DISERTAČNÍ PRÁCE

Univerzita Palackého v Olomouci
Lékařská fakulta

Studium buněčného poškození po aplikaci fotodynamicky aktivních látek, záření a ultrazvuku s využitím fluorescenčních metod a mikroskopie atomárních sil.

MUDr. Petr Kolář

Olomouc 2014

Prohlašuji, že jsem svoji disertační práci vypracoval sám a uvedl jsem všechny použité zdroje literatury.

Olomouc, 2014 MUDr. Petr Kolář

....……

Děkuji své školitelce, doc. Ing. Kateřině Tománkové, Ph.D., za odborné vedení disertační práce a veškerou pomoc během studia.

Dále děkuji prof. RNDr. Haně Kolářové, CSc. a celému kolektivu Ústavu lékařské biofyziky za poskytnuté informace a příjemné podmínky a pomoc při práci. Především děkuji všem spoluautorům prací, které jsou součástí mé disertační práce.

Tato práce vznikla za podpory grantových projektů: FRVŠ 2419/2011/F3a,

GAČR 303/09/H048, CZ.1.05/2.1.00/01.0030 a IGA č. NS9648-4/20

Abstrakt:

Název: Studium buněčného poškození po aplikaci fotodynamicky aktivních látek, záření a ultrazvuku s využitím fluorescenčních metod a mikroskopie atomárních sil.

Práce se zabývá charakterizací fotosensitivních a sonosensitivních vlastností sensitizerů a studiem účinků ultrazvuku na buněčných liniích. Fotodynamické a sonodynamické reakce jsou využitelné pro fotodynamickou a sonodynamickou terapii nádorů, která je v této práci studována *in vitro* fluorescenčními metodami studia buněčného poškození a především pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM) na buněčných liniích. AFM je moderní mikroskopická metoda, která umožňuje studovat vzorky v nanometrovém rozlišení. Pro biologické aplikace byla zavedena metoda pro studium buněčného poškození na buněčných liniích. Předmětem řešení této práce je i zavedení metody umožňující měření mechanických vlastností s využitím mikroskopie atomárních sil, která bude obecně využitelná v biomedicínských aplikacích. Použitím této techniky je možné mimo zobrazení povrchu stanovit i mechanické vlastnosti vzorků jako je modul pružnosti, deformaci, adhezi a disipaci energie, což umožňuje studovat buněčné poškození. Byly studovány účinky porfyrinových sensitizerů $TPPS_4$, $ZnTPPS_4$, $PdTPPS_4$ a derivátů ftalocyaninu $ClAlPcS_2$ v kombinaci se zářením vhodné vlnové délky na buněčných liniích adenokarcinomu plic A549, lidského melanomu G361, myšího melanomu B16FO, nádoru děložního hrdla HeLa a nenádorové buněčné linie myších fibroblastů NIH3T3. Vliv sensitizerů o různých koncentracích, záření a ultrazvuku na životnost buněk, na produkci reaktivních forem kyslíku a na změny v mechanických vlastnostech, byl studován prostřednictvím fluorescenční mikroskopie, spektrofluorimetrie a pomocí mikroskopie atomárních sil. Všechny studované sensitizery vykazovaly fotodynamickou účinnost a byl prokázán synergický účinek kombinace *in vitro* fotodynamické a sonodynamické terapie s využitím ultrazvuku pro aktivaci sensitizerů.

Klíčová slova: mikroskopie atomárních sil, fluorescenční mikroskopie, cytomechanika, fotodynamická reakce, sonodynamická reakce

Abstract:

Title: Study of cell damage after application of photodynamically active compounds, radiation and ultrasound using fluorescence methods and atomic force microscopy.

The presented work deals with the characterization of photosensitive and sonosensitive properties of sensitizers and studies of the ultrasound effects on cell lines. Photodynamic and sonodynamic reactions are useful for photodynamic and sonodynamic therapy of tumors, which in this work is studied by *in vitro* fluorescence methods of cell damage and predominantly by means of atomic force microscopy (AFM) on different cell lines. AFM is a modern microscopic technique that allows to study samples in nanometer resolution. For biological application a method for studying cell damage in cell lines was introduced. The subject of this work is the introduction of a method allowing the measurement of mechanical properties using atomic force microscopy, which will be generally useful in biomedical applications. Using this technique it is possible besides surface imaging to determine mechanical properties of samples such as modulus of elasticity, deformation and adhesion energy dissipation, allowing the study of cellular damage. It has been studied the effects of porphyrin sensitizers $TPPS_4$, $ZnTPPS_4$, $PdTPPS_4$ and phthalocyanine derivatives $ClAlPcS_2$ in combination with radiation of a suitable wavelength on the lung adenocarcinoma cell line A549, human melanoma G361, B16FO mouse melanoma, cervical cancer HeLa cells and non-tumorigenic cell line NIH3T3 mouse fibroblasts. Effect of different sensitizers concentrations, radiation and ultrasound on the viability of cells, the production of reactive oxygen species, changes in mechanical properties were studied by fluorescence microscopy, spectrofluorimetry and by atomic force microscopy. All studied sensitizers showed photodynamic efficiency and also it was proved a synergistic effect of a combination of in vitro photodynamic and sonodynamic therapy using ultrasound to activate sensitizers.

Key words: Atomic Force Microscopy, Fluorescence Microscopy, Cytomechanics, Photodynamic effect, Sonodynamic effect

Cíle práce

1. Zavést metody studia hodnocení buněčného poškození s využitím mikroskopických a fluorescenčních metod.

2. Zavést metodu hodnocení cytomechanických vlastností na buněčných liniích prostřednictvím mikroskopie atomárních sil.

3. Ověřit účinnost fotodynamické terapie *in vitro* s využitím nově vyvíjených sensitizerů.

Obsah

Seznam zkratek 8

I. Teoretický úvod do problematiky 10

1. Úvod 10

2. Mikroskopické metody 11

2.1. Přehled zobrazovacích metod ve světelné mikroskopii 11

2.2. Konfokální mikroskopie 15

2.3. Moderní metody ve fluorescenční mikroskopii 17

2.4. Elektronová mikroskopie 19

2.5. Mikroskopie atomárních sil (AFM) 20

3. Měření mechanických vlastností s využitím AFM 28

4. Fotodynamická a sonodynamická reakce 35

4.1. Principy fotodynamické terapie (PDT) 36

4.2. Sensitizery 37

4.3. Zdroje záření používané pro PDT 39

4.4. Využití PDT v klinické praxi 40

4.5. Sonodynamická teapie (SDT) 41

II. Výsledková část 42

A. Vliv fotodynamické a sonodynamické reakce na buněčné systémy *in vitro* 43

B. Studium buněčného poškození a mechanických vlastností s využitím mikroskopie atomárních sil. 51

III. Závěr 58

IV. Literatura 60

V. Seznam příloh 70

Seznam zkratek

A549 – buněčná linie plicního adenokarcinomu

A7X-S10 – hydrofilní derivát chlorinu

AFM – mikroskopie atomárních sil

ALA – 5- aminolevulová kyselina

aPDT – antimikrobiální fotodynamická terapie

APTES – metoda silanizace

ATX-70 – komplex porfyrinu s gáliem

B16FO – buněčná linie myšího melanomu

$ClAlPcS_2$ – chlorhlinitý disulfonovaný ftalocyanin

CLSM - laserová rastrovací konfokální mikroskopie

CMV – cytomegalovirus

DIC Normanski - Nomarského diferenciální interferenční kontrast

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium - živné médium

DMT – Derjaguin-Müller-Toporov

DNA – deoxyribonukleová kyselina

ES – elastic shell (teorie pružných mušlí)

FA – formaldehyd

FDA – The Food And Drug Administration

FLIM – Fluorescence lifetime imaging (stanovení dob dohasínání fluorescence)

FRAP – Fluorescence Recovery (Redistribution) After Photobleaching

FRET – Fluorescence/Förster Resonance Energy Transfer

G361 – buněná linie lidského melanomu

GA – glutaraldehyd

HeLa – buněčná linie nádoru děložního hrdla virového původu

HIV – virus lidské imunitní nedostatečnosti

HOPG – vysoce organizovaný pyrolytický grafit.

HPD – hematoporfyrin

HSV – herpes simplex virus

IR - infračervené záření

LDL – Low Density Lipoprotein

LED – dioda emitující světlo

MSNL – micro sharp nitride lever

MTT – test buňečné životnosti

NIH3T3 – nenádorové buněčné linie myších fibroblastů

NMR – nukleální magnetická rezonance

NPe6 – laserphyrin

-NT MDT je název firmy,

PDT – fotodynamická terapie

$PdTPPS_4$ – palladium-meso-tetra(4-sulfonatophenyl)porphine

pH – pondus hydrogenia (potenciál vodíku)

PpIX – protoporfyrin IX

PS – fotosenzitizer

QNM – kvantitativní nanomechanické mapování

RNA – ribonukleová kyselina

ROS – reaktivní formy kyslíku

SDCLM **-** konfokální mikroskopie s rotujícím diskem

SDT – sonodynamická terapie

SnET2 – Purlytin

SPM – mikroskopie skenující sondou

STM – skenující tunelovací mikroskopie

TEM – transmisní elektronová mikroskopie

TIRFM - Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy

TNF – tumor necrosis factor

$TPPS_4$ – meso-tetra(4-sulfonatophenyl)porphine

UV – ultrafialové záření

UZ, UZV – ultrazvuk

WST09 – Tookad

$ZnTPPS_4$ – zinc-meso-tetra(4-sulfonatophenyl)porphine

I. Teoretický úvod do problematiky

1. Úvod

V posledních letech dochází k velkému vývoji moderních diagnostických i terapeutických metod založených na biofyzikálních principech. Vzhledem k náročnosti klinických studií je nutné ověřovat nové terapeutické a diagnostické postupy především na experimentálních modelech.

Studium účinků fyzikálních a chemických faktorů na buněčných liniích *in vitro* metodami je velmi aktuálním tématem. Mezi biofyzikální faktory, které jsou v této práci studovány, patří elektromagnetické záření a ultrazvuk. Obecně můžeme zařadit tyto terapeutické metody mezi fyzikální terapie. Elektromagnetické záření v oblasti viditelného spektra v kombinaci se sensitizéry o vhodné koncentraci mohou vyvolat v buňkách fotodynamickou reakci, vedoucí k buněčné smrti. Ultrazvuk v kombinaci se sonosensitizérem vyvolá v buňkách tzv. sonodynamickou reakci, která může rovněž způsobit buněčné poškození. Fotodynamická a sonodynamická reakce jsou základem pro fotodynamickou a sonodynamickou terapii nádorů, která je v této práci studována *in vitro* fluorescenčními metodami studia buněčného poškození (fluorescenční mikroskopie, spektrofluorimetrie, aj.) a především pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM).

AFM je moderní mikroskopická metoda, kde je možné sledovat vzorky v nanometrovém rozlišení. Pro biologické aplikace bylo třeba vyvinout metodu pro studium buněčného poškození na buněčných liniích, ale i metodu studia mechanických vlastností buněk pro další medicínské aplikace. Při ověřování vlastností nových materiálů, které budou využitelné jako náhrady tkání, orgánů, případně jejich částí je nutné ověřovat i adhezivní a mechanické vlastnosti buněk, které budou v kontaktu s novým materiálem. Předmětem řešení této práce je tedy i zavedení metody umožňující měření mechanických vlastností s využitím mikroskopie atomárních sil, která bude obecně využitelná v biomechanických aplikacích.

Dalším velmi aktuálním tématem je v dnešní době řízené uvolňování léčiv v organizmu. Jednou z možností je uvolňování látek z liposomů pomocí ultrazvuku a ověření metody je částečně obsaženo v předložené práci.

Všechny výsledky mé práce byly již publikovány, a proto předkládám disertační práci v podobě komentovaného souboru publikací, doplněného krátkým teoretickým úvodem k mikroskopickým metodám, především k mikroskopii atomárních sil, k fotodynamické a sonodynamické reakci a jejich možnostem využití jako terapeutické metody.

2. Mikroskopické metody

Mikroskopie je souhrn aplikací optiky, které se využívají k zobrazení struktur, které nejsou viditelné pouhým okem (Kolářová 2005 -*Medicínská biofyzika*, Editoři: Navrátil L., Rosina J.). Mikroskopické metody se vyvíjely postupně a jejich rozvoj byl podmíněn stavem vědy a techniky v daném časovém období. Fyzikálním základem řady mikroskopických metod je princip superpozice elektromagnetických polí, kdy jejich vlastnosti jsou ovlivňovány vyšetřovaným předmětem a řízeným zásahem do vlastností pole (amplituda, polarizace, fáze, frekvence) v závislosti na dané mikroskopické metodě (Mikš 2010). Různé způsoby mikroskopického zobrazování se rozlišují na základě druhu záření přicházejícího do objektu (světlo, ultrafialové záření, polarizované světlo, infračervené záření apod.), nebo podle způsobu uspořádání optické soustavy (procházející světlo, odražené světlo, záření emitované fluorescencí, apod.). Tam, kde nestačí rozlišovací schopnost světelné mikroskopie (rozliší 200 nm), se používá mikroskopie elektronová nebo mikroskopie atomárních sil, které rozliší detaily na úrovni 0,1 nm (Kolářová 2005 *Medicínská biofyzika*, Editoři: Navrátil L., Rosina J.).

2.1. Přehled zobrazovacích metod ve světelné mikroskopii

Tvorbu obrazu je třeba chápat nejen na podkladě geometrické (paprskové) optiky, ale rovněž z hlediska vlnové optiky. Na základě Abbeovy teorie, je vysvětlován vznik obrazu v mikroskopu pomocí jevů, které jsou spjaty s působením předmětu na obraz

světelného zdroje vytvářený objektivem. Předmětová rovina je prosvětlena rovnoběžným paprskovým svazkem, na který působí předmět jako plošná nepravidelná mřížka. Proto se v obrazové ohniskové rovině vytvoří obraz světelného zdroje, který je charakterizován řadou ohybových maxim a minim. Tato maxima jsou pak zdrojem sekundárního vlnění, tyto vlny spolu interferují a vytváří tak v obrazové rovině objektu obraz předmětu (Kolářová 2005 *Medicínská biofyzika*, Editoři: Navrátil L., Rosina J.).

Metoda světlého pole. Světelný kužel paprsků z osvětlovací soupravy prochází preparátem (mikroskopie v procházejícím světle), nebo se odráží od preparátu (mikroskopie v odraženém světle) a vstupuje do objektivu.

Metoda temného pole. Osvětlovací soustava je upravena tak, že paprsky osvětlující preparát nevstupují do objektivu, a proto je zorné pole temné. Osvětlující paprsky se však na struktuře preparátu lámou, odrážejí, rozptylují nebo ohýbají, pak dopadají do objektivu a na temném pozadí jsou patrné obrysy struktur preparátu.

Metoda fázového kontrastu. Tato metoda zobrazení je jednou z nejrozšířenějších při pozorování biologických preparátů. Mikroskopické detaily se většinou nepatrně liší svým indexem lomu od indexu lomu okolí. Průchodem světla nativním preparátem dochází ke změně fáze světelné vlny při průchodu malými bezbarvými objekty, oproti světelné vlně procházející okolním prostředím. Zásahem do primárního interferenčního obrazu v obrazové ohniskové rovině objektivu, kdy prostřednictvím např. čtvrtvlnové fázové destičky se vyvolá změna fáze u světelného vlnění způsobujícího jinak intenzivní osvětlení zorného pole. Detaily preparátu budou zvýrazněny světlým obrysem (aureolou), který vzniká kolem neporušeného fázového objektu v důsledku ohybu paprsků na fázové destičce. Pomocí této metody dosáhneme kontrastního obrazu fázového předmětu, tedy předmětu, který prakticky neovlivňuje amplitudu vlnového pole, které jím prochází, ale ovlivňuje pouze jeho fázi (např. bakterie, buňky apod.). Výhodou této metody je, že nepoškozuje živé biologické objekty a umožňuje jejich pozorování v čase. (http://www.mikroskop-mikroskopy.cz/fazovy-kontrast/). Kombinujeme-li metodu fázového kontrastu s metodou šikmého osvětlení, získáme tzv. metodu reliefního fázového kontrastu (http://www.mikroskop-mikroskopy.cz/reliefni-fazovy-kontrast/).

Hoffmanův modulační kontrast (http://www.olympusmicro.com/index.html) je další metodou, která umožňuje dosáhnout zvýšení kontrastu obrazu pozorovaného předmětu.

Princip metody spočívá v tom, že pomocí speciální clony nacházející se v předmětové ohniskové rovině kondenzoru a amplitudového filtru v obrazové ohniskové rovině objektivu je ovlivňováno (modulováno) množství přímého světla propuštěného objektivem (http://www.mikroskop-mikroskopy.cz/hoffmanuv-modulacni-kontrast/). Další rozšířenou metodou, je metoda interferenčního kontrastu (Pluta 1988). Princip metody spočívá v tom, že spolu interferují dvě (nebo více) vlnová pole (buď kvasimonochromatická nebo polychromatická), z nichž první (tzv. předmětové pole) interaguje s vyšetřovaným předmětem a druhé pole je referenční. Pokud je referenčním polem mírně modifikované předmětové pole, pak se jedná o difereciální interferenční kontrast. Nejrozšířenější metodou v mikroskopii je Nomarského diferenciální interferenční kontrast (http://www.mikroskop-mikroskopy.cz/interferencni-kontrast/).

Ultrafialová mikroskopie. Využitím ultrafialového mikroskopu lze zvýšit rozlišovací schopnost (zkrácení vlnové délky způsobí zvýšení rozlišovací schopnosti). Lidské oko není citlivé v ultrafialové oblasti, a proto se záznam obrazu provádí fotograficky, případně specielní snímací CCD kamerou. Používá se optika z křemenného skla a jiných materiálů propouštějících UV záření, protože vlnové délky pod 350 nm běžné sklo nepropouští. Jako zdroj světla se používají výbojky s emisí v UV oblasti.

Infračervená mikroskopie. Infračervené záření (IR) v některých případech proniká objekty snadněji než viditelné světlo a lze studovat poměrně silné preparáty. Používá se blízká IR oblast s rozsahem vlnových délek 750 až 1 100 nm, kde již oko rovněž není citlivé. Používá se běžná skleněná optika a běžné světelné (tepelné) zdroje.

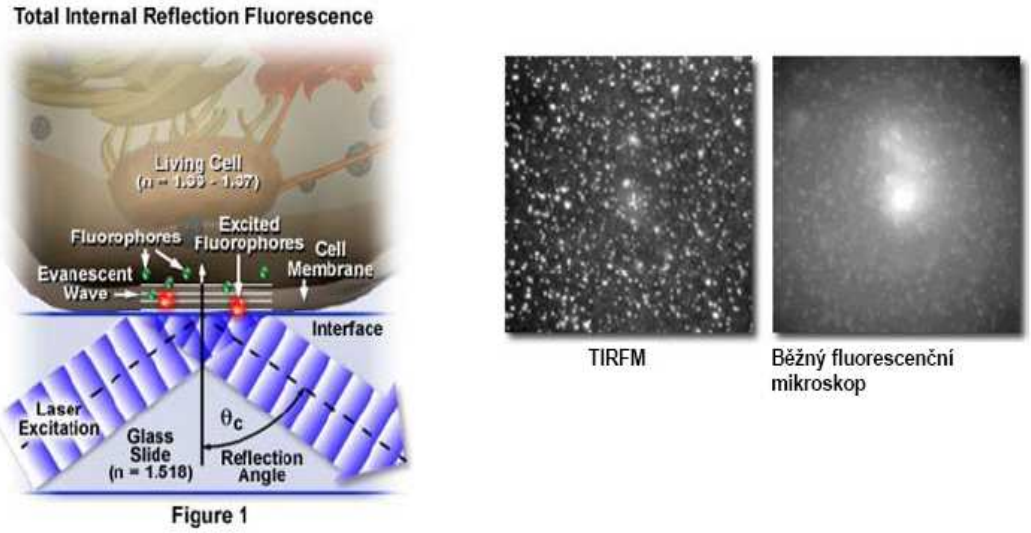
Polarizační mikroskopie. Řadu informací o preparátu lze získat sledováním jeho vlivu na lineárně polarizované světlo. Projeví se především optická aktivita tj. stáčení polarizační roviny světla a dvojlomné oblasti preparátu. Polarizační mikroskop je kombinací světelného mikroskopu a polarimetru. V osvětlovací soustavě je zařazen polarizátor a za objektiv se zařazuje analyzátor. Mikroskop je vybaven přesným úhlovým nastavením polarizátoru, analyzátoru a otočného stolku s preparátem. Tak je možné přesně odečíst úhel stáčení polarizační roviny světla v anizotropních oblastech preparátu. Pozorování objektů v polarizovaném světle (Mikš 2000, 2005) je základem polarizační mikroskopie (Pluta 1988, http://www.olympusmicro.com/index.html), která nachází široké uplatnění zejména v mineralogii. Pozorujeme-li dvojlomný objekt v bílém světle a

umístíme-li jej mezi dva polarizátory, jejich propustné směry spolu svírají nějaký úhel, potom se nám předmět jeví v různých místech různě zabarven v závislosti na tom, jak velký je dvojlom (Mikš 2000, 2005).

