

Univerzita Palackého v Olomouci

Lékařská fakulta

**STUDIUM ÚČINKŮ FOTODYNAMICKY
AKTIVNÍCH LÁTEK S VYUŽITÍM MODERNÍCH
MIKROSKOPICKÝCH METOD**

Mgr. Jakub Malohlava

Školitel: doc. Ing. Kateřina Bartoň Tománková, Ph.D.

Školící pracoviště: Ústav lékařské biofyziky, LF UP

Olomouc 2017

Prohlašuji, že jsem svou disertační práci vypracoval samostatně a uvedl jsem všechny použité zdroje literatury.

Olomouc, 2017

Mgr. Jakub Malohlava

.....

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

Dále děkuji prof RNDr. Haně Kolářové, CSc. za poskytnuté zázemí pro tvorbu této práce a celému kolektivu Ústavu lékařské biofyziky za poskytnuté informace, příjemné podmínky a pomoc při práci. Zvláštní poděkování patří Olze Hustákové a Barboře Manišové za přípravu buněčných linií. A především děkuji všem spoluautorům prací, které jsou součástí mé disertační práce.

Tato práce vznikla za podpory grantových projektů: NPU I LO1304, IGA MZCR NT 14060-3/2013, LF_2015_008, LF_2014_003.

Obsah

Obsah	4
Seznam zkratek	6
Souhrn	9
Summary	10
1. Fotodynamická terapie	11
1.1. Historie	11
1.2. Princip	11
1.3. Průběh	12
1.4. Fotosensitizéry	13
1.4.1. Ideální fotosensitizér	14
1.4.2. Klasifikace	15
1.4.3. Fotosensitizéry porfyrinové povahy	16
1.4.4. Fotosensitizéry neporfyrinové povahy	21
1.5. Zdroje záření	22
1.5.1. Lasery	23
1.5.2. Lamy	24
1.6. Efekt PDT	25
1.6.1. Lokalizace fotosensitizéru	25
1.6.2. Změny signálních drah	26
1.6.3. Adheze a cytoskelet	27
1.6.4. Buněčná smrt	27
1.6.5. Mechanismus destrukce tumoru	28
2. Mikroskopické metody	31
2.1. Historie	31
2.2. Světelná mikroskopie	31
2.2.1. Princip světelného mikroskopu	31
2.2.2. Rozlišovací schopnost a mez mikroskopu	32
2.2.3. Metody světelné mikroskopie	33
2.2.4. Fluorescenční mikroskopie	35
2.2.5. Konfokální mikroskopie	36
2.2.6. Super-resoluční mikroskopie	38
2.3. Mikroskopie atomárních sil	40

2.3.1.	Princip mikroskopu AFM	41
2.3.2.	Zobrazovací režimy	43
2.3.3.	AFM spektroskopie.....	45
2.3.4.	Artefakty zobrazení.....	49
3.	Cíle práce.....	52
4.	Materiál a metody.....	53
4.1.	Materiál	53
4.2.	Buněčné kultury	53
4.3.	Fotodynamický efekt.....	53
4.4.	Test toxicity – MTT test.....	54
4.5.	Fluorescenční barvení	54
4.6.	Mikroskopie atomárních sil.....	55
4.7.	Statistické vyhodnocení	55
5.	Výsledky a diskuze.....	56
6.	Další pozorování pomocí mikroskopie atomárních sil na Ústavu lékařské biofyziky, LF UP v Olomouci.....	73
6.1.	Studium polymerních filmů kyseliny hyaluronové.....	73
6.2.	Charakterizace Ni-Ti endodontických nástrojů	74
6.3.	Studium bakterií.....	75
6.4.	Studium nanočástic stříbra	76
6.5.	Studium nanočástic oxidu titaničitého	77
6.6.	Vazebné síly a adheze	78
7.	Závěr.....	80
	Reference	82
	Publikační činnost autora.....	95

Seznam zkratek

AFM	mikroskopie atomárních sil (atomic force microscopy)
AIDS	syndrom získaného selhání imunity (acquired immunodeficiency syndrome)
ALA	5-aminolevulová kyselina
ATP	adenosintrifosfát
BpD	derivát benzoporfyrinu
DIC	diferenciální interferenční kontrast
DMEM	kultivační médium, Duplecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DMT	matematický model DeJaguin – Müller – Toporov
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru
ER	endoplasmatické retikulum
FBS	fetální bovinní sérum
<i>F-d</i> křivka	<i>závislost síla – vzdálenost (force – distance curve)</i>
HA	kyselina hyaluronová
HOPG	vysoce organizovaný pyrolytický grafit (highly oriented pyrolytic graphite)
Hp	hematoporfyrin
HpD	derivát hematoporfyrinu
IC50	koncentrace inhibující 50% populace
IF	intermediální filamenty
IR	infračervený
i.v.	intravenózní
JKR	matematický model Johnson – Kendall – Roberts
LD	letální dávka

LED	světlo emitující dioda
LSCM	laserová rastrovací konfokální mikroskopie
MT	mikrotubuly
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl tetrazolium bromid
NSOM	skenovací optická mikroskopie blízkého pole (near-field scanning optical microscopy)
PALM	lokalizační mikroskopie fotoaktivací (photoactivated localization microscopy)
PBS	fosfátový pufr
PCD	programovaná buněčná smrt
PDT	fotodynamická terapie
PeakForce QNM	PeakForce Quantitative Nanomechanical Mapping
PpIX	protoporfyrin IX
PS	fotosenzitizér
PSF	rozptylová funkce
ROS	reaktivní formy kyslíku
S_0	základní singletní stav
S_1	excitovaný singletní stav
SIM	mikroskopie se strukturovaným osvětlením (structured illumination microscopy)
SPM	mikroskopie skenující sondou (scanning probe microscopy)
STED	vyčerpání stimulovanou emisí (stimulated emission depletion)
STM	skenovací tunelovací mikroskopie (scanning tunneling microscopy)
STORM	optická rekonstrukční mikroskopie (stochastic optical reconstruction microscopy)
T_1	excitovaný tripletní stav
TiO ₂	oxid titaničitý

UV	ultrafialový
YM	Youngův modul pružnosti
ZnPc	zinečnatý derivát ftalocyaninu

Souhrn

V této práci je hodnocen vliv fotodynamicky aktivních látek pomocí moderních mikroskopických metod. Fotodynamicky aktivní látky jsou součástí alternativní léčby některých nádorových a nenádorových onemocnění označované jako fotodynamická terapie. Fotodynamická terapie je založena na akumulaci fotosenzitizeru v cílové tkáni a jeho následné aktivaci světlem vhodné vlnové délky, což vede k její následné destrukci. K vyhodnocení účinku fotodynamické terapie bylo využito metod konfokální mikroskopie a mikroskopie atomárních sil a metody životnosti buněk.

Mikroskopie atomárních sil (AFM) je moderní metoda, která dokáže pracovat v nanometrickém rozlišení. AFM je tak vhodnou technikou umožňující studovat buněčné poškození poskytující kvalitní obrazovou informaci. Kromě topografického zobrazení je schopna podat informaci o mechanických vlastnostech studovaného systému. Konfokální mikroskopie využívá fluorescenčního značení k zhodnocení funkčního stavu buňky stejně tak jako k evaluaci vnitřního uspořádání.

Byly studovány senzitizery porfyrinové povahy TMPyP a deriváty TPPS₄, jež se řadí mezi fotosenzitizery druhé generace. Senzitizery byly aplikovány na nádorové buněčné linie HeLa, (karcinomu děložního hrdla) a G361 (lidský melanom) a nenádorové linie NIH 3T3 (myší fibroblasty) u nichž byla vyvolána fotodynamická reakce ozářením světlem vlnové délky 414 nm. Výsledky naznačují rozsáhlou reorganizaci cytoskeletu po fotodynamické terapii. Následkem změny rozložení cytoskeletálních proteinů dochází i ke změně Youngova modulu pružnosti. Hodnoty Youngova modulu statisticky signifikantně narůstají v případě nádorových buněčných linií. Kromě změny mechanických vlastností dochází ke změnám morfologie. Buňky prošlé fotodynamickou terapií snižují plochu, kterou jsou adherovány k substrátu, a jejich výška roste.

Summary

This thesis evaluates effects of photodynamically active compounds using modern microscopic methods. Photodynamically active compounds are part of an alternative treatment of several malignant and non-malignant diseases called photodynamic therapy. Photodynamic therapy is based on selective accumulation of a photosensitizer in the targeted tissue followed by irradiation by light of proper wavelength, which leads to its subsequent destruction. There were used confocal microscopy and atomic force microscopy to assess the effects of photodynamic therapy.

Atomic force microscopy (AFM) is modern method which operates in nanometric scale. AFM is a suitable technique to study cellular damage while providing high resolution image. Except of topography it is able to provide information about system's mechanical properties. Confocal microscopy uses fluorescent labelling to assess cell function as well as its structure.

Porphyrin based sensitizers were studied in this thesis. TMPyP and derivatives of TPPS₄ belong to the second generation of photosensitizers. Sensitizers were applied to tumour cell lines HeLa (cervical carcinoma) and G361 (human melanoma) and non-tumour cell line NIH 3T3 (mouse fibroblast). They were irradiated with light of proper wavelength – 414 nm, to induce photodynamic reaction. Results show large reorganization of cytoskeleton after photodynamic treatment. There is a change in Young modulus due to altered distribution of cytoskeletal proteins. Value of Young modulus is significantly higher for tumour cell lines. Except of change of mechanical properties there are alternations in cell morphology. Cells after photodynamic treatment reduce area of adhesion and increase height.

1. Fotodynamická terapie

Fotodynamická terapie (PDT) je jednou z možných terapeutických metod léčby některých nádorových onemocnění. PDT je minimálně invazivní procedura, která využívá charakteristických vlastností nádorů. Je založena na selektivní akumulaci světlocitlivé látky – fotosensitizeru (PS) – v tumoru a jejím ozáření světlem o vhodné vlnové délce, což vede k produkci singletního kyslíku ($^1\text{O}_2$) a dalších reaktivních forem kyslíku (ROS), které v konečném důsledku způsobí destrukci cílové tkáně (Kudinova *et* Berezov, 2010). Fakt, že fotosensitizer také vyzařuje fluorescenci, může být využit k diagnostice a lokalizaci nádoru (Castano, Demidova *et* Hamblin, 2004). Pole působnosti PDT nespočívá pouze v léčbě onkologických novotvarů, ale také zasahuje do oblasti mikrobiologie (Hanáková *et al.*, 2014; Hamblin, 2016), kde představuje alternativu léčby infekcí antibiotiky, či kožního lékařství (Alexiades-Armenakas, 2005).

1.1. Historie

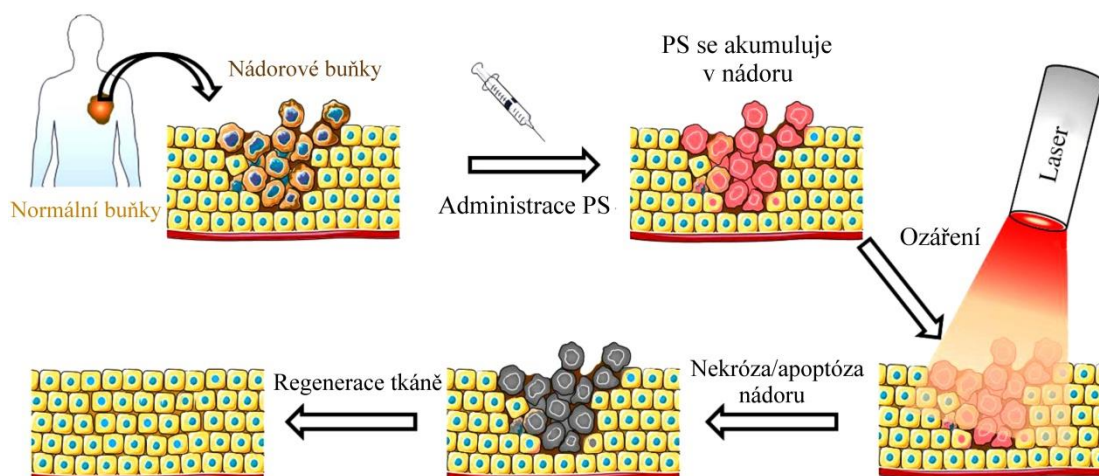
Využití světla v kombinaci s bylinnými extrakty se v léčbě nemocí objevuje již ve starověkém Egyptě, Indii a Číně. Avšak rozšíření této léčby nastalo až koncem 19. a začátkem 20. století, kdy bylo objeveno, že ozáření určité chemické sloučeniny může vést až k buněčné smrti. Tento jev chemické fotosensitizace byl popsán Oscarem Raabem na počátku 20. století. V roce 1907 von Tappeiner zjistil, že k tomuto jevu je také potřeba kyslík, a také jím byl poprvé použit termín „fotodynamický efekt“ (Kessel, 2004; Kudinova *et* Berezov, 2010; Zimčík *et* Miletín, 2004a). Mezi nejvíce studované látky mající fotodynamický efekt patří porfyriny, které byly identifikovány už v polovině 19. století. V té době byl také izolován jeden z prvních fotosensitizerů – hematoporfyrin (Hp) (Kudinova *et* Berezov, 2010). V roce 1955 byl připraven z Hp jeho derivát (hematoporphyrin derivative – HpD), jenž se vyznačoval daleko vyšší účinností. Po částečném vyčištění se stal základem pro v současné době nejrozšířenější fotosensitizer – Photofrin® (Zimčík *et* Miletín, 2004a).

1.2. Princip

Pro navození fotodynamického efektu je potřeba součinnosti tří faktorů: fotosensitizeru, světla specifické vlnové délky a kyslíku. PDT využívá fakt, že se fotosensitizer přednostně akumuluje v cílové tkáni. Po určité době dochází k ozáření tkáně světlem o vlnové délce specifické pro navázaný PS. Po následném ozáření se produkuje singletní kyslík a další reaktivní formy kyslíku, jako je peroxid vodíku, superoxidový anion, hydroxylový radikál, které vedou k nevratným změnám v místě působení (Agostinis *et al.*, 2011).

1.3. Průběh

PDT, jak bylo zmíněno výše, potřebuje 3 základní faktory: fotosensitizer, světlo a kyslík. Samy o sobě jsou jednotlivé faktory netoxické, avšak v přítomnosti všech složek vznikají cytotoxické agens, jenž vedou k destrukčním procesům v místě výskytu a jeho nejbližším okolí (obr. 1). Fotosensitizer může být podán různými způsoby – systémově, lokálně či topikálně. Po době nutné k akumulaci PS v cílové oblasti dochází k ozáření světlem vhodné vlnové délky, nejčastěji červeným světlem. Takto dodaná energie uvádí PS ze základního singletního stavu S_0 do excitovaného stavu S_1 . Návrat PS do základního stavu může nastat fluorescencí či vyzářením přebytečné energie ve formě tepla. Také může nastat mezisystémová konverze, kdy excitovaný singletní stav se změnil na tripletní excitovaný stav T_1 . Přejít z T_1 na S_0 může opět nastat zářivým přechodem – fosforescencí, nebo přenosem energie na další molekuly. Přenos energie může proběhnout dvěma typy reakcí – typ I a typ II. Oba typy reakcí se mohou vyskytnout zároveň a poměr mezi nimi závisí na typu PS, koncentraci substrátu a kyslíku (Castano, Demidova *et Hamblin*, 2004; Agostinis *et al.*, 2011).



Obr. 1: Obecné schéma aplikace fotodynamické terapie v klinické praxi. Převzato a upraveno z Deda *et Araki* (2015).

Reakce typu I

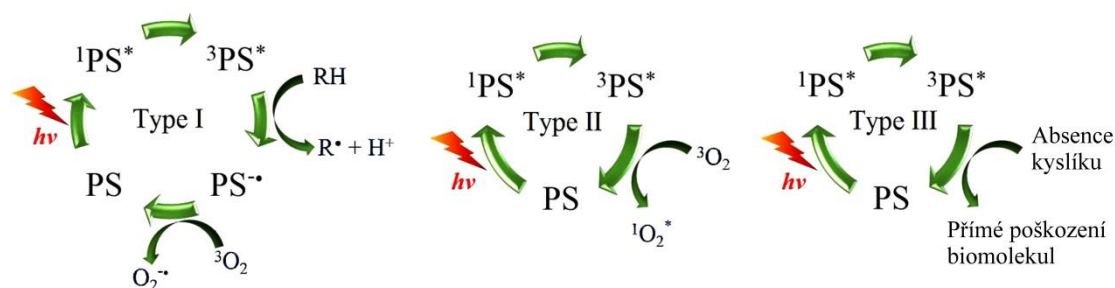
V reakci typu I excitovaný PS reaguje přímo se substrátem, například s buněčnou membránou, a přenáší proton nebo elektron přičemž vytvoří radikálový anion nebo kation. Tyto radikály mohou dále reagovat s kyslíkem a vytvořit reaktivní formy kyslíku. Reakce typu I často zahrnuje produkci superoxidového aniontu vzniklého elektronovým transferem z tripletního PS na molekulární kyslík (monovalentní redukce). Superoxid není příliš reaktivní v biologických systémech a sám o sobě nepůsobuje mnoho oxidativního poškození, ale může reagovat sám se sebou za vzniku

peroxidu vodíku a kyslíku. Superoxid je také důležitý pro tvorbu vysoce reaktivního hydroxylového radikálu ($\text{HO}\cdot$). Během tohoto procesu se superoxid v podstatě chová jako redukující činitel a ne oxidující. Superoxid může dále reagovat s hydroxylovým radikálem ($\text{HO}\cdot$) za vzniku singletního kyslíku, nebo s oxidem dusnatým ($\text{NO}\cdot$) (také radikálem) za vzniku peroxynitritu ($\text{OONO}\cdot$), další vysoce reaktivní oxidující molekuly (Castano, Demidova *et Hamblin*, 2004).

Reakce typu II

Reakce typu II je založena na elektronovém transportu z excitovaného tripletního stavu PS na kyslík, který je v základním stavu tripletní, za vzniku singletního $^1\text{O}_2$ (Agostinis *et al.*, 2011). Singletní kyslík oxiduje plazmatickou membránu, lipidy, zbytky aminokyselin proteinů a další molekuly do vzdálenosti asi 20 nm z důvodu jeho vysoké reaktivity a krátké střední doby života – méně než 40ns (Castano, Demidova *et Hamblin*, 2004).

Kromě reakcí typu I a II může proběhnout přímá interakce mezi tripletním stavem PS a volnými radikály přítomny v okolí, tzv. triplet-doublet proces, což bylo označováno jako modifikovaná reakce typu I. Avšak následující experimenty a kinetický přístup objasnili, že se nejedná o modifikaci reakce typu I, ale o jiný mechanismus, a proto jej lze označit jako reakci typu III (Yoon, Li *et Shim*, 2013). Obr. 2 představuje typy jednotlivých reakcí.



Obr. 2: Typy fotodynamických reakcí. Převzato a upraveno z Deda *et Araki* (2015).

1.4. Fotosensitizéry

Fotosensitizéry patří mezi látky schopné absorbovat světlo specifické vlnové délky a transformovat jej na užitečnou energii. Důležitou charakteristikou PS je jeho schopnost preferenční kumulace v cílové tkáni, kdy po ozáření dochází k produkci cytotoxických agens a indukci požadovaných biologických odezev (Zimčík *et Miletín*, 2004b). PS mohou být lokalizovány v jednotlivých buněčných organelách – mitochondriích, lysozomech, endoplasmatickém retikulu a Golgiho aparátu, a taktéž v plasmatické membráně, a mají určitou selektivitu vůči nádorovým buňkám.

Selektivita léčby je obecně dána způsobem ozáření (Sanabria *et al.*, 2013). Struktura PS hraje důležitou roli a její modifikace může vést k výrazné změně vlastností. Většina fotosensitizerů používaných v léčbě rakoviny je založena na látkách s tetrapyrrolovým kruhem (Agostinis *et al.*, 2011). Hematoporfyrin patří k prvním studovaným PS a směr jeho derivátů patří k prvním klinicky schválenému fotosensitizeru, jenž dostal název Photofrin®. U těchto prvních PS se vyskytovala řada vedlejších účinků. Hlavním problémem byla dlouhotrvající citlivost kůže na světlo, kdy Photofrin® v kůži přetrvává až 6 týdnů (Zimčík *et Miletín*, 2004b). Tyto nevýhody vedly a vedou k dalšímu výzkumu a vývoji PS.

1.4.1. Ideální fotosensitizer

Aby bylo možné porovnat nové fotosensitizery je potřeba nejdříve stanovit určitý standard. Mezi nejdůležitější charakteristiky patří:

- Chemická čistota – PS by měl být chemicky čistý a známého složení.
- Toxicita – PS by měl mít minimální toxicitu ve tmě, aby se předešlo nechtěnému zatížení organismu před ozářením, dále by neměl mít toxické metabolity.
- Farmakokinetika – PS by měl mít vhodné farmakokinetické vlastnosti – absorpce, distribuce, metabolismus a exkrece. Různý retenční čas sensitizeru v maligní tkáni je dán rozdílnou kinetikou odbourávání v nádorové a zdravé tkáni.
- Spektrální vlastnosti – tkáně jsou pro elektromagnetické záření prostupné pouze v omezené míře. Kratší vlnové délky (< 650 nm) pronikají méně a jsou absorbovány, což vede ke zvýšené fotosensitivitě kůže, naopak absorpce při delších vlnových délkách (> 800 nm) nedodává dostatečnou energii pro účinnou produkci singletního kyslíku.
- Kvantový výtěžek $^1\text{O}_2$ – pro PS je žádoucí vysoký kvantový výtěžek tripletního stavu a dlouhá doba života tohoto stavu, což umožní vysokou produkci singletního kyslíku a dalších ROS.
- Selektivita – PS by měl vykazovat zvýšenou kumulaci v nádorové tkáni. Lokalizace PS uvnitř buňky vyvolávající buněčnou smrt apoptózou, např. v mitochondriích, je vhodnější.
- Mutagenita/karcinogenita – PS by neměl prokazovat mutagenní a karcinogenní účinky.
- Cena a dostupnost – PS by neměl být příliš drahý, neboť cena by omezovala jeho široké použití, dále by měl být snadno dostupný komerčně nebo

připravitelný v lokální laboratoři (Allison *et al.*, 2004; Lang, Mosinger *et Wagnerova*, 2004; Zimčík *et Miletín*, 2004b; O'Connor, Gallagher *et Byrne*, 2009).

1.4.2. Klasifikace

Fotosensitizéry lze klasifikovat několika způsoby, vždy s určitým omezením. Velké množství členících schémat neznázorňuje jen rozdíly mezi vědci, lékaři a výrobci, ale také určitý nedostatek relevance (Allison *et Sibata*, 2010). PS lze rozdělit dle:

Generace

První generace zahrnuje deriváty hepatoporfyrinu a Photofrin®. Od 80. let se vyvíjí druhá generace sensitizérů z důvodu odstranění nedostatků první generace jakými jsou např. dlouhotrvající citlivost kůže na světlo a nedostatečná penetrace do tkáně. PS druhé generace jsou chemicky čistější oproti první generaci, absorbují světlo delších vlnových délek a po léčbě se vyskytuje nižší sensitivita kůže vůči světlu. Třetí generaci PS tvoří sensitizéry druhé generace spojené s nosiči, jako jsou protilátky, cholesterol, liposomy, nanomateriály, pro cílenější distribuci v nádorové tkáni (O'Connor, Gallagher *et Byrne*, 2009; Yoon, Li *et Shim*, 2013).

Čistoty

Dělení dle čistoty předjímá fakt, že PS složený z několika komponent je méně kvalitní než jednotlivá látka. Tento systém je relevantní pro chemiky zabývající se syntézou a farmakologické firmy usilující o schválení látky. Klinicky však tento předpoklad neplatí. Zajímavostí je, že běžně užívaný Photofrin®, jakožto směs HpD, by v dnešní době nebyl schválen pro americký trh právě z důvodu čistoty (Allison *et Sibata*, 2010).

Zacílení

PS mohou být rozděleny dle lokalizace uvnitř buňky, např. buněčná membrána, mitochondrie, lysozomy. HpD jsou sloučeniny monomerů, dimerů a velkých oligomerů. Menší složky jsou vychytávány mitochondriemi, zatímco větší komponenty jsou fagocytovány plasmatickou membránou. Deriváty benzoporfyrinu se akumulují v Golgiho aparátu. Aminolevulovou kyselinu lze nalézt v buněčné membráně, lysozomech a mitochondriích (Alison *et Sibata*, 2010).

Chemické struktury

Rozdělení dle chemické struktury je široce přijímaný způsob charakterizace PS mezi chemiky, ale má omezené využití v klinické praxi. Většina fotosensitizérů jsou cyklické tetrapyroly a deriváty porfyrinů, chlorinů a bakteriochlorinů. Purifikací

a syntetickými procesy lze získat nové sensitizéry s vylepšenými fotochemickými vlastnostmi, ale také s toxickými vlastnostmi (Alison *et* Sibata, 2010).

1.4.3. Fotosensitizéry porfyrinové povahy

Hematoporfyrin

Hematoporfyrin (Hp) byl poprvé připraven v roce 1841 Shererem odebráním železa z krve za použití kyseliny sírové. Jeho fluorescenční vlastnosti byly popsány v roce 1867 a termín hematoporfyrin byl zaveden až v roce 1871 Felixem Hoppe-Seylerem. První *in vitro* studie proběhly v roce 1911 Hausmannem ve Vídni na trepkách a červených krvinkách. V roce 1955 Schwartz *et al.* poukázali na to, že do té doby používaný Hp je směs několika porfyrinů, a že po částečné purifikaci má tento čistší Hp nižší afinitu k tumorové tkáni (Hamblin *et* Mróz, 2008).

