection=ecacc_gc.
173. <https://www.atcc.org/products/crl-1424>

9 PUBLIKAČNÍ ČINNOST AUTORA

PŮVODNÍ VĚDECKÉ PUBLIKACE V ČASOPISE S IF

- **LUDMILA ŽÁRSKÁ**, ELENA GIUSTO, DARREN FERFAL BEIRNE, ARIANNA ROSSI, GIADA BASSI, ANDREA RUFFINI, MONICA MONTESI, DIEGO MONTAGNER, VACLAV RANC, SILVIA PANSERI. Graphene oxide nanoplateforms to enhance metal-based drug delivery in anticancer therapy, *Journal of Nanomaterials*, 2022, **IF 5.719**
- **LUDMILA ŽÁRSKÁ**, ZUZANA MALÁ, KATEŘINA LANGOVÁ, LUKÁŠ MALINA, SVATOPLUK BINDER, ROBERT BAJGAR, PETR HENKE, JIŘÍ MOSINGER, HANA KOLÁŘOVÁ. Biological Evaluation of Photodynamic Effect Mediated by Nanoparticles with Embedded Porphyrin Photosensitizer, *International Journal of Molecular Sciences*, 2022; 23: 7, **IF 5.924**
- **LUDMILA ŽÁRSKÁ**, ZUZANA MALÁ, KATEŘINA LANGOVÁ, LUKÁŠ MALINA, SVATOPLUK BINDER, ROBERT BAJGAR, HANA KOLÁŘOVÁ. The effect of two porphyrine photosensitizers TMPyP and ZnTPPS₄ for application in photodynamic therapy of cancer cells *in vitro*. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2021; 34, **IF 2.894**
- ZUZANA MALÁ, **LUDMILA ŽÁRSKÁ**, LUKÁŠ MALINA, KATEŘINA LANGOVÁ, RENATA VEČEŘOVÁ, MILAN KOLÁŘ, PETR HENKE, JIŘÍ MOSINGER, HANA KOLÁŘOVÁ. Photodynamic effect of TPP encapsulated in polystyrene nanoparticles toward multi-resistant pathogenic bacterial strains: AFM evaluation. *Scientific reports*, 2021; 11, **IF 3.998**
- ZUZANA MALÁ, **LUDMILA ŽÁRSKÁ**, ROBERT BAJGAR, KATEŘINA BOGDANOVÁ, MILAN KOLÁŘ, ALEŠ PANÁČEK, SVATOPLUK BINDER, HANA KOLÁŘOVÁ. The application of antimicrobial photodynamic inactivation on methicillin-resistant *S. aureus* and ESBL - producing *K. pneumoniae* using porphyrin photosensitizer in combination with silver nanoparticles. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2020; 33 **IF 2.894**
- SVATOPLUK BINDER, BARBORA HOŠÍKOVÁ, ZUZANA MALÁ, **LUDMILA ŽÁRSKÁ**, HANA KOLÁŘOVÁ. Effect of CIAIPcS₂ Photodynamic and Sonodynamic Therapy on HeLa Cells. *Physiological Research*, 2019; 68 (4): 467-474, **IF 1.701**
- JIŘÍ DOLANSKÝ, PETR HENKE, ZUZANA MALÁ, **LUDMILA ŽÁRSKÁ**, PAVEL KUBÁT, JIŘÍ MOSINGER. Antibacterial Nitric Oxide

and Singlet Oxygen Releasing Polystyrene Nanoparticles: Light and Temperature Trigger. *Nanoscale*, 2018; 10, 2639-2648, **IF 7.367**

ABSTRAKT:

- **LUDMILA ŽÁRSKÁ**, ELENA GIUSTO, DARREN FERGAL BEIRNE, ARIANNA ROSSI, GIADA BASSI, ANDREA RUFFINI, MONICA MONTESI, DIEGO MONTAGNER, VACLAV RANC, SILVIA PANSERI. Platinum conjugated to Graphen Oxide nanoplatform for drug delivery in antitumor therapy, *Nanoinnovation 2022*, Roma, **2022**
- **LUDMILA ŽÁRSKÁ**, ELENA GIUSTO, DARREN FERGAL BEIRNE, ARIANNA ROSSI, GIADA BASSI, ANDREA RUFFINI, MONICA MONTESI, DIEGO MONTAGNER, VACLAV RANC, SILVIA PANSERI. Graphene oxide nanoplatforms to enhance metal-based drug delivery in anticancer therapy, 1st School of Supramolecular and Bio-nanomaterials in Como, Como, **2022**
- **LUDMILA ŽÁRSKÁ**, ZUZANA MALÁ, HANA KOLÁŘOVÁ: Photodynamically active substances and their use for photodynamic therapy of tumors, *Advances in Drug Delivery and Biomaterials: facts and vision (CRS Italy Chapter Annual Workshop)*, Padova, **2018**
- **LUDMILA ŽÁRSKÁ**, ZUZANA MALÁ, ALESSANDRA GALLI, CARLA PEREGO, ALBERTO PASSI, MARTA GALGANO, ILARIA GIUNTINI, MASSIMO COSTA, CRISTINA LENARDI, SIMONA ARGENTIERE: Development of composites hydrogels containig hyaluronic acid and poly-lactic-co-glycolic microparticles for cell delivery in regeneration medicine, *Nanoinnovation 2018*, Roma, **2018**
- ZUZANA MALÁ, **LUDMILA ŽÁRSKÁ**, ALESSANDRA GALLI, CARLA PEREGO, ALBERTO PASSI, MARTA GALGANO, ILARIA GIUNTINI, MASSIMO COSTA, CRISTINA LENARDI, SIMONA ARGENTIERE: Development of composites hydrogels containig hyaluronic acid and poly-lactic-co-glycolic microparticles for cell delivery in regeneration medicine, *Advances in Drug Delivery and Biomaterials: facts and vision (CRS Italy Chapter Annual Workshop)*, Padova, **2018**
- ZUZANA MALÁ, **LUDMILA ŽÁRSKÁ**, KATEŘINA BOGDANOVÁ, MILAN KOLÁŘ, HANA KOLÁŘOVÁ: Synergistic antibacterial effect of photodynamic therapy combined with silver nanoparticles, *Nanoinnovation 2018*, Roma, **2018**

- **LUDMILA ŽÁRSKÁ, ZUZANA MALÁ, HANA KOLÁŘOVÁ:** Photodynamically active substances and their use for photodynamic therapy of tumors, XXXX. Days of Medical Biophysics, Prague, **2017**
- **ZUZANA MALÁ, LUDMILA ŽÁRSKÁ, KATEŘINA BOGDANOVÁ, MILAN KOLÁŘ, HANA KOLÁŘOVÁ:** Synergistic antibacterial effect of photodynamic therapy combined with silver nanoparticles, XXXX. Days of Medical Biophysics, Prague, **2017**