Fluorescenční mikroskopie. Fluorescencí obecně rozumíme proces, při kterém po absorpci kvanta záření látkou (molekulou), je vyzářeno kvantum o delší vlnové délce. U biologických objektů pak rozeznáváme tzv. primární fluorescenci (vlastní), kdy je fluoreskující látka přítomná v objektu jako jeho přirozená složka a sekundární fluorescence, kdy je aplikována fluoreskující látka (fluorofory) pro znázornění původně nefluoreskujících objektů. Luminiscenční mikroskopy jsou vybaveny intenzivním světelným zdrojem. Obvykle se používají vysokotlaké rtuťové nebo xenonové výbojky. Pro vyčlenění excitační vlnové délky světla se používají optické filtry nebo monochromátory. Excitační filtr se dává před kondenzor osvětlovací soustavy, a na preparát dopadá jen zvolené budící záření. U novějších mikroskopů se používá jako zdroj záření laser. Fluorescenční mikroskopy se používají především v imunocytochemii, kde protilátka označená fluoroforem interaguje s antigenem a umožňuje tak zjistit jeho lokalizaci. Velmi často se používá fluorescein emitující zelené světlo při excitaci modrým světlem, který se naváže na jednu protilátku a na jinou protilátku se naváže rhodamin emitující červené světlo při excitaci žluto-zeleným světlem, pak můžeme porovnávat vzájemné pozice různých molekul ve stejné buňce apod. Nevýhodou klasického fluorescenčního mikroskopu je, že části vzorku nad a pod zaostřenou rovinou jsou také excitovány a světlo pocházející z těchto oblastí přispívá k rozmazání obrazu. Další nevýhodou je fotovybělování (*photobleaching*), při kterém fluorofor trvale ztrácí schopnost emitovat záření (http://www.mikroskop-mikroskopy.cz/fluorescence/).

Kombinujeme-li jev fluorescence s totálním odrazem světla na rozhraní dvou prostředí, nazýváme tuto metodu ***TIRFM*** (*Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy*) (http://www.olympusmicro.com/index.html). Princip metody spočívá v tom, že při totálním odrazu světla na rozhraní dvou různých prostředí proniká část světla z prvního prostředí do druhého prostředí, přičemž hloubka průniku je velmi malá. Nachází-li se v tomto prostoru nějaký objekt, pak nastává rozptyl světla na tomto objektu a daný objekt můžeme pozorovat. Je-li v objektu obsažen fluorofor citlivý na extitační světlo, pak dochází k fluorescenci. Objekty nacházející se mimo oblast průniku světla nejsou

pozorovatelné. Metoda umožňuje zobrazit i takové objekty, jejichž velikost leží pod mezí rozlišení použitého mikroskopového objektivu (viz obrázek 1).



Obrázek 1. Srovnání obrazu z běžného mikroskopu a s využitím TIRFM (převzato z: http://www.mikroskop-mikroskopy.cz/tirfm/)

2.2. Konfokální mikroskopie

Laserová konfokální skenovací mikroskopie. K novým perspektivním mikroskopickým metodám patří laserová konfokální skenovací mikroskopie. Při pozorování v konfokálním mikroskopu je studovaný vzorek osvětlen bodovým zdrojem světla, laserovým svazkem, zaostřeným na clonku (tzv. první konfokální bodovou clonku), která je pak objektivem mikroskopu zobrazena do bodu uvnitř vzorku. Odtud pak světlo vzorkem odražené či emitované fluorescencí prochází zpětně objektivem a vytvoří další obraz této bodové clonky v zadní ohniskové rovině, kde je druhá konfokální bodová clonka. Tato clonka zabrání průchodu záření z nezaostřených míst ve vzorku a tím i jeho detekci, neboť detektor je umístěn až za clonkou. Obraz roviny zaostření je získán rastrováním zorného pole rozmítáním laserového paprsku.

Mezi hlavní přednosti konfokální mikroskopie ve srovnání s klasickou optickou mikroskopií tedy patří vyšší rozlišovací schopnost a potlačení rušivého záření z nezaostřených částí studovaného vzorku. Je proto možné vést i tlustším vzorkem relativně tenké optické řezy a lze zaznamenávat série digitalizovaných řezů vzorkem. Tyto sériové řezy jsou navíc přesně slícované, a tak představují vhodná vstupní data jak pro vizualizaci, tak i měření geometrických charakteristik trojrozměrných objektů (např. objem a povrch buněk), které lze takovou sérií optických řezů celé „prokrájet“ (Kolářová 2005 *Medicínská biofyzika*, Editoři: Navrátil L., Rosina J.). S konfokální mikroskopií je možné dosáhnout vyššího kontrastu, než u ostatních metod světelné mikroskopie. Konfokální mikroskopie je neinvazivní a nedestruktivní. Toho je možné dobře využít v biologickém a biomedicínském výzkumu při studiu struktury buněk a tkání. Často vede zlepšení kontrastu při konfokální mikroskopii k zobrazení buněčných struktur, které při použití klasického mikroskopu není možné vůbec pozorovat. Nejčastěji používanou technikou konfokální mikroskopie je laserová rastrovací konfokální mikroskopie (CLSM). Laserový paprsek je v tomto případě fokusován na jediný bod preparátu. Postupně je možné skenovat preparát bod po bodu, dokud není vytvořen kompletní obraz. Kvůli tomu je možné použít tuto techniku pouze u statických obrazů. Problém dynamického systému překonává konfokální mikroskopie s rotujícím diskem (SDCLM). Při této metodě je světlo zaměřeno na preparát přes rotující disk, na kterém se nachází velké množství clonek. Díky tomu je možné zobrazovat několik bodů preparátu najednou a snímání obrazu je rychlejší, než u předešlé metody. Metoda je vhodná pro pozorování rychlých dějů v živých systémech **(**Hájková 2005).

Novější způsob trojrozměrného zobrazování mikroskopických struktur umožňuje další, typ optického mikroskopu, tzv. dvoufotonový mikroskop, který poprvé představili v r. 1990 američtí vědci v čele s W. W. Webbem z Cornellské univerzity. Mikroskop zobrazuje tenké optické řezy tlustším vzorkem, podobně jako „klasický“ konfokální mikroskop, ale místo jednofotonové excitace se zde využívá excitace dvěma fotony, které jsou absorbovány prakticky současně, tedy v jediném kvantovém okamžiku. Toto je možné zabezpečit pouze pomocí speciálního laseru, který vysílá fotony s šířkou pulzu řádově 100 femtosekund. K dvoufotonové excitaci dochází pouze v ohnisku objektivu, a proto k získání obrazů optických řezů vzorkem nepotřebujeme odstiňovat obraz z nezaostřených míst pomocí konfokální clonky, jako je tomu u jednofotonového

konfokálního mikroskopu. Vzorek je tak ozařován pouze bodově a zhášení fluorescenčních barviv v nezaostřených místech vzorku je výrazně omezeno. Mezi další výhody dvoufotonové mikroskopie ve srovnání s klasickou konfokální mikroskopií patří větší hloubka ostrosti (až do 400 μm) i u vzorků, jejichž povrchové vrstvy vykazují silnou fluorescenci a zvýšený podíl signálu k šumu, tedy i kontrastnější obrazy, zejména ve větších hloubkách vzorku. Velkou výhodou je i snížená fototoxicita, umožňující dlouhodobé pozorování živých buněk a tkání i při použití fluorescenčních barviv s UV excitací **(**Kubínová 2003, 2011, 2013).

2.3. Moderní metody ve fluorescenční mikroskopii

V poslední době byly zavedeny nové dynamické metody využívající CLSM, vhodné pro studium živých buněk. Umožňují získat informace o fyzikálních vlastnostech bezprostředního okolí použité fluorescenční sondy.

FRAP **-** Fluorescence Recovery (Redistribution) After Photobleaching, využívá fotodegradace fluorochromů navázaných na membránové molekuly. Je to metoda sloužící k měření difúzní kinetiky membránových komponent, lipidů i proteinů (Fukano 2004). K fotodegradaci dojde během krátkého pulsu laserového paprsku fokusovaného mikroskopem na povrch buňky. Po "vybělení" části vzorku následuje difúze nepoškozených molekul fluorochromu z okolní části preparátu spojená s obnovením fluorescence v místě, kam byl intenzívní puls fokusován. Difúzní kinetika se stanoví na základě časového průběhu nárůstu intensity této fluorescence (Houtsmuller 2005).

FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging) – stanovení dob dohasínání fluorescence se využívá pro měření intenzity fluorescence jako odezvu na změny v interakcích sondy s jejím okolím, bez rušivého vlivu případných lokálních rozdílů v její koncentraci. Zásadní význam má použití *FLIM* při sledování molekulárních interakcí a mezimolekulárních vzdáleností pomocí nezářivého přenosu excitační energie (Wallrabe 2005).

Metoda nezářivého přenosu ***FRET*** (Fluorescence/Förster Resonance Energy Transfer) je metoda pro měření nanometrových vzdáleností a jejich změn mezi molekulami *in vivo* i *in vitro*. Tato technika umožňuje studovat interakci mezi dvěma různými molekulami (proteiny). Tyto molekuly jsou označeny odlišnými fluorochromy, které jsou zvoleny

tak, aby se emisní spektrum jednoho z nich překrývalo s excitačním spektrem druhého. Pokud tyto molekuly vzájemně reagují a jejich fluorochromy se dostanou velice blízko (méně než na 4 nm), energie excitovaného světla se může přenést z jednoho fluorochromu na druhý. Tedy při osvícení komplexu excitačním světlem prvního fluorochromu dostaneme emisní světlo odpovídající druhému fluorochromu. Excitační energie je důsledkem interakce mezi elektrickými dipóly dvou fluorochromů - donoru, který absorbuje excitační záření, a akceptoru, který po nezářivém přenosu excitace emituje svoji vlastní fluorescenci, přičemž fluorescence donoru přestává být pozorovatelná. Aby k nezářivému přenosu vůbec došlo, musí emisní spektrum donoru částečně překrývat absorpční spektrum akceptoru. Výsledná účinnost *FRET* je nepřímo úměrná šesté mocnině vzdálenosti mezi donorem a akceptorem. Prakticky využitelných hodnot v rozpětí jednotek až desítek procent kvantového výtěžku fluorescence donoru dosahuje při mezimolekulárních vzdálenostech ležících v rozmezí 1 - 10 nm. FRET proto představuje indikátor těsné blízkosti donor-akceptorových párů fluorochromů, jejichž kolokalizaci lze takto prokazovat při vzdálenostech až stokrát menších, než je reálná rozlišovací schopnost mikroskopu v běžném fluorescenčním módu. *FRET* je tedy nástrojem pro zkoumání prostorového rozložení membránových receptorů nebo interakcí mezi proteiny (Kenworthy 2000).

STED (Stimulated Emission Depletion). Je metoda umožňující dosáhnout rozlišení (30 nm) vyšší než je klasická mez ($0{,}6\lambda/NA$). Princip metody spočívá v tlumení fluorescence excitovaných molekul v krajních partiích stopy (rozptylové funkce) skenujícího laserového svazku a to pomocí dvou časově synchronizovaných a prostorově koincidujících laserových pulsů, z nichž první (excitační) provádí excitaci fluorochromů a druhý (STED puls) tlumí (ochuzuje) saturací emisi. K tlumení emise dochází v okrajových partiích stopy excitačního svazku, její střed však není tlumen. Dochází tak k podstatnému zmenšení fluorescenční stopy a tím k výraznému zvýšení rozlišení (Point Spread Function engineering) (Hell 1994). V laserové konfokální mikroskopii se uplatňují metody využívající spontánně fluoreskující protein nazývaný zelený fluorescenční protein (GFP) izolovaný již v roce 1962 z medúzy pohárovky - *Aequorea victoria*, žijící v severní části Tichého oceánu (Johnson 1962). Tato medúza obsahuje kromě GFP bioluminiscenční protein *aequorin*, který emituje modré světlo. Světelná emise je u aequorinu regulována přítomností kalciových iontů. Úlohou GFP je převádět

modrou chemiluminiscenci aequorinu (o emisi v modré části spektra, s maximem o vlnové délce 395 nm) na emisi zeleného světla s maximem o vlnové délce 509 nm (Morin 1971). Alternativou GFP je červený fluorescenční protein DsRed izolovaný z rodu *Discosoma* vyskytujících se jako korálové útesy v Indickém a Tichém oceánu. Má velkou odolnost proti světelnému vybělení (photobleaching) (Garcia 2001).
Dalšími používanými bioluminiscenčními proteiny, používanými zejména jako markery při metodě FRET jsou žlutý fluorescenční protein YFP a cyanový fluorescenční protein CFP (Mizuno 2001). Nověji objevený fluorescenční protein Kaede je naklonovaný z kamenného korálu *Trachyphyllia geoffroyi a slouží* pro barevné označení cytoplazmy celé buňky nebo znázornění neuronální synapse (Ando 2002, Mizuno 2003),

Novým nástrojem výrazně vylepšujícím současné možnosti mikroskopu a to až na úroveň pozorování virů nebo nukleonových kyselin je tzv. fotonický nanojet, kdy je možné rozlišení pod úrovní 100 nanometrů. Úzký paprsek světla s velkou intenzitou, který se šíří dielektrikem tvaru průhledných mikrokuliček o průměru 60 mikrometrů, a které jsou umístěny na povrch zkoumaného vzorku a díky jim je možno dosáhnout rozlišení až na úrovni jedné sedminy vlnové délky. Mikrokuličky jsou vyrobeny titaničitanu barnatého (Heifetz 2013).

2.4. Elektronová mikroskopie

U elektronových mikroskopů je funkce světelných paprsků nahrazena svazkem elektronů emitovaných ve vakuu elektronovou tryskou. Skleněná optika používaná u světelných mikroskopů je nahrazena systémem elektromagnetických čoček, jejichž pole působí na procházející elektrony. Vliv magnetického pole elektromagnetické čočky lze srovnat s vlivem lámavosti skleněných čoček. Podobně jako kvalita obrazu zvětšeného objektu a rozlišovací schopnost světelného mikroskopu je závislá na kvalitě optické soustavy a světelného zdroje, kvalita výsledného obrazu v elektronovém mikroskopu a jeho rozlišovací schopnost je dána dokonalostí elektronoptické soustavy, stabilitou zdroje, který vytváří potenciál mezi anodou a katodou, stabilitou proudů budících elektromagnetické čočky a kvalitou vakua v tubusu. V elektronové mikroskopii rozlišujeme podle způsobu zobrazení transmisní elektronovou mikroskopii (TEM) a

rastrovací (skanovací) elektronovou mikroskopii (SEM). Transmisní (prozařovací) elektronová mikroskopie je systém přímého pozorování a snímání obrazu, kdy proud elektronů prostupuje speciálně připraveným objektem a difraktované paprsky na jeho strukturách vytvoří interferencí výsledný obraz na luminiscenčním stínítku, který můžeme pozorovat okulárem nebo jej převést CCD kamerou na monitor, případně snímat fotografickou cestou. Rastrovací elektronová mikroskopie představuje systém nepřímého pozorování a snímání obrazu, kdy objekt je řádkován urychleným elektronovým svazkem, a uvolněné elektrony ze vzorku jsou registrovány příslušným detektorem. Obraz je po jeho digitalizaci uložen v paměti PC. Předností elektronové mikroskopie je nejen značná rozlišovací mez (TEM řádově 0,1 nm, u SEM 1 nm) a velká hloubka ostrosti (u rastrovacích elektronových mikroskopů), ale po připojení speciálních detektorů možnost získat informace o chemickém složení vzorku, jeho struktuře apod. Při zobrazení v klasické SEM se musí na biologické vzorky nanést vrstva vodivého materiálu, protože se vyznačují špatnou vodivostí a jsou náchylné k poškození elektronovým svazkem. Vodivá vrstva odvádí hromadící se náboj na povrchu vzorku, který zkresluje obraz. Nedostatky klasické SEM jsou odstraněny v tzv. environmentální rastrovací elektronové mikroskopii, kdy je eliminován jev nabíjení preparátu a vzorky není třeba fixovat, vysušovat a pokovovat. Speciálními detektory, které nejsou citlivé na teplo ani světlo, jsou detekovány přímo elektrony a vznikající rentgenové záření (Kolářová 2005 *Medicínská biofyzika*, Editoři: Navrátil L., Rosina J.).

2.5. Mikroskopie atomárních sil (AFM)

AFM *(atomic force microscopy)* patří do skupiny metod tzv. sondové mikroskopie. Obraz povrchu vzorku je snímán po jednotlivých řádcích sondou upevněnou na piezoelektrickém polohovacím zařízení. Vlastní sonda je tvořena hrotem, nejčastěji ve tvaru čtyřboké pyramidy vyleptané z nitridu křemíku, na ploché pružině ze stejného materiálu. Ohyb pružiny způsobený interakcí hrotu s povrchem vzorku je snímán paprskem laseru odráženým pružinou do fotodetektoru. Tak mohou být detekovány nejen ohyby pružiny ve směru kolmém na povrch vzorku, ale i její stranové (laterární) zkrucování. Síly vyvolávající tyto deformace jsou řádově velikosti nanonewtonů. Hrot

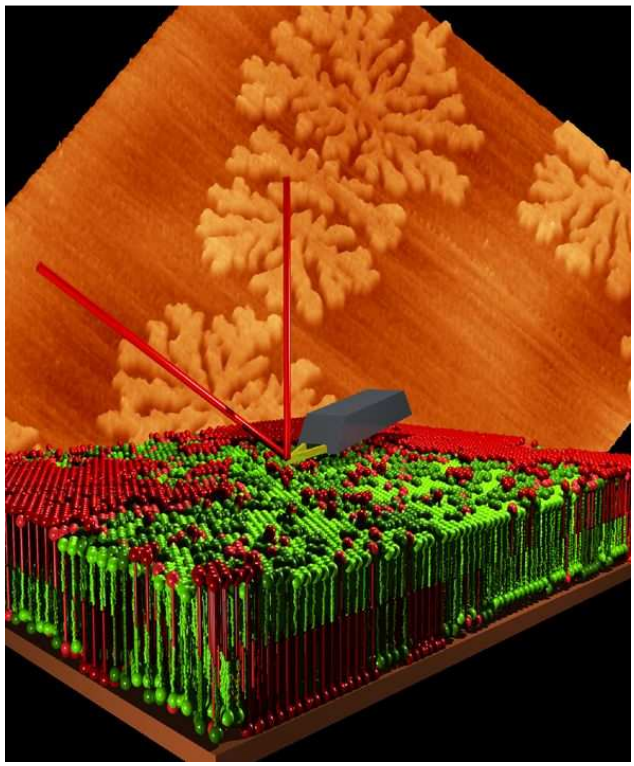
sondy se pohybuje ve větší vzdálenosti od povrchu vzorku (bezkontaktní režim) v oblasti přitažlivých sil, jakými jsou např. kapilární a van der Waalsovy síly nebo je pružina uvedena do oscilací blízko vlastní rezonanční frekvence. Interakce hrotu s povrchem vzorku je minimální, a proto je tento režim využíván s výhodou pro studium měkkých nebo slabě adhezivních povrchů jako jsou např. biologické materiály. Další aplikační možností založené na principu rastrovací sondové mikroskopie je např. mikroskopie s magnetickou sondou, která umožňuje zobrazování magnetických domén. Vhodnou chemickou modifikací hrotu lze využít mikroskopie atomárních sil také k selektivní detekci určitých molekul na základě jejich specifické interakce s hrotem sondy apod. Sondová mikroskopie má řadu předností, kterých nelze dosáhnout jakoukoliv jinou metodou. Je možné dosáhnout až miliardová zvětšení, umožňující přímé zobrazení jednotlivých atomů na površích. Obrazy jsou třírozměrné a hloubku útvarů, kromě šířky, je možno rovněž měřit. Je možné zobrazování v přirozených podmínkách a v různých prostředích, jako je vzduch, kapalina nebo vakuum. Pomocí sondové mikroskopie jsou možná měření fyzikálních nebo chemických vlastností povrchů při extrémně vysokém prostorovém rozlišení. Její velkou výhodou je schopnost vytvářet obrazy v libovolném prostředí, což je důležité např. při analýze buněk a biomolekul. (Kolářová 2005 Medicínská biofyzika, Editoři: Navrátil L., Rosina J.)

Výhoda mikroskopie atomárních sil je, že biologické vzorky mohou být studovány ve fyziologicky relevantním kapalném prostředí. AFM může pracovat při 37 °C, což tvoří ideální podmínky pro studium buněk nebo tkání. AFM se používá v kombinaci s optickým mikroskopem a je umožněna přímá korelace strukturálních a mechanických změn s nativním obrazem (Goldman 2010). Hlavní nevýhodou pro běžné použití jsou limity AFM: laterální rozlišení je závislé zejména na vlastnostech vzorku, na velikosti a tvaru hrotu a na silách vyvíjených na vzorek během skenování (Tománková habilitační práce 2013). Pro zobrazení buněčných částí i celých buněk se nejčastěji používají dva zobrazovací módy: kontaktní a poklepový (Franz 2008).