Photofrin® (porfimer sodium, dihematoporfyrin ether, Photohem®, Photosan®)

Photofrin® je derivát hematoporfyrinu (HpD), respektive směs monomerů, dimerů a oligomerů odvozených z hematoporfyrinu, s absorpčním maximem kolem 630nm. Reakcí Hp s kyselinou octovou a sírovou a následnou filtrací a neutralizací vzniká HpD. Poměr jednotlivých složek se dle výrobního procesu může lišit, ale pro správnou funkci je potřeba všech složek HpD (Nyman *et* Hynninen, 2004). Obecně se Photofrin® podává intravenózně (i.v.) v koncentraci 2 mg/kg s následným ozářením 24 – 48 hodin po podání. Mechanismus účinku spočívá v poškození cévního zásobování s následnou hypoxií, buněčné nekróze tumorové tkáně a vyvoláním zánětu a aktivaci imunitního systému. Využívá se pro léčbu rakoviny plic, močového měchýře, Barretova jícnu, Kaposiho sarkomu, maligních a nemaligních onemocnění kůže a dalších onemocnění (Allison *et al.*, 2004; O'Connor, Gallagher *et* Byrne, 2009). HpD má několik nevýhodných vlastností. Samotný absorpční pás využívaný během terapie – 630 nm, je nejslabší, avšak světlo této vlnové délky proniká nejhluběji do cílové tkáně (Nyman *et* Hynninen, 2004). Vychytávání v nádorech není příliš selektivní a HpD lze najít i v dalších tkáních – játrech, ledvinách, slezině (Kessel, 1984). Photofrin® také způsobuje dlouhodobou fotosensitivitu kůže. Přes všechny tyto nedostatky je Photofrin® považován za „zlatý standart“ PDT (O'Connor, Gallagher *et* Byrne, 2009).

Verteporfin (BpD)

Zakladní skelet verteporfinu je blízký porfyrinům a klinicky využitelný je v kombinaci s liposomy. Jeho absorpční maximum je 690 nm umožňující větší průnik záření do cílové tkáně. Verteporfin je rychle absorbován tkání a ozáření obvykle probíhá 15 – 30 minut po i.v. podání. Jeho účinek je založen na ovlivnění cévního zásobení, tudíž je vhodný pro léze závislé na neovaskularizaci. Využívá se zejména při léčbě senilní makulární degenerace (Allison *et al.*, 2004; Zimčík *et* Miletín, 2004b).

Foscan® (Temoporfin, *m*THPC)

Foscan® (meso-tetra-hydroxyphenyl-chlorine) patří mezi sensitizéry odvozené z chlorinů a je aktivován světlem o vlnové délce 652 nm. Obecně se podává dávka 0,1 – 0,2 mg/kg i.v. a přibližně 4 dny trvá, než se akumuluje v cílové tkáni a vyplaví z ostatních (Allison *et Sibata*, 2010). Oproti Photofrinu® je Foscan® 100× účinnější, má lepší fotofyzikální vlastnosti a vyšší kvantový výtěžek singletního kyslíku. Účinek Temoporfinu leží v přímé toxicitě v nádorových buňkách a v cévním poškození. Využívá se při léčbě rakoviny v oblasti krku a hlavy, gastrointestinálního traktu ad. (Allison *et al.*, 2004; O'Connor, Gallagher *et Byrne*, 2009). Přestože Foscan® patří mezi velmi účinné fotosensitizéry jeho hlavní nevýhodou je dlouhá fotosensitivita kůže v řádu několika týdnů (O'Connor, Gallagher *et Byrne*, 2009).

Tookad®

Tookad® (palladium bacteriopheophorbide) je bakteriofeoforbid vzniklý z bakteriochlorofylu obsahující palladium s absorpčním maximem 763 nm. Při této vlnové délce hloubka penetrace tkáně dosahuje až 4 mm (O'Connor, Gallagher *et Byrne*, 2009). Tookad® se velmi rychle vylučuje, až 95% během 10 minut z krevního řečiště, z okolních tkání se akumuluje v játrech během několika hodin a po 48 hodinách se vyloučí úplně (Koudinova *et al.*, 2003). Jeho výhodou je krátký čas mezi podáním a ozáření PS. Tookad® působí na krevní zásobení, vyvolává zánět, hypoxii a nekrózu. Jeho uplatnění lze nalézt při léčbě rakoviny prostaty či podkožních tumorů. Tookad® překonává PS první generace v několika oblastech a dokonce i některé PS druhé generace. Jeho výhodou je malá nebo žádná fotosensitivita kůže a velká hloubka penetrace tkáně. Tookad® představuje slibný fotosensitizér pro léčbu nepovrchových nádorů jakým je například karcinom prostaty (O'Connor, Gallagher *et Byrne*, 2009).

NPe6 (Talaporfin, MACE)

Talaporfin (mono-L-aspartyl chlorin e6) je hydrofilní chlorinový PS odvozený z chlorofylu *a* s absorpčním maximem 664 nm. Dávka nižší než 1,65 mg/kg nepřináší dostatečnou odpověď PDT (Chan *et al.*, 2005). Z důvodu rychlé kinetiky talaporfinu dochází k ozáření 4 hodiny od i.v. podání (Allison *et al.*, 2004). Na rozdíl od Photofrinu®, který primárně poškozuje mitochondrie, talaporfin působí v lysozomech (Chen *et al.*, 2005). Navíc, vyšší koncentrace NPe6 v krevní plasmě přispívá k efektivnější léčbě. Mechanismus působení nespočívá pouze v přímé cytotoxicitě tumoru, ale také přerušování cévního zásobení (O'Connor, Gallagher *et Byrne*, 2009). V Japonsku byl talaporfin schválen pro léčbu časného stádia rakoviny plic (Zimčík *et Miletín*, 2004b). Dále lze NPe6 použít pro léčbu rakoviny hlavy a krku, plic, jater, prostaty, přičemž byla hlášena pouze malá fotosensitivita (Allison *et Sibata*, 2010; O'Connor, Gallagher *et Byrne*, 2009; Zimčík *et Miletín*, 2004b).

Purlytin (SnET2)

Purlytin je purpurin, degradační produkt chlorofylu, s navázaným centrálním atomem cínu. Má silné absorpční maximum okolo 660 nm. K ozáření dochází 24 hodin po i.v. podání s minimální dávkou 1,2 mg/kg, přičemž se přednostně váže na lipoproteiny. Kožní fotosensitivita oproti HpD není výrazně snížena a přetrvává až 14 dní po podání, avšak penetrace tkáně vůči Photofrinu® je vyšší. Purlytin je možné využít při léčbě kožních metastáz adenokarcinomu prsu, bazálního buněčného karcinomu, Kaposiho sarkomu u pacientů s AIDS (Allison *et* Sibata, 2010; O'Connor, Gallagher *et* Byrne, 2009).

Lutrin (Lu-TEX, motexafin lutecium)

Motexafin lutecium patří mezi texafyriny, což jsou synteticky rozšířené porfyriny s jedinečnými vlastnostmi přesahující oblast fotodynamické terapie. Tento hydrofilní PS má velmi snadné i.v. podání a je také velmi rychle vylučován a po jednom dni nevykazuje známky fotosensitivitu (Allison *et* Sibata, 2010). Lutrin má absorpční pás při 732 nm a je dobře vychytáván maligní tkání a nově vznikajícími cévami. Lutrin prochází klinickými zkouškami léčby rakoviny prsu a prostaty. Někteří pacienti však hlásili bolest při terapii, což lze kompenzovat lokálními anestetiky (O'Connor, Gallagher *et* Byrne, 2009).

Levulan (ALA, 5-aminolevulová kyselina)

5-aminolevulová kyselina je přirozeně se vyskytující látka vznikající konverzí glycinu a sukcinylkoenzymu A a slouží jako prekurzor porfyrinu při biosyntéze hemu. ALA se přeměňuje na fotoaktivní protoporfyrin IX (PpIX), jehož fotodynamické vlastnosti jsou inaktivovány inkorporací atomu železa. Při nadbytku ALA vzniká a hromadí se PpIX, neboť biosyntéza hemu je limitována (Allison *et* Sibata, 2010). PpIX má absorpční maximum při 410 nm s menšími absorpčními píky při 510, 540, 580 a 635 nm, což umožňuje volit různé zdroje světla. Dobrá akumulace PS v cílové tkáni může mít několik příčin: významný rozdíl v množství enzymů účastnících se syntézy hemu, menší koncentrace železa v rakovinných buňkách, či větší cévní propustnost tumoru. K ozáření dochází 1-8 hodin od podání v závislosti na způsobu administrace. V roce 1999 americká FDA (Food and Drug Administration) vydala povolení k použití Levulanu k léčbě aktinické keratózy v obličeji a na temeni (O'Connor, Gallagher *et* Byrne, 2009). Mezi další možné aplikace Levulanu patří léčba akné, fotodetekce a léčba cervikální dysplazie, léčba nemelanotické rakoviny kůže, Barretova jícnu a psoriázy (Zimčík *et* Miletín, 2004b).

Metvix

Metvix je methyl ester kyseliny 5-aminolevulové, který má větší lipofilní charakter než Levulan. Fotofyzikální, fotochemické, farmakologické a fotobiologické vlastnosti

jsou podobné Levulanu. Větší lipofilita mu umožňuje hlubší pronikání do cílové tkáně, např. u bazálního buněčného karcinomu má po 3 hodinách od podání hloubku penetrace 2 mm oproti Levulanu s 1 mm. V Evropě je Metvix schválen pro léčbu aktinické keratózy a bazálního buněčného karcinomu. V porovnání s Levulanem nebyl pozorován signifikantní rozdíl v účinnosti léčby, nicméně byl pozorován rozdíl v intenzitě bolesti, kterou pacienti během léčby pociťovali, ve prospěch Metvixu (O'Connor, Gallagher *et* Byrne, 2009).

Porfyceny

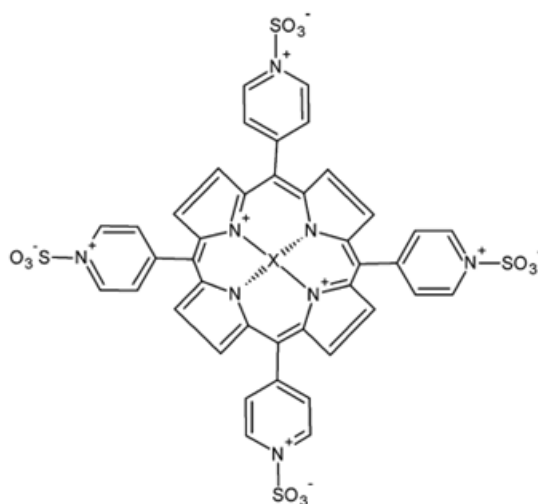
Porfyceny jsou chemicky modifikovatelné isomery porfyriu s absorpčním maximem kolem 600 nm. Jejich velkou výhodou je právě jejich modifikovatelnost. Úpravou postranních řetězců je možné zvýšit vychytávání PS, produkci ROS, upravit kinetiku PS, atd. Funkcionalizované porfyceny mají 17 – 220 krát vyšší fotodynamickou aktivitu než Photofrin®. S porfyceny se nespojuje, případně v omezené míře, fotosensitivita kůže z důvodu rychlého odbourávání z těla, zejména u hydrofilních porfycenů. Z těchto důvodů jsou slibnými PS pro klinické využití (O'Connor, Gallagher *et* Byrne, 2009).

Ftalocyaniny

Ftalocyaniny je skupina fotosensitizerů strukturálně podobná porfyriu. Jejich uplatnění je široké a lze je mimo jiné nalézt v textilním, fotografickém a elektro průmyslu. Výhodné fotofyzikální a fotochemické vlastnosti je řadí mezi potenciální PS. Mohou chelatovat kationty různých kovů, nejčastěji zinek, hliník či křemík. Mají silný absorpční pás okolo 670 nm a vysokou produkci singletního kyslíku (Allison *et* Sibata, 2010). Jednou z jejich výhod je flexibilita struktury a tím změna některých vlastností. Interval mezi aplikací (topikálně) a ozáření může být pouze 1 hodina (O'Connor, Gallagher *et* Byrne, 2009). Ftalocyaniny jsou v různých klinických fázích léčby rakoviny kůže, prsu, plic a gastrointestinálního traktu (Zimčík *et* Miletín, 2004b).

TPPS₄

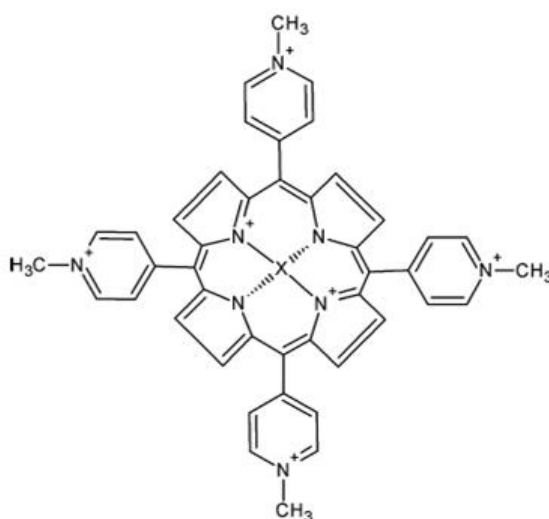
TPPS₄ (*meso*-tetra(4-sulfonatophenyl) porphine) patří mezi syntetické porfyryny. Má přesně definovanou symetrickou strukturu (obr. 3), je výborně rozpustný ve vodě, a je schopen vázat se na albumin (Song *et al.*, 2011). Prvotní práce prokázaly vysokou koncentraci látky v tkáni tumoru u krys s Walkerovým sarkomem, avšak později se objevili práce poukazující na možnou neurotoxicitu (Babjuk *et al.*, 2000, Nyman *et* Hynninen, 2004). Po modifikaci procesu přípravy TPPS₄ Jirsou a Kakáčem byly provedeny toxikologické studie, které prokázaly minimální neurotoxicitu (Babjuk *et al.*, 2000). Chelatace atomu kovu do středu porfyriu zvyšuje kvantový výtěžek a střední dobu života tripletního stavu, a ne jinak je tomu u TPPS₄ (Kubát *et* Mosinger, 1996; Mosinger *et* Mička, 1997).



Obr. 3: *Strukturní vzorec TPPS₄. X představuje 2H⁺ a může být chelátován atomem kovu. Převzato z Kawai et al. (2014).*

TMPyP

TMPyP (meso-tetrakis(4-N-methylpyridyl)porphine) patří mezi porfyrinové PS druhé generace (obr. 4). Má dobrý kvantový výtěžek a je aktivován blízkým infračerveným zářením. Buněčná lokalizace tohoto PS se může v některých případech změnit po ozáření (Snyder, Lambert *et al.*, 2006). TMPyP se elektrostaticky váže na molekulu DNA, jenž po aktivaci světlem indukuje cytotoxické poškození. Z důvodu absorpce relativně nízkoenergetických fotonů také proniká hlouběji do cílové tkáně (Abdelghany *et al.*, 2013).



Obr. 4: *Strukturní vzorec TMPyP. X představuje 2H⁺ a může být chelátován atomem kovu. Převzato z Kawai et al. (2014).*

1.4.4. Fotosensitizéry neporfyrinové povahy

Hypericin

Hypericin patří mezi chinony s absorpčním maximem kolem 590 nm. PDT s hypericinem je silně závislá na přítomnosti kyslíku a neprojevuje se v hypoxických tkáních. Mechanismus účinku leží v přímé toxicitě a poškození cévního zásobení. Hypericin má lipofilní charakter a lze jej lokalizovat v buněčných membránách. Dále dobře lokalizuje nádor a má minimální toxicitu ve tmě, avšak může vyvolávat bolest během léčby. Klinické zkoušky nejsou prozatím příliš úspěšné a je potřeba optimalizovat léčebný protokol (O'Connor, Gallagher *et* Byrne, 2009).

Chalcogenopyryliová barviva

Chalcogenopyryliová barviva jsou potenciální PS z důvodu modifikovatelnosti fotofyzikálních a fotochemických vlastností. Obsahují těžké kovy, jako je selen nebo tellur, jež zvyšují jejich kvantový výtěžek. Navíc jsou dobře vychytávány nádorovými buňkami (O'Connor, Gallagher *et* Byrne, 2009).

Fenothiaziniová barviva

Fenothiaziniová barviva jsou poměrně dlouhou dobu známá skupina barviv, mezi něž patří např. methylenová modř, toluidinová modř či nilská modř. Jejich absorpční maxima leží nad 600 nm a působí přímou cytotoxicitou. Methylenová modř je využívána v několika oblastech medicíny. Má absorpční maximum při 666 nm a způsobuje poškození nukleových kyselin obdobným způsobem jako nukleázy. Přímým podáním do nádoru a následným ozářením způsobí až 75% destrukci tumoru jedinou aplikací. Methylenová modř byla také využita u léčby neoperovatelné rakoviny jícnu. Nicméně po i.v. podání není příliš selektivní, zejména z důvodu značného hydrofobního charakteru. Navíc jednořetězcová poškození DNA jsou do 4 hodin opravena, což může vysvětlovat její nízkou fototoxicitu. Nicméně je methylenová modř stále zkoumána jako možný PS, ať už samostatně nebo zapouzdřená v nanočásticích (O'Connor, Gallagher *et* Byrne, 2009).

Kyaniny

Kyaniny je různorodá třída barviv s širokým uplatněním, například v textilním nebo fotografickém průmyslu. Obecně mají absorpci v červené oblasti spektra v závislosti na délce methinového řetězce, což také ovlivňuje jejich stabilitu a rozpustitelnost. Většina kyaninových látek jsou kationtové sloučeniny, které se akumulují v mitochondriích rakovinových buněk. Užití najdou při léčbě leukémie, avšak srovnávací studie s komerčně dostupnými látkami (Foscan) jsou v neprospěch kyaninových barviv (O'Connor, Gallagher *et* Byrne, 2009).

1.5. Zdroje záření

Pro proběhnutí fotodynamické reakce je kromě PS nutná přítomnost světla vhodné vlnové délky. Značné množství studovaných fotosensitizerů, mezi něž patří deriváty porfyrinu, ftalocyaniny či chloriny, obsahují tetrapyrolový kruh. Tyto látky jsou charakterizované velkou mírou absorpce v okolí 400 nm, v tzv. Soretově pásu, a v menší míře absorpcí nad 500 nm v tzv. Q pásech (Ethirajan *et al.*, 2008). Q pásy nad 600 nm jsou často využívány v PDT, neboť světlo této vlnové délky má stále dostatek energie pro průběh fotochemické reakce typu I a II, přičemž je schopno hlouběji proniknout do tkáně (Brancaleon *et Moseley*, 2002). Modré světlo, oproti červenému a infračervenému záření, proniká do tkáně nejméně. Průměrná hloubka penetrace záření při 630 nm je okolo 1 – 3 mm, přičemž u záření se 700 – 850 nm je hloubka penetrace přibližně dvojnásobná (Castano, Demidova *et Hamblin*, 2004). Oblast 600 – 1200 nm je často nazývána optickým oknem tkáně. Avšak záření přibližně od 800 nm neposkytuje dostatek energie k průběhu fotodynamické reakce a k tvorbě singletního kyslíku (Agostinis *et al.*, 2011).

Kromě volby vlnové délky záření shodné s absorpčním maximem fotosensitizeru je potřeba brát v potaz také jeho časovou a prostorovou distribuci. Existuje několik možností jak ozářit cílovou tkáň:

Povrchové ozáření

Povrchové ozáření probíhá u tenkých a lehce dostupných nádorů na povrchu kůže či sliznice ústní dutiny. Tloušťka tumorů odpovídá hloubce penetrace použitého záření. Kromě ozáření postižené tkáně je ozářeno i blízké okolí, tzv. bezpečnostní lem v šířce 0,5 – 1 cm, který je obvyklý i u běžných zákroků (Kübler, 2005).

Intersticiální ozáření

K intersticiálnímu ozáření dochází v případě větších nádorů. Do cílové tkáně je implantován světelný difuzér připojený k optickému vláknu. K přesnému umístění se využívá různých zobrazovacích technik, jakými jsou počítačová tomografie, magnetická rezonance nebo ultrazvuk. U velkých nádorů může být použito několik difuzérů umístěných blízko sebe (1 – 2 cm od sebe), aby došlo k ozáření nádoru v celém objemu (Kübler, 2005).

Souběžné ozáření s chirurgickým zákrokem

PDT může být využito souběžně s chirurgickým zákrokem. PS je podán v dostatečném časovém předstihu před operací, aby se stihl akumulovat v cílové oblasti. Po chirurgické resekci nádorů je postižené místo ozářeno světlem vhodné vlnové délky. Tento proces cílí na zbývající nádorové buňky a nádorové lůžko (Kübler, 2005).

Volba zdroje záření záleží na několika faktorech: použitím fotosensitizeru (absorpčním spektru), onemocnění (velikosti a umístění léze, přístupností, optických vlastnostech okolní tkáně), rozsahu a ceně. Klinická účinnost PDT také záleží na celkové dozimetrii: celkové dávce záření, expozičním času a ozařovacím schématu (Agostinis *et al.*, 2011).

1.5.1. Lasery

Lasery patří mezi zdroje produkující vysokoenergetické monochromatické záření. Úzké vlnové rozpětí laseru ($< 1\text{nm}$) umožňuje jeho upotřebení jen na specifický fotosensitizer, jehož absorpční pás se kryje s danou emisní linií. Laditelné lasery lze naopak použít pro více PS. Díky propojení s optickým vláknem a dalšími optickými členy, např. mikro čočky, difuzéry, lze doručit záření do konkrétního místa (Weersink *et Lilge*, 2008; Pervaiz *et Olivo*, 2006).

Argonové lasery a barvivové lasery čerpající argon

Tyto lasery se řadí ke standartním zdrojům při klinické aplikaci PDT (Mang, 2004). Laserová barviva, např. rhodamine B, mají překryv absorpčního pásu alespoň s jednou emisní linií argonu (488 a 514 nm) a emisí v oblasti 600 – 650 nm, což je shodné s oblastí absorpce porfyrinů. Intenzita ozáření těchto kontinuálních laserů může dosahovat až 1 W/cm^2 . Argonové lasery jsou především určeny pro endoskopickou PDT z důvodu malého průřezu výstupního paprsku a snadného propojení s optickými vlákny (Brancaleon *et Moseley*, 2002).

Barvivové lasery čerpající páry kovů

Další široce využívanou skupinou laserů jsou barvivové lasery čerpající páry kovů. Na rozdíl od argonových laserů jsou tyto lasery pulsní. Jsou charakterizovány vysokou pulsní frekvencí (1 kHz), délkou pulsu 10 – 50 ns, a intenzita ozáření může dosahovat až několik stovek mW/cm^2 (Brancaleon *et Moseley*, 2002). Mezi zajímavé lasery lze řadit lasery s párami zlata a mědi. Lasery s párami zlata vykazují emisí s 627,8 nm, a tudíž nepotřebují propojení s barvivovým laserem, který by zajišťoval posun vlnové délky záření do oblasti absorpce PS. Jejich nevýhodou jsou poměrně vysoké provozní náklady. Lasery s párami mědi jsou levnější, avšak emisní linie jsou 511 a 578 nm, tudíž je nutné propojení s barvivovým laserem (Mang, 2004).

Pevnolátkové lasery

Dalším pokrokem v oblasti zdrojů pro PDT bylo zavedení pevnolátkových laserů. Oproti předchozím typům laserů nabízí kompaktnější design, což je výhodou v laboratorní a klinické praxi, navíc dosahují vyšších pulsních frekvencí (MHz) a kratších délek pulsů. Tyto lasery obvykle emitují v infračervené oblasti, např.

Nd:YAG laser při 1064 nm. Vyzářená energie u základních linií může dosáhnout až 7 J na puls (Brancaleon *et* Moseley, 2002).

Diodové lasery

Vývoj diodových laserů přináší možný průlom v oblasti zdrojů pro PDT. Tyto polovodičové lasery mají kompaktní rozměry, přičemž si zachovávají dostatečný výkon. Spektrální šířka záření je obvykle 6 nm. Dalším pozitivem je možnost pracovat v kontinuálním i pulsním režimu. Kompaktnost, snadná přenositelnost, možnost nastavení výkonu a časového průběhu paprsku, a uživatelská přívětivost jsou vlastnosti, které se uplatní nejen v laboratoři, ale i v klinické praxi (Brancaleon *et* Moseley, 2002, Lim, 2011).

1.5.2. Lampy

Lampy patří mezi zdroje širokospektrálního nekoherentního světla. Často jsou použity s různými typy filtrů, např. UV filtr, IR filtr. Tyto zdroje jsou historicky starší, uživatelsky přívětivé a relativně levné. Jejich nevýhodou je zahřívání, nízká hustota zářivé energie a špatná kontrola dávky záření (Pervaiz *et* Olivo, 2006). Dále nemohou být použity v kombinaci s optickými vlákny, právě kvůli špatné kvalitě světelného paprsku, velikosti paprsku a nízké hustotě zářivé energie. Avšak jsou schopné ozářit větší plochu, tudíž jsou vhodné k léčbě velkých povrchových lézí (Brancaleon *et* Moseley, 2002).

Halogenové lampy

Halogenové lampy patří mezi zdroje s žhavicím wolframovým vláknem, které dosahuje teploty až 3000 K. Při této teplotě dochází k emisi širokého spektra záření, od UV po IR. Tyto lampy mohou poskytnout intenzitu ozáření až 250 mW/cm² v širším spektru 350 – 850 nm. K dosažení určité vlnové délky je potřeba použít vhodnou kombinaci filtrů (Brancaleon *et* Moseley, 2002).

Xenonové obloukové lampy

Zdrojem záření je xenonová výbojka. Světlo je vyzařováno elektrickým obloukem hořícím mezi dvěma elektrodami v přítomnosti vysokého tlaku xenonových par. Xenonové lampy jsou charakterizovány širokým spektrálním rozsahem (300 – 1200 nm) a vysokým výkonem. Pro selekci vlnové délky je opět nutné použít vhodnou kombinaci filtrů (Brancaleon *et* Moseley, 2002).