V kontaktním módu je hrot v přímém kontaktu s povrchem vzorku. Jejich vzájemná interakce způsobuje ohnutí nosníku, které je následně detekováno optickým systémem. Tento signál je využit ve zpětnovazebné smyčce, která usměrňuje napětí na piezoelektrických prvcích a reguluje tak vzájemné silové působení. V poklepovém módu kmitá hrot blízko své rezonanční frekvence. Během skenu dochází k útlumu jednotlivých oscilací, jež jsou závislé na silové interakci mezi vzorkem a hrotem. Pomocí

zpětnovazebné smyčky je obnovována jejich amplituda. Výhodou tapping módu je redukce laterálních sil, neboť dochází pouze k letmému dotyku s povrchem (Franz 2008, Kuznetsova 2007).

Hrot o délce řádově mikrometrů s poloměrem křivosti několika nanometrů je umístěn na konci pružného raménka o délce přibližně 200 μm s odraznou vnější plochou, na kterou je nastaven laserový paprsek Ten snímá výchylky nosníku a následně rekonstruuje obraz v počítači (viz obrázek 2) (Kaupp 2006).



Obrázek 2. Princip AFM: laserový paprsek snímá výchylky nosníku, na kterém je ze spodní strany umístěn hrot. Výchylky jsou způsobeny rozdílnou topografií povrchu vzorku. Odražený laserový svazek je zafokusován do čtyřsegmentové fotodiody a výsledný obraz je rekonstruován v počítači pomocí matematického algoritmu.

(převzato z: http://heikoseeger.xscience.info/Gallery_English.html)

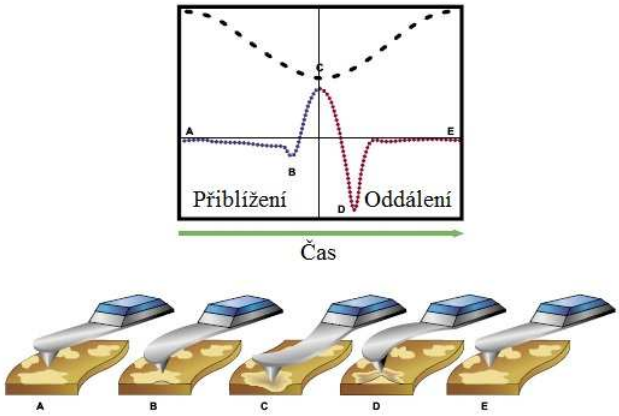
Jako standardní operační mód v biologických, a tedy i v medicínských, aplikacích je možno využít nejjednodušší kontaktní mód, který lze použít zejména při studiu mechanických vlastností, kde se plně využije vysoké pružnosti a nízké konstanty tuhosti nosníku. Kontaktem hrotu se vzorkem je možné dosáhnout atomárního rozlišení, čehož

využívá jehlový profilometr k měření topografie atomů. AFM dosáhne značně vysokého rozlišení již při použití velmi nízkých sil aplikovaných na hrot – většinou v rozmezí 10^{-7} – 10^{-11} N, které tím tvoří velice malou kontaktní plochu mezi hrotem a vzorkem. Tyto malé aplikované síly jsou základním rozdílem mezi kontaktním módem AFM a jehlovým profilometrem, kde se používají síly o velikosti 10^{-4} N a pravděpodobnost dosažení atomárního rozlišení se zvětšuje. Tento mód dává stabilní obrazy, ale stlačení hrotem může způsobit poničení vzorku. Operační síly jsou obvykle v rozmezí 1 – 10 nN (Serdyuk 2007).

Nekontaktní mód využívá skutečnosti, že hrot není v kontaktu se vzorkem a nehrozí poškození preparátu. Nosník s hrotem osciluje s určitou frekvencí (těsně nad jeho rezonanční frekvencí) nad povrchem vzorku, obvykle v řádu několika nm. Snížení rezonanční frekvence nosníku způsobují síly, které působí v rozsahu maximálně do vzdálenosti hrotu od povrchu, například van der Waalsovy síly. Systémem zpětné vazby je udržována konstantní amplituda kmitů. Měřením vzdálenosti hrotu od vzorku v každém bodu skenu se rekonstruuje obraz (Hawkes 2006).

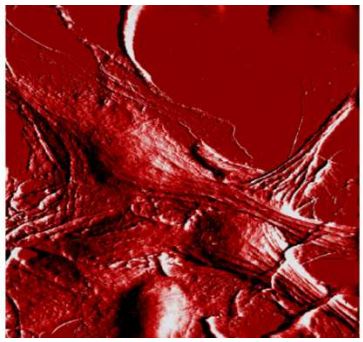
Nejčastěji používaným módem v biologických aplikacích je přerušovaný (semi-kontaktní, tapping, oscilační) mód, který lze využít zejména při zobrazování měkkých snadno poškoditelných vzorků (Tománková habilitační práce 2013). Nosník, řízený piezoelektrickým ovladačem, vibruje s určitou rezonanční frekvencí. Po přiblížení hrotu ke vzorku, na spodní části dráhy každého zhoupnutí, hrot jemně klepne do jeho povrchu a výsledkem je snížení oscilační amplitudy. Zpětnovazebná smyčka drží toto snížení na určité přednastavené hodnotě. Oscilační amplituda bývá nastavena v rozsahu 50 – 100nm a tuhost nosníku se používá mezi 10 – 100 N/m. Použitím semi-kontaktního módu se eliminuje jak poškození hrotu, tak destruktivní vliv laterálních sil na vzorek, díky krátké době trvání kontaktu mezi hrotem a vzorkem (Serdyuk 2007, Hawkes 2006).

Nejnovější ze zobrazovacích módů jsou Peak Force QNM a Scan Asyst módy patentované firmou Bruker. Jedná se o kvantitativní nanomechanické mapování (QNM) v každém bodu kontaktu hrotu s povrchem vzorku založeném na semi-kontaktním režimu (viz obrázek 3). Navíc v módu Scan Asyst je využíváno inteligentních algoritmů a systém sám sleduje a nastavuje nejvhodnější parametry měření bez nutnosti korekce uživatelem. Tím se práce na AFM značně zjednodušuje (www.bruker.com).



Obrázek 3. Průběh pohyb hrotu nad vzorkem v během měření parametrů pomocí Peak Force QNM. V každém bodě rozlišení změří F-d křivka, ze kterých je možno určit mechanické parametry vzorku (převzato ze http://blog.brukerafmprobes.com).

Nejčastěji sledovaným signálem je režim výšky (topography), který zobrazuje změny ve výšce vzorku během skenování. Měří se tzv. výchylka neboli deflection. Je také možné monitorovat změny ve výchylce nosníku tak, že signál zpětnovazebné smyčky se porovnává s přednastavenou výškou a v dalším bodě upraví nastavení vzdálenosti hrotu od vzorku. Obraz je poté více kontrastní a detaily obrazu jsou lépe identifikovatelné. Tento mód se nazývá Deflection Error (viz obrázek 4).

A B 

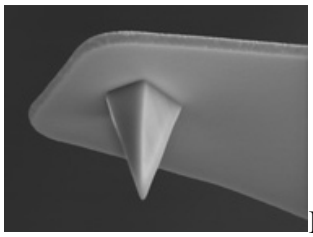
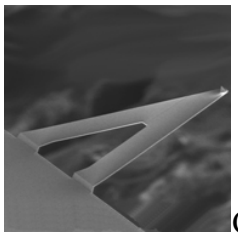
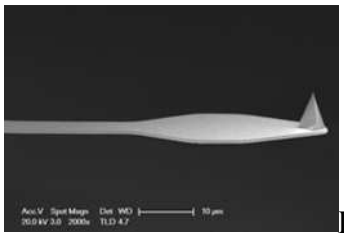
Obrázek 4. AFM skeny zaznamenané pomocí pracovního módu Scan Asyst a s hrotem Scan Asyst Fluid v živném médiu DMEM při pokojové teplotě s rozlišením 256 pixelů. Výškový signál (A) a Deflection error (B) reprezentuje topografii buněčné linie lidského melanomu G361. Velikost skenů je 100 × 100 µm s výškou 0 - 7,6 µm (bílé oblasti obr. A) a 0 - 92,9 nm (bílé oblasti obr. B). Skeny byly pořízeny na AFM Bioscope Catalyst fy Bruker a zpracovány SW Nanoscope Analysis. (Převzato z Tománková habilitační práce 2013)

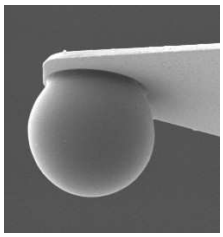
Podobně lze nastavovat přítlak hrotu k povrchu vzorku vždy v následujícím bodě skenu v typu zobrazení nazývaném Peak Force Error využívaným zejména v měření mechanických vlastností. Fázové zobrazení (Phase Imagigng) je forma vyjádření signálu v semi-kontaktním módu, kdy sonda kmitá s určitou frekvencí a systém zaznamená změnu posunu ve fázi v závislosti na změně vlastností materiálu (Tománková habilitační práce 2013).

Ke kvalitě AFM obrazu biologických struktur přispívá mnoho faktorů jako je velikost a tvar vzorku, velikost, tvar a materiál hrotu, vlastnosti zpětnovazebné smyčky, mechanické a chemické vlastnosti vzorku a zobrazujícího prostředí. Konečná velikost hrotu limituje laterální rozlišení a tvar hrotu značně přispívá k získání vysokého rozlišení obrazu. U AFM mohou některé atomy na špičce hrotu interagovat zároveň s více atomy na povrchu vzorku. To dokazuje, že AFM nemůže dosáhnout skutečného atomárního rozlišení na rozdíl od STM mikroskopů, kde tunelový proud závisí exponenciálně na vzdálenosti mezi hrotem sondy a povrchem vzorku a jen nejbližší atomy STM hrotů interagují s nejbližšími atomy povrchu vzorků (Kubínek 2003).

Pro studium živých buněk je součástí AFM sestavy injekční pumpa s průtokovou kapalinovou celou, která nepřetržitě doplňuje vhodná růstová média, plyny nebo testované chemikálie do kapalného prostředí, které obklopuje vzorek. Tím je možné udržovat konstantní fyziologické pH a kompenzovat vypařování. Jehla na vstupním konci je naplněna sterilním médiem a 5% obsahem CO_2. Tato směs je pumpována přes cca 1 m dlouhou sterilní hadičku do průtokové cely. Výstupní konec je připojen k odpadovému zásobníku a mechanické vakuové pumpě opět přes 1m dlouhou sterilní hadičku. Často je také možno připojit průtok plynu přímo do cely a tím udržovat vhodné pH během skenování buněk. Pro zabránění průtokových změn po přívodu plynu přímo do cely, je vhodné použít živná média, která jsou schopna dlouhodobě udržovat konstantní pH (Goldman 2010).

Pro každý typ experimentu je nezbytné vybrat správnou sondu (viz obrázek 5).

A  B  C  D



Obrázek 5. Sondy využívané AFM technikou. DNP10 s konstantou tuhosti 0,06 – 0,12 N/m (A), Scan Asyst Air - s konstantou tuhosti 0,4 N/m (B), Scan Asyst Air High Resolution s konstantou tuhosti 0,4 N/m (C), pro detekci mechanických vlastností prostřednictvím režimu síla-objem (F-V) s konstantou tuhosti 42 N/m a velikostí kuličky od 1,5 – 9 µm (D) (převzato z: www.bruker.com).

Materiály, ze kterých jsou hroty a nosníky vyráběny jsou opracované křemíkové kužely nebo čtyřstranné pyramidální hroty z nitridu křemíku. Hroty mohou být pokryty vrstvou oxidu křemičitého a k dosažení ostrosti a malého poloměru křivosti je možné leptat povrch například pomocí hydroxidu draselného. Takové hroty jsou poté připevněny nejčastěji leptáním k pružnému nosníku. Výroba velmi ostrých hrotů je zajištěna depozicí elektronovým nebo iontovým svazkem (Kaupp 2006).

Konstanta tuhosti udává citlivost AFM k mechanickým vlastnostem vzorku. Poloměr křivosti definuje kvalitu obrazu a rozlišení během skenování. Sondy z nitridu křemíku s konstantou tuhosti v rozsahu 0,01 N/m – 0,06 N/m jsou typicky užívané pro zobrazování a mechanické testování velmi měkkých biologických materiálů. Tyto sondy jsou citlivé k silám v rozsahu pikonewton (pN) – nanonewton (nN). Sondy s konstantou tuhosti 0,05 – 1,5 N/m jsou využívané pro kontaktní režim, naopak sondy s konstantou tuhosti 40 – 80 N/m jsou využívány pro nekontaktní a semi-kontaktní pracovní režimy (Kaupp 2006).

K testování silově-objemových vlastností vzorků se může využít přilepené skleněné kuličky k AFM sondě. Ačkoliv průměr kuličky může být 5 až 10 μm, výběr velikosti kuličky do značné míry závisí na struktuře vzorku. Nalepení ultrazvukem a etanolem očištěné borosilikátové kuličky na nosník se provádí pomocí speciálních epoxidových lepidel, nejčastěji pod hrot nebo na nosník bez hrotu. Zobrazování takto upraveným nosníkem je však možné jen v mikrometrickém rozlišení a vhodnější použití je mechanické testování vlastností v režimu síla-objem. Je důležité experimentálně určit konstantu tuhosti a citlivost každé sondy před začátkem měření (Taatjes 2006). Naměřené hodnoty se mohou lišit od hodnot stanovených výrobcem a jsou důležité pro správné nastavení sil aplikovaných na vzorek.

Studované biologické vzorky musí být pevně uchyceny k podkladu, aby jej hrot případným kontaktem se vzorkem během skenování nenarušil. Toho lze dosáhnout zesílením vazby k substrátu nebo redukováním síly vycházející z hrotu (Churnside 2012). Úprava substrátu je nutná zejména pří měření malých biomolekul. Pro testování kolagenu je vhodné použít slídu (muskovit) nebo HOPG (vysoce organizovaný pyrolytický grafit). Slída je používaná pro svůj „atomárně rovný povrch“ a negativní náboj. HOPG má také rovný štěp, ale nepolární povrch. Nejběžněji užívaná slída je muskovit – vytvořený vrstvami $(Si,Al)_2O_5$ iontově vázanými k centrálnímu $Al_2(OH)_2$. (Goldman 2010, Stylianou 2013). Pro měření nukleových kyselin je možné použít slídu, avšak tyto molekuly nejsou pevně připoutány k jejímu povrchu díky stejnému negativnímu náboji slídy i nukleových kyselin a hrot může biomolekulou smýkat, což často vede k rozmazání a obtížné identifikaci objektu. Slídu je tedy vhodné upravit například metodou silanizace pomocí APTES. Jedná se o ponoření substrátu (sklo, slída, křemíkové destičky) do roztoku 3-aminopropyltriethoxysilanu rozpuštěného v organickém rozpouštědle. Po oplachu rozpouštědlem a ultračistou vodou máme substrát, který obsahuje funkční vysoce reaktivní silanové skupiny schopné vytvořit kovalentní vazbu s biomolekulami (Lyubchenko 2011). Nejjednodušší metoda přípravy povrchu substrátu je modifikace poly-L-lysinem nebo poly-L-argininem, čímž zvýšíme afinitu biomolekul nebo buněk k povrchu. Jedná se o pouhé ponoření substrátu po definovanou dobu do vhodně koncentrovaného roztoku (nejčastěji 0,01%) a poté oplach v ultračisté vodě. Tato metoda je hojně využívána pro testování buněčných linií (Dulinska 2006).

Pro skenování buněk je často nezbytné použít fixační proces a skenovat za sucha nebo v kapalině. Skenování fixovaných buněk za sucha zvýší rozlišení obrazu, ovšem buňky již nejsou živé. Jednou z metod imobilizace vzorku je jeho pokovení, což využívají zejména jiné typy mikroskopických technik a je náročné na přípravu. Ovšem biologické preparáty jsou zcela imobilizované a dostatečně rigidní a morfologicky stabilní. Jako fixační činidla se nejčastěji používají činidla převzatá z jiných typů mikroskopie a to například z elektronové nebo imunofluorescenční. Nejběžněji užívaná fixační činidla jsou glutaraldehyd, formaldehyd, paraformaldehyd, etanol a metanol. Z výše jmenovaných činidel se v AFM mikroskopii užívá 0,1 – 2% glutaraldehyd (GA) (Tománková 2013).

3. Měření mechanických vlastností s využitím AFM

AFM umožňuje více než jen topografické zobrazení zkoumaného vzorku, ale také detekci mechanických vlastností za fyziologických podmínek. AFM je možné použít k dynamickému sledování změn tvaru buňky a změny mechanických vlastností například v průběhu farmakologické terapie (Rotsch 2000, Li 2012). AFM může pracovat v mnoha různých zobrazovacích a měřících režimech v závislosti na podstatě interakce mezi hrotem a povrchem vzorku. Mechanické vlastnosti povrchu vzorku mohou být detekovány buď v kontaktním módu (mikroskopie laterálních sil, modulace síly, analýza silových křivek atd.) nebo fázovým zobrazením semi-kontaktního módu (Ikai 2007). Moderní přístroje AFM jsou schopny zaznamenat několik signálů najednou včetně mechanických vlastností vzorku. AFM, jako žádná jiná mikroskopická technika, dokáže ve vysokém rozlišení zobrazit topografii, mechanické vlastnosti, deformaci, adhezi hrotu, disipaci energie a chybový signál a další, dle nastavení jednotlivých kanálů uživatelem. Všechny tyto signály jsou zaznamenávány v každém bodu skenu podle příslušného rozlišení obrazu. Změny polohy nosníku a tím i odpovídající síly působící na nosník mohou být vypočteny pomocí Hookova zákona (Serdyuk 2007, Goldman 2010).

$$F = k_c \cdot d \,, \tag{1}$$

kde F je síla, k_c je konstanta tuhosti nosníku a d je prohnutí nosníku.

Pohyb nosníku je možné detekovat již při změně 0,1 nm, 3D obraz může být generován buď signálem z prohnutí nosníku (výchylka, deflection image) nebo vertikálním posunem piezoelektrického členu (topografie). Během rastrovacího skenování, sonda může oscilovat s vysokou frekvencí přibližně kolem 300 kHz. Když hrot narazí na výškovou změnu na povrchu vzorku, amplituda oscilací se změní. Systém zpětné vazby potom odpovídá udržením oscilační amplitudy nosníku na konstantní úrovni. Do tohoto typu operačního módu spadají základní pracovní režimy: kontaktní, nekontaktní a semi-kontaktní.

Při ověřování mechanických vlastností vzorku je možné sbírat více signálů najednou a to v každém bodě skenu různou interpretací *F-d* křivky (obrázek 10). Jedná se například o základní výškový signál spolu s tuhostí (Modulus), adhezní mapou (Adhesion), disipací energie (Dissipation) nebo deformací (Deformation) skenovaného materiálu (www.bruker.com). Kalibrací standardním vzorkem příslušné tuhosti, je možné dosáhnout absolutních hodnot modulu (Pa), adheze (N) a disipace energie (eV).

Modul pružnosti

Modul pružnosti (Youngův modul) v Peak Force Tapping je získán fitováním z oddalující se *F-d* křivky na model Derjaguin-Müller-Toporov (DMT) (Derjaguin 1975):

$$F - F_{adh} = \frac{4}{3} E^* \sqrt{R(d - d_0)^3}\,, \tag{2}$$

kde $F - F_{adh}$ je interakční síla v závislosti na adhezi, R je poloměr hrotu, $d - d_0$ je deformace vzorku a E^* je redukovaný Youngův modul.

Pokud je znám Poissonův poměr, software přímo vypočítá Youngův modul dle vztahu

$$\frac{1}{E^*} = \frac{1 - \nu_{hrot}^2}{E_{hrot}} + \frac{1 - \nu_{vzorek}^2}{E_{vzorek}}, \tag{3}$$

kde $E_{vzorek,}$ ν_{vzorek} *a* $E_{hrot,}$ ν_{hrot} jsou Youngovy moduly a Poissonovy konstanty pro materiál hrotu a vzorku. Pro buňky je Poissonův poměr volen 0,5 (dokonale nestlačitelné).

Adheze

Podstata adheze spočívá v jakékoli přitažlivé síle mezi hrotem a vzorkem. Pokud je hrot modifikován, podstata adhezních sil se mění a odráží chemické složení vzorku.

Deformace

Deformace je definovaná jako hloubka vrypu hrotu do povrchu vzorku v oblasti největšího silového působení (Peak Force). Hodnota deformace obsahuje plastický i elastický příspěvek. Se znalostí jednotlivých parametrů hrotu a kontaktní oblasti lze tuto hodnotu deformace přepočítat na tuhost.

Disipační energie

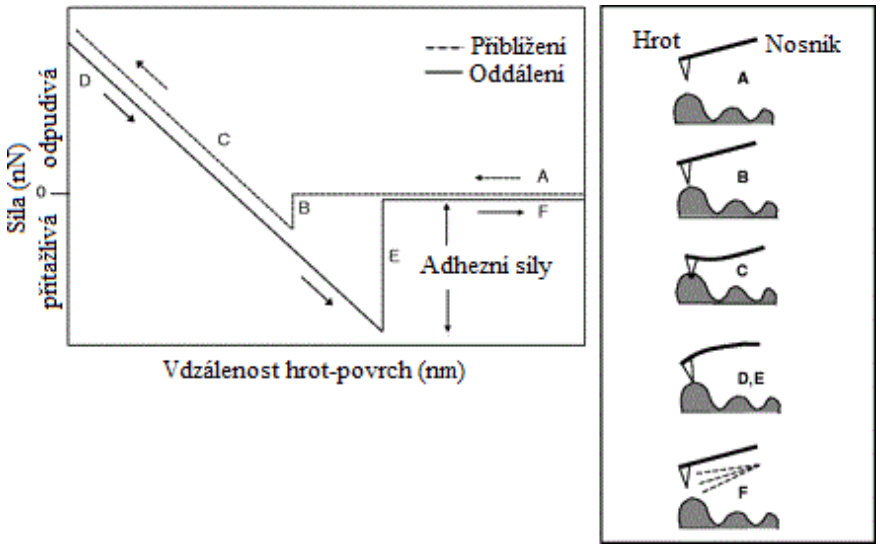
Disipační energie je dána součinem síly a také rychlosti integrovaná po dobu jednoho cyklu Peak Force:

$$W = \int \vec{F} \cdot d\vec{Z} = \int_0^I \vec{F} \cdot \vec{v}\, dt\,, \tag{4}$$

kde W je disipační energie jednoho cyklu, F je silová interakce a dZ je posunutí ve směru osy z.

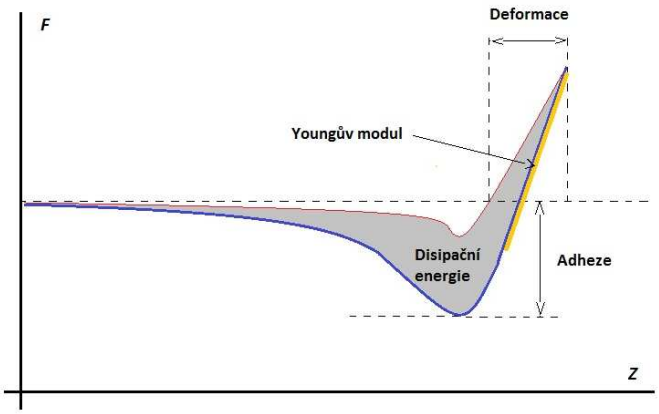
Z důvodu opačného směru vektorů pohybu ve směru osy z a rychlosti může být integrace nulová, pokud se křivky přiblížení a oddálení překrývají, je disipační energie rovna hysterezi mezi křivkami (User Guide Peak Force QNM, www.bruker.com).

Kromě zobrazování povrchů je AFM vhodné pro měření mechanických vlastností jako je tuhost nebo v komprese, plasticita a viskoelastické vlastnosti biologických vzorků ve fyziologických podmínkách. Na rozdíl od rastrového skenování sodnou, které se využívá při zobrazování, se mechanické testování provádí pomocí silových křivek nebo módu měření síly. Pomocí AFM je možné vyvolat lokální deformaci povrchu vzorku jeho kontaktem s ostrou špičkou hrotu, který je umístěná na volném konci nosníku. Síly jsou poté odhadnuty snímáním výchylky nosníku pomocí laserového paprsku dopadajícího z konce odrazivé plochy raménka do fotodiody (viz obrázek 6) (Goldman 2010).



Obrázek 6. Průběh ideální F-d křivky při jednom cyklu přiblížení k povrchu vzorku. A – hrot se blíží k povrchu, B – první kontakt je zprostředkován prostřednictvím van der Waalsových sil, C – dochází k protlačení (indentaci), D – hrot se vrací do původní polohy a zvedá se od povrchu, E – přitažlivé síly brání hrotu odpoutat se od povrchu a nosník se prohýbá, F – hrot je odtržen od povrchu (převzato z Tománková disertační práce 2013)

Silové křivky obsahují informace o dlouhé a krátké oblasti interakce a představuje základ pro stanovení Youngova modulu vzorku (viz obrázek 7). Pokročilejší metody mapování silových křivek se označují jako režim síla-objem *(F-V)* nebo mapování sil, který vyžadují uživatelem specifikovaný sběr silových křivek v dané oblasti ve 2D uspořádání. Je nutné kontrolovat rychlost a hloubku přitlačení a odtrhnutí hrotu od vzorku, abychom zabránili poškození hrotu. Použitím módu síla-objem můžeme vytvořit model prostorového rozložení tuhosti na povrchu vzorku. Výsledné měření tuhosti může být interpretováno jako modul pružnosti (Youngův modul) vypočteného jako poměr stres/napětí (stress/strain). Stres je definován jako normalizovaná síla průřezem (síla působící na plochu), zatímco napětí je změna v délce podělená počáteční délkou materiálu (Goldman 2010).



Obrázek 7. Rozdělení F-d křivky na jednotlivé segmenty při stanovení specifických mechanických charakteristik vzorku. F-d křivka = červená křivka – přibližování, modrá – oddálení (převzato z Malohlava 2013).

Pro určení absolutní hodnoty Youngova modulu je problémem vybrat vhodný mechanický model. Nejčastěji užívaným modelem je Hertzův model, který popisuje jednoduchý případ elastické deformace dvou dokonale homogenních bodů dotykem při zatížení. Ovšem pro použití tohoto modelu je nutné zajistit následující předpoklady: sonda musí mít kulovitý tvar (často se leptá skleněná kulička pod špičku hrotu (obrázek 8.) a protlačovaný vzorek musí mít dostatečnou tloušťku v poměru k hloubce protlačení. Předpoklad kulovité sondy zůstává v platnosti pouze tehdy, kdy její poloměr je větší než hloubka protlačení. Jestliže sondou je přibližná koule s poloměrem *r*, je možné sílu vytvořenou nosníkem určit ze vztahu:

$$F(h) = \frac{4\sqrt{r}}{3} E^* h^{3/2} \quad , \qquad (5)$$

kde h je hloubka protlačení, E^* je efektivní modul systému hrot – vzorek vypočtený ze vztahu (3):

Pro případ, že materiál hrotu je značně tvrdší, než materiál vzorku použijeme následující rovnici

$$E^* \approx \frac{E_{vzorek}}{1-\nu_{vzorek}^2} . \quad (6)$$

Sneddonova variace hertzova modelu je používána v případě kuželovitého hrotu:

$$F(h) = \frac{2}{\pi} \tan\alpha \frac{E_{vzorek}}{1-\nu_{vzorek}^2} h^2 , \quad (7)$$

kde α je otevřený úhel AFM hrotu.

Hertzův model je užíván zejména pro statistický odhad Youngova modulu. Vzorky jsou ovšem heterogenní (membrány a submembránové struktury) a Hertzův model předpokládá chybu. Další model pro studium elastických vlastností je založen na teorii pružných mušlí (ES, Elastic Shell), kde buňky jsou považovány za skořápky naplněné kapalinou. Youngův modul může být odvozen ze vztahu mezi efektivním Youngovým modulem, tloušťkou stěny a modulem prohnutí (Kuznetsova 2007). Pomocí AFM je možné nejen zobrazovat miniaturní povrchy a jejich mechanické vlastnosti, ale může být také použita k měření sil až do rozsahu piconewtonů, což je rozsah 10× menší, než hodnota jedné kovalentní vazby. Schopnost mikroskopu atomárních sil k měření těchto malých sil umožňuje zkoumání vazeb mezi molekulami, bílkovinami, testování jednotlivých receptorů na povrchu buněk popřípadě DNA a její odpovídající ligandy. Studium povrchu vzorku může odhalit různé odlišnosti mechanických vlastností povrchu v nanometrovém rozlišení dokonce i v podpovrchových vrstvách vzorku, což je metoda nazývaná tomografie tuhosti (Stiffness Tomography). Změnou zpracování *F-d* křivek, je možné získat nové parametry vzorku v jeho podpovrchových vrstvách (Roduit 2009). Během indentace lze pozorovat změnu tuhosti, a pokud tento proces aplikujeme na celý objem objektu, při záznamu, ve kterém je v každém bodě zaznamenávána *F-d* křivka, lze kromě topografie vzorku získat informaci o pružnosti pod povrchem. Pro provedení analýzy stiffness tomography je nejdříve potřeba získat *F-d* křivku, kdy hrot AFM je vtlačen do vzorku a je zaznamenávána změna ohybu nosníku. Poté je získaná křivka

odečtena od křivky naměřené na tvrdém, nedeformovatelném povrchu. Následně je křivka rozdělena na jednotlivé segmenty přičemž uživatel může volit velikost segmentů. Posledním krokem je fitování vhodně zvoleného teoretického modelu na jednotlivé segmenty křivky, což je hlavní rozdíl mezi stiffnes tomography a standardní analýzou *F-d* křivek. Mohou být zvýrazněné struktury, které by zanikly použitím standardní analýzy (Malohlava 2013, Roduit 2009).

4. Fotodynamická a sonodynamická reakce

V současné době jsou intenzivně studovány nové možnosti fotochemoterapie nádorových onemocnění. Fotodynamická terapie (PDT) je vedle chemoterapie, radioterapie a imunoterapie další možností léčby nádorového onemocnění. Jedná se o fotochemoterapii, která představuje kombinované použití fotodynamicky aktivní látky (sensitizeru) a světla za přítomnosti kyslíku. Princip léčby nádorů je založen na celkovém nebo zevním podání fotodynamicky aktivní látky s následným ozářením zpravidla viditelným zářením. Fotosensitizující látka se po určité době selektivně akumuluje v nádoru a pak dojde k ozáření světlem o vhodných vlnových délkách shodných s absorpčním maximem sensitizeru. Po absorpci světla dochází ve sensitizeru ke vzniku excitovaných stavů a k přenosu transformované energie na kyslík se vznikem singletového kyslíku, který je reaktivnější než základní molekulární stav a vede k oxidaci membránových lipidů a proteinů, což se projevuje cytolýzou a tumorózní destrukcí. Dále může excitovaná forma sensitizeru reagovat přímo se substrátem za vzniku volných radikálů substrátu. Volné radikály, především radikály lipidických složek buněčných membrán, jsou pak příčinou destrukce nádoru. Výsledným terapeutickým efektem je apoptóza , současně s nekrózou nádorových buněk. Nejčastěji jsou užívané deriváty hematoporfyrinů (HPD), které jsou aplikovány v dávce 2,5 - 5 mg/kg hmotnosti intravenosně (Kolářová 2005: Kuna P, Navrátil L. *Klinická radiobiologie*).

Fotodynamická reakce je základem pro tzv. antimikrobiální fotodynamickou terapii (aPDT), která může doplnit nebo v některých případech nahradit léčbu antibiotiky. V posledních letech totiž celosvětově nárůstá rezistence různých kmenů bakterií vůči antibiotikům, a proto jsou studovány nové metody antibakteriální léčby (Jori 2006, Maisch 2011, Soares 2011). Antimikrobiální fotodynamická terapie je účinnější u Gram–pozitivních bakterií, než u Gram–negativních, což je zapříčiněno odlišnou bakteriální stavbou. Sensitizer se akumuluje na cytoplazmatické membráně a po ozáření světlem vhodné vlnové délky indukuje nevratné poškození bakterií (O'Riordan 2005).

Některé látky tzv. sonosesitizery mohou být aktivovány ultrazvukem (UZV) a mohou vyvolat sonodynamickou reakci, která je podstatou sonodynamické terapie (SDT) pro léčbu nádorových onemocnění. Pro navození sonodynamické reakce je využíván

terapeutický ultrazvuk o frekvencích v rozmezí 1-3 MHz a intenzitách 0,5-3 $W.cm^{-2}$ (Shibaguchi 2011). Výsledným terapeutickým efektem je apoptóza i nekróza nádorových buněk podobně jako u PDT (Yumita 2008). Nově je studován kombinovaný vliv fotodynamické a sonodynamické reakce na nádorové buňky (Wang 2009, Kolářová 2009).

4.1. Principy fotodynamické terapie (PDT)

Fotodynamické reakce byly poprvé systematicky studovány na začátku tohoto století Raabem na kulturách paramecií v kombinaci s akridinem. Von Tappeine prokázal závislost těchto procesů na kyslíku a již v r. 1903 publikoval první klinické zkušenosti s užitím eosinu a světla v léčbě kožních nádorů, lupus vulgaris a condylomata lata. Princip léčby je založen na fotodynamickém účinku. Obecně lze tento jev definovat jako schopnost fotosenzibilizujících látek, především organických barviv, vyvolávat za přítomnosti světelného záření oxidaci nejrůznějších látek. Tento účinek se převážně studuje na biologických soustavách, které se poškozují senzibilizovanou fotooxidací (Ackroyd 2001). Významnou vlastností barviv, která vykazují fotodynamický efekt, je jejich fluorescence. Excitovaný stav - první singletový, který se uplatňuje při fluorescenci, nemá pro fotodynamický účinek význam z důvodu krátké doby života (10^{-9} s). Fotodynamicky aktivní jsou sloučeniny, které mohou tvořit excitované stavy s dlouhou dobou života (10^{-6} s) tzv. tripletové stavy, vznikající vnitřním přechodem ze svých excitovaných singletových stavů. Mechanismus fotodynamické reakce tedy spočívá v absorpci kvanta světelné energie sensitizerem, který vstupuje do vysokoenergetického tripletového stavu. Tripletový stav má relativně dlouhou dobu života a vrací se do základního stavu přenosem energie na molekulární kyslík, z něhož vzniká cytotoxický singletový kyslík. Ten je asi 1000× reaktivnější než základní molekulární stav a vede k alteraci celulárních membránových systémů cestou lipidové peroxidace a poškození proteinů, což se projeví cytolýzou a tumorózní destrukcí (Robertson 2009). Dále může excitovaná forma sensitizeru reagovat přímo se substrátem za vzniku volných radikálů substrátu. Volné radikály, především radikály lipidických složek buněčných membrán, jsou pak příčinou destrukce nádoru (Kolarova 2008).

Specifickým místem zásahu na subcelulární úrovni jsou různé oblasti pro různé třídy sensitizerů se vztahem k aktuální lokalizaci sensitizeru v buňce v čase fotoaktivace. Selektivní tumorózní destrukce při fotodynamické léčbě je dosaženo přednostním hromaděním sensitizeru v maligní tkáni. Nejčastěji používané hematoporfyrinové deriváty včetně Photofrinu jsou po i.v. injekci nejprve vychytány většinou normálních tkání i nádorových buněk, ale po 24 h zůstávají selektivně retinovány v tumorózní tkáni, kůži a v parenchymatózních orgánech. Po ozáření patologického ložiska zářením příslušné vlnové délky světla postihuje fotochemická reakce nejen vlastní nádorové buňky, ale i cévní složku tumoru, což vede k ischemické nekróze (Wilson 2008). PDT vyvolává i imunologickou odpověď na tumor prostřednictvím expozice neoantigenům nebo sekvestrovaným antigenům po rozpadu nádoru. Přímým efektem na makrofágy stimuluje produkci TNF (tumor necrosis factor). Biologický význam těchto fenoménů je zatím nejasný, ale zřejmě modulují přímé tkáňové efekty na PDT. Efektivnost PDT je ovlivněna faktory zahrnujícími absorpční spektrum sensitizeru, vlnovou délku aktivačního světla, hloubku tkáňové penetrace světla a biologickou odpověď tkáně na singletový kyslík. V ideálním případě by použitá vlnová délka měla odpovídat jednomu z absorpčních maxim sensitizeru. Poněvadž tkáňová penetrace závisí na vlnové délce, musí být vlnové délky vybrány tak, aby dostatečné množství fotonů dosáhlo určeného místa zásahu. Ve viditelné oblasti spektra se vzrůstající vlnovou délkou roste i hloubka penetrace záření do tkání (Kolářová 2005 *Klinická radiobiologie*, Editoři: Kuna P., Navrátil L.).

4.2. Sensitizery

Dosud bylo studováno několik tříd sensitizerů včetně porfyrinů, chlorinů (redukovaných porfyrinů), ftalocyaninů a různých organických barviv (O'Connor 2009). První generaci sensitizerů představují deriváty hematoporfyrinu v různém stupni purifikace. Nejvyšších efektů bylo dosaženo po i.v. podání v dávce 1-2 mg/kg hmotnosti s kompletní inhibicí epidermální DNA, RNA a proteinové syntézy po ozáření. Nevýhodou sensitizerů první generace je, že tyto látky nejsou přesně definované a po intravenózní aplikaci vyvolávají kožní fotosensitivitu po interakci se slunečním zářením.

V současné době jsou HPD používány v klinických studiích pod firemními názvy - Photofrin - Porfimer sodium, dihematoporfyrin ether (USA), Photocarcinorin (Čína), Photosan (Německo), Photogem (Rusko), Haematodrex (Bulharsko) (Triesscheijn 2006). Sensitizery druhé generace jsou ověřovány a vyvíjeny od r. 1991. Jejich předností nevýrazná kožní fotosensitivita po léčbě. Patří sem např. chloriny (degradační produkty chlorofylu které absorbují světlo o vlnových délkách 640 - 700 nm), 5-aminolevulová kyselina (ALA), ftalocyaniny, které nevyvolávají kožní fotosensitivitu, mají aktivační vlnové délky v dlouhovlnné oblasti viditelného světla (630 - 700 nm) s větší penetrací do kůže (Kolarova 2007). Dále jsou ve stádiu vývoje pheoforbidy a pyropheoforbidy s absorpčním maximem při 665 nm, které jsou izolovány z chlorofylu, dále pak purpuriny, naftalocyaniny a další (O'Connor 2009, Kolar 2008).

Levulan (Protoporfyrin IX, 5-aminolevulová kyselina) s absorpčním maximem 410 nm a dále se 4 malými píky blízko vlnových délek 510, 540, 580 a 635 nm a umožňuje tedy navození fotodynamického jevu různými zdroji světla vyzařujícími na uvedených vlnových délkách. Levulan byl schválený v roce 1999 FDA (The Food And Drug Administration) k léčbě aktinické keratózy. Léčba Levulanem využívá hydrofobní ALA, která je prekurzorem biosyntézy hemu. Je metabolizována fotoaktivním protoporfyrinem IX (PpIX) v mitochondriích. Akumulace PpIX probíhá za podmínek, je-li poměr přeměny ALA na PpIX větší než přeměna PpIX na hem. Některé z faktorů přispívají k selektivní akumulaci (nižší koncentrace železa v nádorových buňkách snižuje poměr přeměny PpIX na hem). Metvix je více lipofilní prekurzor Levulanu s podobnými vlastnostmi jako má Levulan. Porfyceny jsou chemicky modifikované isomery porfyrinu s absorpčním maximem kolem 600 nm. Rychle se vylučují z organismu a jsou velmi účinné. Tookad (palladium bacteriopherophorbide fotosensitizer, WST09) je derivát bakteriochlorofylu obsahující paladium. Vlnová délka absorpčního maxima je 763 nm a hloubka penetrace je za těchto podmínek kolem 4 mm zatímco u Photofrinu je při vlnové délce 630 nm hloubka penetrace jen 1,6 mm. Výhodou Tookadu je nižší riziko fotosensitivity kůže. Další výhodou je jeho schopnost aktivovat se relativně dlouhou vlnovou délkou a hlouběji penetrovat do tkáně. Foscan (mezo-tetra-hydroxyfenyl-chlorin, Temoporfin), který je aktivován světlem o vlnové délce 652 nm, ale jeho nevýhodou je dlouhodobá fotosensitivita kůže trvající i několik týdnů po ukončení léčby. Purlytin (SnET2) je syntetický purpurin strukturně analogický chlorofylu a aktivovaný

vlnovou délkou světla 664 nm, který způsobuje kožní fotosensitivitu přibližně 14 dní. Hlouběji proniká do tkáně, ale není rozpustný ve vodě. NPe6 (mono-l-aspartyl chlorine 6, talaporfin sodium, laserphyrin) s absorpčním maximem o vlnové délce 664 nm byl již schválený v Japonsku pro léčbu rakoviny plic. Lutrin (motexafin lutecium, Lu-Tex) patří mezi texaphyriny a umožňuje vzhledem k absorpčnímu maximu 732 nm hlubší proniknutí do tkáně. Výhodou je dobrá rozpustnost ve vodě a dostatečná produkce singletního kyslíku po ozáření. (O´Connor 2009, Berlanda 2010). Ftalocyaniny jsou syntetické porfyriny vykazující největší absorpci v dlouhovlnné oblasti viditelného spektra. Jsou chelovány zinkem nebo hliníkem a tyto diamagnetické kovy zvyšují jejich fototoxicitu. Přítomnost zinku nebo hliníku je důvodem produkce velkého množství ROS s dlouhotrvajícím tripletním stavem. Jedna z hlavních výhod ftalocyaninů je flexibilita jejich struktury a následně různé vlastnosti jednotlivých látek. Deriváty ftalocyaninů stejně jako chloriny jsou aktivovány červeným světlem a jejich hlavní předností je minimální kožní fototoxicita. Další generaci sensitizerů budou zřejmě představovat na monoklonální protilátky vázané fotosensitizující látky, zvyšující selektivitu destrukce patologické tkáně (Kolářová 2005: Kuna P., Navrátil L. *Klinická radiobiologie*).