Lampy kovových halogenidů

U tohoto typu lamp se využívá jako zdroj elektrický oblouk, avšak oproti xenonovým lampám, za přítomnosti pár rtuti a kovových halogenidů. Opět poskytují

široké spektrum záření doplněné o emisní linie použitých par. Intenzita ozáření se pohybuje od 10 do 250 mW/cm² a ozařovaná plocha může být dosti značná (Brancaleon *et Moseley*, 2002).

Sodíkové lampy s fosforovým povrchem

Sodíkové lampy pracují na podobném principu jako lampy kovových halogenidů, kde je elektrický oblouk generován v přítomnosti sodíkových par. Povrch výbojky je pokryt fosforem, který absorbuje sodíkové linie a emituje záření v různých oblastech. Spektrum záření se pohybuje v oblasti 590 – 670 nm a intenzita ozáření se pohybuje v rozmezí 25 – 100 mW/cm² (Brancaleon *et Moseley*, 2002).

Světlo emitující diody (LED)

Světlo emitující diody patří k dalším zdrojům nekoherentního světla. Na rozdíl od lamp LED diody produkují záření s úzkým rozpětím vlnových délek (5 – 10 nm). Vlnová délka LED diod se pohybuje od UV záření po blízké IR (350 – 1100 nm). Intenzita ozáření může dosahovat až 150 mW/cm², což může být limitující faktor pro jejich rozšíření (Brancaleon *et Moseley*, 2002). Velkou výhodou LED diod je jejich cena, všestrannost, kompaktnost, modifikovatelnost a přenositelnost. Diody lze sestavit do různých ozařovacích schémat, od uzpůsobení balonkovému katetru po velkoplošná uspořádání (Pervaiz *et Olivo*, 2006).

1.6. Efekt PDT

1.6.1. Lokalizace fotosenzitizéru

Výsledek PDT je nejvíce ovlivněn interakcí fotosenzitizéru a buňky cílové tkáně, nebo nádoru. Existence singletního kyslíku je velmi krátká, přibližně 10 – 320 ns, což omezuje jeho akční rádius asi na 10 – 55 nm uvnitř buňky (Agostinis *et al.*, 2011). Proto je velmi důležité znát lokalizaci fotosenzitizéru, neboť PS se může nacházet v jednotlivých buněčných organelách – mitochondriích, lysozomech, endoplasmatickém retikulu, atd. Tato znalost je důležitá pro výběr nejefektivnějšího PS pro konkrétní aplikaci (Castano, Demidova *et Hamblin*, 2004).

Buněčná lokalizace byla určena pro mnoho senzitivizérů s různou strukturou. Důležitými charakteristikami jsou celkový náboj, který může nabývat od -4 do +4, míra hydrofobicity a míra asymetrie molekuly PS. Fotosenzitizéry, které jsou hydrofobní a mají záporný náboj (-2 a nižší), difundují skrz plasmatickou membránu a umísťují se do jednotlivých membrán uvnitř buňky. Fotosenzitizéry, které jsou méně hydrofobní a mají vyšší náboj než -2, jsou příliš polární, aby difundovaly skrz plasmatickou membránu, a proto vstupují dovnitř buňky endocytózou (Robertson, Evans *et Abrahamse*, 2009).

Obecně, látky, které ovlivňují mitochondriální funkce, poškozují rakovinové buňky efektivněji, než ty, které mitochondrie neovlivňují. Fotodynamické poškození mitochondrií spočívá v interakci s reaktivními formami kyslíku, ztrátě mitochondriálního membránového potenciálu a uvolnění proapoptických faktorů (Oleinick, Nieminen *et* Chiu, 2008). Existuje mnoho sensitizérů, které se akumulují ve více membránových systémech, např. pyrofeoforbide (Castano, Demidova *et* Hamblin, 2004). Kromě mitochondriálních membrán mají PS tendenci se akumulovat také v membránách endoplasmatického retikula (ER). Oxidace proteinů ER může způsobit dvě značné změny funkce ER: změna homeostáze vápenatých kationtů (Ca^{2+}) a agregaci nesložených a chybně složených proteinů (Oleinick, Nieminen *et* Chiu, 2008). Lysozomy patří k dalším organelám akumulující PS, avšak relativní letální účinek je signifikantně nižší než při akumulaci v jiných organelách (Castano, Demidova *et* Hamblin, 2004).

1.6.2. Změny signálních drah

V počátečním období výzkumu fotodynamické terapie byl hlavní cíl usmrtit nežádoucí buňky, nehledě o jaký typ buněčné smrti se jednalo. Po prvních zprávách o indukované apoptóze fotodynamickou terapií se začala řešit otázka odezvy na PDT – buněčné opravy a přežití buňky, apoptóza, nekróza (Plaetzer *et al.*, 2003). Na rozdíl od terapií využívající ionizující záření a chemoterapie, kde dochází spíše k poškození DNA a buněčná smrt je indukována v rámci kontrolních uzlů buněčného cyklu, buněčná smrt u PDT je spíše způsobena odpovědí na akutní stres, např. poškození mitochondrií (Castano, Demidova *et* Hamblin, 2005a). Odpovědí často bývá indukce apoptózy ať už mitochondriální cestou, kdy dochází k uvolnění kaspáz a cytochromu c, tak dráhami zahrnující ceramidy nebo receptory buněčné smrti (Robertson, Evans *et* Abrahamse, 2009). Nicméně, za určitých podmínek dochází také k nekróze. Pochopení vlivu PDT na signální dráhy tak může vést k optimalizaci PDT jako možného léčebného postupu.

Fotodynamická terapie způsobuje v rakovinových buňkách nárůst koncentrace Ca^{2+} iontů, které jsou spojovány s buněčnou smrtí, a za určitých podmínek i s jejich přežitím. Vápenaté ionty jsou důležitým článkem v mnoha signálních drahách a hrají tak důležitou roli v tom, jak velký efekt má PDT na buněčné funkce (Robertson, Evans *et* Abrahamse, 2009). Aktivuje například fosfolipázy, které mohou následně vést k apoptóze (Castano, Demidova *et* Hamblin, 2005a). PDT dále ovlivňuje tirosinkinázy, např. receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR), který ovlivňuje iniciaci a progresi mnoha typů rakoviny. PDT způsobuje ztrátu EGFR a indukuje tak anti proliferaci odpověď (Robertson, Evans *et* Abrahamse, 2009). Transkripční faktory jsou další velkou rodinou, na kterou má PDT dopad. Slouží hlavně jako spouštěči a regulátoři transkripce DNA, a mají vliv na indukci a také prevenci apoptózy (Castano, Demidova *et* Hamblin, 2005a).

1.6.3. Adheze a cytoskelet

Živočišné buňky jsou uchyceny k extracelulární matrix a k sobě navzájem pomocí specifických membránových receptorů. Ty lze rozdělit do čtyř skupin: integriny, nadrodina imunoglobulinu G, selectiny a cadheriny. Integriny jsou trans membránové proteiny, které zajišťují interakci s extracelulární matrix a s ostatními buňkami. Selectiny zprostředkovávají interakci mezi leukocyty a endoteliálními buňkami nebo krevními destičkami. Proteiny z nadrodiny imunoglobulinu zajišťují specifickou adhezi mezi buňkami stejného typu. Cadheriny jsou primárně zodpovědné za pevné propojení buněk v tkáních (Castano, Demidova *et Hamblin*, 2005a). Změna v uchycení buněk k substrátu a k sobě navzájem je významný důsledek PDT. Tyto změny jsou způsobeny poškozením adhezních molekul lokalizovaných na buněčných membránách. Navíc pokles v buněčné adhezi může přímo souviset s poklesem metastatického potenciálu nádorových buněk (Robertson, Evans *et Abrahamse*, 2009).

Cytoskelet tvoří komplexní síť biomolekul, jež primárně určuje tvar buňky a mechanickou odolnost. Skládá se ze tří hlavních biopolymerních molekul – aktinových mikrofilament, intermediálních filament a mikrotubulů. Kromě podpory struktury buňky se cytoskelet účastní mnoha dalších funkcí spojených s pohybem, adhezí, růstem, proliferací a odpovědí na vnější podněty. Aktinová mikrofilamenta jsou složena do dvou vlákně helikální struktury s průměrem 5 – 9 nm. Určují tvar buňky a jsou nezbytné pro její pohyb. Intermediální filamenta jsou tvořena velkou skupinou proteinů a tvoří vlákna s průměrem kolem 10 nm. Poskytují mechanickou odolnost zejména vůči smykové deformaci. Mikrotubuly jsou duté cylindrické struktury s vnějším průměrem asi 25 nm a zajišťují intramolekulární transport (Alberts *et al.*, 2002). PDT vyvolává komplexní odpověď buňky, mezi níž patří i rozsáhlá reorganizace a redistribuce cytoskeletálních proteinů (Ruiz-González *et al.*, 2013).

1.6.4. Buněčná smrt

Jak bylo zmíněno výše, PDT je schopná iniciovat buněčnou smrt několika různými způsoby. Existují dva základní typy buněčné smrti – apoptóza a nekróza. V případě PDT dochází k jejich kombinaci. Nicméně s rozvojem metod rozlišující apoptózu a nekrózu se ukázalo, že některé biochemické a morfologické znaky obou buněčných smrtí se vyskytují zároveň. To naznačuje, že zde existuje spektrum programů vedoucích k buněčné smrti a „klasické“ pojetí apoptózy a nekrózy jsou extrémny tohoto spektra (Proskuryakov, Konoplyannikov *et Gabai*, 2003).

Apoptóza

Apoptóza, také aktivní buněčná smrt, představuje regulovanou buněčnou sebevraždu, kontrolovanou vnitřními a vnějšími faktory vedoucí k sekvenci typických

morfologických, energetických a biochemických změn (Plaetzer *et al.*, 2003). Apoptóza je považována za programovanou buněčnou smrt (PCD). Koncept PCD tvrdí, že buněčná smrt z popudu patofyziologického stimulu je konkrétní příklad evolučního konzervačního mechanismu buněčné eliminace (Proskuryakov, Konoplyannikov *et Gabai*, 2003). Apoptóza vede k systematické a kontrolované destrukci buňky a rozpadu do membránově uzavřených, sférických tělísek, které jsou následně pohlceny fagocytujícími buňkami. To zabraňuje nekontrolovanému úniku intracelulárního materiálu do okolí a předchází poškození okolních buněk a zanícení tkáně (Plaetzer *et al.*, 2003). Apoptóza je charakterizována ztrátou objemu, puchýřováním plasmatické membrány, kondenzací chromatinu, rozpadem jádra atd. až k rozpadu do apoptických tělísek (Castano, Demidova *et Hamblin*, 2005a).

Apoptóza je značně prostudovaný typ buněčné smrti, jenž má klíčový význam pro celkový vývoj, udržení homeostázy a pro patogenezi řady nemocí. Apoptóza je žádaným mechanismem u různých terapií léčby rakoviny včetně PDT. Apoptóza může být aktivována vnější signální dráhou, která zahrnuje zapojení signálního receptoru, a vnitřní signální dráhou, kde hlavní roli hrají mitochondrie. Obě dráhy zahrnují aktivaci kaspáz; specifické proteázy, které jsou vykonavatelé apoptózy (Ortel, Shea *et Calzavara-Pinton*, 2009).

Nekróza

Nekróza je ireverzibilní buněčné poškození, také označována jako pasivní buněčná smrt. Může být zapříčiněna extrémními vnějšími fyzikálními podmínkami, např. teplota, tlak, osmolarita, pH, nebo být vyústěním závažného buněčného poškození způsobeného různými chemickými procesy, např. metabolickými inhibitory, letálními dávkami ionizujícího záření nebo různými toxickými látkami (Plaetzer *et al.*, 2003). Je potřeba rozlišovat mezi nekrózou tkáně a nekrotickou buněčnou smrtí vyplývající z molekulárních drah (Ortel, Shea *et Calzavara-Pinton*, 2009). Na buněčné úrovni je charakterizována nabytím cytoplasmy, destrukcí organel a porušením plasmatické membrány, což má za následek rozlití buněčného obsahu do okolí a jeho zanícení (Castano, Demidova *et Hamblin*, 2005a). Nicméně závěr, že nekróza je pasivní a nekontrolovatelný proces, ignoruje mnoho jevů, kde nekrotická buněčná smrt je regulovaným procesem, který je aktivován specifickými fyziologickými a patologickými podmínkami (Proskuryakov, Konoplyannikov *et Gabai*, 2003).

1.6.5. Mechanismus destrukce tumoru

Tři specifické mechanismy byly pozorovány při redukci a destrukci tumoru pomocí PDT. První mechanismus je přímý cytotoxický efekt volných radikálů a produktů oxidace na nádorové buňky. Druhý je poškození cévního systému nádoru. A třetí

mechanismus je aktivace imunitního systému vůči nádorovým buňkám (Kudinova *et* Berezov, 2010).

Přímý vliv na buňku

Rozsah poškození a cytotoxicita je závislá na použitém typu sensitizéru, jeho lokalizaci uvnitř a vně buňky, jeho koncentraci, celkové dávce záření, přístupnosti kyslíku a době mezi podáním PS a ozářením. Střední doba života singletního kyslíku je velmi krátká, což omezuje jeho působení uvnitř buňky (Agostinis *et al.*, 2011). Lipofilní sensitizéry a sensitizéry s celkovým záporným nábojem způsobují poškození všech membrán – plazmatické, mitochondriální, lysozomální včetně membrány jádra a endoplasmatického retikula. Fotoperoxidace cholesterolu a nenasycených fosfolipidů vede ke změnám propustnosti membrány, ztrátě fluidity, zesílení aminolipidů a polypeptidů, a inaktivaci membránových enzymů a receptorů. Hydrofilní sensitizéry se preferenčně akumulují v lysozomech. Porušením lysozomů dojde k uvolnění hydrolytických enzymů do cytoplasmy, což je hlavní příčinou buněčné smrti (Kudinova *et* Berezov, 2010). Akumulace PS napříč nádorem je nehomogenní a se zvyšující se vzdáleností od cévního zásobení jeho koncentrace klesá, stejně tak i usmrcení nádorových buněk (Castano, Demidova *et* Hamblin, 2005b).

Vliv na cévní systém

První dodatečný efekt, který se objevuje během fotodynamické terapie, k přímému cytotoxickému působení na samotnou buňku je poškození cévního systému. Dochází k němu po ukončení ošetření a přispívá ke kontrole tumoru v delším časovém měřítku. Po ošetření PDT je možné pozorovat kolaps mikrocév, jenž vedou k vážné a trvalé hypoxii nádoru. Mechanismus ovlivnění cév během PDT se liší při použití různých fotosensitizérů (Castano, Demidova *et* Hamblin, 2005b). Časový interval mezi počátkem poškození a uzavřením cévy se může lišit u jednotlivých nádorů a různých sensitizérů. Např. v experimentálních systémech za použití Photofrinu 2 byly už několik sekund po aplikaci PDT pozorovány shluky krevních destiček, následovány přechodnou vazokonstrikcí, vazodilatací, případně celkovou zástavou krevního toku a krvácením (Kudinova *et* Berezov, 2010).

Velmi důležitým faktorem je čas mezi podáním látky a jejím ozářením. Cévní okluze může být vyvolána po ozáření tkáně nedlouho po podání sensitizéru. Rychlost, s jakou se i.v. podaný PS váže na stěny cévy a vyplavuje z proudící krve, je závislá na chemické struktuře sensitizéru (Castano, Demidova *et* Hamblin, 2005b). Hlavní faktor ovlivňující fotosensitivitu cév se jeví v množství cirkulujícího PS. Následky cévního poškození pro mikroprostředí nádoru jsou závažné. Snižuje se rychlost proudění krve a dochází k hypoxii v nádorových buňkách. Oba následky se prohlubují se vzrůstajícím časem od ozáření (Kudinova *et* Berezov, 2010). Hypoxie však může mít i opačný efekt, může podporovat tvorbu nových cév – angiogenezi, což vede k růstu a návratu nádoru.

Tento nežádoucí jev je potřeba potlačovat, např. pomocí inhibitorů angiogeneze (Weiss *et al.*, 2012).

Vliv na imunitní systém

Kromě přímého cytotoxického působení a ovlivnění cévního zásobení PDT stimuluje imunitní odpověď vůči nádoru. Vlivem PDT dochází k uvolnění mediátorů zánětlivé a imunitní reakce, což vede k infiltraci lymfocytů, leukocytů a makrofágů do ošetřované tkáně fotodynamickou terapií. V současnosti jsou předkládány 2 způsoby, jak PDT ovlivňuje imunitní odpověď vůči nádoru: okamžitá indukce zánětlivého procesu a tvorba dlouhodobé odpovědi imunitního systému vůči nádoru (Castano, Demidova *et Hamblin*, 2005b). Imunitní reakce je zprostředkována mnoha různými faktory, např. látky ovlivňující průsvit cév, proteinázy, peroxidázy, leukocytní chemoatraktanty, cytokiny, růstové faktory a další modulátory (Kudinova *et Berezov*, 2010). Díky zánětlivým procesům a jejich signálním drahám dochází k vytvoření specifických peptidů, což vede k vytvoření podmínek pro rozpoznání antigenů nádoru a aktivaci T lymfocytů se specifickými epitopy. Aktivita těchto T lymfocytů není limitována pouze na místo ošetření PDT a působí i v místech metastáz. Přestože je PDT lokální metoda ošetření, má vliv na celý systém právě díky vyvolání komplexní imunitní reakce (Castano, Demidova *et Hamblin*, 2005b).

2. Mikroskopické metody

2.1. Historie

Vývoj mikroskopických technik prošel velmi dlouhou cestou a byl podmíněn stavem vědy a techniky v daném časovém období. Již ve starověkém Řecku znali optické vlastnosti čoček, a také rozpoznali možnost zapálení ohně soustředěním slunečních paprsků spojnou čočkou. První mikroskop vzniká kolem roku 1600 a jeho vznik je připisován Hansi a Zachariášovi Janssenovým. Avšak až Antoni van Leeuwenhoek je považován za zakladatele mikroskopie jako exaktní vědy. Významně k rozvoji mikroskopie přispěl také britský fyzik a astronom Robert Hooke. První mikroskopy byly zatíženy různými vadami, zejména chromatickou, kdy se bílé světlo láme na jednotlivé barvy, které mají různě vzdálené ohnisko a tvoří tak barevné okraje kolem zvětšeného objektu, a sférickou, způsobenou zakřivením čočky, kdy paprsky procházející středem čočky a okraji nejsou stejně lámány a poskytují tak zkreslený obraz (Bardel, 2004). V 20. století dochází k značnému vývoji mikroskopických technik. Dochází k vypracování metody fluorescenční mikroskopie, přichází objev fázového kontrastu. Tam, kde nestačí rozlišovací schopnost světelné mikroskopie (rozliší 200 nm), přichází na řadu elektronová mikroskopie a mikroskopie atomárních sil s rozlišením až 0,1 nm (Kolářová, 2005).

2.2. Světelná mikroskopie

Mikroskopy jsou speciální optická zařízení, která jsou uzpůsobena pro zobrazení a záznam drobných struktur, která nejsou viditelná pouhým okem. Mikroskopické zařízení musí splnit 3 základní úkony: poskytnout zvětšený obraz vzorku, rozlišit detaily v obraze a poskytnout je lidskému oku nebo snímacímu zařízení. V této skupině nástrojů lze nalézt kromě vícečočkových systémů s objektivy a kondenzory také jednočočkové ruční nástroje, např. lupy (Olympus America Inc., © 2012). Mikroskopické metody s vysokým rozlišením spadají do dvou velkých kategorií: metody pracující v blízkém poli a metody pracující ve vzdáleném poli. Metody v blízkém poli spoléhají na skenování sondou několik nanometrů nad studovaným povrchem. Prostorové rozlišení je dáno fyzikálními rozměry sondy a informace je získána pouze z povrchu. Metody ve vzdáleném poli se potýkají s difrakcí jako určujícím faktorem pro prostorové rozlišení. Jinak řečeno, rozlišení je dáno vlnovou délkou použitého záření (Lu 2005).

2.2.1. Princip světelného mikroskopu

Tvorbu obrazu je třeba chápat nejen na podkladě geometrické optiky, ale také 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 (Kolářová, 2005). Světlo zdroje prochází vzorkem, který působí jako nepravidelná plošná mřížka, a dochází k lomu a difrakci. Následně dochází k interferenci světla prošlého vzorkem a mimo vzorek, a vzniku interferenčních maxim a minim, které jsou nakonec promítnuty na sítnici. Jelikož lidské oko je citlivé na změnu intenzity jasu, dochází tak k více či méně přesné rekonstrukci obrazu vzorku (Zeiss, 2016). Ideální mikroskop zachytí každý foton vycházející ze vzorku a zaznamená polohu s nekonečnou přesností, odkud vyšel, a všechny jeho vlastnosti (energii, polarizaci, fázi). Díky tomu může být vytvořen přesný obraz vzorku. Naneštěstí mohou být tyto vlastnosti zaznamenány pouze s konečnou přesností z důvodu limitů vycházejících z konstrukce mikroskopu a základních fyzikálních vlastností (Lu, 2005).

2.2.2. Rozlišovací schopnost a mez mikroskopu

Rozlišovací schopností mikroskopu je chápána minimální vzdálenost dvou bodů objektu, které se ještě zobrazí jako navzájem oddělené. Žádný objektiv nemůže zobrazit bodový objekt opět jako bod. I při dokonalé korekci všech možných vad zobrazení, které souvisí s technologií výroby objektivů, jsou obrazem bodu Airyho kroužky. Tak se nazývá difrakční obrazec vznikající ohybem zobrazujícího se světla na čočkách objektivu. Při zobrazení dvou blízkých bodů se mohou jejich Airyho kroužky překrývat, až se při jisté minimální vzdálenosti stanou téměř nerozlišitelnými. Tato mez se běžně odhaduje dle Rayleighova kritéria, které vychází ze skutečnosti, že lidský zrak zaznamená pozvolný předěl mezi dvěma difrakčními kroužky teprve tehdy, poklesne-li intenzita mezi nimi alespoň o 20 % oproti přilehlým maximům (Plášek, 1995). Formálně rozlišovací mez představil Ernst Abbé pro laterální a axiální rovinu následovně:

$$d_{xy} = \frac{\lambda}{2 NA},$$

$$d_z = \frac{2 \lambda}{NA^2},$$

kde λ je vlnová délka světla, NA je numerická apertura. Objektivy používané v mikroskopii mají numerickou aperturu obvykle menší než 1,5. Proto teoretická rozlišovací mez modrého světla (400 nm) je okolo 150 nm v laterální rovině a 400 nm axiálně při použití objektivu s NA 1,4. V praxi při použití zeleného fluorescenčního proteinu v živých buňkách lze dosáhnout rozlišovací meze přibližně 200 a 500 nm, a tedy struktury, které jsou blíže, než 200 nm nemohou být rozlišeny klasickou fluorescenční ani konfokální mikroskopii (Zeiss, 2016).

2.2.3. Metody světelné mikroskopie

Techniky světelné mikroskopie lze v zásadě rozdělit na dvě velké skupiny dle způsobu osvětlení zkoumaného vzorku: mikroskopie v procházejícím světle a mikroskopie v odraženém světle. Mikroskopie v procházejícím světle je vhodná pro preparáty propouštějí záření zcela nebo alespoň částečně, přičemž ovlivňují jeho vlastnosti (intenzitu, polarizaci, fázi). Mikroskopie v odraženém světle je vhodná pro opaleskující preparáty. Většinu dále zmiňovaných metod lze aplikovat na oba typy mikroskopie, avšak v této práci se budu soustředit na mikroskopii v procházejícím světle.

Metoda světlého pole

Pozorování ve světlém poli je základní mikroskopickou technikou. Světlo z osvětlovací soustavy prochází preparátem a vstupuje do objektivu. Objekty jsou viditelné díky tomu, že jsou schopny absorpci zeslabovat intenzitu záření. Tato metoda je proto vhodná pro objekty nepropustné, nebo alespoň barevné. Příkladem barevných objektů jsou třeba chloroplasty nebo chitinový exoskelet hmyzu. Většina biologických preparátů v procházejícím světle poskytuje omezené množství informací, např. obrysy a pozice jádra a velkých vezikul, proto je potřeba zlepšit viditelnost například barvením. Cytochemické a histochemické postupy umožňují specificky barvit nejrůznější biologické tkáně. Barvením se vedle základní informace o fyzické morfologii strukturních detailů zkoumaných objektů získává také informace o jejich chemickém složení (Plášek *et Reischig*, 1995).

Metoda temného pole

Při pozorování v temném poli je konstrukce osvětlovací soustavy upravena tak, že do objektivu se dostane jen světlo, které interakcí se vzorkem pozměnilo směr šíření. Zorné pole je proto zcela tmavé a pozorované objekty září na temném pozadí. V temném poli lze snadno detekovat velmi malé objekty, včetně takových, jejichž rozměry jsou pod hranicí teoretické rozlišovací schopnosti mikroskopu. Pro seriózní studium valné většiny objektů se však pozorování v temném poli nehodí, neboť je při něm nadměrně zdůrazněn kontrast kontur a malých strukturních detailů (Plášek *et Reischig*, 1995).

Metoda fázového kontrastu

Většina světelných mikroskopů umožňuje pozorovat jen takové objekty, které v různé míře absorbují světlo – mění amplitudu záření, jedná se tedy o amplitudové preparáty. Avšak řada objektů neposkytuje při průchodu světla žádné rozdíly v absorpci a proto nejsou viditelné v procházejícím světle. Mění pouze fázi procházejícího světelného vlnění z důvodu různého indexu lomu v jednotlivých bodech. Tyto objekty

se nazývají fázové preparáty. Fázový kontrast umožňuje transformaci fázové změny na změnu amplitudy.