4.3. Zdroje záření používané pro PDT

Úspěšnost PDT je tedy závislá nejen na sensitizeru a hladině kyslíku v nádorové buňce, ale také na použitém světelném zdroji. Jako zdroje světla se pro PDT mohou používat širokospektrální zdroje doplněné barevnými a tepelnými filtry z důvodu odstranění nežádoucích složek záření (Nielsen 2005). Zářivé výkony v aktivačních vlnových délkách však nejsou dostatečné pro navození fotodynamického jevu v celém objemu nádoru. Proto se používají lasery, které jsou zdrojem velmi intenzivního monochromatického, lineárně polarizovaného a koherentního záření. V současné době se stále více používají lasery polovodičové, které mají menší rozměry a nižší pořizovací a provozní náklady než například laditelné barvivové lasery. Vzhledem k tomu, že při PDT je třeba zajistit co nejkratší ozařovací časy a tedy velkou intenzitu záření na relativně malých plochách, vyhovuje nejlépe jako zdroj záření právě laser (Alexiades-Armenakas 2006).

4.4. Využití PDT v klinické praxi

V klinické praxi je v současnosti fotodynamická léčba především používána pro paliativní řešení maligních endobronchiálních a ezofageálních obstrukcí, dále v terapii karcinomů močového měchýře, kožních a mozkových nádorů. Dále je PDT doporučována jako adjuvantní intraoperační postup při chirurgickém řešení rozsáhlých tumorů různých systémů. Nejčastěji je PDT používána v terapii nádorů a premaligních lézí oblastí hlavy a krku, protože se jedná o metodu, která je méně agresivní než chirurgický zákrok a radioterapie. U časných stádií nádorového onemocnění se úspěšnost terapie pohybuje mezi 70 - 80 % případů. V orofaciální oblasti jsou tímto způsobem léčeny např. karcinomy dutiny ústní, nasofaryngu, orofaryngu, laryngu, glanduly parotis, ale např. i oční tumory. V dermatologii byla PDT používána například u spinocelulárního karcinomu, Kaposiho sarkomu, kožních metastáz karcinomu prsu. Pomocí PDT byla také úspěšně léčena primární stadia karcinomu plic, žaludku, tumory genitálií, kolorektální tumory, karcinomy močového měchýře i nádory hrdla děložního. PDT se začíná využívat i u některých nemaligních onemocnění, například u kardiovaskulárních aterosklerotických změn a revmatoidní artritidě. Ve stadiu preklinického výzkumu je využití antivirového efektu PDT, proti HIV - I viru, herpes simplex viru – typ I a II (HSV - 1, HSV - 2) a cytomegaloviru (CMV) (Brown 2004). V současnosti PDT nezahrnuje pouze orientaci směrem k léčbě nádorových onemocnění, ale díky klesající účinnosti antibiotik představuje také alternativu při léčbě hojení ran či bakteriálních zánětů (Maisch 2011). Karcinogenní ani mutagenní účinky PDT nebyly zaznamenány, což je považováno za hlavní přednost ve srovnání s chemoterapeutickými a radioterapeutickými postupy v onkologii. Vzhledem k malé systémové toxicitě celkově podávaných fotoaktivních látek lze PDT bezpečně opakovat, je-li to nezbytné. Při zákroku není nutná anestézie, nedochází ke ztrátám krve, také pooperační bolestivost ozářeného místa je přijatelná (Allison 2004). Hlavním vedlejším účinkem PDT je kožní fotosensitivita. Běžné fotoprotektivní prostředky zde nejsou účinné, poněvadž akční spektrum této fototoxicity je ve viditelné oblasti spektra. Vývoj tedy směřuje k syntéze

nových fotoaktivních derivátů s omezenou systémovou fototoxicitou při zachování vysoké terapeutické účinnosti.

4.5. Sonodynamická teapie (SDT)

Ultrazvuk s nízkými intenzitami (low-intensity) se používá především v diagnostice. Nově se začal však využívat i terapeuticky v kombinaci se sonosensitizery a rozvíjí se nový typ fyzikální terapie s názvem sonodynamická terapie pro léčbu nádorových onemocnění. Pro navození sonodynamické reakce je využíván terapeutický ultrazvuk o frekvencích v rozmezí 1-3 MHz a intenzitách 0,5-3 $W.cm^{-2}$. Většina sonosensitizerů, které jsou intenzívně studovány jsou aktivovatelné nejen ultrazvukem, ale i světlem (Jin 2000). Byla ověřovaná sonodynamická i fotodynamická aktivita různých typů sensitizerů např. derivátů hematoporfyrinu, Photofrin II, protoporfyrinu IX, komplex porfyrinu s gáliem ATX-70, hydrofilní deriváty chlorinu A7X-S10, ftalocyaniny a dalších na nádorových buněčných liniích (Kuroki 2007, Kolarova 2009, Zhi-Jun Dai 2013). Dá se tedy očekávat kombinovaný účinek PDT a SDT, který vede u nádorových buněk k apoptotické i nekrotické smrti. Přesný mechanismus účinku není ještě vysvětlen (Rosenthal 2004). Předpokládá se ovlivnění propustnosti membrány, snadnější penetrace sonosensitizerů do nádorových buněk a zvýšená produkce reaktivních forem kyslíku (Yumita 2012, Misík 2000). Velkou výhodou je, že ultrazvuk proniká hlouběji do tkáně než světlo, terapie nemá karcinogenní účinky a dá se neomezeně opakovat.

II. Výsledková část

Experimentální část disertační práce se zabývá studiem fotofyzikálních vlastností sensitizerů a účinku ultrazvuku na biologické systémy *in vitro*. Studium účinků bylo rozděleno na molekulární metody a mikroskopické techniky. Do oblasti molekulárních metod byl zařazen vliv sensitizerů a ultrazvuku na životnost buněk, na produkci reaktivních forem kyslíku a na studium typu buněčné smrti nádorových buněčných linií plicního adenokarcinomu A549, lidského melanomu G361, myšího melanomu B16FO, nádoru děložního hrdla virového původu HeLa a nenádorové buněčné linie myších fibroblastů NIH3T3. Těmito metodami byl studován vliv fotodynamické a sonodynamické reakce v kombinaci se sensitizery první i druhé generace včetně jejich metalokomplexů. Jako fotodynamicky aktivní látky byly využity sensitizery $TPPS_4$, $ZnTPPS_4$, $PdTPPS_4$, $ClAlPcS_2$.

Do oblasti mikroskopických technik bylo zařazeno ověření účinnosti fotodynamické a sonodynamické reakce na morfologii a mechanickou charakteristiku buněčných linií. Jako mikroskopická technika byla využívána zejména mikroskopie atomárních sil. Pro ověření morfologických změn po terapii byla využita i fluorescenční a elektronová mikroskopie. V rámci mého postgraduálního studia byla zavedena metoda měření cytomechanických vlastností adherentních buněčných linií pomocí mikroskopie atomárních sil. Použitím této techniky je možné mimo pouhého zobrazení povrchu stanovit i mechanické vlastnosti vzorků jako je modul pružnosti, deformaci, adhezi a disipaci energie, což otevírá nové možnosti studia vlivu fotodynamické a sonodynamické reakce na buněčné linie.

Ověření stavu buněčných linií, zejména jejich mechanických vlastností, může být v budoucnu využito při vývoji nových látek a studiu jejich vlivu na buněčné systémy. Kromě detekce stavu buněk jako celku, je možno stanovovat stav sub-membránových struktur a malých molekul po terapiích.

V následujícím komentovaném souboru prací jsou prezentovány výsledky studia účinků fotodynamické a sonodynamické reakce na buněčné linie aktivované fotodynamicky

aktivními látkami a ultrazvukem s využitím fluorescenčních metod a moderních mikroskopických technik.

A. Vliv fotodynamické a sonodynamické reakce na buněčné systémy *in vitro*

Fotodynamická reakce využívá kombinace účinku fotodynamicky aktivní látky, která je preferenčně vychytávána v nádorové tkáni, světla o vhodné vlnové délce a kyslíku (Jiang 2014). Preferenční vychytávání je zajištěno změněným metabolismem nádorové buněčné linie, změněným pH nebo vazbou na specifické přenašeče. Jako přenašeče je možné využít LDL (Low Density Lipoprotein) a albumin (Malina 2013). K albuminu se váží spíše hydrofilní sensitizery jako je $TPPS_4$. Zvýšená selektivita sensitizeru v nádorech je zajištěna zvýšenou propustností kapilár v okolí nádoru a receptorům, které zprostředkovávají intracelulární akumulaci látek endocytózou (Sharman 2004). Další metodou zprostředkovávající selektivitu sensitizeru v nádorové tkáni je tzv. foto-imunoterapie, která kombinuje cytotoxické vlastnosti sensitizeru a selektivitu monoklonálních protilátek, peptidů nebo růstových faktorů (Nowis 2005). Pro zvýšení účinosti fotodynamické reakce je studovana elektro-fotodynamická terapie, která využívá elektrických impulzů na plazmatickou membránu pro zvýšení transportu sensitizeru (Melo 2013).

Spojením nanotechnologií s fotodynamickou reakcí vznikají specifické vazby mezi sensitizerem a nanočásticemi, vzniklé nanokompozity umožňují prodloužit čas kontaktu sensitizeru s nádorovou tkání a také díky například magnetickým vlastnostem nanočástic je možné účinnou látku aplikovat na konkrétní místo léze. Terapii je možné nazvat „teranostickou“, což je metoda kombinující diagnostiku a cílenou terapii, včetně monitorování efektivity (Ray 2010). Nanočástice tak představují určitou náhradu za liposomy, které jsou často dosti veliké a tím nevhodné pro ideální endocytózu buňkou. Všechny tyto kombinace přenašečů a fotosensitizerů první nebo druhé generace jsou nazývány sensitizery generace třetí.

Jednou z možností stanovení efektivity fotodynamické reakce je prostřednictvím měření produkce reaktivních forem kyslíku. Pomocí fluorescenční sondy CM-H_2DCFDA je možno stanovit hladinu fluorescence peroxydového radikálu H_2O_2, hydroxylového radikálu HO-, kyseliny chlorné HOCl a karboxylového radikálu COO-. Reaktivní formy kyslíku jsou odpovědny za přímý důsledek poškození buňky na molekulární úrovni. Stupeň produkce

ROS obecně odpovídá stupni fototoxického efektu. Vyšší hladina ROS zapřičiňuje rozsáhlejší poškození na buněčné úrovni.

Pro navození fotodynamického efektu byl použit sensitizer palladium(II)*meso*-tetrakis(4-sulfonatophenyl) porphyrin a LED zdroj záření o vlnové délce 414 nm (**Příloha 1**). Ověřované koncentrace sensitizeru byly 0,5, 5 a 50 μM. Bylo zjištěno, že vyšší koncentrace ROS jsou generovány zejména se zvyšující se koncentrací PS (Tabulka 1). Kinetická produkce ROS byla stanovena jako lineární regresní koeficient z přímkové části křivky a vyjadřuje tak přírůstek reaktivních forem kyslíku vždy za stejnou časovou jednotku (například každou minutu). Kalibrací prostřednictvím peroxidu vodíku byla stanovena koncentrace ROS (stanovená na μM H_2O_2) namísto relativních fluorescenčních jednotek (RFU).

Tabulka 1: Kinetická produkce reaktivních forem kyslíku generovaná buněčnou linií A549 s využitím sensitizeru $PdTPPS_4$ a ozářením vlnovou délkou 414 nm o dávce záření 15 J.cm^2.

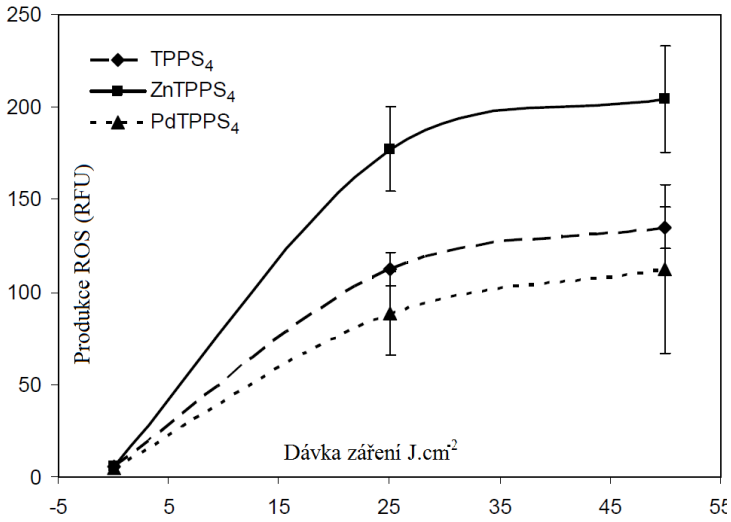
Koncentrace $PdTPPS_4$ [μM]	**ROS kinetická produkce [μM.s^{-1} H_2O_2] v prvních 10 s**	**ROS kinetická produkce [μM.s^{-1} H_2O_2] v prvních 5 min**	**ROS kinetická produkce [μM.s^{-1} H_2O_2] v 10 min**	**ROS konc. v dávce záření 15.J cm^{-2} [μM H_2O_2]**
0,5	272,2 ± 54,9	13,2 ± 2,9	12,5 ± 2,8	2409,7 ± 445,9
5	332,7 ± 72,0	16,0 ± 1,7	18,0 ± 0,9	4164,1 ± 226,9
50	333,1 ± 50,7	28,8 ± 1,8	27,2 ± 0,9	6015,1 ± 252,4
0	271,1 ± 51,6	13,1 ± 1,3	11,4 ± 0,6	2402,1 ± 183,4

Poznámka: V práci je jednotka J.cm^2, pro hustotu energie vztaženou na jednotku plochy, používán název dávka záření v souladu se zahraniční literaturou "Dose of radiation".

Nejvyšší nárůst ROS je vždy na počátku kontinuálního ozařování vzorku buněčné linie: 333,1 $\mu M.s^{-1}$ H_2O_2 v prvních 10 vteřinách ve srovnání s 27,2 $\mu M.s^{-1}$ H_2O_2 v 10 minutách a to každou minutu měření při koncentraci 50 µM $PdTPPS_4$.

Obdobných výsledků bylo dosaženo při porovnání tří porfyrinových sensitizerů $TPPS_4$, $ZnTPPS_4$ a $PdTPPS_4$ v koncentraci 10 µM (**Příloha 2**). Nejvyšší efekt vůči linii lidského melanomu G361 vykazoval zinečnatý metalokomplex porfyrinu $TPPS_4$. Pro vyšší účinek fotodynamické terapie se využívá navázání centrálních kovů a polokovů, z nichž některé prodlužují trvání tripletového stavu fotosensitizéru, a tím i zvyšují jeho účinnost v PDT. Jedná se například o Zn, Al, Si. Z předchozích studií vyplývá, že kladný vliv na fotosensitivní vlastnosti mají pouze diamagnetické kovy (Zn, In). Paramagnetické kovy (Fe nebo Cu) takovou schopnost nemají (Castno 2004). Efekt centrálního kovu na produkci ROS je možno vidět na Obrázku 8, kde zinečnatý komplex zvyšuje produkci reaktivních forem kyslíku a snižuje celkovou životnost buněk ve srovnání s porfyrinem bez navázaného centrálního kovu a ve srovnání s centrálním kovem Pd.

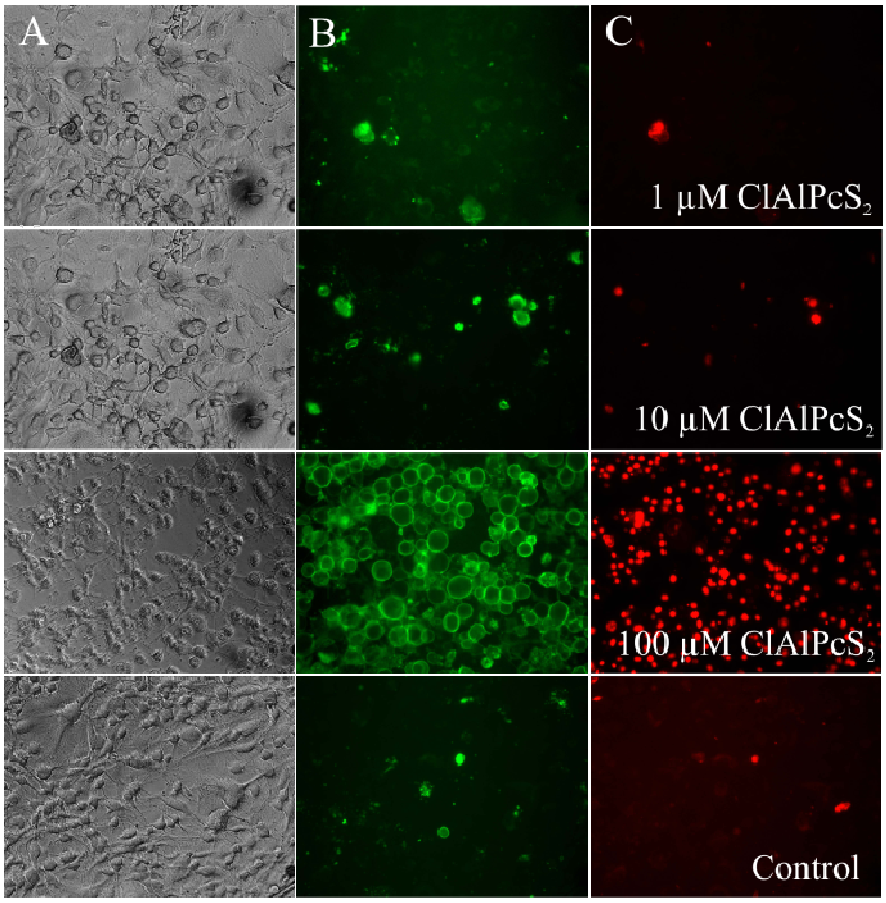
Porfyriny a jejich metalokomplexy se preferenčně akumulují v membránách intracelulárních organel, jako jsou lysosomy a mitochondrie (Lam 2001). Obecně můžeme stanovit, že vyššího fototoxického vlivu můžeme dosáhnout prostřednictvím záření o nižší intenzitě s delší dobou ozáření, než s krátkodobě aplikovanou vysokou intenzitou záření.



Obrázek 8. Vliv produkce ROS v závislosti na dávce záření při koncentraci sensitizerů 10 µM.

Odpověď na fotodynamickou reakci je tedy závislá na použitém sensitizeru, podmínkách ozáření a oxidačním statusu tkáně a na typu buněčné linie (Tomankova 2013). Obdobně odpověď tkáně na sonodynamickou terapii zajišťují parametry ultrazvuku, frekvence, intenzita a doba ozvučení a vznik kavitací (Yumita 2004). Ultrazvukové mechanické vlnění je možné využívat kromě zobrazování tkání a orgánů, tedy diagnostice, také v terapii. Ultrazvuk lze použít ke zvýšení cytotoxického efektu fotodynamické reakce. Ultrazvuk může v cílené tkáni zapříčinit tzv. vnitřní kavitaci, což je proces, kde vzduchová bublina vyvolaná ultrazvukem v kapalině náhle zkolabuje a vyvolá šokovou vlnu doprovázenou silným uvolněním tepelné energie. Okolní molekuly vody se přitom rozloží na volné radikály, které spolu s následně vzniklými radikálovými produkty opět spouští řetězové radikálové reakce a poškozují buňku na molekulární úrovni. Ultrazvuk může také způsobit změnu rozmístění sensitizeru v buňce a přeměnu agregovaných molekul sensitizeru na monomerní formu, která může být více cytotoxická. Ultrazvuk může rovněž narušit buněčnou membránu, buňka se stane citlivější a zvýší se transport léčiva buněčnou membránou (Pížová 2012).

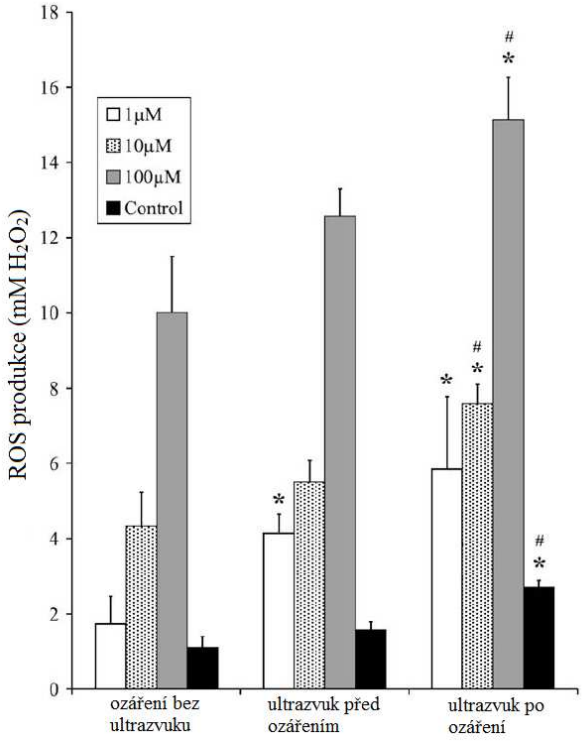
Vybrané sensitizery lze často aktivovat jak fotochemicky, tak sonochemicky. Ultrazvuk a zinečnatý komplex ftalocyaninu může vést ke zvýšení hladiny hemolýzy a peroxidace lipidů (Milowska 2005). Kombinace fotodynamického a sonodynamického jevu může způsobit rozsáhlejší poškození buněčných linií, kdy zejména intenzita ultrazvuku má vliv na životnost buněk. Typickou odpovědí k fotodynamické a sonodynamické reakci, zejména při použití nižších koncentrací sensitizeru je apoptóza. Na druhé straně při využití vyšší koncentrace, vyšší dávky záření a vyšší intenzity ultrazvuku dochází k rychlé odpovědi buněk a nastává nekróza (viz obrázek 9).



Obrázek 9. Určení typu buněčné smrti pomocí annexinu (zelená složka obrazu) a propidium iodidu (červená složka obrazu) aplikovaného na buněčnou linii B16FO.

Účinek sensitizeru $ClAlPcS_2$ s podpůrným vlivem ultrazvuku byl studován na nádorové linii G361 (**Příloha 3**) Výsledky naznačují zvýšení hladiny reaktivních forem kyslíku po zařazení ultrazvuku do protokolu. Parametry ultrazvuku byly 1 MHz, 2 $W.cm^{-2}$ s časem ozvučení 10 minut. K nejvyššímu nárůstu ROS po aplikaci ultrazvuku došlo při koncentraci 100 μM $ClAlPcS_2$, ovšem nejvyšší signifikantní rozdíly při aplikaci ultrazvuku a bez něj nastaly při koncentraci ftalocyaninu 1 μM. Ftalocyaninové sensitizery se vážou primárně na membránové struktury a aktivace sensitizeru světlem způsobí destabilizaci membrány s narušením její integrity a funkcí. Účinek ultrazvuku může tento jev posílit, přičemž zvýšená hladina reaktivních forem kyslíku působí cytotoxicky s přímým účinkem na lipidy, proteiny a nukleové kyseliny. Studium vhodnosti aplikace ultrazvuku před nebo po fotodynamické reakci idukované pomocí ftalocyaninového sensitizeru $ClAlPcS_2$ na

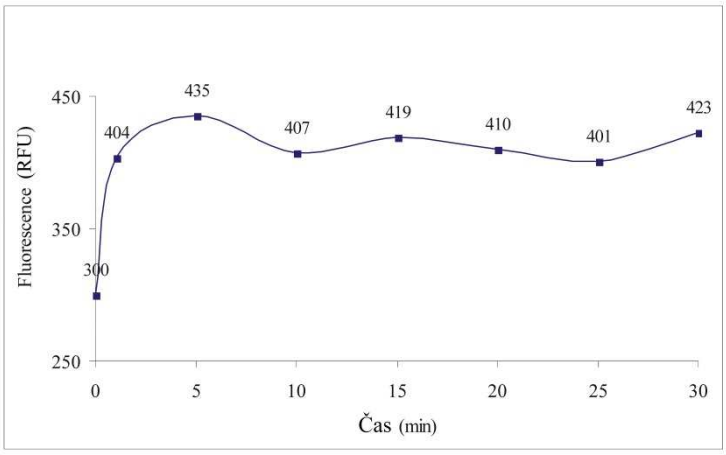
buněčnou linii lidského melanomu G361 poskytlo důležité informace pro stanovení optimálních podmínek při sestavení protokolu a zařazení aplikace ultrazvuku před, a nebo po ozáření buněčné linie pomocí LED ozařovače o vlnové délce 670 nm s celkovou dávkou záření 15 J.cm^{-2}. Výsledky ukazují signifikantní nárůst reaktivních forem kyslíku po aplikaci ultrazvuku zařazeného po ozáření červeným světlem o vlnové délce 670nm (obrázek 10).



Obrázek 10. Vliv ultrazvuku na produkci reaktivních forem kyslíku. Ultrazvuk byl zahrnut do protokolu před, a nebo po fotodynamické aktivaci sensitizeru $ClAlPcS_2$ ozářením světlem o vlnové délce 670 nm.

Vliv ftalocyaninového sensitizeru na buněčnou linii myšího melanomu (B16FO) a myších fibroblastů (NIH3T3) byl ověřen detekcí kinetické produkce reaktivních forem kyslíku, kdy do protokolu bylo zahrnuto po ozáření světlem o vlnové délce 660 nm s celkovou dávkou záření 15 J.cm^{-2} (**Příloha 4**). Vliv ultrazvuku zvyšuje cytotoxický efekt, který se projevuje na buněčné životnosti a koreluje s hladinou reaktivních forem kyslíku. Vliv fotodynamického a sonodynamického efektu byl také ověřen studiem typu buněčné smrti.

Jak již bylo naznačeno v předchozím textu, vyšší koncentrace sensitizeru v kombinaci s ozářením způsobí nekrózu (zeleno-červená složka na obrázku 9). Naopak při nižší kkoncentraci dochází k apoptóze (pouze zelená složka na obrázku 9). Dalším zajímavým aspektem je, že vyšší vliv na produkci reaktivních forem kyslíku a buněčnou životnost měla kombinace ftalocyaninového sensitizeru a ultrazvuku na nádorovou buněčnou linii B16FO ve srovnání s nenádorovou linií myších fibroblastů NIH3T3.



Obrázek 11. Vylití obsahu liposomu (propidium iodidu) v závislosti na čase ozvučení s parametry ultrazvuku 1 MHz, 2 W.cm^{-2}. Měřeno v relativních fluorescenčních jednotkách (RFU).

Vedle kombinace UZ jako podpůrného vlivu fotodynamické reakce je možno UZ použít jako mechanickou energii při otevírání liposomů využívaných k přenosu léčiv (**Příloha 5**, Míčková 2008). Liposomy se ve farmakoterapii využívají pro cílené podávání léčiv. Látky jsou přenášeny v dutině liposomu a jsou tak chráněny před okolním prostředím lipidovou dvojvrstvou. Přenos látek lze zajistit jak pro hydrofilní, tak pro hydrofobní látky. Na základě výše uvedených vlastností, mohou liposomy sloužit jako přenašeče pro řadu biologicky aktivních látek (Matteucci 2000).

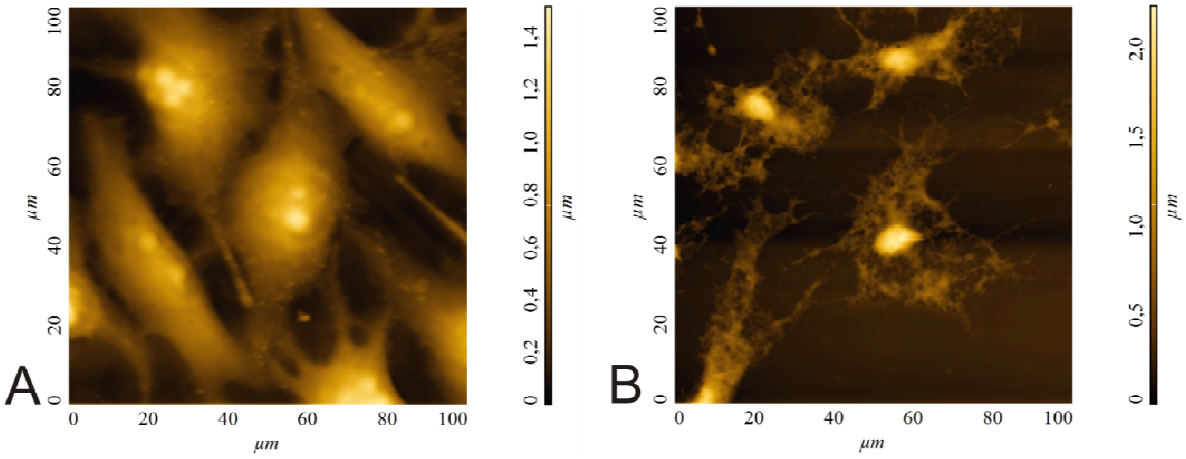
Mechanizmus kolapsu liposomu a vylití obsahu dutiny dosud nebylo přesně objasněno. Pravděpodobně po kontaktu liposomu s povrchem buněk se tyto struktury mohou spojit s plazmatickou membránou, případně dojde k endocytóze či fagocytóze či prosté difuzi. K difuzi ovšem dojde pouze za předpokladu, že obsah liposomu byl uvolněn již před

průnikem liposomu plazmatickou membránou. Vylití liposomálního obsahu také závisí na teplotě, tlaku a pH (Ulrich 2002).

Liposomy reagují na ultrazvuk uvolněním jejich obsahu a změnou velikostí. Množství uvolněného obsahu z liposomů pomocí ultrazvuku a rázových vln bylo předmětem další komentované práce (**Příloha 5**). Experimentálně vysledované parametry ultrazvuku pro ideální otevírání liposomů byly: frekvence 1 MHz, čas 5 min, a intenzita 2 $W.cm^{-2}$ (obrázek 11). Vhodnější metodou pro otevírání liposomů je však použití rázové vlny, kdy k otevření liposomu stačí 0,5 μs. Nejen díky lepší fokusaci rázové vlny na cílené místo se rázová vlna zdá být perspektivním nástrojem pro řízené uvolňování léčiv z liposomů (Mickova 2008).

B. Studium buněčného poškození a mechanických vlastností s využitím mikroskopie atomárních sil.

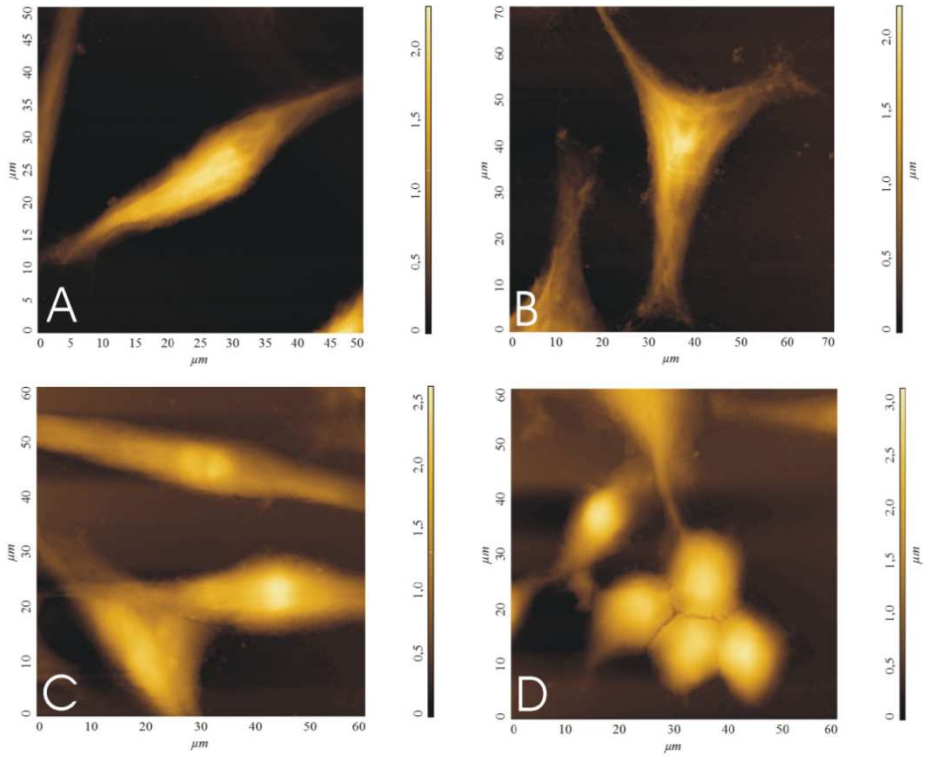
Zobrazování buněčných linií prostřednictvím mikroskopie atomárních sil je jednou z nejobtížnějších aplikací této mikroskopické techniky. Základem pořízení reprodukovatelného skenu je pevné připoutání preparátu (buněk) na pevně uchycený substrát. Jako substrát je možno využít velké množství materiálů, které však splňují základní kritérium atomárně rovného povrchu. Obvykle jsou využívány křemíkové, zlaté a stříbrné leštěné destičky, čerstvě odštípnutou slídu (muskovit) nebo HOPG (vysoce organizovaný pyrolytický grafit). Dále je možné využít skleněné povrchy a plastová krycí skla Thermanox s vynikající afinitou k buněčným liniím. Pokud však některé povrchy vykazují kladný náboj, je vhodné jej nahradit pomocí specifických činidel na náboj záporný, který je ideální pro adhezi kladně nabitých buněk. Takováto činidla jsou nejčastěji poly-L-lysin, poly-L-arginin nebo 3-aminopropyltriethoxysilan.



Obrázek 12. Změna morfologie fotodynamicky neaktivované (A) a fotodynamicky aktivované (B) buněčné linie NIH3T3. Buněčná linie byla sensitizována prostřednictvím $ClAlPcS_2$ o koncentraci 100 µM a světlem o vlnové délce 660 nm při celkové dávce záření 15 $J.cm^{-2}$. Obraz byl zaznamenán pomocí mikroskopie atomárních sil Ntegra Aura (NT-MDT) v semi-kontaktním režimu s rozlišením 256 × 256 pixelů. Skenovací rozsah byl 100 × 100 µm a skenovací rychlost 80 $µm.s^{-1}$.

Pokud chceme studovat pouze morfologické vlastnosti buněk a jejich změnu před a po fotodynamické reakci je možné, použít fixačních činidel. Zajistit adherenci buněčné linie na

povrch substrátu není jednoduchým úkolem a zejména po určitých terapiích jsou buňky snadno deadherovatelné ze substrátu. Do terapií ovlivňujících adherenci patří i fotodynamická nebo sonodynamická reakce. Nejčastěji využívaná fixační činidla jsou formaldehyd, paraformaldehyd, glutaraldehyd, metanol a etanol. Pro zobrazení změny morfologie buněčné linie NIH3T3 a B16FO po aplikaci fotodynamického jevu byl využit 0,5 % glutaraldehyd v DMEM (**Příloha 4**). Buňky, které neprošly terapií (obrázek 12), snadno adherují na povrch substrátu a tvoří monovrstvu. Mohou se také spojovat pomocí invadopodií, které jsou dlouhé několik desítek µm. Tvar nepoškozených buněk je charakteristický s výškou většinou v rozmezí 3 – 5 µm a větší plochou, kterou jsou adherované k substrátu (Tománková 2013).



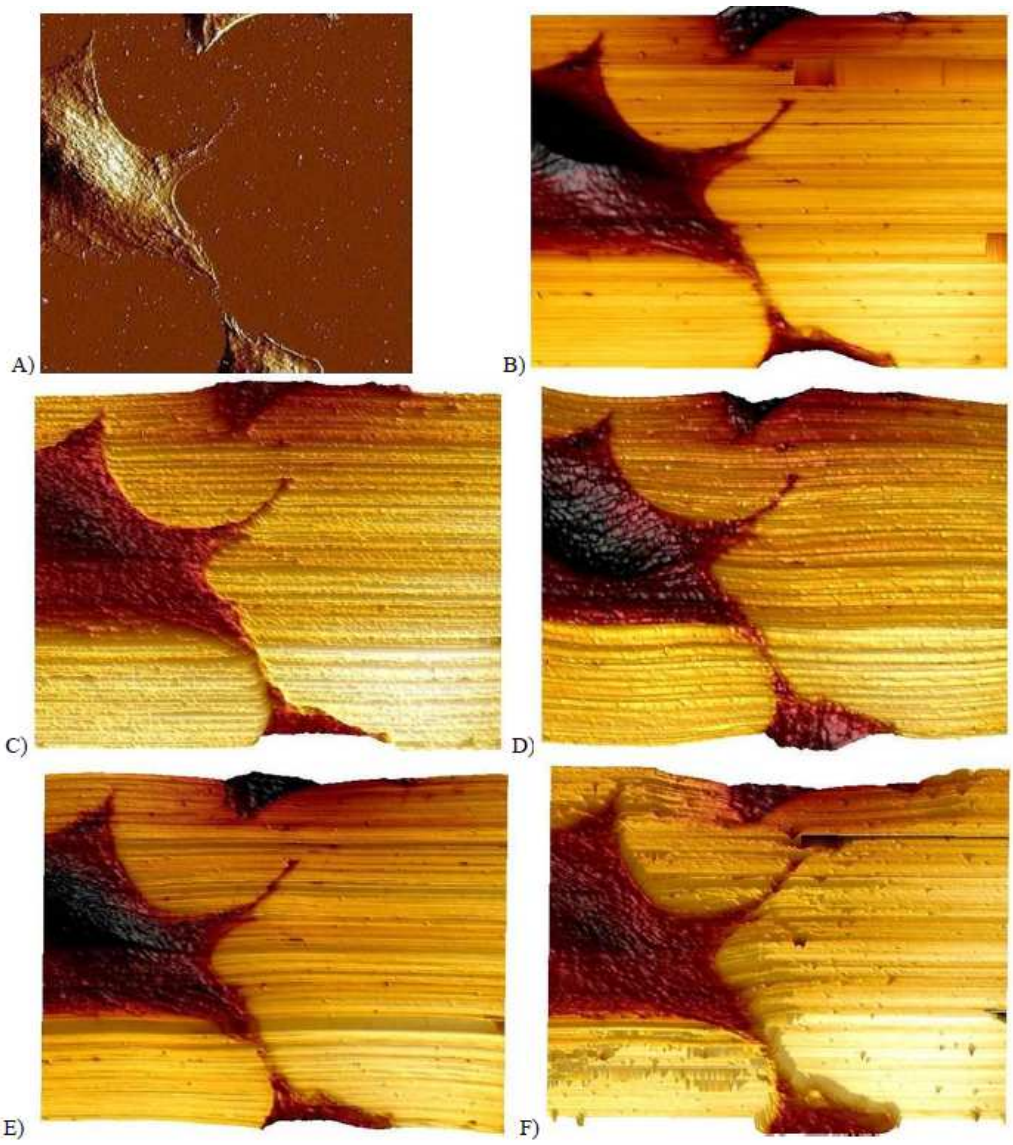
Obrázek 13. Změna morfologie fotodynamicky a sonodynamicky neaktivované (A) a sonodynamicky aktivované (B), fotodynamicky aktivované (C) a fotodnyamicky a sonodynamicky aktivované (D) buněčné linie G361. Buněčná linie byla sensitizována prostřednictvím $ClAlPcS_2$ o koncentraci 10 µM a světlem o vlnové délce 670 nm při celkové dávce záření 15 J.cm^{-2}. Parametry ultrazvuku byly frekvence 1 MHz, s intenzitou 2 W.cm^{-2} a časem ozvučení 10 minut. Obraz byl zaznamenán pomocí mikroskopie atomárních sil Ntegra Aura (NT-MDT) v semi-kontaktním režimu s rozlišením 256 × 256 pixelů. Skenovací rozsah 100 × 100 µm a skenovací rychlost 0,6 Hz.

Na druhé straně, poškozené buňky se zkracují ve své délce, zmenšují plochu adherence se substrátem a zaujímají kulovitý tvar bez invadopodií nebo filopodií. Jsou také celkově vyšší a to až 10 μm. Také povrchová struktura vykazuje větší hrubost. Sonodynamická reakce má vliv na morfologii buněk deadherencí ze substrátu (**Příloha 3**). Buňky zaujímají kulovitý tvar a zobrazit je pomocí mikroskopie atomárních sil je možné pouze po předchozí fixaci (obrázek 13). Nefixované živé buněčné linie je možné studovat pouze několik hodin. Poté se začnou projevovat morfologické změny v důsledku teplotní nestability. Pomocí moderních AFM mikroskopů se tomu dá ovšem předejít a to za použití průtokové cely a vyhřívané podložky na posuvném stole invertovaného mikroskopu.

Při studiu mechanických vlastností je nezbytné vyvarovat se fixace buněčné linie. Fixace způsobí zesítění cytoplazmy a zvýší tak celkovou tuhost buňky. Modul pružnosti glutaraldehydem fixované HeLa buňky je v místě nejvyšší tuhosti 5 Arb (**Příloha 6**). Naopak modul pružnosti nefixované buněčné linie HeLa byl stanoven na 15,6 mArb (**Příloha 7**). Pro srovnání tuhosti byl stanoven také modul pružnosti skleněného substrátu, na kterém jsou buňky obvykle kultivovány a měřeny prostřednictví AFM. Modul pružnosti byl stanoven na 1,9 Arb. Díky tomuto srovnání je možné porovnat skutečný rozdíl tuhosti HeLa buňky před a po fixaci pomocí 0,5% glutaraldehydu.