Metoda fázového kontrastu patří mezi nejrozšířenější při pozorování biologických preparátů. Podstatou metody fázového kontrastu je realizace posuvu fází (fázovou destičkou) mezi ohybovými maximy difraktovaného světla a nultým maximem. Konkrétně jde o posunutí fáze nultého maxima o $\frac{1}{4}$ vlnové délky, což poskytuje po interferenci vysoký kontrast v obraze. Fázového kontrastu je docíleno vložení dvou fázových destiček do optické dráhy mikroskopu. První, umístěná v kondenzoru mikroskopu, vymezuje dutý kužel světla dopadající na objekt a vytváří tak dvě hlavní optické dráhy. Druhá fázová destička je umístěna v ohniskové rovině objektivu a ovlivňuje okolní nevychýlené světlo. První optická dráha prochází preparátem beze změny, druhá je obvykle zpožděna o méně než $\frac{1}{4}$ vlnové délky. Tuto fázovou změnu lze převést na změnu amplitudy posunem fáze u světla, které prošlo preparátem beze změny a následnou interferencí paprsků jednotlivých optických drah (Nikon Instruments Inc., © 2016; Olympus America Inc., © 2012). Nedostatkem fázového kontrastu je existence halo, což je jasně zářící rozhraní mezi objektem a okolním prostředím, které vzniká v důsledku lomu světla na stěnách mikroskopických objektů, zejména když jsou z materiálu o vysokém indexu lomu (Plášek *et* Reischig, 1995).

Diferenciální interferenční kontrast

Metoda interferenčního kontrastu je další velmi rozšířenou metodou pro zobrazování málo viditelných biologických preparátů. Podobně jako fázový kontrast i diferenciální interferenční kontrast (DIC) využívá pro vznik viditelného (amplitudového) obrazu rozdíly v indexech lomu prostředí, objektu, nebo jeho jednotlivých komponent. Při fázovém kontrastu interferuje difraktované záření se zářením, které při průchodu vzorkem nezměnilo směr šíření. U interferenčního kontrastu se fázové posuvy detekují pomocí interference s referenčním paprskem, pro který je v interferenčním mikroskopu zvláštní dráha oddělená od té, po které prochází světlo interagující se vzorkem (Plášek *et* Reischig, 1995).

DIC využívá k tvorbě kontrastu polarizované světlo, jenž je docíleno upravenými Wollastonovými hranoly dle Nomarského. Průchodem světla polarizátorem, umístěným v oblasti kondenzoru, dochází k rozdělení paprsku na řádný a mimořádný, jejichž vlnění je navzájem kolmé a laterálně jsou od sebe mírně vzdáleny, pod rozlišovací mezí objektivu. Po průchodu dalším Wollastonovým hranolem – analyzátozem, umístěným v objektivu, dochází ke složení obou paprsků. Jelikož paprsky nemusely projít stejnou optickou dráhou při průchodu preparátem, dochází k jejich interferenci, jež vede ke změně amplitudy složeného paprsku (Olympus America Inc., © 2012; Zeiss, 2016).

Polarizační mikroskopie

Metoda využívá interakce polarizovaného světla s opticky anizotropními látkami, při které dochází k tzv. dvojlomu. Polarizační mikroskopie má vysokou citlivost a může být využita pro kvalitativní a kvantitativní analýzu různých anizotropních látek. Polarizační mikroskop se od běžného mikroskopu liší vloženým párem zkřížených polarizátorů a kompenzační destičkou. Dvojlomné objekty i jejich pozadí zobrazuje v pestrých barvách, přičemž konečný výsledek závisí jak na tloušťce a optických vlastnostech objektů, tak i na nastavení kompenzační destičky. Největší uplatnění našel polarizační mikroskop v krystalografii (Plášek et Reischig, 1995, Zeiss, 2016).

2.2.4. Fluorescenční mikroskopie

Fluorescence je luminiscenční proces, při kterém molekula emituje světelné záření při přechodu z elektronově excitovaného stavu do základního. Excitace může být způsobena fyzikálně (např. absorpcí světla), mechanicky (třením) nebo chemicky. Luminiscence vyvolána absorpcí fotonu ultrafialového nebo viditelného záření se nazývá fotoluminiscence a formálně je rozdělena do dvou kategorií: fluorescence a fosforescence, v závislosti na deexcitační dráze (Zeiss, 2016). Fluorescenci lze rozdělit na několik částí, které se od sebe časově liší v rozmezí několika řádů. Excitace vhodné molekuly trvá femtosekundy, zatímco vibrační relaxace excitovaného stavu na nejnižší hladinu probíhá v pikosekundách. Nakonec emise, kdy dochází k vyzáření fotonu a návratu molekuly do základního stavu, se měří v nanosekundách (Olympus America Inc., © 2012). Během fluorescence dochází ke ztrátě části energie jinými, nefluorescenčními procesy (uvolnění tepla, rezonanční přenos na okolní molekuly a podobně). Ztráta energie se projeví v posunu vlnové délky vyzářeného fotonu, a tento posun se nazývá Stokesův posun (Zeiss, 2016).

Fluorescenční mikroskopie je v současné době široce rozšířený přístup jak v rostlinné tak živočišné histologii a buněčné biologii. Intenzivní rozvoj v letech nedávno minulých i současných stále přináší nové postupy pro detekci struktur, organel nebo jednotlivých molekul. Jedním z hlavních důvodů častého využití fluorescenční mikroskopie je její vysoká citlivost. Fluoreskující molekuly mohou být detekovány již při velmi malých koncentracích. Zdrojem této vysoké citlivosti je vysoký kontrast vůči pozadí. U fluorescence obvykle je získán jasný (světlý) signál na temném pozadí. Toho je dosaženo použitím dvou filtrů, které oddělí na základě vlnových délek excitační a emisní záření. Excitační filtr vymezuje rozsah vlnových délek použitých pro excitaci. Naopak emisní (bariérový) filtr umožňuje vydělit část spektra představující hlavně požadovaný signál. Právě jejich kombinace obou filtrů určuje efektivní minimalizaci signálu pozadí, který pak nepřekrývá vlastní fluorescenční signál. Ten je následně dobře čitelný i při nízké úrovni (Soukup, © 2004).

Fluorescenční molekuly mohou absorbovat jen světlo určité vlnové délky díky své povaze a rozložení delokalizovaných elektronů. K označení fluorescenčních molekul se využívá několik termínů. Fluorochrom označuje molekulu, která je schopná fluorescence, zatímco fluorofor je pojmenování pro fluorochrom s konjugovanou molekulou, která slouží k zacílení na specifickou biologickou strukturu. K popisu a porovnání jednotlivých fluoroforů se využívají tři parametry: molární extinkční koeficient, kvantový výtěžek a doba zhášení (Zeiss, 2016). Extinkční koeficient vyjadřuje množství záření, které barvivo přijme při dané koncentraci a tloušťce řezu (objektu). Je závislý na vlnové délce. Jaká část přijatého záření bude transformována na emitované záření udává kvantový výtěžek. U většiny běžných fluorochromů se pohybuje okolo 30 %. Může však být výrazně ovlivněn podmínkami prostředí a blednutím fluorochromu (photobleaching). Výsledkem součtu těchto faktorů je, že pouze velmi malé množství světelné energie, které dopadá na preparát, je transformováno na fluorescenční signál (Soukup, © 2004).

Ve standardní světelné mikroskopii v procházejícím světle je paprsek fokusován kondenzorem na vzorek. Při průchodu vzorkem dochází k jeho změně a takto upravený je detekován pomocí objektivu a záznamového zařízení. Při zachování tohoto uspořádání během fluorescence vyvstávají problémy při separování záření excitačního a vycházejícího z fluoroforu. Separace emitovaného záření od ostatních vlnových délek je mnohem jednodušší, pokud vyzářené světlo směřuje opačným směrem než excitační. Z tohoto důvodu je u většiny fluorescenčních mikroskopů docíleno iluminace vzorku přes objektiv. Odražené excitační záření má menší intenzitu než záření fluoroforu. Tento způsob osvětlení se nazývá epifluorescence (Jerome *et* Price, 2011). Jako zdroj světla pro fluorescenční mikroskopii se obvykle používají vysokotlaké výbojky. Obloukový výboj mezi elektrodami představuje intenzivní bodový zdroj světla vhodný pro osvětlení zadní ohniskové roviny objektivu. Používají se buď rtuťové, nebo xenonové výbojky. Rtuťové výbojky jsou napájeny střídavým proudem, kdežto xenonové výbojky používají usměrněné zdroje o vyšším napětí. Dalším rozdílem jsou spektra emitovaného záření. Xenonové výbojky mají homogennější rozložení, bez výrazných píků, a mají menší zastoupení v UV oblasti (Soukup, © 2004).

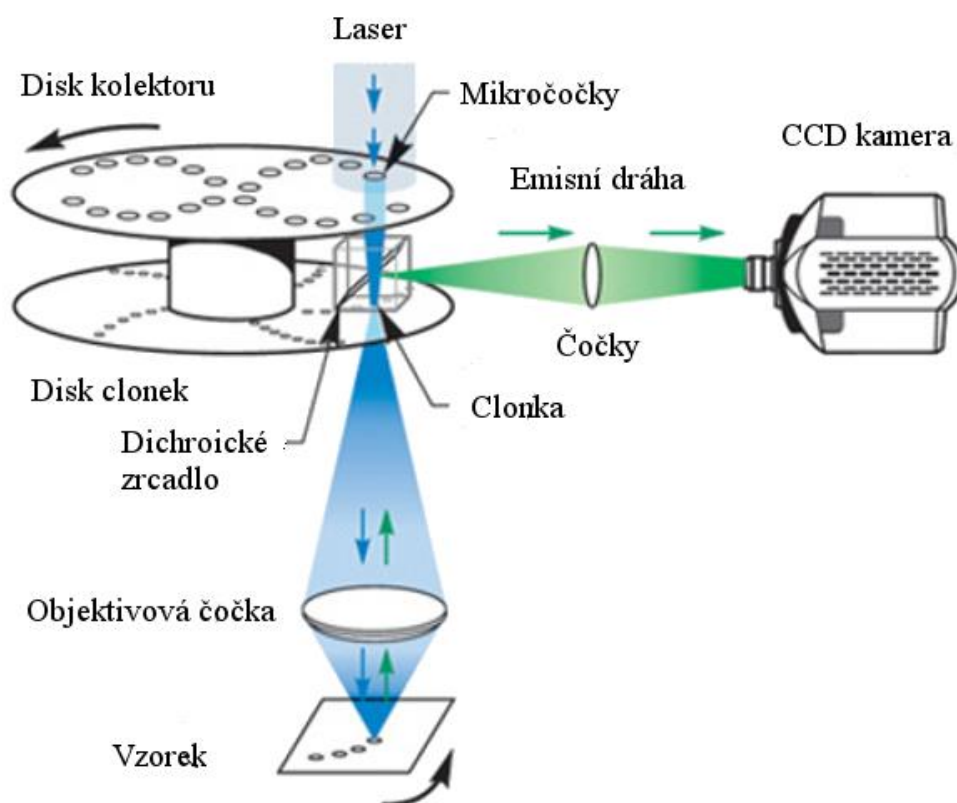
2.2.5. Konfokální mikroskopie

Konfokální mikroskopie představuje jeden z obrovských pokroků v oblasti mikroskopie posledního století, neboť je to technika s vysokým rozlišením umožňující potlačit pozadí z mimo ohniskové roviny (Mertz, 2010). Konfokální mikroskopie nabízí několik výhod oproti konvenční optické mikroskopii. Je zde možné lépe kontrolovat hloubku optického řezu, potlačit nebo redukovat pozadí ohniskové roviny a získat sérii optických řezů tlustého preparátu. Základem konfokálního přístupu je použití prostorových filtračních technik k eliminaci záření mimo ohniskovou rovinu.

Konfokální mikroskopie získává stále více na popularitě z několika důvodů. Zejména se jedná o relativně jednoduchou techniku poskytující vysoce kvalitní obrazy z preparátů určených pro běžnou fluorescenční mikroskopii, a také roste počet aplikací v buněčné biologii, které se opírají o vizualizaci fixovaných i živých preparátů (Olympus America Inc., © 2012).

V běžném epifluorescenčním mikroskopu je obraz struktur v ohniskové rovině objektivu kvalitativně snižen díky fluorescenci pocházející z celého ozářeného objemu. Tento problém se zhoršuje se zvětšující se tloušťkou vzorku až do bodu, kdy drobné detaily již nejsou viditelné. Konfokální mikroskopie přispívá k optické rozlišovací mezi zanedbatelně (v axiální i laterální rovině), avšak vylučuje sekundární fluorescenci při tvorbě obrazu ohniskové roviny. V běžném mikroskopu je vzorek ozářen v celém objemu, avšak v konfokálním mikroskopu dochází k ozařování jednotlivých bodů (Nikon Instruments Inc., © 2016). Pozorovaný vzorek je osvětlován bodovým zdrojem světla. Tím je laserový paprsek fokusovaný na clonku, která je pak objektivem mikroskopu zobrazena na vzorek, do bodu o průměru rovnajícím se rozlišovací schopnosti objektivu. Tentýž objektiv pak sbírá světlo vzorkem odražené nebo rozptýlené, popřípadě jeho fluorescenci. Po zpětném průchodu tohoto sekundárního záření objektivem vznikne další obraz bodové clonky, který je pomocí děliče paprsků lokalizován před fotonásobič. Zde se nachází druhá, konfokální bodová clonka, blokující detekci záření pocházejícího z míst vzorku mimo rovinu, do které je mikroskop právě zaostřen. Obraz celé zaostřené roviny pak získáme jejím rastrováním bod po bodu (Plášek, 1995).

Laserová rastrovací konfokální mikroskopie (LSCM) je limitována rychlostí sběru dat z důvodu potřeby extrémně přesné kontroly galvanometrických zrcadel, které jsou používány k rastrování vzorku, a také počtem registrovaných fotonů během snímání jednoho bodu. Při běžném zobrazování LSCM skenuje rychlostí 1 pixel za mikrosekundu, což lze převést přibližně na 1,5 – 2 sekundy na obraz v závislosti na rozměrech obrazu. Proto je většina LSCM nevhodná pro záznam dynamických jevů odehrávajících se v živých buňkách a trvajících milisekundy. Ačkoli limit skenovací rychlostí lze překonat rezonančními skenovacími schémata, vysoká rychlost skenování se negativně promítne do poměru signál/šum, protože se velmi zkrátí čas pro sběr fotonů z daného bodu. Mnoho rychlostních limitů spojených s rastrovací konfokální mikroskopií může být překonáno použitím vícero excitačních paprsků, které pracují paralelně. Konfokální mikroskopie s rotujícím diskem (obr. 5) je tak vhodnější nástroj pro rychlé časové a prostorové zobrazení živých objektů (Zeiss, 2016).



Obr. 5: Schéma konfokálního mikroskopu s rotujícím diskem. Převzato a upraveno z Duke University (2017).

2.2.6. Super-resoluční mikroskopie

V současnosti využitím fluorescenční a konfokální mikroskopie lze rozlišit značné množství struktur buněk a tkání, např. jádro, mitochondrie, Golgiho aparát, cytoskelet nebo endoplasmatické retikulum. Existují fluorescenční techniky, které umožňují sledovat proteiny, signální peptidy, a interakce v živých buňkách. Avšak limity prostorového rozlišení zamezují rozeznat další důležité struktury, např. synaptické vezikuly, ribozomy, nebo interakce, které spadají pod rozlišovací mez mikroskopu. V posledních letech však dochází k rozvoji metod, které tyto rozlišovací limity obcházejí, a obecně se nazývají super-resoluční nebo superrozlišovací metody (Zeiss, 2016).

4Pi mikroskopie

4Pi mikroskop je upravený laserový konfokální mikroskop. V ideálním případě dojde ke sběru veškerého světla, tedy z 4π steradiánů (odtud název 4Pi). Ve skutečnosti se této geometrie nedosahuje a využívá dvou objektivů umístěných naproti sobě a zaostřených na stejnou rovinu preparátu, který je umístěn mezi objektivy. Světelné paprsky z obou objektivů navzájem interferují a zkvalitňují interferenční obraz preparátu. Použití dvou objektivů zvyšuje numerickou aperturu mikroskopu a zlepšuje jeho rozlišení (Lu, 2005, Zeiss, 2016).

Mikroskopie se strukturovaným osvětlením

Mikroskopie se strukturovaným osvětlením (SIM, structured illumination microscopy) využívá ke zvýšení rozlišení fyzikální (optický) a matematický (informatický) přístup. Obvykle dochází k osvětlení preparátu uniformním zářením a interferenční obraz je dán pouze jeho strukturou. Naproti očekávání může použití přesně definovaného strukturovaného osvětlení zvýšit obrazovou informaci. Interferencí strukturovaného osvětlení dochází k moiré efektu a jeho následným matematickým zpracováním lze získat přesnější umístění jednotlivých prvků preparátu (Murray, 2010).

STED

STED (stimulated emission depletion) mikroskopie patří mezi techniky, které upravují rozptylovou funkci (PSF) pro obejití difrakčního limitu. STED využívá prostorově modulované a saturované přechody mezi dvěma molekulárními stavy, aby upravil tvar PSF. Vzorek je ozářen dvěma ultrarychlými synchronizovanými lineárními zdroji světla, kdy excitační laserový puls je následován červeně posunutým vyčerpávajícím pulsem, tzv. STED pulsem. Obecně je excitační puls kratší než STED puls. STED puls je upraven fázovým modulátorem, aby dosáhl nulové intenzity ve středu paprsku a k okrajům paprsku intenzita exponenciálně rostla. Tato úprava vytváří „koblihový“ tvar paprsku, který obepíná střed excitačního paprsku. Vlnová délka a doba STED pulsu je volena tak, aby se shodovala s excitačním maximem, respektive saturací, studovaného fluoroforu. Následně dochází k deaktivaci fluoroforů v okrajových partiích stopy excitačního svazku, její střed však tlumen není. Při vysokých výkonech vyčerpávajících laserů dochází téměř okamžitě k přechodu na základní stav stimulovanou emisí. Ve výsledku tak dochází k podstatnému zmenšení fluorescenční stopy a tím k výraznému zvýšení rozlišení (Zeiss, 2016).

STORM a PALM

Předchozí techniky jsou navrženy tak, aby zobrazili soubor fluoroforů v celém vzorku. Ačkoli jednotlivé metody se liší rozlišením, všechny excitují fluorofory tak, aby modifikovaly rozptylovou funkci v závislosti na konstrukci mikroskopu. Naproti tomu jednomolekulové techniky STORM (stochastic optical reconstruction microscopy) a PALM (photoactivated localization microscopy) se liší v tom, že zobrazují jen malý soubor fluoroforů, který představuje jednotlivé molekuly rozprostřené napříč vzorkem, a tím překračuje mez rozlišitelnosti. Princip těchto metod totiž spočívá v tom, že jedna molekula může být lokalizována s přesností na několik nanometrů, pokud je zaznamenán dostatečný počet fotonů a pokud v okolí asi 200 nm není zaznamenána další podobně vyzařující molekula. Dále se opírají o stochastické navození fluorescence či nezávislou fotoaktivaci jednotlivých molekul, kdy dochází k jejich nasnímání a fotovybělení (photobleaching). Fluorofory, které jsou velmi blízko sebe, a nebylo by schopné je rozlišit v rámci difrakčního limitu, jsou tak od sebe rozlišeny časově.

Nakonec dochází k propojení pozic jednotlivých molekul získaných z opakovaných cyklů fotoaktivace – zobrazení – vybělení, a vzniku obrazu s vysokým rozlišením (Zeiss, 2016).

Skenovací optická mikroskopie blízkeho pole

Skenovací optická mikroskopie blízkeho pole (NSOM, near-field scanning optical microscopy) pracuje oproti předchozím technikám, které operují v oblasti dalekého pole, v oblasti blízkeho pole, tedy že vzorek je zobrazován ze vzdálenosti řádově shodné s použitou vlnovou délkou ozáření. K překonání difrakčního limitu využívá vlastností evanescentních vln. Základem je umístění detektoru velmi blízko k povrchu vzorku a detekce nepropagujících se světelných vln na povrchu. Rozlišení je dáno fyzickými rozměry apertury, nikoli vlnovou délkou použitého světla. Kontrast v obraze je dán indexy lomu, chemickým složením případně vlastnostmi emise fluorescence použitého fluoroforu. Využití evanescentní vlny je však limitováno pouze na povrch (Zeiss, 2016). Dále lze detekovat světlo prošlé vzorkem, rozptýlené nebo lze sledovat fluorescenci vyvolanou osvětlením v blízkeho poli. NSOM dává nejenom obraz vzorku, ale v každém bodě zároveň umožňuje měřit různá optická spektra nesoucí mnoho dalších informací, např. o energetické struktuře a vzájemném ovlivňování přítomných molekul (Valenta, 1995).

2.3. Mikroskopie atomárních sil

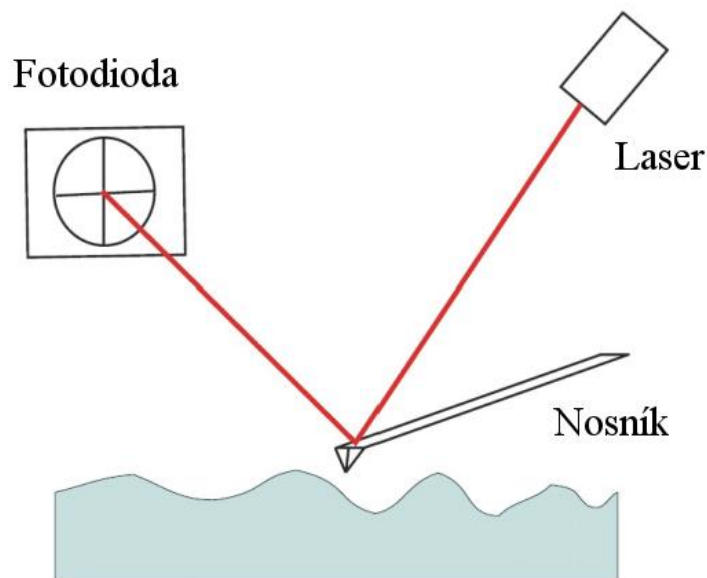
Mikroskopie atomárních sil (AFM) patří do skupiny technik označovaných jako mikroskopie skenující sondou (SPM). SPM je soubor experimentálních metod určených ke studiu struktury povrchu s atomárním rozlišením s možností stanovení trojrozměrných (3D) obrazů povrchu a jejich parametrů. Tyto techniky zaznamenaly bouřlivý rozvoj po objevení metody skenovací tunelovací mikroskopie (STM). Teoretický popis metody vychází z poznatků kvantové fyziky, konkrétně tunelového jevu. STM je schopna poskytnout vysoké rozlišení při rutinním měření. Oproti ostatním metodám např. elektronové mikroskopii nevyžaduje náročnou přípravu vzorku, avšak poskytuje jen informace o povrchu vzorku. Dále neposkytuje okamžitý vizuální obraz, ale dochází k postupnému snímání a zobrazení na počítači. Jednotlivé techniky SPM již nejsou založeny na tunelovém jevu, ale všechny využívají přesného polohování a těsného přiblížení sondy k povrchu vzorku (Kubínek, Vůjtek *et* Mašláň, 2003).

AFM nabízí jedinečnou možnost vizualizovat, manipulovat a kvantitativně zhodnotit strukturní a mechanické aspekty nativních biologických preparátů s nanometrickým rozlišením. Obrovskou výhodou oproti jiným mikroskopickým technikám s vysokým rozlišením, zejména elektronové mikroskopie, je možnost prozkoumat biologické vzorky, které mají rozpětí od tkání po jednotlivé molekuly, ve fyziologicky vhodném vodném prostředí. AFM je schopné pracovat při 37°C, což z něj

činí ideální nástroj pro studium buněk a tkání *in situ*. V kombinaci s optickým mikroskopem je možné ihned korelovat strukturální a nanomechanické změny s optickým a fluorescenčním obrazem (Plodinec, 2010).

2.3.1. Princip mikroskopu AFM

Mikroskopie AFM je založena na mapování atomárních sil na povrchu vzorku. Poprvé byla uskutečněna roku 1986. Dnešní metoda AFM využívá sondu, která rastruje povrch vzorku ostrým hrotem (Kubínek, Vůjtek *et* Mašláň, 2003). AFM sonda se skládá z ostrého hrotu vyleptaného na konci pružného nosníku (cantilever). Hrot má nejčastěji tvar pyramidy a je tvořen křemíkem (Si), případně nitridem křemíku (Si_3N_4). Vrchol hrotu má poloměr obvykle do 10 nm u křemíkových hrotů a 20 – 60 nm u Si_3N_4 (Jandt, 2001). AFM je založeno na detekci odpuzivých a/nebo přitažlivých sil. Interakce mezi povrchem vzorku a hrotem, který je umístěn velmi blízko k povrchu, odpovídá působícím silám mezi atomy vzorku a hrotu. Tyto interakce způsobují ohyb a skroucení nosníku v závislosti na působící síle. Změny nosníku jsou zaznamenávány pomocí laserového paprsku fokusovaného na volný konec nosníku. Odraz laserového paprsku je detekován pomocí fotodiody rozdělené na čtyři části (obr. 5) (Kuznetsova *et al.*, 2007). Změny nosníku jsou závislé na topografickém charakteru skenovaného vzorku. Změny v prohnutí nosníku, případně jeho oscilací, jsou způsobeny různou vzdáleností mezi hrotem a povrchem, přičemž vzdálenost a velikost interakce je neustále korigována pomocí zpětné vazby pozičního systému a počítačově řízených piezo prvků. Obraz s trojrozměrnou topografickou informací je následně rekonstruován na základě dat ze zpětné vazby (informace v ose z) a pozičního systému (informace v ose x a y). Rozlišení metody je tedy dáno vlastnostmi sondy, přesnosti počítače při tvorbě obrazu, a dynamické povaze zobrazovaného vzorku. Přihlédnutím k výše zmíněným faktorům lze získat rozlišení 1 nm v laterální rovině a 0,1 nm ve vertikální rovině. Rozlišení v laterální rovině je ovlivněno geometrickými rozměry apikální části hrotu. Vliv hrotu může být redukován korekčním softwarem (Gaczynska *et* Osmulski, 2008).