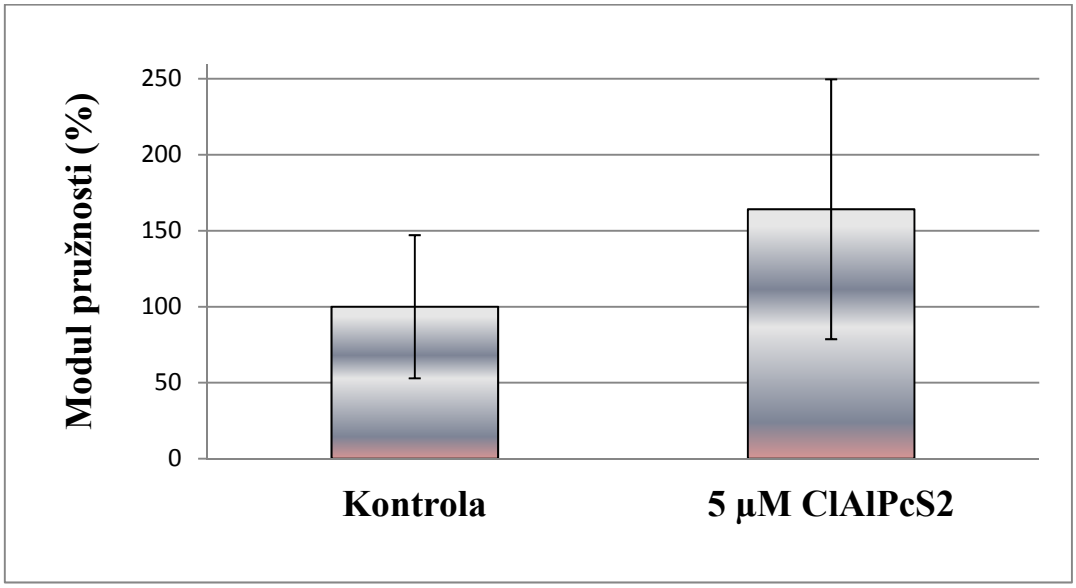
Komplexní charakteristika mechanických vlastností Hela buněk byla stanovena pomocí AFM mikroskopu Bioscope Catalyst (Bruker). Základem pro měření nefixovaných buněk je použití hrotu o nízké konstantě tuhosti. Obecně se používají hroty s nízkou konstantou tuhosti k měření měkkých, snadno poškoditelných biologických preparátů, jaké jsou například buněčné linie. Nejměkčí část buňky je její jádro (obrázek 14). Stejně tak nejvyšší deformaci, disipaci energie a adhezi hrotu k povrchu buňky vykazuje tato oblast. Buňka během svého života interaguje s vnějším prostředím např. změnou složení buněčných membrán (Caille 2002) nebo reorganizací cytoskeletálního systému (Petroll 2004), které se projevují změnou mechanických vlastností. V makroskopickém měřítku jsou mechanické vlastnosti podstatné pro funkci jednotlivých tkání, jako jsou kosti, šlachy nebo zuby. Lze tedy předpokládat, že mají vliv i na mikroskopické úrovni. Určením vlastností jednotlivých biomolekul lze zjistit vliv na samotný celek. Je také známo, že aktuální fyziologický stav

systému se projevuje v jednotlivých buněčných charakteristikách. Mělo by tedy být možné korelovat změnu mechanickou se změnou strukturální (Kasas 2008).



Obrázek 14. Komplexní charakteristika mechanických vlastností buněčné linie HeLa. Skeny byly zaznamenány pomocí režimu Peak Force QNM. A – chybový signál, B – topografie, C – modul pružnosti, D – adheze hrotu k buňce, E – disipace energie, F – deformace. Velikost skenu je 76 × 76 µm, rozlišení 512 pixelů, a skenovací rychlost 0,1 Hz.

Fotodynamická reakce má výrazný vliv na změnu mechanických vlastností a strukturálních vlastnosti buněčné linie HeLa (obrázek 15, 16). Fotodynamického narušení cytoskeletární struktury má následek ve zvýšené tuhosti buňky a to o více než 64% v jaderné oblasti (**Příloha 8**). Detekcí modulu pružnosti byl zjištěn medián a kvartil^{25}, kvartil^{75} Youngova modulu na jádře kontrolní (fotodynamicky nenarušené) a nefixované HeLa buňky: 35,283; 28,061; 50,416 kPa a mimo oblast jádra: 107,442 a 97,185; 125,270 kPa. Medián a kvartil^{25}, kvartil^{75} Youngova modulu na jádře fotodynamicky poškozené buňky byl stanoven na: 61,144; 50,814; 88,866 kPa a mimo oblast jádra: 193,605; 174,196; 217,614 kPa, mimo oblast jádra (**Příloha 9**).

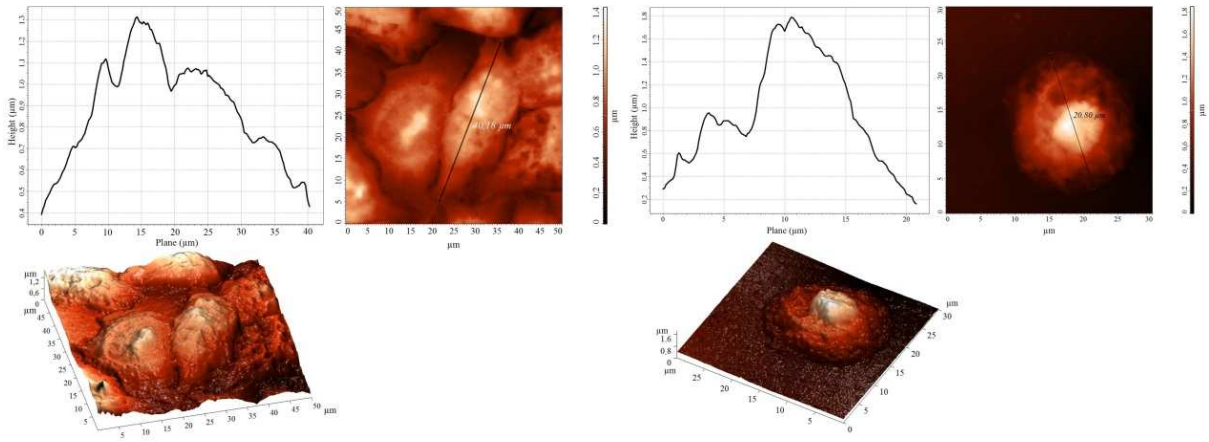


Obrázek 15. Modul pružnosti (% kontrolní skupiny) a skupiny ošetřené 5 µM $ClAlPcS_2$ stanovené aplikací Hertzova modelu fitací F-d křivky na buněčnou linii HeLa. Pro měření byl využit mikroskop atomárních sil Ntegra Aura (NT-MDT).

Do polymerních bílkovin tvořících vnitřní strukturu buněk spadají tři strukturní cytoskeletární komponenty: aktinová mikrofilamenta (F-aktin), střední filamenta (vimentin) a mikrotubuly (tubulin) (Suresh 2007). Modul pružnosti buněk poskytuje důležité

informace o stavu buňky a fázi v jaké se buňka nachází. Nižší koncentrace mikrotubulů vede ke zvýšení celkové tuhosti buňky (Haga 2000). Deformace cytoskeletálních bílkovin může mít vliv na schopnost buněk komunikovat s okolním prostředím. Struktura cytoskeletu může být transformována nádorovým bujením a tato pozměněná struktura má vliv na mechanickou charakteristiku buněk a možnost detekce celulárních změn pomocí stanovení změny mechanických charakteristik pří maligním onemocnění nabývá na významu.

Fotodynamická reakce může indukovat cytoskeletární změny. V prvních 10 sekundách od ozáření dojde ke smrštění buňky a k počáteční fázi narušení mikrotubulů bez výrazných změn na mirkofilamentech. V další fázi po ozáření může dojít k narušení mikrotubulů. Membrána vznikajících mikrotubulových váčků může být obklopena reorganizovanými mikrofilamenty. Ovšem výrazné změny v cytoskeletární struktuře nastávají v 10 minutě po ozáření, kdy dochází k narušení celého cytoskeletu (Jung 2009). Fotodynamická reakce nemění hladiny cytoskeletálních proteinů, ale ovlivňuje proteiny, které se účastní remodelace aktinových filament a mikrotubulů: dystrofin formuje síť vazeb aktinových filament do plazmatické membrány a calponin aktivuje aktinová filamenta (Uzdensky 2012).



Obrázek 16. Změna morfologie a liniového profilu fotodynamicky neaktivované (A) a fotodynamicky aktivované (B) buněčné linie HeLa. Skeny byly pořízeny na mikroskopu atomárních sil Ntegra Aura (NT MDT) a mechanická charakteristika na mikroskopu atomárních sil Bioscope Catalyst (Bruker).

V makroskopickém měřítku jsou mechanické vlastnosti podstatné pro funkci jednotlivých tkání, jako jsou kosti, šlachy nebo zuby. Lze tedy předpokládat, že mají vliv i na mikroskopické úrovni. Určením vlastností jednotlivých biomolekul lze zjistit vliv na samotný celek. Je také známo, že aktuální fyziologický stav systému se projevuje v jednotlivých buněčných charakteristikách. Mělo by tedy být možné korelovat změnu mechanickou se změnou strukturální (Kasas 2008).

III. Závěr

Fotodynamické a sonodynamické reakce jsou využitelné pro fotodynamickou a sonodynamickou terapii nádorů, která je v této práci studována *in vitro* fluorescenčními metodami studia buněčného poškození a především pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM) na buněčných liniích. Fotodynamická reakce využívá kombinace účinku fotodynamicky aktivní látky, která je preferenčně vychytávána v nádorové tkáni, světla o vhodné vlnové délce a kyslíku. Preferenční vychytávání je zajištěno změněným metabolismem nádorových buněk, změněným pH nebo vazbou na specifické přenašeče. Byly studovány účinky porfyrinových sensitizerů $TPPS_4$, $ZnTPPS_4$, $PdTPPS_4$ a derivátů ftalocyaninu $ClAlPcS_2$ v kombinaci se zářením vhodné vlnové délky na buněčných liniích adenokarcinomu plic A549, lidského melanomu G361, myšího melanomu B16FO, nádoru děložního hrdla HeLa a nenádorové buněčné linie myších fibroblastů NIH3T3. Při srovnání fotodynamických účinků tří porfyrinových sensitizerů $TPPS_4$, $ZnTPPS_4$ a $PdTPPS_4$ pro koncentraci 10 μM byl prokázán nejvyšší efekt na linii lidského melanomu G361 při použití zinečnatého metalokomplexu porfyrinu $TPPS_4$ ($ZnTPPS_4$). Pro vyšší účinek fotodynamické terapie se využívá navázání centrálních kovů a polokovů, z nichž některé prodlužují trvání tripletového stavu sensitizeru, a tím i zvyšují jeho účinnost v PDT. Zinečnatý komplex zvyšuje produkci reaktivních forem kyslíku a snižuje celkovou životnost buněk ve srovnání s porfyrinem bez navázaného centrálního kovu. Porfyriny a jejich metalokomplexy se preferenčně akumulují v lysosomech a mitochondriích. Ke zvýšení cytotoxického efektu fotodynamické reakce lze použít ultrazvuk. Ultrazvuk může v cílené tkáni způsobit změnu distribuce sensitizeru v buňce a zabránit agregaci molekul sensitizeru. Ultrazvuk může rovněž narušit buněčnou membránu, buňka se stane citlivější a zvýší se transport látky buněčnou membránou. Některé sensitizery lze tedy aktivovat jak fotochemicky, tak sonochemicky. Kombinace fotodynamického a sonodynamického jevu může způsobit rozsáhlejší poškození buněk a snížení jejich životnosti. Při použití nižších koncentrací sensitizeru a nízké dávky záření dochází k apoptóze. Na druhé straně při využití vyšší koncentrace, vyšší dávky záření a vyšší intenzity ultrazvuku dochází k rychlé odpovědi buněk a nastává nekróza. Účinek sensitizeru $ClAlPcS_2$ s podpůrným vlivem ultrazvuku byl studován na nádorových liniích G361, B16FO a došlo ke zvýšení hladiny reaktivních forem kyslíku po zařazení

ultrazvuku do protokolu. Byly optimalizovány ozařovací a ozvučovací podmínky pro navození fotodynamické a sonodynamické reakce na buněčných liních. Ke studiu buněčného poškození byla využita mikroskopie atomárních sil, která umožňuje studovat vzorky v nanometrovém rozlišení. Pro biologické aplikace byla zavedena v rámci této práce metoda pro studium buněčného poškození na buněčných liniích a metoda umožňující měření mechanických vlastností s využitím mikroskopie atomárních sil, která bude obecně využitelná v biomedicínských aplikacích. Použitím této techniky je možné mimo zobrazení povrchu stanovit i mechanické vlastnosti vzorků jako je modul pružnosti, deformaci, adhezi a disipaci energie, což umožňuje studovat buněčné poškození. Vliv sensitizerů o různých koncentracích, záření a ultrazvuku na životnost buněk, na produkci reaktivních forem kyslíku, na změny v mechanických vlastnostech byl studován prostřednictvím fluorescenční mikroskopie, spektrofluorimetrie a pomocí mikroskopie atomárních sil. Všechny studované sensitizery vykazovaly fotodynamickou účinnost a byl prokázán synergický účinek kombinace *in vitro* fotodynamické a sonodynamické terapie s využitím ultrazvuku pro aktivaci sensitizerů. V současné době se ještě pro zvýšení ekfektivnosti nabízí spojení nanotechnologií s fotodynamickou reakcí, kdy vznikají specifické vazby mezi sensitizerem a nanočásticemi. Vývoj dále směřuje k syntéze nových fotoaktivních a sonoaktivních látek s omezenou systémovou fototoxicitou při zachování vysoké terapeutické účinnosti.

IV. Literatura

Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol 74, 656-669, 2001.*

Alexiades-Armenakas M. Laser-mediated photodynamic therapy. *Clinics in Dermatology*, 24(1), 16-25, 2006

Allison R, Downie G, Cuenca R, Hu X, Childs C, SibataC. Photosensitizers in clinical PDT**.** *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1(1), Pages 27-42, 2004

Ando R, Hama H, Yammamoto-Hino M. An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 99***,** 2002.

Berlanda J, Kiesslich T, Engelhardt V, Krammer B, Plaetzer K. Comparative in vitro study on the characteristics of different photosensitizers employed in PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 100(3), 173-180, 2010

Brown S, Brown E, Walker I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment.*The Lancet Oncology 5(8),* 497-508, 2004

Caille N, Thoumine O, Tardy Y, Meister JJ. Contribution of the nucleus to the mechanical properties of endothelial cells. *Journal of Biomechanics 35*, 177-187, 2002

Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy 1*, 279 – 293, 2004

Churnside AB, Sullan RMA, Nguyen DM, Case SO, Bull MS, King G, Perkins T. Routine and timely sub-picoNewton force stability and precision for biological applications of atomic force microscopy. *Nano Letters* 12, 3557–3561, 2012

Derjaguin BV, Müller VM, Toporov YP. Effect of contact deformations on adhesion of particles. Journal of Colloid and Interface Science 53, 314–326, 1975

De Cássia Martins Antunes de Melo V, Lee AN, Perussi JR, Hamblin MR. Electroporation enhances antimicrobial photodynamic therapy mediated by the hydrophobic photosensitizer, hypericin. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy 10*, 647-650, 2013

Dowling E, Ronan W, McGarry J. Computational investigation of in situ chondrocyte deformation and actin cytoskeleton remodelling under physiological loading. *ACTA BIOMATERIALIA* 9(4), 5943-5955, 2013

Dulinska I, Targosz M, Strojny W, Lekka M, Czuba P, Balwierz W, Szymonski M. Stiffness of normal and pathological erythrocytes studied by means of atomic force microscopy. *Journal of Biochemistry and Biophysics: Methods 66*, 1–11, 2006

Fukano T, Hama H, Miyawaki A. Similar diffusibility of membrane proteins across the axon-soma and dendrite-soma boundaries revealed by a novel FRAP technique. *J. Struct. Biol. 147*, 12-18, 2004

Franz C, Puech P. Atomic Force Microscopy: A Versatile Tool for Studying Cell Morphology, Adhesion and Mechanics. *Cellular and Molecular Bioengineering,* 1, 289-300, 2008

Garcia-Parajo M, Koopman M, van Dijk E. The nature of fluorescence emission in the red fluorescent protein DsRed, revealed by single-molecule detection. *PNAS 98*, 14392-14397, 2001

Goldman R, Swedlow J, Spector D. *Live Cell Imaging: A laboratory manual.* CSHL press, New York, USA, 2010. ISBN 978-0-87969-892-8

Haga H, Sasaki S, Kawabata K, Ito E, Ushiki T, Sambongi T. Elasticity mapping of living fibroblasts by AFM and immunofluorescence observation of the cytoskeleton. *Ultramicroscopy 82*, 253-258, 2000

Hawkes P, Spence J. *Science of Microscopy*. Springer. New York, USA, 2006. ISBN: 978-0-387-25296-4

Ikai A. *The World of Nano-Biomechanics. Mechanical Imaging and Measurement by Atomic Force Microscopy.* Elevier, China, 2007. ISBN: 978-0-444-52777-6

Jung S, Park J, Yoo J, Shin I, Kim Y, Ha Q. Identification and ultrastructural imaging of photodynamic therapy - induced microfilaments by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy 109,* 1428–1434, 2009

Hájková L, Žurovec M, Reischig J. Effects of adenine nucleosides on cultured Drosophila cells. *J. Appl. Biomed.3*, 2005

Heifetz A, Kong S, Sahakian A, Taflove A, BackmanV. Photonic Nanojets, *Journal of Computational and Theoretical Nanoscience Vol. 6*, 1979–1992, 2009

Hell S, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics Letter* 19(11), 780-782, 1994

Houtsmuller A. Fluorescence recovery after photobleaching: application to nuclear proteins. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 95*, 177-99, 2005

Hu K, Zhao, F, Wang Q. Mechanical characterization of living and dead undifferentiated human adipose-derived stem cells by using atomic force microscopy . *PROCEEDINGS OF THE INSTITUTION OF MECHANICAL ENGINEERS PART H-JOURNAL OF ENGINEERING IN MEDICINE* 227(12) , 1319-1323 , 2013

Jiang Z, Shao J, Yang T, Wang J, Jia L. Pharmaceutical development, composition and quantitative analysis of phthalocyanine as the photosensitizer for cancer photodynamic therapy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 87*, 98-104, 2014

Jin ZH, Miyoshi N, Ishiguro K, Umemura S, Kawabata K, Yumita N, Sakata I, Takaok K, Udagawa T, Nakajima S, Tajiri H, Ueda K, Fukuda M, Kumakiri M.Combination effect of photodynamic and sonodynamic therapy on experimental skin squamous cell carcinoma in C3H/HeN mice. *J Dermatol.27(5),* 294-306, 2000

Johnson F, Gershman L, Waters J. Quantum efficiency of Cypridina luminescence, with a note that of Aequorea. *J. Cell. Comp. Physiol. 60*, 85-104, 1962

Jung SH, Park JY, Yoo JO, Shin I, Kim YM, Ha QS. Identification and ultrastructural imaging of photodynamic therapy - induced microfilaments by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy 109*, 1428-1434, 2009

Kasas S, Dietler G. Probing nanomechanical properties from biomolecules to living cells. Pflugers Archiv. *European Journal of Physiology 456*, 13-27, 2008

Kaupp G. *Atomic Force Microscopy, Scanning Nearfield Optical Microscopy and Nanoscratching. Application to Rough and Natural Surfaces.* Springer, Berlin, Germany, 2006. ISBN: 10-3-540-28405-2

Kolar P, Kolarova H, Tomankova K, Mosinger J. Photodynamic activity study of paladium(II)meso-tetrakis(4-sulfonatophenyl) porphyrin sensitizer on cancer cell lines A549. *Metal Ions in Biology and Medicine 10*, 500 - 505, 2008

Kolar P, Kolarova H, Tomankova K, Mosinger J. Photodynamic activity study of paladium(II)meso-tetrakis(4-sulfonatophenyl) porphyrin sensitizer on cancer cell lines A549. *Metal Ions in Biology and Medicine 10*, 500 - 505, 2008

Kolar P, Tomankova K, Vujtek M, Malohlava J, Safarova K, Jancik D, Kolarova H. The effect of photodynamic treatment on the morphological and mechanical properties of the HeLa cell line. *General Physiology and Biophysics 32*, 337-346, 2013

Kolárová H, Bajgar R, Tománková K, Krestýn E, Dolezal L, Hálek J. In vitro study of reactive oxygen species production during photodynamic therapy in ultrasound-pretreated cancer cells. *Physiol Res. 2007*, 56 Suppl 1, 27-32, E-pub 2007

Kolárová H, Kubínek R, Strnad M. Assesment of Cellular Damage by Inverted Fluorescent Microscopy. *In Science, Technology and Education of Microscopy: An Overview, Edited by A. Mendez – Vilas, Formatex*, 464-468, Spain, 2003, ISBN 84-607-6679-7

Kolarova H, Lenobel R, Kolar P, Strnad M. Sensitivity of different cell lines to phototoxic effect of disulfonated chloroaluminium phthalocyanine. *Toxicol In Vitro*, 21(7), 1304-6. E-pub 2007

Kolarova H, Lenobel R, Kolar P, Strnad M. Sensitivity of different cell lines to phototoxic effect of disulfonated chloroaluminium phthalocyanine. *Toxicol In Vitro*, 21(7), 1304-6, E-pub 2007

Kolarova H, Nevrelova P, Tomankova K, Kolar P, Bajgar R, Mosinger J. Production of reactive oxygen species after photodynamic therapy by porphyrin sensitizers. *General Physiology and Biophysics 27*, 101 – 105, 2008

Kolarova H, Nevrelova P, Tomankova K, Kolar P, Bajgar R, Mosinger J. Production of reactive oxygen species after photodynamic therapy by porphyrin sensitizers. *General Physiology and Biophysics 27*, 101 – 105, 2008

Kolarova H, Tomankova K, Bajgar R, Kolar P, Kubinek R. Photodynamic and sonodynamic treatment by phthalocyanine on cancer cell lines. *Ultrasound in Medicine and Biology 35*, 1397 – 1404, 2009

Kolářová H. Optické metody a přístrojová technika. s.241-257. In: *Medicínská biofyzika*, Editoři: Navrátil L, Rosina J. 524 stran. Grada 2005 ISBN 80-247-1152-4.

Kolářová H. Fotodynamická terapie s. 171-175 In: Kuna P., Navrátil L. *Klinická radiobiologie. 222 stran*, Manus 2005 ISBN: 80-86571-09-02.

Kubinek R, Vůjtek M, Mašláň M. *Mikroskopie skenující sondou*, Vydavatelství UP Olomouc, 2003, ISBN: 80-244-0602-0

Kubínová L, Mao X, Janácek J, Archambeau J. (*2003*) Stereology Techniques in Radiation Biology. *Radiation Research,* 160(1), 110-119, 2003

Kubínová L, Mao X, Janácek J, Archambeau J. *Stereology Techniques in Radiation Biology Microscopy Research and Technique* 74(9), 831–838, 2011

Kubínová L, Mao X, Janácek J. Blood Capillary Length Estimation from Three-Dimensional Microscopic Data by Image Analysis and Stereology. *Microscopy and Microanalysis 19(4),* 898-906, 2013.

Kuroki M, Hachimine K, Abe H, Shibaguchi H, Kuroki M, Maekawa S, Yanagisawa J, Kinugasa T, Tanaka T, Yamashita Y. Sonodynamic therapy of cancer using novel sonosensitizers. *Anticancer Res*. *27(6A),* 3673-7, 2007

Kuznetsova T, Starodubtseva M, Yegorenkov N, Chizhik S, Zhdanov R. Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron* 38, 824-833, 2007

Lam M, Oleinick NL, Nieminen AL. Photodynamic therapy-induced apoptosis in epidermoid carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry 276*, 47379–47386, 2001

Li M, Liu LQ, Xi N, Wang YC, Dong ZL, Xiao XB, Zhang WJ. Drug-Induced Changes of Topogrpahy and Elasticity in Living B Lymphoma Cells Based on Atomic Force Microscopy. *Acta Physico-Chimica Sinica* 28, 1502-1508, 2012

Luque T, Melo E, Garreta E, Cortiella J, Nichols J, Farre R, Navajas D. Local micromechanical properties of decellularized lung scaffolds measured with atomic force microscopy . *ACTA BIOMATERIALIA* 9 (6), 6852-6859, 2013

Macrene Alexiades-Armenakas.Laser-mediated photodynamic therapy. *Clinics in Dermatology 24(1)*, 16-25, 2006

Maisch T, Hackbarth S, Regensburger J, Felgenträger A, Bäumler W, Landthaler M Röder B. Photodynamic inactivation of multi-resistant bacteria (PIB)—a new approach to treat superficial infections in the 21st century. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* 9(5), 360–366, 2011

Malina L. Studium fotodynamického vlivu na buněčné linie užitím fluorescenčních metod. *Diplomová práce PřF LF UP Olomouc*, 2013

Matteucci M, Thrall D. The role of liposomes in drug delivery and diagnostic imaging: a review. *Vetrinary Radiology and Ultrasound 41*, 100–107, 2000

Mickova M, Tomankova K, Kolarova H, Bajgar R, Kolar P, Sunka P, Plencner M, Jakubova R, Benes J, Kolacna L, Planka L, Necas A, Amler E. Ultrasonic shock-wave as a control mechanism for liposome drug delivery system for possible use in scaffold implanted to animals with iatrogenic articular cartilage defects. *Acta Veterinaria Brno 77*, 285 - 289, 2008

Mikš A.*: Aplikovaná optika 10*, Vydavatelství ČVUT, 2000

Mikš A.*: Fyzika 2 – Elektromagnetické pole,* Vydavatelství ČVUT, 2005.

Milowska K, Gabryelak T. Synergistic effect of ultrasound and phthalocyanines on nucleated erythrocytes in vitro. *Ultrasound in Medicine and Biology 31*,1707–1712, 2005

Misík V, Riesz P. Free radical intermediates in sonodynamic therapy. *Ann N Y Acad Sci.*, 899,335-48, 2000

Mizuno H, Sawano A, Eli P. Red fluorescent protein from Discosoma as a fusion tag and a partner for Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Biochemistry 40*, 2502-2510, 2001

Mizuno H, Mal T, Tong K, Ando R. Photo-induced peptide cleavage in the green-to red conversion of a fluorescent protein. *Mol.Cell 12*, 1051-1058, 2003

Morin J, Hastings J. Energy transfer in a bioluminescent system. *J. Cell. Physiol. 77***,** 313-318, 1971

Nielsen K, Juzeniene A, Juzenas P, Stamnes K, Stamnes J, Moan J. Choice of optimal wavelength for PDT: the significance of oxygen depletion. *Photochem Photobiol 81, 1190-1194, 2005*

Nowis D. Stokłosa T. Legat M. Issat T. Jakóbisiak M. Gołąb J. The influence of photodynamic therapy on the immune response. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy 2*, 283 – 298, 2005

O'Connor AE, Gallagher WM, Byrne AT. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochem Photobiol 85, 1053-1074, 2009*

O'Connor AE, Gallagher WM, Byrne AT. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochem Photobiol 85, 1053-1074, 2009*

Petroll WM, Cavanagh HD, Jester JV. Dynamic three-dimensional visualization of collagen matrix remodeling and cytoskeletal organization in living corneal fibroblasts. *Scanning 26*, 1-10, 2004

Pížová K, Tománková K, Langová K, Hanáková A, Lenobelová H, Zapletalová H, Malohlava J, Binder S, Bajgar R, Vachutka J, Doležal L, Kolářová H. Vliv ultrazvuku na účinnost fotodynamické terapie – *in vitro* studie. *Lékař a technika,* 18-23, 2012.

Pluta, Maksymilian. Advanced Light Microscopy: Principles and Basic Properties, *PWN-Polish Scientific Publishers*, vol.1-3, 1988

Prabhune M, Belge G, Dotzauer A, Bullerdiek J, Radmacher M. Comparison of mechanical properties of normal and malignant thyroid cells. *MICRON 4*3(12), 1267-1272, 2012

Rai P, Mallidi S, Zheng X, Rahmanzadeh R, Mir Y, Elrington S, Khurshid A, Hasan T. Development and applications of photo-triggered theranostic agents Advanced Drug *Delivery Reviews 62*, 1094-1124, 2010

Robertson CA, Evans DH, Abrahamse H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J Photochem Photobiol B 96,* 1-8, 2009

Roduit C, Sekatski S, Dietler G, Catsicas S, Lafont F, Kasas S. Stiffness Tomography by Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal 97*, 674–677, 2009

Rosenthal I, Sostaric J, Riesz P. Sonodynamic therapy-a review of the synergistic effects of drugs and ultrasound. trason *Sonochem.* 11(6), 349-63, 2004

Rotsch C, Radmacher M. Drug-Induced Changes of Cytoskeletal Structure and Mechanics in Fibroblasts: An Atomic Force Microscopy Study. *Biophysical Journal* 78, 520-535, 2000

Sharman WM, van Lier JE, Allen CM. Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews 56*, 53 – 76, 2004

Serdyuk IN, Zaccai NR, Zaccai J. *Methods in Molecular Biophysics*. Cambridge Univerity Press, United Kingdom, 2007. ISBN 13-978-0-521-81524-6

Shibaguchi H, Tsuru H, Kuroki M, Kuroki M. Sonodynamic cancer therapy: a non-invasive and repeatable approach using low-intensity ultrasound with a sonosensitizer. *Anticancer Res.* 31(7), 2425-9, 2011

Sokolov I, Dokukin M, Guz N. Method for quantitative measurements of the elastic modulus of biological cells in AFM indentation experiments. *METHOD* 60 (2), 202-213, 2013

Suresh S. Biomechanics and biophysics of cancer cells. *Acta Biomaterialia 3*, 413–438, 2007

Taatjes DJ, Mossman BT. *Cell Imaging Techniques: Methods and Protocols.* Humana Press, New Jersey, USA, 2006. eISBN: 1-59259-993-1

Takahashi R, Ichikawa S, Subagyo A, Sueoka K, Okajima T. Atomic force microscopy measurements of mechanical properties of single cells patterned by microcontact printing *ADVANCED ROBOTICS* 28(7), 449-455, 2014

Tomankova K, Kolar P, Malohlava J, Kolářová H. Mechanical Characterisation of HeLa Cells using Atomic Force Microscopy. Formatex - Microscopy book series, Current Microscopy Contributions to Advances in *Science and Technology 5*, 549 – 554, 2012

Tomankova K, Kolarova H, Kolar P, Kejlova K, Jirova D. Study of cytotoxic effect of Photodynamically and Sonodynamically Activated Sensitizers in vitro. *Toxicology in Vitro 23*, 1465-1471, 2009

Tománková K, Kolář P, Malohlava J, Kolářová H. Vliv fotodynamické terapie na cytomechaniku nádorové buněčné linie HeLa. Lékař a technika 3, 32 – 36, 2012

Tomankova K. *Mikroskopie atomárních sil v biofyzikálních vědách a zubním lékařství.* Habilitační práce, LF UP Olomouc 2013.

Triesscheijn M, Baas P, Schellens J, Stewart F. Photodynamic therapy in oncology. *Oncologist 11,* 1034-1044, 2006.

Ulrich A. Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. *Bioscience Reports 22*, 129–150, 2002

Uzdensky A, Kolpakova E, Juzeniene A, Juzenas P, Moana J. The effect of sub-lethal ALA-PDT on the cytoskeleton and adhesion of cultured human cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta 1722*, 43–50, 2005

Wang X, Zhang W, Xu Z, Luo Y, Mitchell D, Moss RW.Sonodynamic and photodynamic therapy in advanced breast carcinoma: a report of 3 cases. *Integr Cancer Ther*. 8(3), 283-7, 2009

Wilson BC, Patterson MS. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys Med Biol 53,* 61-109, 2008

Yumita N, Han QS, Kitazumi I, Umemura S. Sonodynamically-induced apoptosis, necrosis, and active oxygen generation by mono-l-aspartyl chlorin e6. *Cancer Sci.*, 166-72, E-pub 2007

Yumita N, Iwase Y, Nishi K, Komatsu H, Takeda K, Onodera K, Fukai T, Ikeda T, Umemura S, Okudaira K, Momose Y. Involvement of reactive oxygen species in sonodynamically induced apoptosis using a novel porphyrin derivative. *Theranostics* 2(9), 880-8, E-pub 2012

Yumita N, Umemura S. Sonodynamic antitumour effect of chloroaluminum phthalocyanine tetrasulfonate on murine solid tumour. *Joural of Pharmacy and Pharmacology 56*, 85–90, 2004

Zhi-Jun Dai. Sonodynamic therapy (SDT): A novel treatment of cancer based on sonosensitizer liposome as a new drug carrier**.** *Medical Hypotheses* 80(3), 300-302, 2013

Internetové zdroje:

http://www.mikroskop-mikroskopy.cz

http://www.olympusmicro.com

http://heikoseeger.xscience.info

www.bruker.com

http://blog.brukerafmprobes.com

V. Seznam příloh

1. **Kolar P.,** Kolarova H., Tomankova K., Mosinger J. Photodynamic activity study of paladium(II)*meso*-tetrakis(4-sulfonatophenyl) porphyrin sensitizer on cancer cell lines A549. Metal Ions in Biology and Medicine 10, 500 - 505, 2008

2. Kolarova H., Nevrelova P., Tomankova K., **Kolar P.,** Bajgar R., Mosinger J. Production of reactive oxygen species after photodynamic therapy by porphyrin sensitizers. General Physiology and Biophysics 27, 101 – 105, 2008. **IF 1,286**

3. Kolarova H., Tomankova K., Bajgar R., **Kolar P.,** Kubinek R. Photodynamic and sonodynamic treatment by phthalocyanine on cancer cell lines. Ultrasound in Medicine and Biology 35, 1397 – 1404, 2009. **IF 2,395**

4. Tomankova K., Kolarova H., **Kolar P.,** Kejlova K., Jirova D. Study of cytotoxic effect of Photodynamically and Sonodynamically Activated Sensitizers in vitro. Toxicology in Vitro 23, 1465-1471, 2009. **IF 2,473**

5. Mickova M., Tomankova K., Kolarova H., Bajgar R., **Kolar P.,** Sunka P., Plencner M., Jakubova R., Benes J., Kolacna L., Planka L.,Necas A., Amler E. Ultrasonic shock-wave as a control mechanism for liposome drug delivery system for possible use in scaffold implanted to animals with iatrogenic articular cartilage defects. Acta Veterinaria Brno 77, 285 - 289, 2008, **IF 0,687**

6. Malohlava J., Tománková K., **Kolář P.,** Kolářová H. Studium mechanických vlastností s využitím mikroskopie atomárních sil. Lékař a technika 3: 5-9, 2013

7. Tomankova K., **Kolar P.,** Malohlava J., Kolářová H. Mechanical Characterisation of HeLa Cells using Atomic Force Microscopy. Formatex - Microscopy book series, Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology 5 (1), 549 – 554, 2012

8. Tománková K., **Kolář P.,** Malohlava J., Kolářová H. Vliv fotodynamické terapie na cytomechaniku nádorové buněčné linie HeLa. Lékař a technika 3, 32 – 36, 2012.

9. **Kolar P.,** Tomankova K., Vujtek M., Malohlava J., Safarova K., Jancik D., Kolarova H. The effect of photodynamic treatment on the morphological and mechanical properties of the HeLa cell line. General Physiology and Biophysics 32, 337-346, 2013. **IF 0,852**

Příloha č. 1

Photodynamic activity study of palladium(II)*meso*-tetrakis (4sulfonatophenyl)porphyrin sensitizer on cancer cell line A549.

Kolar P., Kolarova H., Tomankova K., Mosinger J.

Metal Ions in Biology and Medicine 10, 500 – 504, 2008

Recenzovaný, v anglickém jazyce

Práce se zaměřuje na fototoxický vliv a produkci reaktivních forem kyslíku paladnatého komplexu sensitizeru $TPPS_4$. Byla ověřena jeho účinnost na buněčnou linii adenokarcinomu plic A549.

Příloha č. 2

Production of reactive oxygen species after photodynamic therapy by porphyrin sensitizer.

Kolarova H., Nevrelova P., Tomankova K., **Kolar P.,** Bajgar R., Mosinger J.

General Physiology and Biophysics 27, 101-105, 2008

IF 1,286

Experimentální práce srovnává účinnost porfyrinového sensitizeru $TPPS_4$ a jeho dvou metalokomplexů $ZnTPPS_4$ a $PdTPPS_4$ v kombinaci s ozářením prostřednictvím LED zdroje s odpovídající excitační vlnovou délkou. Nejvyšší citlivost k buněčné linii melanomu G361 vykazoval sensitizer $ZnTPPS_4$.

Příloha č. 3

Photodynamic and sonodynamic treatment by phthalocyanine on cancer cell lines.

Kolarova H., Tomankova K., Bajgar R., **Kolar P.,** Kubinek R.

Ultrasound in Medicine and Biology 35, 1397 – 1404, 2009

IF 2,395

V této experimentální práci byl prokázán vliv sensitizeru $ClAlPcS_2$ na nádorovou buněčnou linii lidského melanomu G361. Dále byl ověřován efekt terapeutického ultrazvuku v kombinaci s fotodynamickou reakcí. Bylo stanoveno zvýšení reaktivních forem kyslíku po zařazení sonodynamické reakce za fotodynamickou reakci.

Příloha č. 4

Study of cytotoxic effect of photodynamically and sonodynamically activated sensitizers *in vitro*.

Tomankova K., Kolarova H., **Kolar P.,** Kejlova K., Jirova D.

Toxicology in Vitro 23, 1465-1471, 2009

IF 2,473

Publikace pojednává o vlivu fotodynamické reakce na nádorovou buněčnou linii myšího melanomu B16FO a nenádorovou buněčnou linii myších fibroblastů NIH3T3. Dále o vlivu ultrazvuku a antioxidantu na vznik reaktivních forem kyslíku. Byla zjištěna vyšší citlivost nádorové buněčné linie vůči fotodynamickému poškození a vyšší životnost buněk nenádorové linie za přítomnosti antioxidantu.

Příloha č. 5

Ultrasonic shock-wave as a control mechanism for liposome drug delivery system for possible use in scaffold implanted to animals with iatrogenic articular cartilage defects.

Mickova M., Tomankova K., Kolarova H., Bajgar R., **Kolar P.,** Sunka P., Plencner M., Jakubova R., Benes J., Kolacna L., Planka L.,Necas A., Amler E.

Acta Veterinaria Brno 77, 285 - 289, 2008

IF 0,687

Experimentální práce pojednává o řízeném uvolňování léčiv z liposomů pomocí ultrazvuku a rázových vln. Krátkodobá ultrazvuková sonikace pomocí terapeutického ultrazvuku je postačující pro narušení liposomů, ovšem vhodnější metodou pro otevírání liposomů je použití rázové vlny, zejména díky menším negativním vedlejším účinkům na organizmus.

Příloha č. 6

Studium mechanických vlastností s využitím mikroskopie atomárních sil.

Malohlava J., Tománková K., **Kolář P.,** Kolářová H.

Lékař a technika, 3: 5-9, 2013

Recenzovaný, v českém jazyce

Publikace představuje nové metody studia mechanických vlastností buněk s využitím mikroskopie atomárních sil. Práce je zaměřena na rekonstrukci *F-d* křivek a využití různého matematického přístupu k výpočtu mechanických vlastností biologického preparátu jako je adheze, modul pružnosti, disipace energie a deformace.

Příloha č. 7

Mechanical characterisation of HeLa cells using atomic force microscopy.

Tomankova K., **Kolar P.,** Malohlava J., Kolarova H.

Formatex - Microscopy book series, Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology 5, 549 – 554, 2012

Recenzovaný, v anglickém jazyce

V práci je představena komplexní mechanická charakteristika buněčného těla pomocí mikroskopie atomárních sil. S využitím módu Peak force QNM je možné provést měření mechanických vlastností v každém bodě skenu. V práci je stanoven Youngův modul pružnosti nádorové buněčné linie HeLa. 111

Příloha č. 8

Vliv fotodynamické terapie na cytomechaniku nádorové buněčné linie HeLa.

Tománková K., **Kolář P.,** Malohlava J., Kolářová H.

Lékař a technika 3, 32 – 36, 2012.

Recenzovaný, v českém jazyce

Využitím mikroskopie atomárních sil je možné stanovit změnu mechanických vlastností buněk indukovaných fotodynamickou reakcí. Fotodynamická reakce vyvolává změny v cytoskeletární struktuře a tím výrazně mění mechanické vlastností buněk linie HeLa. Změna Youngova modulu před a po reakci byla 64%.

Příloha č. 9

The effect of photodynamic treatment on the morphological and mechanical properties of the HeLa cell line.

Kolar P., Tomankova K., Vujtek M., Malohlava J., Safarova K., Jancik D., Kolarova H.

General Physiology and Biophysics 32, 337-346, 2013

IF 0,852

Experimentální práce se zabývá změnou mechanických vlastností buněk vyvolaných fotodynamickou reakcí na nádorovou buněčnou linii HeLa. Byl stanoven Youngův modul před a po reakci s výsledkem zvýšené tuhosti jak v oblasti jádra, tak v cytoplazmě.