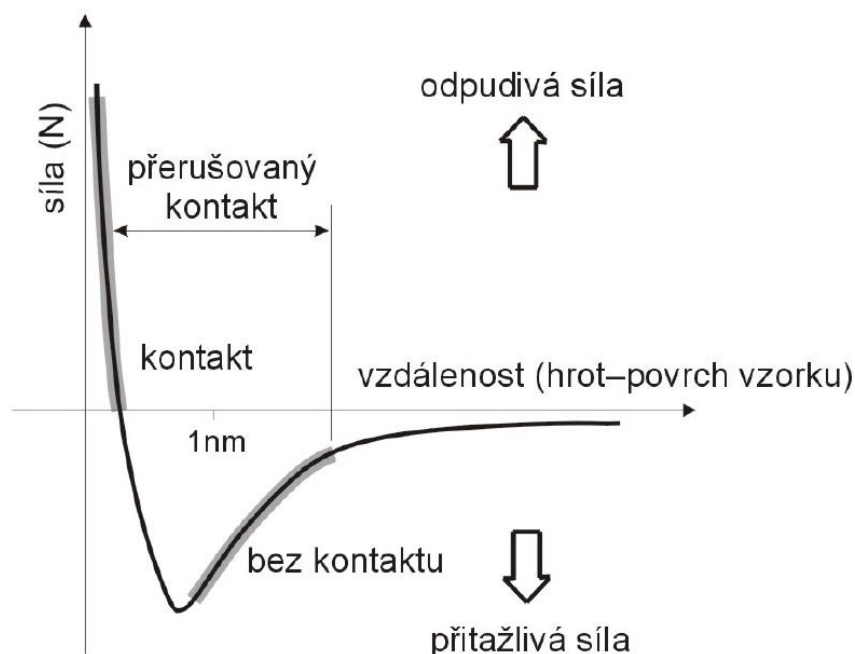


Obr. 6: Princip mikroskopu atomárních sil. Převzato a upraveno z *Universität Heidelberg* (2017).

Důležitým faktorem pro aplikace AFM je to, že působící síly se projevují u jakéhokoliv vzorku nezávisle na jeho vodivosti, což u STM je nutná podmínka. Tedy na rozdíl od STM může být AFM také využito pro studium izolantů a polovodičových materiálů. Síly ohýbající raménko mohou být různé fyzikální podstaty, především se uplatňuje van der Waalsova přitažlivá síla působící mezi dvěma atomy (dipól-dipólová interakce) a síla odpuzivá, plynoucí z Pauliho principu, je-li vzájemná vzdálenost menší než součet atomových poloměrů. Pro modelování celkové síly se nejčastěji používá Lennard-Jonesův potenciál:

$$U(r) = \varepsilon \left[\left(\frac{r_0}{r} \right)^{12} - \left(\frac{r_0}{r} \right)^6 \right],$$

kde je ε konstanta a r_0 je konečná vzdálenost, při níž má potenciál nulovou hodnotu. Pro korektní vyšetřování sil mezi hrotem a vzorkem nestačí znát pouze interakce mezi dvěma molekulami, ale interakci mezi tělesy. Ta je zpravidla dána integrací předchozí interakce, přičemž se mnohdy musí započítat i vícečásticové interakce, vliv prostředí či vazba mezi hrotem a vzorkem. Dále je potřeba brát v potaz, že skenování je dynamický proces, vznikají třecí síly apod. (Kubínek, Vůjtek *et* Mašláň, 2003).



Obr. 7: Graf působících sil v závislosti na vzdálenosti. Převzato z Kubínek, Vůjtek et Mašláň (2003).

2.3.2. Zobrazovací režimy

AFM může pracovat v různých zobrazovacích módech v závislosti na povaze interakce mezi hrotem a povrchem vzorku. Mechanické vlastnosti buněčného povrchu a podpovrchových vrstev mohou být zjištěny v metodách kontaktního režimu (silová modulace, mikroskopie laterálních sil, analýza silových křivek) nebo zobrazením fázového posunu v poklepovém režimu (Kuznetsova *et al.*, 2007). Na obrázku 7 jsou vyznačeny režimy lišící se vzdáleností a povahou interakce – kontaktní a nekontaktní režim.

Kontaktní režim

V kontaktním režimu (contact mode) udržuje hrot raménka jemný „mechanický kontakt“ se vzorkem. Vzdálenost mezi hrotem a povrchem je menší než několik desetin nm a síla mezi atomy přicházejícími do interakce je odpudivá. Kontaktní síly způsobují během skenování ohyb a výchylky nosníku v korespondenci se změnami topografie vzorku. Kontaktní režim může pracovat ve dvou variantách – s konstantní výškou, kdy je udržována určená hodnota výšky nad povrchem a je snímáno ohnutí nosníku, a s konstantní silou, při němž je udržováno konstantní prohnutí nosníku (Kubínek, Vůjtek *et Mašláň*, 2003).

Nekontaktní režim

Nekontaktní režim pracuje v oblasti dalekodosahových van der Waalsových interakcí, řádově jednotky až desítky nm od povrchu vzorku, a síla mezi atomy vzorku a hrotu je přitažlivá. Celková síla mezi hrotem a vzorkem je velmi malá a pohybuje se okolo 10^{-12} N. Malá síle je výhodou při studiu měkkých a/nebo pružných povrchů, avšak vlastní měření je obtížnější ve srovnání s kontaktním režimem. V nekontaktním režimu nosník s hrotem kmitá poblíž rezonanční frekvence, zpravidla 100 – 400 kHz, a jsou detekovány změny v rezonanční frekvenci nebo amplitudě kmitů, které se projevují v závislosti na vzdálenosti od povrchu vzorku. Hrot je přitahován ke vzorku, a proto musí být nosník dostatečně tuhý, aby nedošlo k poškození, avšak na něj v této vzdálenosti působí malé síly a ohnutí nosku je velmi malé. Z tohoto důvodu je i velmi malý měřicí signál (špatný poměr signál/šum) (Kubínek, Vůjtek *et* Mašláň, 2003).

Poklepový režim

Poklepový režim, v literatuře také označovaný jako tapping, intermittent, semicontact, je podobný nekontaktnímu. Nosník opět kmitá frekvencí blízké rezonanční, ale rozkmit (amplituda) je natolik velký, že dochází k občasnému dotyku hrotu s povrchem. Povrch je opět mapován ze změny rezonanční frekvence. Přestože kontaktní režim má teoreticky lepší rozlišovací schopnost zobrazování, tapping mód nabízí několik výhod. Při zobrazování adhezivních povrchů v kontaktním režimu hrot je velmi náchylný k přilnutí a nepravidelnému pohybu během skenování. Tomu je předcházeno v poklepovém režimu díky velmi krátkému dotyku s povrchem, navíc je méně destruktivní vůči měkkým povrchům (laterální síly jsou značně redukovány). Také nabízí informace, které nejsou v kontaktním režimu dostupné. Interakce mezi povrchem vzorku a hrotem nezpůsobují pouze změnu amplitudy, ale také dochází k fázovému posunu oscilací. Analýzou fázového posunu lze získat kvalitativní informace, např. tuhost či viskozita (Thormann *et al.*, 2010).

Peak Force Tapping

S rozvojem mikroskopických technik dochází k představování nových skenovacích režimů a jedním z nich je Peak Force Tapping, představený firmou Bruker (dříve Veeco). Stejně jako jeho předchůdce HarmoniX dokáže pracovat s širokou nabídkou standartních hrotů. V režimu Peak Force Tapping dochází ke krátkodobým dotykům hrotu a povrchu vzorku, podobně jako je tomu u poklepového režimu, které omezují vliv laterálních sil. Na rozdíl od tapping módu, kde zpětnovazebná smyčka udržuje konstantní amplitudu kmitání, Peak Force Tapping kontroluje maximální působící sílu tzv. Peak Force (Pittenger, Erina *et* Su, 2010). Jeho výhodou je možnost využití pro různé typy vzorků, souběžné získání mechanických vlastností bez nutnosti dodatečného zpracování získaných dat, a nízké silové působení jen několik pN (Adamcik, Berquand *et* Mezzenga, 2011).

2.3.3. AFM spektroskopie

AFM spektroskopie je základní technika pro kvantitativní měření mechanických vlastností studovaného materiálu. Spektroskopii se v AFM rozumí měření závislosti síla – vzdálenost od povrchu. Studium závislosti síly mezi hrotem a povrchem na vzdálenosti hrotu je užitečné pro monitorování vertikální síly, kterou hrot působí na povrch v kontaktním režimu. Spektroskopii lze využít k analýze kontaminovaných povrchů (viskózní látky, lubrikanty, lokální změny v elastických vlastnostech povrchu apod.), dále umožňuje např. měření síly jednotlivých vazeb (Kubínek, Vůjtek *et* Mašláň, 2003).

AFM je schopno naměřit závislosti síla – vzdálenost (F - d křivky) na jakémkoli povrchu v jakémkoli prostředí s vysokým rozlišením (25 nm laterálně, 0,1 Å vertikálně a 1 pN silově), přičemž toto silové měření lze korelovat s topografií vzorku (Cappella *et* Dietler, 1999). Měření závislosti probíhá následovně: hrot se přibližuje k povrchu vzorku, dochází k prohnutí nosníku. Pro vzdálenosti větší než 10 nm převládají elektrostatické a hydrofobní interakce mezi hrotem a vzorkem. Pokud je působící síla přitažlivá, nosník se prohýbá směrem ke vzorku. Pro vzdálenosti menší než 10 nm je prohnutí převážně způsobeno přitažlivými van der Waalsovými silami. Při dalším přibližování hrotu k povrchu dochází v určité vzdálenosti ke skokovému přiblížení a dotyku hrotu s povrchem, tzv. jump-in. Toto nastane v momentě, kdy přitažlivé síly jsou větší než konstanta tuhosti nosníku. Další přiblížení způsobí větší prohnutí nosníku a v závislosti na použité síly může dojít k elastické nebo plastické deformaci hrotu, nosníku a/nebo vzorku, dochází k indentaci. Při následném oddalování dochází ve vzdálenosti, kdy se objevil jump-in, k opačnému prohnutí nosníku, což je způsobeno adhezivními a kapilárními silami. Nakonec dojde k náhlému odskočení od povrchu vzorku, tzv. jump-out nebo pull out (Jandt, 2001).

F - d křivka vyjadřuje závislost velikosti síly interakce mezi hrotem a vzorkem na vzdálenosti mezi hrotem a vzorkem. Pro sestavení této závislosti se hrot nebo vzorek pohybuje podél osy Z a je zaznamenáno prohnutí nosníku δ_c . Síla je dána Hookovým zákonem:

$$F = -k_c \delta_c .$$

Zaznamenávána vzdálenost během měření nepředstavuje aktuální vzdálenost mezi hrotem a vzorkem (d), ale vzdálenost Z mezi povrchem vzorku a klidovou pozicí nosníku. Toto je potřeba rozlišit, protože není započten vychýlení nosníku (δ_c) a deformace vzorku (δ_s). Vzájemný vztah je dán následovně:

$$d = Z - (\delta_c + \delta_s).$$

Jelikož dopředu není známo prohnutí nosníku, ani deformace vzorku, jediná vzdálenost, která lze kontrolovat a měřit, je vzdálenost Z , která představuje rozložení piezo členů (piezo displacement). Z tohoto důvodu by měla být přímá silová křivka označována jako *force – displacement* než jako *force – distance* křivka (Cappella *et* Dietler, 1999).

Prerekvizitou k získání přesné silové závislosti je použití kalibrovaných nosníků se známou konstantou tuhosti. Díky nastaveným tolerancím při výrobě se může značně lišit aktuální hodnota konstanty tuhosti od definované výrobcem. Existuje několik metod pro její určení. V jedné z těchto metod se využívá rozdíl rezonančních frekvencí mezi prázdným nosníkem a nosníkem se známou zátěží (Jandt, 2001). Nejčastější metodou pro určení konstanty tuhosti je metoda teplotního šumu, která je běžně implementována do mikroskopů AFM. Fluktuace prostředí neustále poskytují malé silové impulsy a tyto fluktuace mohou být zaznamenány ve formě funkce, která je závislá na teplotě prostředí a konstantě tuhosti nosníku.

Silovou křivku lze rozdělit na dvě části – část přitlačnou (approach curve), kdy se hrot pohybuje směrem k povrchu vzorku, a část oddalovací (withdrawal curve), kdy se hrot vrací zpět do počáteční pozice. Na obou částech křivky lze pozorovat tři regiony – oblast bez kontaktu, kontaktní linie a nulová linie. Nulová linie je pozorovatelná, pokud je hrot daleko od povrchu vzorku a nosník téměř nejeví prohnutí. V kapalinách podávají nulové linie informaci o viskozitě kapaliny (Cappella *et* Dietler, 1999). Z části křivky, která představuje oblast kontaktu hrotu se vzorkem, mohou být odvozeny informace týkající se elasticko-plastické povahy vzorku. Pokud je vzorek dokonale elastický, obě části křivky se překrývají. Pokud je vzorek dokonale plastický, podléhá deformaci během přitlačné části a během oddalování nedochází k jeho obnově. Většina vzorků projevuje plastické i elastické chování, proto se přitlačná a oddalovací část křivky zřídka překrývají (Butt, Cappella *et* Kappl, 2005). Důležitou úlohu u $F-d$ křivky také hraje bod dotyku, místo na approach křivce, kdy se hrot dostane do kontaktu s povrchem vzorku. Z geometrie mezi sférickým hrotem a plochým povrchem lze odvodit elasticitu vzorku (k_s), která je proporcčně vázána na známou konstantu tuhosti nosníku, vzdálenost Z a prohnutí nosníku δ_c . Elastická konstanta k_s vyjádřena následovně:

$$k_s = \frac{3}{2} a E_r ,$$

$$\frac{1}{E_r} = \frac{3}{4} \left(\frac{1-\nu_s^2}{E_s} + \frac{1-\nu_t^2}{E_t} \right),$$

kde a je poloměr oblasti kontaktu, E_s a E_t je Youngův modul vzorku a hrotu, E_r je redukovaný Youngův modul, ν_s a ν_t je Poissonův poměr vzorku a hrotu. V mnoha

případech je hrot mnohem tužší než vzorek a lze zanedbat deformaci hrotu, a předcházející rovnici lze vyjádřit:

$$k_s = 2a \frac{E_s}{1-\nu_s^2}$$

(Cappella *et al.*, 1999; Butt, Cappella *et al.*, 2005). Pro analýzu $F-d$ křivek bylo vyvinuto několik matematických modelů, které využívají různou míru zjednodušení.

Hertzův model

Hertzův model je velmi často využíván pro určení Youngova modulu v biologických aplikacích, zejména u buněčných linií (Kuznetsova *et al.*, 2007). Klasický Hertzův model se datuje do roku 1881 a je vyjádřen následovně:

$$F = \frac{4\sqrt{R}}{3} \frac{E}{1-\nu^2} h^{3/2},$$

kde h , ν , R a E představuje hloubku indentace, Poissonův poměr, poloměr koule představující hrot, a Youngův modul pružnosti. Poissonův poměr nabývá hodnot 0 – 0,5 a představuje schopnost komprese vzorku. Pro buňky je předpokládána hodnota 0,5, tedy nekompresibilní materiál. Hertzův model popisuje jednoduchý případ elastické deformace dvou dokonale hladkých homogenních těles. Hertzův model má následující předpoklady: vtačované těleso má kulový tvar, tloušťka vrstvy, do které je vtačován hrot, je mnohonásobně větší než hloubka indentace, nepůsobí zde žádné adhezní síly (Guo *et al.*, 2012; Kuznetsova *et al.*, 2007).

Sneddonův model

Sneddonův model z roku 1965 upravuje Hertzův model pro jiný tvar vtačovaného tělesa. Tento model předpokládá vtačování rigidního kuželu do měkkého rovného povrchu a má následující tvar:

$$F = \frac{2}{\pi} \tan \alpha \frac{E}{1-\nu^2} h^2,$$

kde α je polovina vrcholového úhlu hrotu tvaru kužele (Guo *et al.*, 2012; Kuznetsova *et al.*, 2007).

Derjaguin – Müller – Toporov, Johnson – Kendall – Roberts, Maugis

Model Dejaguin – Müller – Toporov (DMT) a Johnson – Kendall – Roberts (JKR) spolu s Hertzovým modelem patří mezi nejpoužívanější modely popisující vzájemnou interakci hrotu s povrchem vzorku. Na rozdíl od Hertzova modelu DMT a JKR započítává i adhezi vzorku, konkrétně model DMT zvenčí kontaktní plochy a JKR

uvnitř kontaktní plochy. Oba modely operují s prací adheze, kterou lze vypočítat z místa jump-off. Model DMT je vyjádřen jako:

$$F = \frac{E_r a^3}{R} - 2\pi R W,$$

kde, E_r je redukovaný Youngův modul, a je poloměr oblasti kontaktu, R je poloměr hrotu, a W je práce adheze, přičemž hloubka indentace je dána:

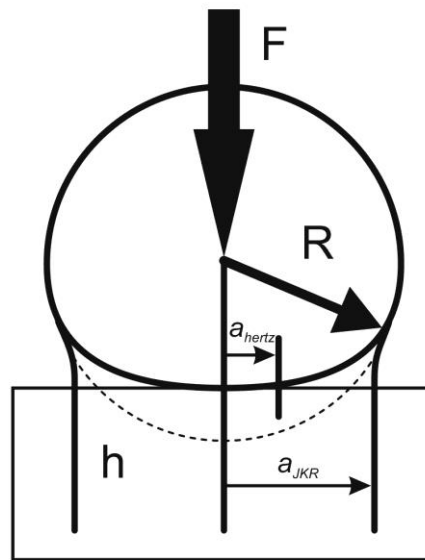
$$h = \frac{a^2}{R}.$$

Model JKR je vyjádřen následovně:

$$F = \frac{E_r a^3}{R} - \sqrt{6\pi W E_r a^3},$$

$$h = \frac{a^2}{R} - \frac{2}{3} \sqrt{\frac{6\pi W a}{E_r}}.$$

Model JKR lze aplikovat na velké hroty a měkké vzorky, kde je vysoká míra adheze. Model DMT je spíše aplikovatelný na menší hroty a tužší vzorky s menší adhezí (Butt, Cappella *et* Kappl, 2005; NT-MDT, © 1998-2016).



Obr. 8: Deformace elastické koule na rovném substrátu podle Hertzovy a JKR teorie. Teorie DMT má stejnou oblast kontaktu jako Hertzova teorie. Převzato a upraveno z Cappella *et* Dietler (1999).

Maugisova teorie je nejvíce ucelená a nejpřesnější teorie v oblasti elastického kontaktu dvou těles, kterou lze aplikovat na všechny druhy materiálů od velkých rigidních koulí s vysokou povrchovou energií po malá měkká tělesa s malou

povrchovou energií. Pro popis materiálových vlastností byl zaveden bezrozměrný parametr λ

$$\lambda = \frac{2,06}{z_0} \sqrt[3]{\frac{RW^2}{\pi E_r^2}},$$

kde z_0 je typický rozměr atomu. Modely DMT a JKR tak představují krajní případy Maugisovy teorie (Cappella *et* Dietler, 1999; Butt, Cappella *et* Kappl, 2005).

2.3.4. Artefakty zobrazení

Artefakty jsou objekty, které jsou na snímku zobrazeny, ve skutečnosti však neexistují. Mezi ně patří například vznik hřebenů a stínů na pozvolných stěnách, zrcadlení hrotu, vznik opakujícího se vzoru, ad. (Kubínek, Vůjtek *et* Mašláň, 2003). Artefakty vznikají z rozličných důvodů a je velmi obtížné je rozeznat i zkušenými uživateli. Naměřená data jsou ovlivněna konečnou velikostí skenujícího hrotu, deformacemi a znečištěním hrotu, hysterezí piezo skeneru, teplotní nestabilitou, vibracemi okolí, nepřesným nastavením zpětné vazby, aj. Některé artefakty lze odstranit změnou způsobu snímání, např. odlišnou skenující rychlostí či natočením vzorku (Golek *et al.*, 2014).

Artefakty způsobené hrotem

Geometrický tvar bude vždy ovlivňovat výsledný obraz skenovaného vzorku. Pokud hrot je mnohem ostřejší než objekty, které se zobrazují, bude se obraz více podobat skutečnému tvaru zobrazovaného objektu. Ostrost hrotu a úhel boční stěny hrají významnou roli v závislosti na velikosti a výšce zobrazovaného znaku. Obecně výška zkoumaného vzorku není ovlivněna tvarem hrotu, zatímco laterální geometrie je jím ovlivněna výrazně, zejména pokud obsahuje prudká převýšení (Ricci *et* Braga, 2004). Výsledný obraz je vždy konvolucí reálné topografie vzorku a hrotu.

Mezi časté artefakty patří zrcadlení hrotu a zdvojení. Jestliže je zobrazován povrch, který obsahuje ostré hroty, jejichž šířka je menší než šířka hrotu, dojde k „výměně“ funkcí, a v tomto případě bude povrch vzorku snímat hrot. Dojde k zrcadlení hrotu. Ke zdvojení dochází, jsou-li někde dva přibližně stejně vzdálené atomy. To může nastat třeba tehdy, má-li hrot dva vrcholy (Kubínek, Vůjtek *et* Mašláň, 2003). Dalším artefaktem vycházejícím z konvoluce povrchu a hrotu je rozdíl v laterálním tvaru skenovaného objektu. Velmi malé objekty, jakými jsou např. nanočástice, globulární proteiny, vlákna DNA, jsou širší, a jejich laterální rozměry by měly být brány jako horní hranice jejich velikosti. Taktéž prohlubně a lokální díry mohou být ovlivněny tvarem hrotu. Samotný hrot totiž nemusí dosáhnout dna, a mohou se tedy zdát menší a mělké. Použití poškozeného nebo kontaminovaného hrotu často vede k zvláště tvarovaným objektům, které lze obtížně objasnit (Ricci *et* Braga, 2004). K odstranění

nebo alespoň potlačení vlivu hrotu lze využít dodatečných softwarových dekonvolučních nástrojů.

Artefakty způsobené skenovacím systémem

Pohybové zařízení (skener) je nedílnou součástí mikroskopu, umožňuje přibližování hrotu a vzorku a při měření je nositelem měronosného signálu (Kubínek, Vůjtek *et* Mašláň, 2003). Konstrukce skeneru je neustále vylepšována, avšak existuje zde řada artefaktů, která je dána jejich fyzickými a mechanickými vlastnostmi. Vlastnosti piezoelektrických skenerů jsou proměnné v čase a na způsobu užívání, proto je potřeba je v určitých časových intervalech kalibrovat (Ricci *et* Braga, 2004).

V prvním přiblížení lze předpokládat, že výchylka skeneru je přímo úměrná přivedenému napětí. Reálný piezoelektrický skener však tento předpoklad nerespektuje. Vlastní (intrinická) nelinearita je způsobena přímo materiálem skeneru a prodloužení či zkrácení není lineárně závislé na přiloženém napětí. Při znázornění prodloužení skeneru na přiloženém napětí grafem bude křivka ve tvaru písmene S. Efekt nelinearity je výraznější při skenování větších ploch a projevuje se distorzí původně rovinné ekvidistantní mřížky měřících bodů. Většina piezoelektrických materiálů vykazuje určitý stupeň hystereze, kterou nelze zanedbat. Hystereze se projevuje vytvořením uzavřené smyčky v grafu závislosti prodloužení na přiloženém napětí. Při měření v obou směrech (zleva do prava a zprava doleva) je znatelný posun v pozici sledovaného prvku. Creep (tečení) je jev, který nastává při náhlém přiložení napětí. Piezoelektrický skener se neroztahuje jako celek, ale po částech. Výsledkem je, že když dojde k nastavení skeneru na požadované místo, začne lokalizovaná poloha pozvolna ujíždět během homogenizace prodloužení v celém objemu piezoelektrické keramiky. Křížový efekt je charakterizován nežádoucím pohybem v určitém směru, je-li požadován pohyb ve směru jiném. Obvykle mají skenery jeden konec volný a druhý pevně připevněný k tělu mikroskopu, z toho důvodu se skener pohybuje po oblouku a v obraze se projevuje zaoblení. Stárnutí skeneru se projevuje změnou piezoelektrického koeficientu d v čase. Není-li používán, dochází k exponenciálnímu poklesu d vlivem postupného a náhodného orientování dipólů. Naopak, je-li používán, dochází k nasycování a k téměř dokonalé orientaci. Stárnutí se projeví chybným určováním rozměrů, přestože charakter objektů zůstává nezměněn. Drift je pozvolné ujíždění hrotu vzhledem ke vzorku z nejrůznějších příčin. Drift je zvláště patrný při malých rychlostech, protože narůstá doba, během níž se může projevit. Nejdůležitější složkou driftu je složka tepelná, která vzniká v důsledku rozdílnosti koeficientů teplotní roztažnosti jednotlivých konstrukčních částí mikroskopu. Nelze zanedbat ani vnitřní zdroje ohřevu, jako je průchod proudu či ohřev použitým osvětlením. Další složkou je elektronická, která se projevuje změnou nastavení zesilovačů. Efekt se rovněž může měnit s teplotou. Zejména při zobrazování až s atomárním rozlišením je důležité nechat systém teplotně stabilizovat. Nastavení zpětné vazby patří mezi další zdroje artefaktů.

V závislosti na použitém operačním módu a zobrazovaném systému je potřeba nastavit hodnoty zpětné vazby (set point, gain, amplitude), skenovací rychlost atd. Měkké vzorky jsou zobrazovány při nižších rychlostech a s nižší interakční silou, podobně vzorky s velkou drsností musí být zobrazovány při nižších rychlostech. Pokud zpětnovazebná smyčka není optimalizována, může být zdrojem dodatečného periodického šumu (Kubínek, Vůjtek *et* Mašláň, 2003; Ricci *et* Braga, 2004).

Jiné zdroje artefaktů

Významným zdrojem obrazových artefaktů jsou vibrace. Mikroskop atomárních sil je velmi citlivý na drobné vychýlení nosníku, které nemusejí nutně pocházet pouze z interakce hrotu a vzorku. Zdrojem těchto vychýlení mohou být vibrace okolí. Obvykle se tyto artefakty projevují oscilacemi. Mezi zdroje vibrací patří podlahy, které mohou kmitat s amplitudou několika mikrometrů s frekvencí do 5 Hz. Dalším zdrojem vibrací jsou akustické vlny, např. rozhovor obsluhujícího pracovníka, hudba, bouchání dveří, zvuky v okolí budovy. K potlačení nežádoucích účinků vibrací je potřeba použít různých pomůcek, např. antivibrační stoly, akustické uzávěry, a vhodně umístit mikroskop v místnosti a budově (Ricci *et* Braga, 2004).

Další skupina artefaktů pochází ze softwarového zpracování naměřených dat. Nejčastější vznikají artefakty použitím nevhodného nástroje. Například, jak bylo zmíněno výše, téměř všechny obrazy projevují určité zakřivení dané geometrií skeneru, a pokud je k odečtení zakřivení použit nevhodný typ dochází k distorzi obrazu. Dalším příkladem mohou být spektrální filtrace, kdy nevhodně zvoleným filtrem lze získat atomární strukturu i z náhodného šumu. Vymazání či zvýraznění části spektra se zdůrazní některé směry, které mohou vytvářet falešnou symetrickou strukturu (Kubínek, Vůjtek *et* Mašláň, 2003; Ricci *et* Braga, 2004).

3. Cíle práce

Zavést metody hodnocení buněčného poškození nádorových a nenádorových buněčných linií s využitím mikroskopických a fluorescenčních metod.

Zavést metodu hodnocení cytomechanických vlastností nádorových a nenádorových buněčných linií prostřednictvím mikroskopie atomárních sil.

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

Ověřit vliv fotodynamické terapie na cytoskeletální vlastnosti nádorových a nenádorových buněčných linií.

4. Materiál a metody

4.1. Materiál

V experimentech byly jako biologický materiál použity buněčné linie HeLa (virový epiteloidní karcinom děložního čípku), G361 (lidský melanom) a NIH 3T3 (myší fibroblasty). Pro kultivaci byly použity 96-jamkové mikrotitrační destičky, Petriho misky o průměru 35 mm (TPP) a Petriho misky se skleněným dnem o průměru 50 mm (Will-Co). Jako chemikálie pro kultivaci byly použity kultivační médium DMEM (Dublecco's Modified Eagle Medium) s 10 % FBS (fetal bovine serum), 2 % 200 mM L-glutaminu a 0,4 % penicillin/streptomycin (Sigma Aldrich), fosfátový pufr (PBS – pH 7,4: KCl; NaCl; KH_2PO_4 ; Na_2HPO_4 ; destilovaná voda; HCl). Pro navození fotodynamického efektu byly použity sensitizéry MgTPPS₄, ZnTPPS₄ a TMPyP. Pro test cytotoxicity byly použity chemikálie dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma Aldrich), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl tetrazolium bromid (MTT, Sigma Aldrich). Pro fixaci a fluorescenční barvení byly použity 4% p-formaldehyd (Lach-Ner), 0,1 % Triton X-100 (Serva electrophoresis), 1 mg/ml fluorescenční sonda Alexa Fluor 532 Phalloidin (Molecular probes Invitrogen), monoklonální primární protilátka anti- α -tubulin (Sigma Aldrich), sekundární protilátka DyLight 550 (Thermo Scientific), Hoechst 33258 (Sigma Aldrich). Měření proběhlo na mikroskopu atomárních sil Bioscope Catalyst (Bruker) v kombinaci s transmisním optickým mikroskopem IX81 (Olympus), na konfokálním mikroskopu Axio Observer Z1 (Zeiss) s rotujícím diskem CSU X1 (Yokogawa) a na readeru Synergy HT (Biotek).

4.2. Buněčné kultury

Pro experimenty byla použita buněčné linie lidských epitelálních buněk HeLa, představující karcinom děložního čípku. Dále byla použita buněčná nádorová linie G361 (lidský melanom). Jako nenádorová linie byla použita buněčná linie myších fibroblastů NIH 3T3. Buněčné linie byly kultivovány v médiu DMEM doplněné o 10 % FBS, 2 % 200 mM L-glutaminu a 0,4 % penicillin/streptomycin při teplotě 37 °C a 5 % CO₂.

4.3. Fotodynamický efekt

Fotosensitizéry MgTPPS₄, ZnTPPS₄ a TMPyP byly rozpuštěny a naředěny na příslušné koncentrace pro jednotlivé buněčné linie v kultivačním médiu DMEM. Buněčné linie byly se sensitizéry inkubovány po dobu 24 h ve tmě při teplotě 37 °C a 5 % CO₂. Po době inkubace byly buňky zbaveny neabsorbovaného sensitizéru a ozářeny dávkou 5 J/cm². K ozáření byl použit systém LED diod zářících o vlnové

délce 414 nm sestrojeným na pracovišti Ústavu lékařské biofyziky a chráněn národním patentem CZ 302829 B6. Po ozáření byly buněčné linie uchovávány pro další experimenty ve stejných kultivačních podmínkách.

4.4. Test toxicity – MTT test

Pro zhodnocení fototoxicity fotosensitizerů byl proveden standardní test cytotoxicity – MTT test. Do jamky na 96-jamkové mikrotitrační destičce bylo vyseto 10^4 buněk. K adhezi buněk došlo přes noc. Po navození fotodynamického efektu byly buňky uchovávány ve tmě při teplotě 37 °C a 5 % CO₂ po dobu 24 h. Poté bylo kultivační médium nahrazeno 50 µl roztoku tetrazoliové soli MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl tetrazolium bromid) rozpuštěné ve fosfátovém pufru (PBS), a buňky byly inkubovány s roztokem MTT po dobu 3 h ve stejných kultivačních podmínkách. Po inkubaci byl roztok MTT nahrazen 100 µl DMSO (dimethylsulfoxid), které rozpustilo fialové krystaly formazanu vzniklé při metabolizaci MTT živými buňkami. Následně byla proměřena absorbance takto připraveného roztoku a byl určen rozdíl absorbance při 570 nm, představující maximum absorbance roztoku formazanu, a 690 nm, představující pozadí. Nakonec byly určeny hodnoty IC₅₀.

4.5. Fluorescenční barvení

Buňky pro fluorescenční barvení byly adherované na krycích sklech. Sterilizované krycí sklo bylo vloženo do Petriho misek o průměru 35 mm a na ně vyseto 5×10^4 buněk. Adheze buněk proběhla přes noc. Po adhezi byly buňky fixovány 4 % p-formaldehydem po dobu 1 h při pokojové teplotě. Buněčná stěna byla permeabilizována 0,1 % Tritonem X-100 po dobu 10 min při pokojové teplotě. Fluorescenčně byly značeny složky cytoskeletu – aktin a tubulin, a buněčné jádro, konkrétně DNA. Pro vizualizaci aktinu byla použita fluorescenční sonda Alexa Fluor 532 Phalloidin. Vizualizace tubulinu byla provedena dvoustupňovou imunocytochemickou metodou. DNA bylo zobrazeno pomocí fluorescenční sondy Hoechst 33258. Po permeabilizaci byla nanášena primární protilátka anti- α -tubulin, která byla inkubována po dobu 1 hod. v koncentraci 1:500 při 37 °C. Následně byla aplikována sekundární protilátka DyLight 550 po dobu 1 hod. v koncentraci 1:250 při 37 °C. Poté byla použita sonda Alexa Fluor 532 Phalloidin po dobu 1 h v koncentraci 1:200 při 37 °C. Nakonec byla inkubována sonda Hoechst 33258 po dobu 10 min v koncentraci 1:5000. Po každém kroku barvení byly buňky dvakrát propláchnuty fosfátovým pufrem (PBS). Fluorescenční značení bylo vyhodnocováno pomocí konfokální mikroskopu Axio Observe Z1 doplněný o rotující disk Yokogawa CSU X1. Byl použit imerzní objektiv 63 \times s 1,4 NA, excitace fluoroforů proběhla systémem laserů, jenž nabízí excitační vlnové délky 405, 488, 532/561 a 639 nm. Zpracování fluorescenčních obrazů proběhlo ve volně šiřitelném programu ImageJ.

4.6. Mikroskopie atomárních sil

Pro experimenty s využitím mikroskopu atomárních sil byly použity speciální Petriho misky o průměru 50 mm se skleněným dnem WillCo. Do nich bylo vyseto 10^5 buněk s 2 ml kultivačního média DMEM. Adheze buněk probíhala přes noc. Snímání buněk probíhalo při pokojové teplotě s čerstvě vyměněným kultivačním médiem pomocí mikroskopu atomárních sil Bioscope Catalyst od firmy Bruker. Obraz topografie byl získán pomocí PeakForce QNM (Quantitative Nanomechanical Mapping) skenovacího módu při rychlosti snímání 0,1 – 0,2 Hz a s PeakForce amplitudou 1000 nm. Pro zobrazování byl použit hrot z nitridu křemíku s rezonanční frekvencí 16 – 28 kHz a nominální hodnotou konstanty tuhosti 0,12 N/m. Pro vyhodnocení Youngova modulu byly zaznamenány $F-d$ křivky pomocí operačního módu Force Volume. Sběr křivek probíhal s frekvencí 5,58 Hz a rychlostí hrotu 24,6 $\mu\text{m/s}$. Rozsah v ose z dosahoval až 3500 nm, a přitlačná síla hrotu dosahovala 2 nN. Vzdálenost křivek mezi sebou dosahovala 1 popřípadě 2 μm . Silové křivky byly fitovány Sneddoným modelem

$$F = \frac{2}{\pi} \tan \alpha \frac{E}{1-\nu^2} h^2,$$

kde h představuje hloubku indentace, α je polovina vrcholového úhlu hrotu tvaru kužele, ν je Poissonův poměr, a E představuje Youngův modul pružnosti. Pro buňky je předpokládána hodnota Poissonova poměru 0,5. Pro sběr silových křivek byl použit hrot z nitridu křemíku s rezonanční frekvencí 16 – 28 kHz a nominální hodnotou konstanty tuhosti 0,12 N/m, přičemž každý hrot byl kalibrován pomocí interního kalibračního procesu Thermal Tune, založeného na frekvenční analýze volného pohybu hrotu při dané teplotě. Obrazy ze systému AFM byly zpracovány v programu Gwyddion 2.40 a $F-d$ křivky byly vyhodnocovány v modulu pro analýzu silových křivek program SPIP 6.0.10.

4.7. Statistické vyhodnocení

Statistické vyhodnocení probíhalo pomocí statistického softwaru IBM SPSS Statistics (USA). Jednotlivé skupiny dat byly získány alespoň z 3 nezávislých měření. Pro zhodnocení MTT testu a stanovené hodnoty IC 50 byla použita metoda analýzy rozptylu (ANOVA) s Bonferroniho korekcí. Pro zhodnocení topografických změn – výšky, plochy buněk, byly použity neparametrické Mann-Whitney U testy. Hodnoty Youngova modulu a délky aktinových filament byly také porovnávány neparametrickými Mann-Whitney U testy. Prezentované hodnoty představují medián, 1. a 3. kvartil jednotlivých parametrů.

5. Výsledky a diskuze

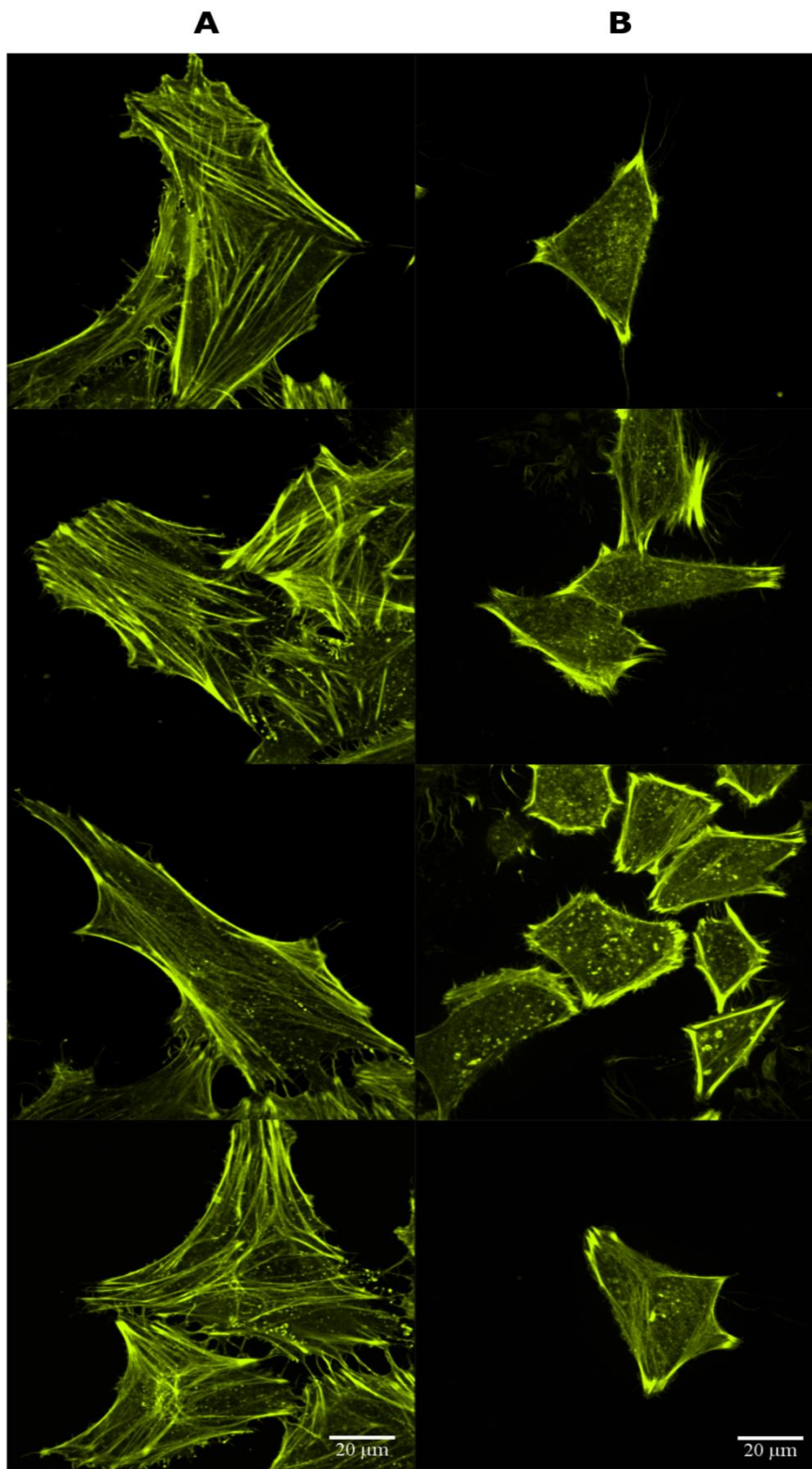
V této práci je hodnocen vliv fotodynamicky aktivních látek, konkrétně porfyrinových sensitizérů druhé generace – TMPyP a derivátů TPPS₄, na buněčné linie. Jako buněčné modely byly použity nádorové linie HeLa, odvozena z karcinomu děložního hrdla, a G361, odvozena z lidského melanomu, a nenádorové linie NIH 3T3, odvozena z myších fibroblastů. Pro vyhodnocení účinku jednotlivých fotosensitizérů byly převážně využity mikroskopické metody. První metodou je mikroskopie atomárních sil, jež se řadí mezi techniky mikroskopie skenující sondou. Metoda AFM se liší oproti tradiční optické mikroskopie principem tvorby obrazu a přináší tak nové informace o zkoumaném systému. Další mikroskopickou metodou je konfokální mikroskopie, konkrétně konfokální mikroskopie s rotujícím diskem. Tento typ mikroskopie využívá fluorescenčního barvení a spolu s upravenou konstrukcí mikroskopu poskytuje obraz s vyšším rozlišením.

Pro zhodnocení účinku fotodynamicky aktivních látek je nutné nejdříve vyloučit cytotoxicitu daných látek. Testy viability jsou založeny na různých vlastnostech živých a usmrcených buněk jako je enzymatická aktivita, membránová propustnost, produkce ATP a buněčná adheze. Mezi cytotoxické testy patří například MTT, WST, XTT, tryptofanová modř atd. (Dojindo Molecular Technologies Inc., © 2017). MTT test patří mezi standardní testy životnosti a představuje kvantitativní spektrofotometrickou metodu, která analyzuje schopnost buněčné proliferace na základě mitochondriální aktivity živých buněk. Metoda sleduje aktivitu mitochondriálních dehydrogenáz, které jsou schopné metabolizovat tetrazoliovou sůl MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl tetrazolium bromid) na barevně odlišný formazan. Ve vodném roztoku nerozpustný formazan tvoří krystaly, které je možné rozpustit v organickém rozpouštědle, např. dimethylsulfoxid. Vyšší počet proliferujících buněk se projeví vyšší koncentrací formazanu. Fotosensitizéry byly přidány k buněčným liniím a byly provedeny testy viability. Bylo zjištěno, že nádorové buněčné linie vykazují nižší hodnotu IC₅₀ než linie nenádorové, což lze mimo jiné vysvětlit tak, že nádorové buňky mají vyšší schopnost akumulace sensitizéru. Selektivita nádorové tkáně je ve své podstatě poměr mezi koncentrací fotosensitizéru v nádorové a okolní tkáni. Tento poměr lze však velmi obtížně odhadnout, neboť závisí na schopnosti vychytávat (uptake) a uvolňovat (clearance) sensitizér a na faktorech, které uptake a clearance ovlivňují. Mezi tyto faktory např. patří vaskularizace, rychlost proliferace nebo nízké pH. Selektivita a zacílení nádoru je také ovlivněna hydrofobicitou sensitizéru a spřažením s nosnou molekulou (Jori, 1996). Vzhledem k možnosti lokalizace tumoru je třeba brát v potaz vlastnost tetrapyrrolových látek, a to schopnost vázat se navzájem a na sérové proteiny. Na vyšší koncentraci PS v nádoru má také vliv farmakokinetika. U sensitizéru s pomalejší farmakokinetikou je dána vyšší koncentrace v nádoru spíše selektivní retencí (Castano, Demidova *et* Hamblin, 2005b). Nicméně zvýšená schopnost

akumulace sensitizéru v nádorových tkáních je požadována vlastnost fotosensitizéru a předpokládá vyšší účinnost fotochemické reakce a vyšší efektivitu terapie (Allison *et Sibata*, 2010).

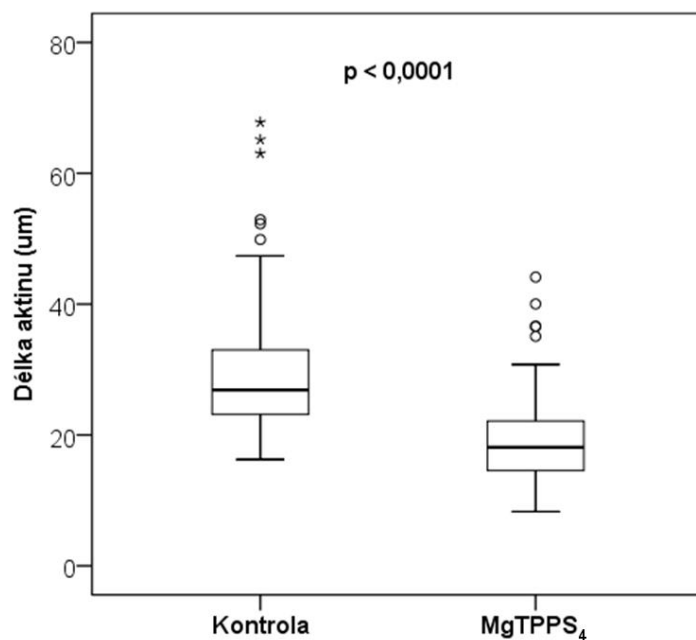
Buněčná lokalizace fotosensitizérů výrazně ovlivňuje výsledek fotodynamického ošetření, navíc určuje místo primárního poškození a buněčné odpovědi (Szurko *et al.*, 2009). Na molekulární úrovni je poškození nádorové tkáně prostřednictvím PDT způsobeno nevratným poškozením důležitých subcelulárních struktur, např. plasmatická membrána nebo membrány mitochondrií, lysozomů, Golgiho aparátu nebo endoplasmatického retikula. Jelikož se většina sensitizérů nehromadí v buněčném jádře, má PDT menší potenciál poškozovat DNA v porovnání s ozařováním rentgenovými paprsky (Buytaert, Dewaele *et Agostinis*, 2007). Sensitizér TPPS₄ byl lokalizován napříč cytoplasmou v buněčné linii Vero (Austen *et al.*, 1978) a v mitochondriích buněčné linie CT-26 (Weizman *et al.*, 2000), zatímco TMPyP byl lokalizován v jádře buněčné linie HL-60 (Tada-Oikawa *et al.*, 2009). Lokalizace fotosensitizéru je také důležitá z toho hlediska, že singletní kyslík má krátkou střední dobu života a je schopen difundovat přibližně 20 nm od místa svého vzniku (Tsai *et al.*, 2005). Tudiž struktury bohaté na kyslík a s vysokou koncentrací PS budou primárními místy poškození po ozáření. Existuje několik faktorů, které ovlivňují lokalizaci PS. Mezi ně patří fyzikálně chemické vlastnosti jako lipofilita a náboj, navázání na lipoproteiny nebo speciální transportní systémy jako jsou liposomy nebo cílené protilátky (Plaetzer *et al.*, 2003).

Místa primárního působení fotosensitizérů je mnoho, např. plasmatická membrána, mitochondrie, Golgiho aparát nebo lysosomy. Zacílení PS na cytoskeletální strukturu buňky je důležitý faktor protinádorových terapií, neboť cytoskelet hraje důležitou roli ve většině buněčných procesů spojených s progresí tumoru (Barata *et al.*, 2015). Cytoskelet je hlavně tvořen třemi rozdílnými komponentami – mikrofilamenty, intermediálními filamenty a mikrotubuly. Celkově tvoří vláknitou síť, která se skládá z různých proteinů, a jako celek vykazuje jedinečné strukturální a funkční vlastnosti (Liu, Wu *et Berkam*, 2010). Mechanismus buněčné smrti je také výrazně závislý na míře ovlivnění cytoskeletální struktury buňky. Apoptóza indukovaná fotodynamickou reakcí způsobuje snížení exprese F-aktinu a vinkulinu, naproti tomu PDT indukovaná nekróza se projevuje okamžitým buněčným poškozením a zabraňuje tak rozkladu vinkulinu. Nicméně vinkulin má obdobnou distribuci po poškození PDT jako u kontrolních buněk. Poškození a změna distribuce F-aktinu a mikrotubulů jsou rozdílné a závažnější v případě nekrózy oproti apoptóze (Di Venosa *et al.*, 2015). Některé fotosensitizéry, včetně porfyrinů, mohou ovlivnit mikrotubulární systém a vést tak k blokádě buněčného cyklu při přechodu z metafáze do anafáze, což vede k buněčné smrti mitotickou katastrofou (Juarranz *et al.*, 2001).

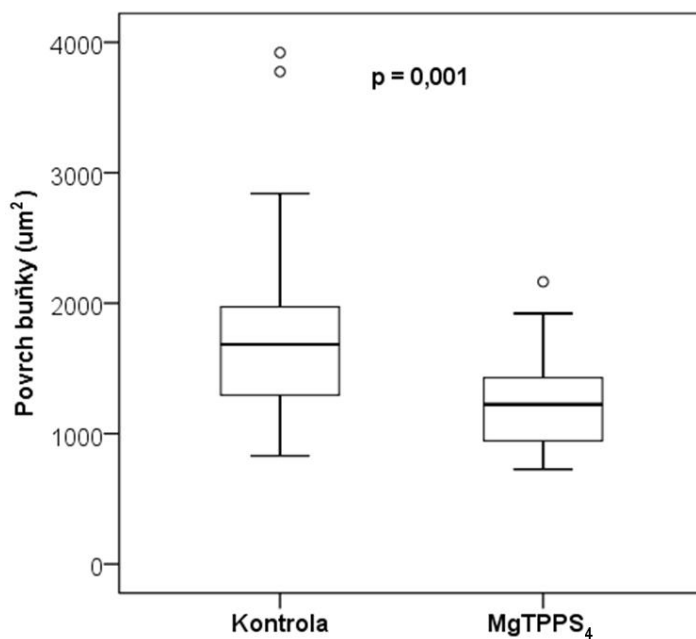


Obr. 9: Změna rozdělení aktinových vláken před (A) a po (B) navození fotodynamické reakce senzitizerem MgTPPS₄ u buněčné linie HeLa. Aktin byl barven fluorescenční sondou Alexa Fluor 532 Phalloidin.

Fotodynamická terapie indukuje dramatické změny v buněčné morfologii a v cytoskeletu v závislosti na míře ozáření, koncentraci fotosensitizeru a době po ozáření (Jung *et al.*, 2009). Udává se, že aktin je z cytoskeletálních proteinů nejvíce ovlivněn PDT, nehledě na to, zdali se jedná o počáteční fáze nebo pokročilé fáze fotopoškození (Di Venosa *et al.*, 2015). Při hodnocení vlivu PDT za použití sensitizeru MgTPPS₄ na síť aktinových vláken byla pozorována rozsáhlá redistribuce těchto mikrofilament (obr. 9). Pozorování bylo provedeno pomocí konfokální mikroskopie za použití fluorescenční sondy Alexa Fluor 532 Phalloidin, což je mykotoxin izolovaný z houby *Amanita phalloides* vázající se na F-aktin. Dále byla provedena analýza obrazu a naměřena délka aktinových vláken a určena plocha buněk. Pro určení délky aktinových filament byly vybrány 3 jasně ohraničené filamenta z každé buňky. Délka aktinových vláken dosahuje mediánu 26,88 μm pro kontrolní buňky a 18,12 μm pro buňky, které podstoupily PDT. První kvartil dosahuje 23,10 μm a třetí kvartil 33,07 μm u kontrolních buněk, a 14,55 μm a 22,13 μm u ovlivněných buněk. Při statistickém zhodnocení je patrná signifikantně vyšší hodnota pro kontrolní buňky ($p < 0,001$). Obrázek 10 představuje distribuci délek aktinových vláken ve formě filament s vyznačenými mediány a jednotlivými kvartily. Plocha buněk adherovaných k substrátu byla určena výpočtem z celkové plochy zaujímané buňkami a podělena počtem buněčných jader. Medián, 1. kvartil a 3. kvartil nabývá hodnot 1683 μm^2 , 1294 μm^2 a 1989 μm^2 pro kontrolu a 1223 μm^2 , 935 μm^2 , 1432 μm^2 pro ovlivněné buňky. Mann-Whitney U test prokázal statisticky signifikantní rozdíl plochy mezi kontrolními a ovlivněnými buňkami ($p < 0,001$). Na obrázku 11 lze pozorovat rozpětí plochy zaujímající buňky s vyznačenými mediány a jednotlivými kvartily. Liu, Wu *et Berkam* (2010) pozorovali dramatickou ztrátu cytoplasmatického G-aktinu po terapii, přičemž mikrofilamenta F-aktinu pod buněčnou membránou ubývaly pozvolně. Uzdensky *et al.* (2005) pozorovali po 5 – 10 minutách nárůst stresových aktinových vláken asi o polovinu u buněk ovlivněných fotodynamickou reakcí se subletální koncentrací ALA. Dle Juarranz *et al.* (2001) při použití subletálních dávek zinečnatého derivátu ftalocyaninu (ZnPc) si většina buněk zachovává podobnou morfologii jako neovlivněné buňky a F-aktin není výrazně ovlivněn. Při použití LD₂₀ nebo LD₆₀ (ZnPc) po 8 respektive po 24 h jsou buňky smršťené, ale stále jsou viditelné svazky aktinových filament. V přeživších buňkách lze pozorovat reverzi poškození aktinových vláken po 24 h respektive po 48 h po použití LD₂₀ respektive LD₆₀ ZnPC (Juarranz *et al.*, 2001). Liu, Wu *et Berkam* (2010) pozorovali změnu celkového množství aktinu v ovlivněných buňkách, což je však v rozporu se zjištěními Juarranz *et al.* (2001) a Casas *et al.* (2008), kteří rozdíl nezaznamenali. Za zmínku také stojí fakt, že změna F-aktinu po PDT je závislá na buněčné linii, a tedy buňky rezistentní k PDT vykazují vyšší nebo nižší stupeň organizace F-aktinu v závislosti na typu buněčné linie a použitým fotosensitizeru (Di Venosa *et al.*, 2015).



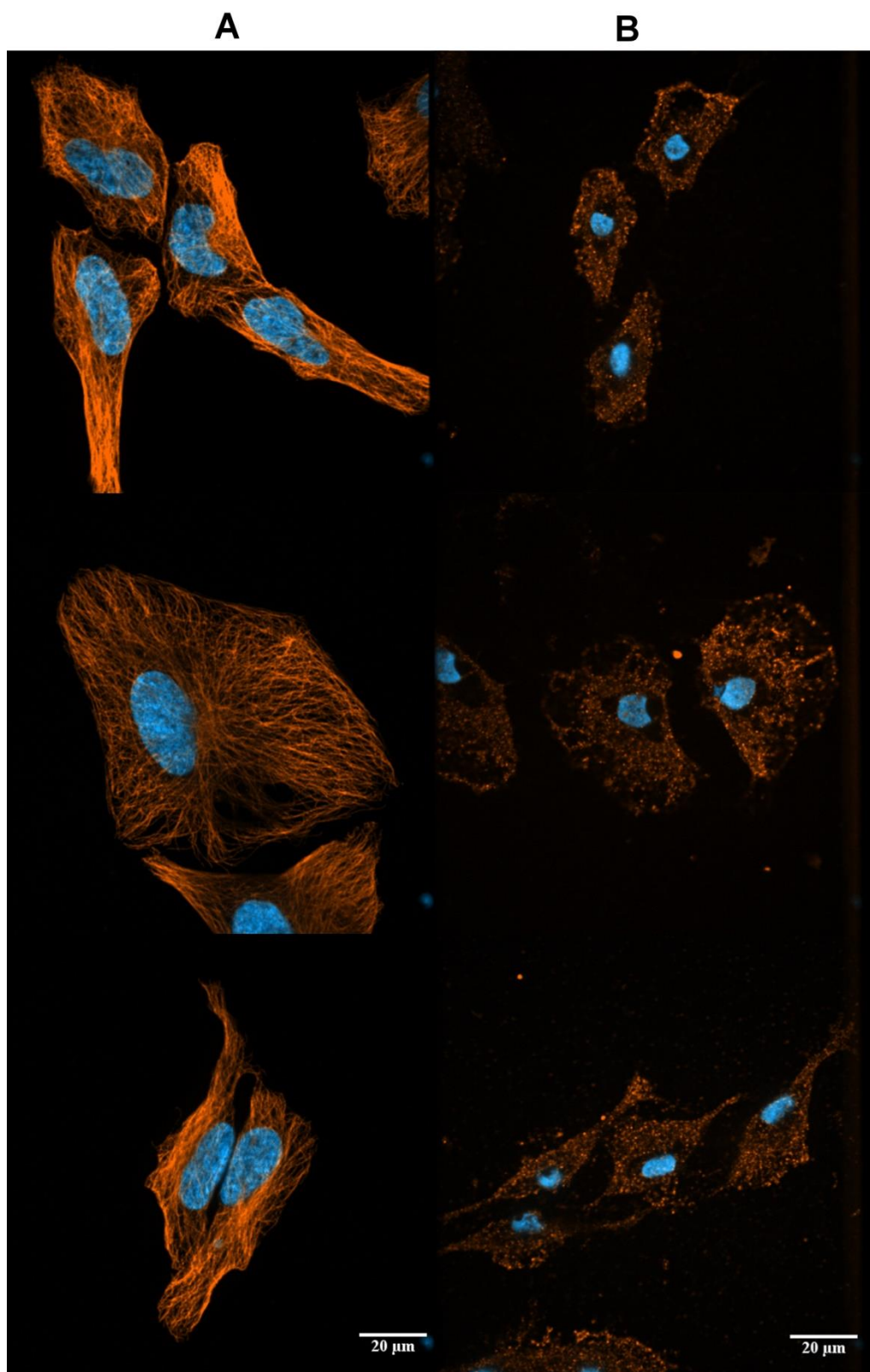
Obr. 10: Distribuce délek aktinových vláken. Mann-Whitney U test prokázal statisticky signifikantní rozdíl mezi kontrolními buňkami a buňkami po fotodynamickém ošetření ($p < 0,001$).



Obr. 11: Plocha adherovaných buněk k substrátu. Plocha byla určena výpočtem z celkové plochy zaujímané buňkami a vydělena počtem jader. Mann-Whitney U test prokázal statisticky signifikantní rozdíl mezi kontrolními buňkami a buňkami po fotodynamickém ošetření ($p = 0,001$).

Mikrotubuly (MT) tvoří dynamickou strukturu, která se účastní řady buněčných funkcí, např. segregace chromosomů, určení tvaru buňky a organizace uvnitř cytoplasmy. Všechny tyto procesy jsou založeny na schopnosti polymerizace a depolymerizace MT, jenž tak tvoří velmi dynamickou strukturu (Barata *et al.*, 2015). Organizace mikrotubulů byla studována pomocí fluorescenčního dvoustupňového imunocytochemického značení na konfokálním mikroskopu s rotujícím diskem. Primární protilátka se váže na α -tubulin, na kterou je následně navázána sekundární fluorescenční protilátka DyLight 550. Na obr. 12 lze pozorovat dobře rozvinutou síť mikrotubulů u kontrolních buněk a rozsáhlou redistribuci a depolymerizaci MT sítě u buněk po navození fotodynamické reakce s fotosenzitizérem TMPyP. K fixaci a fluorescenčnímu barvení došlo 20 h po ozáření. Jung *et al.* (2009) předkládá časový průběh po fotodynamické terapii s derivátem feoforbidu, kdy v prvních 10 sekundách po ozáření může dojít k mírnému smrštění buňky a k počáteční fázi narušení mikrotubulů bez výrazných změn mikrofilament. Navíc se mohou na buněčné membráně objevovat malé váčky. Po 300 sekundách PDT indukuje morfologické změny a dochází k rozpoznatelnému zmenšení buňky s výraznějším nárůstem vezikul na buněčné membráně a vážným narušení MT. Ve dvojnásobném čase od ozáření (600 s) dochází k zintenzivnění předchozích změn a rozrušené mikrotubuly jsou patrné v membránových a extracelulárních váčkách. Vezikuly MT na membránách jsou obklopeny reorganizovanými mikrofilamenty, zatímco extracelulární mikrotubulové váčky jsou lokalizovány na extracelulárních mikrofilamentech (Jung *et al.*, 2009). Rozrušení mikrotubulů vede k tvorbě stresových vláken a spouští signalizační kaskádu závislou na integrinu (Uzdensky *et al.*, 2005). Při detailnější analýze buněk v metafázi lze pozorovat abnormality v uspořádání mikrotubulů a chromosomů. U mitotických buněk lze pozorovat změnu mitotického vřeténka (Barata *et al.*, 2015). Spolu se stejnou lokalizací hypericinů a mikrotubulů a nenormálním mitotickým vřeténkem způsobené subletální PDT může vést k pozastavení buněčného cyklu v G2/M fázi (Di Venosa *et al.*, 2015).

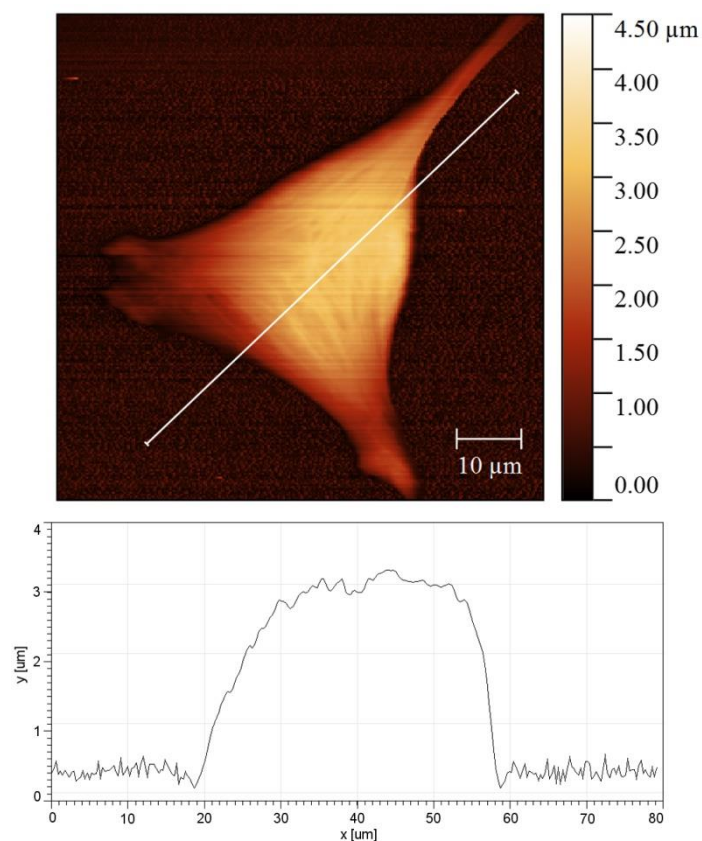
Intermediální filameny (IF) jsou velmi dynamickou strukturou a jsou reorganizovány během různých buněčných procesů, např. diferenciaci, mitózy, apoptózy. Existuje mnoho typů intermediálních filament s množstvím variací v jednotlivých podjednotkách. Různé typy IF jsou exprimovány v různých typech buněk. Vimentin lze nalézt v mnoha buňkách s mesenchymálním původem, desmin ve svalech, keratiny v epiteliálních buňkách (Alberts *et al.*, 2002). Liu, Wu *et al.* (2010) pozorovali reorganizaci cytokeratinu 8 a 18 u buněčné linie adenokarcinomu prostaty po navození fotodynamické reakce konjugátem pyrofeoforbidu doprovázené jejich agregací. Agregace cytokeratinů ovlivňuje dynamicky proces depolymerace a polymerace a vede k dysfunkci intermediálních filament.



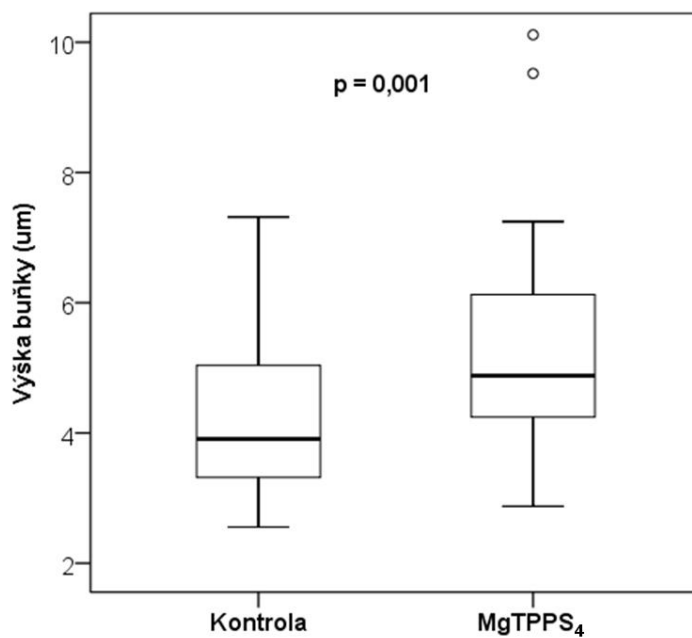
Obr. 12: Změna rozdělení mikrotubulů před (A) a po (B) navození fotodynamické reakce senzitizerem TMPyP u buněčné linie HeLa. Mikrotubuly byly barveny imunofluorescenčně anti- α -tubulinem a sondou DyLight 550, jádra byly barveny Hoechst 33258.

Ruiz-González *et al.* (2013) pozorovali pokles počtu elementů propojených s vinkulinem a nárůstem fluorescence v cytosolu buněk s apoptickým chromatinem a membránovými váčky. Tyto změny jsou spojovány s rozkladem stresových vláken. Adhezní ložiska (focal adhesions) jsou oblasti buňky, kde se buňka propojuje s extracelulární matrix a kde jsou napojeny aktinová stresová vlákna, strukturální proteiny vázající aktin a vinkulin. Adhezní ložiska jsou tvořeny adhezními receptory tzv. integriny (Suresh, 2007). Integriny pouze neuchycují buňku k extracelulární matrix, ale také interagují s mnoha dalšími makromolekulami a kontrolují některé kritické buněčné funkce, např. přežití a migraci, a dále se účastní několika signálních mechanismů. Odpověď integrinů na PDT se zdá být závislá na typu buněčné linie (Di Venosa *et al.*, 2015).

K zhodnocení změn morfologie byly využity také topografická data z mikroskopu atomárních sil. Obr. 13 představuje vyhodnocení topografie jednotlivých buněk. Pro každou buňku byl vytvořen liniový profil, který byl veden přes nejvyšší místo na buňce, a byla proměřována vertikální vzdálenost buňky od povrchu substrátu. Bylo zjištěno, že dochází ke statisticky významné změně výšky buněk, u kterých byla navozena fotodynamická reakce. Hladina významnosti p je menší než 0,001. Medián hodnot je 4,88 μm pro ovlivněné buňky a 3,91 μm pro kontrolní. Také byl určen 1. a 3. kvartil, který dosahuje 4,05 μm a 6,29 μm pro ovlivněné buňky a 3,31 μm a 5,08 μm pro kontrolu. Obrázek 14 představuje rozložení hodnot napříč měřenými daty výšky s vyznačenými mediány a jednotlivými kvartily. Ke změně tvaru dochází v důsledku stárnutí a patologických změn zapříčiněných nemocí, jak ukazuje Jin *et al.* (2010) na změnách erytrocytů u osob různého stáří a osob s diabetem. Ke ztrátě tvaru po PDT dochází po 30 minutách od ozáření a buňky ztrácí svůj pravidelný tvar. Přibližně po 3 hodinách se buňky začínají hroutit a buněčné jádro se začíná scvrkávat. Po 12 h se objevují buněčné úlomky, porušení membrány, další scvrkávání jádra a je pozorováno granulování chromatinu (Liu *et al.*, 2015).



Obr. 13: Liniový profil buněčné linie HeLa.



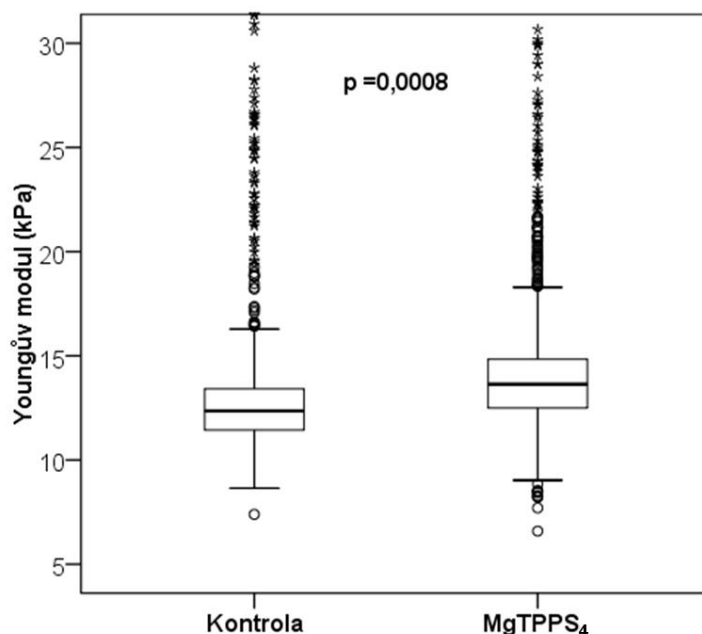
Obr. 14: Rozložení výšky buněčné linie HeLa před a po fotodynamické terapii. Mann-Whitney U test prokázal statisticky signifikantní rozdíl mezi kontrolními a ovlivněnými buňkami ($p = 0,001$).

Velmi časté je tvrzení, že struktura buňky určuje její funkci. Nicméně struktura není jediný definující faktor, patří mezi ně i chemické složení a mechanické vlastnosti. Buňka během svého života interaguje s vnějším prostředím např. změnou složení buněčných membrán (Caille *et al.*, 2002) či reorganizací cytoskeletálního systému (Petroll, Cavanagh *et Jester*, 2004). Reorganizace cytoskeletu se také projeví změnou mechanických vlastností (Chen *et al.*, 2010, Lulevich *et al.*, 2006, Milanovic *et al.*, 2012). Ke správnému určení mechanických vlastností je však třeba použít vhodný nástroj. Jedním z nejučinnějších je mikroskop atomárních sil (Binnig, Quate *et Gerber*, 1986, Rico *et al.*, 2005). AFM lze využít nejen pro zobrazení topografie zkoumaného systému, ale také k evaluaci mechanických vlastností za fyziologických podmínek. AFM může být také použito k dynamickému sledování změn tvaru buňky a změny mechanických vlastností například v průběhu farmakologické terapie (Rotsch *et Radmacher*, 2000, Li *et al.*, 2012). K měření mechanických vlastností je možné použít i jiné techniky jako jsou mikropipety (Zhou, Quek *et Lim*, 2010) či optické tweezery (Li *et al.*, 2009).

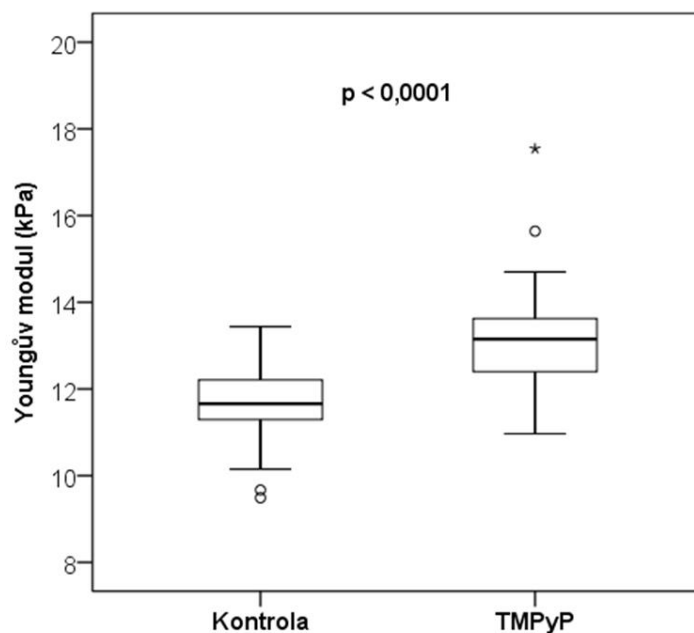
V makroskopickém měřítku jsou mechanické vlastnosti podstatné pro funkci jednotlivých tkání, jako jsou kosti, šlachy nebo zuby. Lze tedy předpokládat, že mechanické vlastnosti mají také vliv na mikroskopické úrovni. Určením těchto vlastností lze odhadnout chování jednotlivých proteinů a jejich svazků. Aktuální fyziologický stav buněk se také projevuje v jednotlivých buněčných charakteristikách, a proto by mělo být možné korelovat změnu mechanickou se změnou strukturální (Kasas *et Dietler*, 2008). Nanoindentace patří mezi přímé a běžně používané metody ke zjištění mechanických vlastností. Během tohoto procesu je vtlačen tuhý a ostrý hrot do vzorku přičemž je zaznamenávána použitá síla a hloubka vrypu. Právě indentace a módy silové modulace AFM patří k nejčastějším metodám pro určení elasticity s vysokým prostorovým rozlišením (Withers *et Aston*, 2006). Během těchto indentací/vrypů se zaznamenává závislost *síla – vzdálenost*, tzv. *F-d* křivky. Silové křivky jsou poté vyhodnocovány pomocí mnoha různých teoretických a empirických modelů.

První složkou cytoskeletálního systému deformovanou při indentaci hrotem AFM jsou aktinová mikrofilamenta. Přestože jsou aktinová vlákna rozprostřena v celém prostoru buňky, nejvyšší koncentrace dosahují ve vrstvě pod plasmatickou membránou (Pogoda *et al.*, 2012). Při zachování malé hloubky indentace budou hodnoty elasticity ovlivněny převážně mikrofilamenty aktinu. Na obrázku 15, 16, 17 a 18 lze pozorovat rozložení Youngova modulu (YM) u jednotlivých buněčných linií HeLa, G361 a NIH 3T3, u kterých byla navozena fotodynamická reakce fotosenzitizéry MgTPPS₄, ZnTPPS₄ a TMPyP. Youngův modul pružnosti reprezentuje míru elasticity materiálu a lze jej definovat jako poměr napětí a jím vyvolané deformace. Vyšší hodnotu modulu mají materiály, které potřebují vyšší napětí pro dosažení stejné deformace. Na

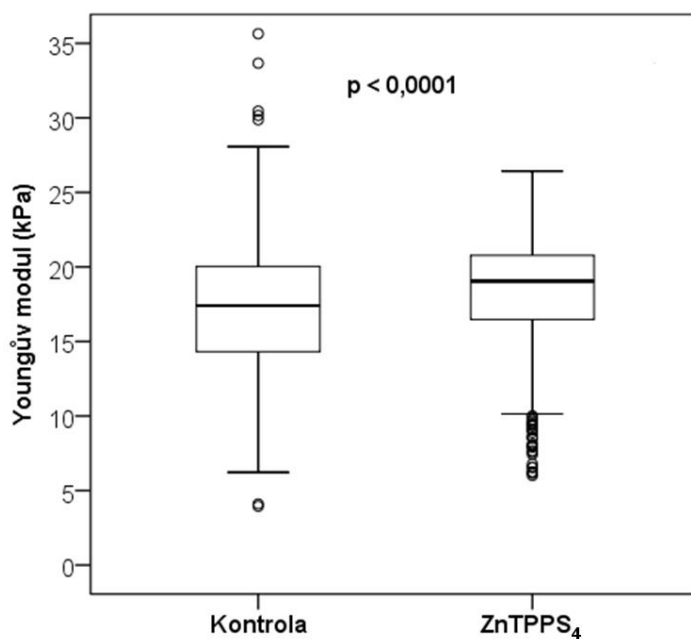
krabicových diagramech jsou také vyznačeny hodnoty mediánu, prvního a třetího kvartilu. Poměrně velká distribuce hodnot Youngova modulu naznačuje velkou diversitu rozložení aktinu 20 h po navození fotodynamické reakce. Na obr. 19 lze pozorovat detailnější rozložení povrchových a podpovrchových struktur – aktinu. Medián Youngova modulu pro nádorovou buněčnou linii HeLa, u které byla navozena fotodynamická reakce PS MgTPPS₄, je 13,4 kPa a 12,2 kPa pro kontrolu. První a třetí kvartil dosahuje 12,6 kPa a 14 kPa pro ovlivněné buňky a 11,9 kPa a 12,9 kPa pro kontrolní. Podle Mann-Whitney U testů je hodnota YM pro ovlivněné buňky statisticky signifikantně vyšší ($p < 0,001$). Při použití fotosensitizeru TMPyP u stejné buněčné linie dosahuje medián YM hodnotu 13,2 kPa a 11,7 kPa pro kontrolu. Jednotlivé kvartily mají hodnotu 12,4 kPa a 13,6 kPa pro fotodynamicky poškozené buňky a 11,3 kPa a 12,2 kPa pro kontrolní. Hodnoty mediánu se statisticky signifikantně liší na hladině významnosti $p < 0,001$. Youngův modul pružnosti se také statisticky signifikantně liší ($p < 0,001$) u nádorové buněčné linie G361 a použitím sensitizeru ZnTPPS₄, kdy medián hodnot dosahuje 19 kPa u ovlivněných buněk a 17,4 kPa u kontrolních. První a třetí kvartil dosahuje hodnot 16,5 kPa a 20,8 kPa u fotodynamicky poškozených buněk, a 14,3 kPa a 20 kPa u kontrolních. U nenádorové buněčné linie NIH 3T3 byl také hodnocen vliv fotodynamické reakce vyvolané PS ZnTPPS₄, avšak statisticky signifikantní rozdíl nebyl prokázán ($p = 0,428$). Medián YM v tomto případě dosahuje 19 kPa u ovlivněných buněk a 19,5 kPa u kontroly. Jednotlivé kvartily nabývají hodnot 16,6 kPa a 23,8 kPa u buněk po fotodynamické terapii a 17,9 kPa a 20,8 kPa u kontrolních buněk.



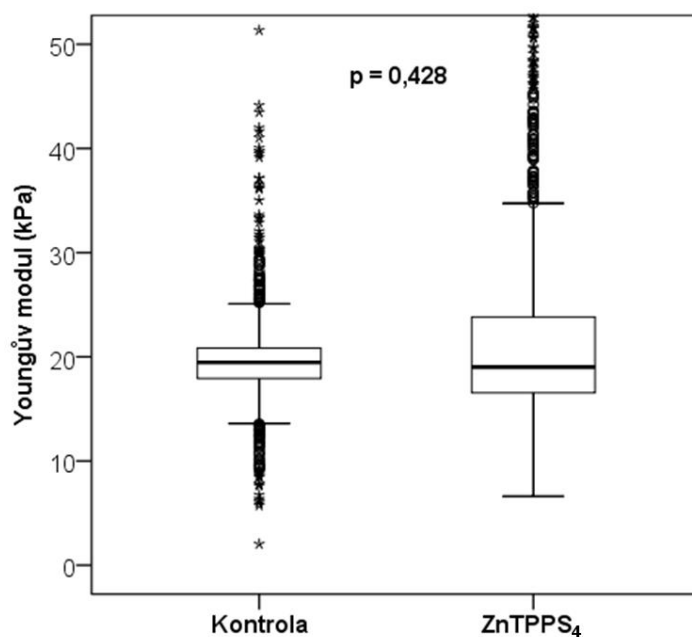
Obr. 15: Distribuce Youngova modulu pružnosti u buněčné linie HeLa. Fotodynamická reakce byla vyvolána sensitizerem MgTPPS₄. Mann-Whitney U test prokázal statisticky signifikantně vyšší hodnotu YM u buněk po fotodynamickém ošetření ($p < 0,001$).



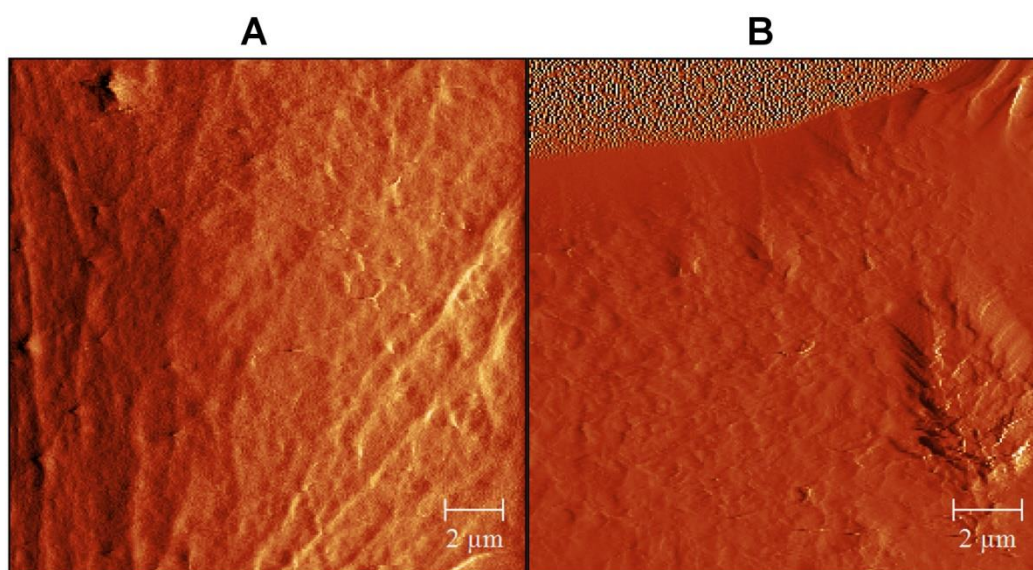
Obr. 16: Distribuce Youngova modulu pružnosti u buněčné linie HeLa. Fotodynamická reakce byla vyvolána sensitizérem TMPyP. Mann-Whitney U test prokázal statisticky signifikantní rozdíl hodnot u kontrolních a ovlivněných buněk ($p < 0,001$).



Obr. 17: Distribuce Youngova modulu pružnosti u buněčné linie G361. Fotodynamická reakce byla indukována sensitizérem ZnTPPS₄. Mann-Whitney U test prokázal statisticky signifikantně vyšší hodnotu YM u fotodynamicky poškozených buněk ($p < 0,001$).



Obr. 18: Distribuce Youngova modulu pružnosti u buněčné linie NIH 3T3. Fotodynamická reakce byla vyvolána senzitivizérem ZnTPPS₄. Mann-Whitney U test neprokázal statisticky signifikantní rozdíl hodnot YM ($p = 0,428$).



Obr. 19: Reorganizace aktinových vláken v povrchových a podpovrchových vrstvách buněčné linie HeLa. Fotodynamická reakce byla navozena senzitivizérem MgTPPS₄. A představuje kontrolní buňku, B ovlivněnou. Obraz byl nasnímán mikroskopem atomárních sil a představuje chybový kanál. Snímání probíhalo hrotem z nitridu křemíku o nominální hodnotě konstanty tuhosti 0,12 N/m s rychlostí skenování 0,2 Hz, velikost skenu je 30×30 μm.

Hodnota Youngova modulu se liší pro jednotlivé buněčné linie a může nabývat relativně širokého rozpětí. Kuznetsova *et al.* (2007) uvádí škálu YM pro různorodé buněčné linie, např. kardiocyty, erytrocyty, fibroblasty, endoteliální buňky, atd. Několik studií již poukázalo na korelaci mezi změnou tuhosti a elasticity s buněčnými procesy, jakými jsou např. buněčný růst a zrání, buněčná smrt, změna adheze, migrace, karcinogeneze, efekt oxidativního stresu či napadení viry a parazity (Hu *et al.*, 2009; Mustata *et al.*, 2010; Vilenko *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2015). Změna mechanických vlastností byla využita jako indikátor změn spojených s rakovinným bujením např. u karcinomu prsu (Li *et al.*, 2008), močového měchýře (Lekka *et al.*, 1999) a štítné žlázy (Prabhune *et al.*, 2012).

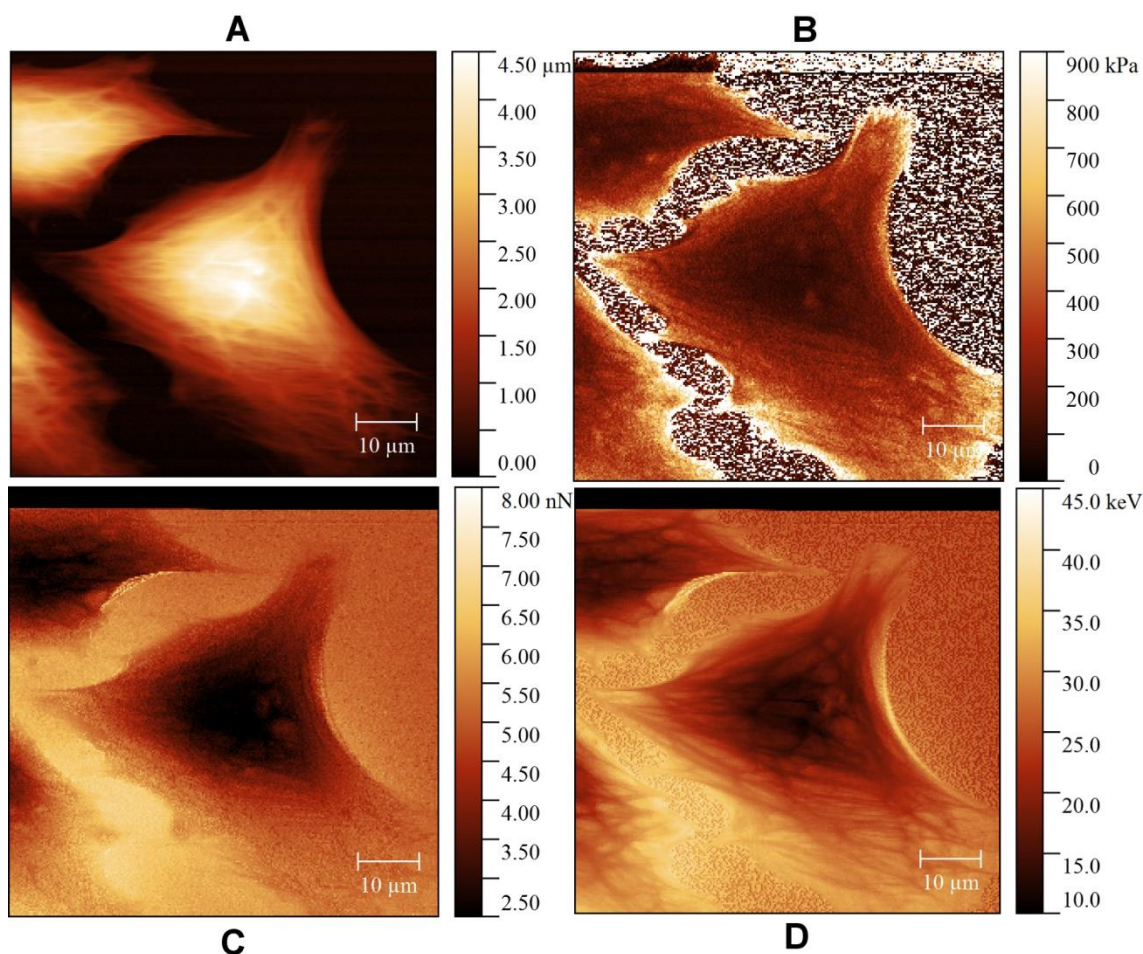
Tři základní biopolymery cytoskeletu mají rozdílnou odezvu vůči mechanickému působení: F-aktin obsažený v mikrofilamentech má vysokou odolnost proti deformaci až do určité kritické hodnoty místního působení tlaku a jeho Youngův modul byl určen na 1,3 – 2,5 GPa. Intermediální filameny dosahují hodnot Youngova modulu 1 – 5 GPa. Tato vlákna mají daleko nižší rezistenci k tlakové deformaci, avšak jsou vysoce odolná vůči smykové deformaci a tím udržují strukturální integritu buňky. Mikrotubuly, a v nich obsažený tubulin samostatně nemá dostatečnou pevnost a tuhost. Nicméně, působí v souladu s ostatními cytoskeletálními biopolymery a přispívá k celkové stabilitě cytoskeletu. Jeho Youngův modul byl určen 1,9 GPa (Suresh, 2007).

Vliv jednotlivých strukturálních elementů na celkovou mechanickou odpověď buňky byl námětem několika studií (Rotsch *et Radmacher*, 2000, Wakatsuki *et al.*, 2001, Kasas *et al.*, 2005). Použití látek ovlivňující strukturu aktinu, cytochalasin a lantrunculin, naznačuje, že hlavní vliv na mechanické vlastnosti buňky mají aktinová vlákna. Cytochalasin narušuje aktinová vlákna zatímco lantrunculin inhibuje polymerizaci aktinu. Při použití obou látek došlo k poklesu Youngova modulu (Rotsch *et Radmacher*, 2000, Wakatsuki *et al.*, 2001). Naopak, při použití látek, které narušují nebo stabilizují mikrotubuly, nebyl prokázán efekt na celkovou elasticitu (Kasas *et al.*, 2005). Kasas *et al.* (2005) také poukázal na změnu průběhu silové křivky. Při použití látek ovlivňující aktin došlo ke změně počáteční části silové křivky. Při průniku hrotu hlouběji do buňky se silová křivka zplošťuje, neboť narazila na oblast bohatší na mikrotubuly.

Youngův modul určený pomocí AFM by měl být brán jako relativní hodnota a porovnání je možné jedině při stejných experimentálních podmínkách. Nejčastěji je YM jednotlivých buněčných linií získán na základě Hertzově a Sneddonově kontaktní teorie, které předpokládají nekonečnou tloušťku indetovaného materiálu a axiálně symetrického vtažení hrotu. Nicméně buňky nejsou izotropní materiál, proto by měly být hodnoty YM brány jako relativní. Rozdíly hodnot YM u stejné buněčné linie měřené v rozdílných laboratořích může být dáno nedodržením stejných experimentálních podmínek (Lekka *et al.*, 2012). Kromě rozdílných podmínek existují

další faktory, které ovlivňují hodnotu Youngova modulu, jak shrnuje Lekka *et al.* (2012). První faktor, který je třeba brát v potaz, je hloubka indentace, neboť buňka má vysokou strukturální heterogenitu. Pro malé hloubky YM představuje elasticitu oblasti bohaté na aktinová vlákna. Pro větší hloubky hodnota YM klesá a lze jej interpretovat jako elasticitu celé buňky. Druhým faktorem je použitý substrát, na kterém jsou buňky uchyceny. Použitím modifikovaného substrátu dojde ke změně adheze a rozložení cytoskeletu, což v konečném důsledku ovlivní hodnotu YM. Třetí faktor představuje rychlost indentace. Při použití vyšších rychlostí vtlačování hrotu se hodnota YM také zvýší. Mezi další faktory patří lokalizace na buňce a doba, po kterou probíhá experiment.

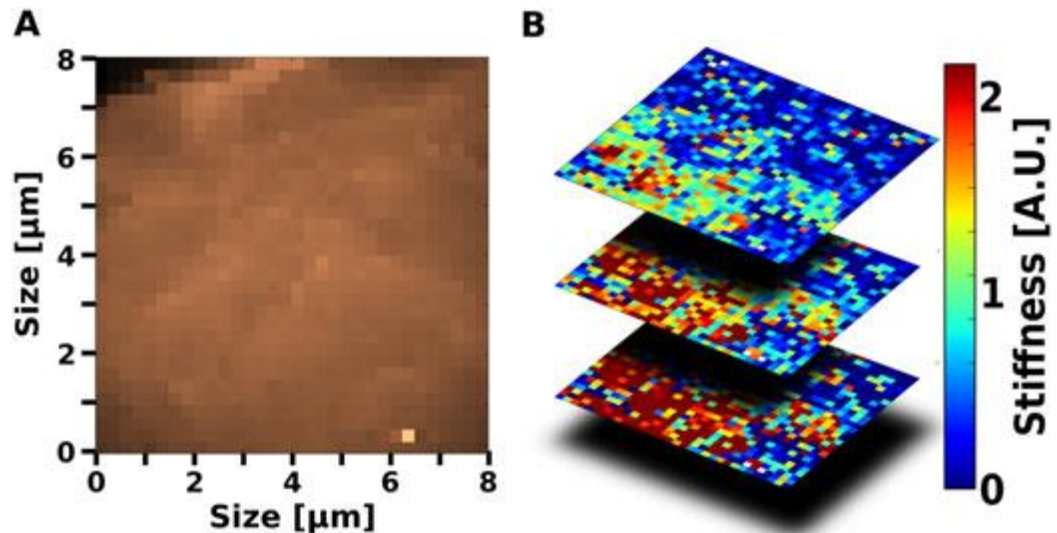
Zobrazování buněčných linií a obecně biologických vzorků prostřednictvím mikroskopu atomárních sil patří mezi velice obtížné aplikace této techniky. AFM je obecně navrženo tak, aby poskytovalo obrazy s vysokým rozlišením na tvrdých a rovných površích, což biologické materiály ve většině případů nesplňují. Buňky jsou v porovnání se skenujícím hrotem velké a lehce deformovatelné, což zvyšuje riziko poškození nejen dané části mikroskopu, ale i buněk. Základem pořízení reprodukovatelného obrazu je pevné připoutání preparátu k substrátu. Jako substrát je možno využít mnoha materiálů, měli by však splňovat základní kritérium atomárně rovného povrchu. Mezi časté substráty patří sklo, čerstvě odštipnutá slída, nebo HOPG (vysoce organizovaný pyrolytický grafit). Pokud není možné uchytit vzorek k substrátu, je možné jeho fyzikálně chemické vlastnosti modifikovat nejrůznějšími činidly. Mezi nejčastější činidla patří poly-L-lysin, poly-L-arginin, fibronectin nebo 3-aminopropyltriethoxysilan. Ideální metody imobilizace by měly umožňovat zobrazování živých buněk ve fyziologických podmínkách (Morris, Kirby *et Gunning*, 1999). Volba operačního módu a nastavení parametrů zpětné vazby výrazně ovlivňuje výsledný obraz, a správné nastavení snižuje riziko poškození zkoumaného vzorku a skenujícího hrotu. K zobrazení buněčných linií bylo použito operačního módu PeakForce QNM. Tento operační mód kromě topografie zaznamenává silové křivky a v reálném čase je analyzuje a zobrazuje pomocí barevných map jednotlivých vlastností v daném datovém kanálu, viz. obrázek 20. Při analýze silových křivek se získává hodnota Youngova modulu pomocí modelu DMT, dále adheze, disipační energie a maximální deformace. PeakForce QNM je mnohem rychlejší než běžná nanoindentace, kde jeden cyklus probíhá obvykle s frekvencí 0,5 – 10 Hz (Sweers *et al.*, 2011).



Obř. 20: Zobrazení buněčné linie HeLa pomocí operačního módu PeakForce QNM. A – výškový kanál, B – kanál modulu pružnosti (fitovací model DMT), C – kanál adheze, D – kanál disipační energie. Tmavá barva naznačuje nižší hodnotu daného parametru, např. v B tmavá hodnota představuje nižší hodnotu YM a měkčí oblast na buňce. Snímání probíhalo hrotem z nitridu křemíku o nominální hodnotě konstanty tuhosti 0,12 N/m s rychlostí skenování 0,2 Hz, velikost skenu je 70×70 μm.

Tomografie tuhosti (stiffness tomography) představuje zajímavou alternativu analýzy silových křivek. S touto změnou zpracování $F-d$ křivek přišel Roduit *et al.* (2009). $F-d$ křivka umožňuje určit Youngův modul pružnosti fitováním vhodného matematického modelu, přičemž je potřeba znát tvar hrotu a Poissonův poměr pro měřený vzorek. Nejčastěji se v biologických aplikacích využívá Hertzovy a Sneddonovy teorie kontaktu, jak bylo zmíněno výše, která předpokládá, že indentovaný materiál je homogenní, izotropní a nekonečně velký. V analýze stiffness tomography je substrát považován za kompozitní strukturu, a může obsahovat „inkluzy“, jež změni tvar silové křivky deterministickým způsobem. Pro provedení analýzy je nejdříve potřeba získat $F-d$ křivku, při které je hrot AFM vtlačován do vzorku a je zaznamenávána změna ohybu nosníku. Poté je od získané křivky odečtena křivka naměřené na tvrdém, nedeformovatelném povrchu jako je např. safírová destička. Následuje rozdělení křivky

na jednotlivé segmenty, jejichž velikost je volitelná uživatelem. Posledním krokem je fitování vhodně zvoleného teoretického modelu na jednotlivé segmenty křivky. Hlavním rozdílem mezi standardní analýzou $F-d$ křivek a stiffness tomography je aplikace teoretického modelu. U standardní analýzy je model fitován na celou křivku, u stiffness tomography je křivka nejdříve rozdělena a poté je na každou část aplikován vybraný model. Takto získaná data představují 3D mapu pružnosti zkoumaného objektu (obr. 21). Mohou tak být zvýrazněné struktury, které by zůstaly skryty při použití standardní analýzy.



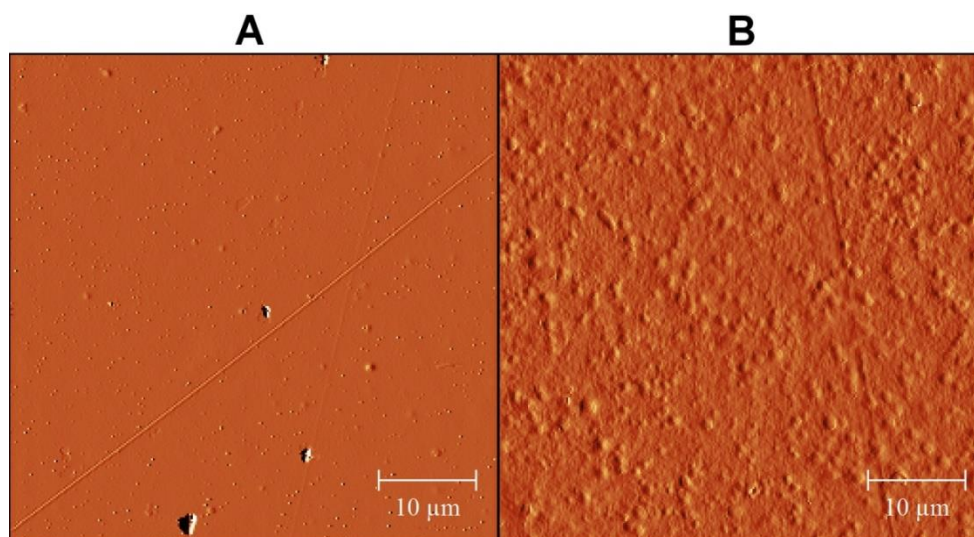
Obr. 21: Topografie fixovaného makrofágu (A) a mapy tuhosti v 0, 20 a 40 nm (B). Červená barva představuje vyšší tuhost. Převzato z Roduit et al. (2012).

6. Další pozorování pomocí mikroskopie atomárních sil na Ústavu lékařské biofyziky, LF UP v Olomouci

6.1. Studium polymerních filmů kyseliny hyaluronové

Kyselina hyaluronová (Hyaluronic acid, HA) je lineární polysacharid o vysoké molekulové hmotnosti skládající se z opakujících se disacharidových jednotek kyseliny D-glukuronové a N-acetylglukosaminu propojených $\beta(1,4)$ a $\beta(1,3)$ glykosidickými vazbami. Kyselina hyaluronová je důležitou složkou extracelulární matrix, slouží jako lubrikant a účastní se sorpce a retence vody, a dalších buněčných funkcí, např. migrace, proliferace. Z tohoto důvodu je HA zajímavá jako biokompatibilní a biodegradabilní polymer pro aplikace ve farmakologii nebo tkáňovém inženýrství. Hlavní nevýhody HA mohou být rychlá rozpustnost ve vodě, špatná mechanická stabilita a rychlé odbourávání *in vivo*. Pro překonání těchto nevýhod je možné využít fyzikálních a chemických kros linků (Foglarova *et al.*, 2016).

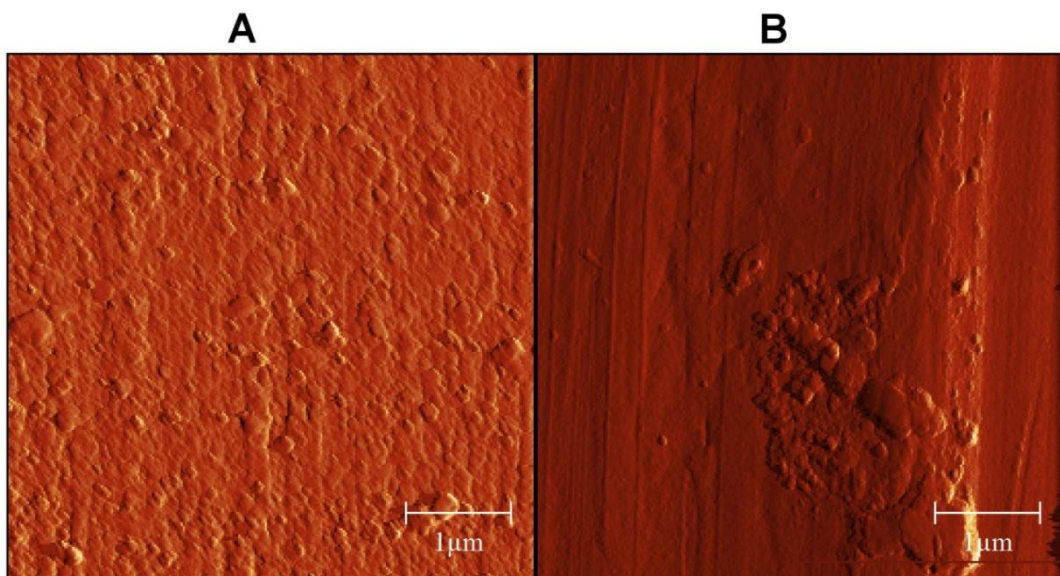
Mezi základní evaluaci polymerních filmů patří i zhodnocení povrchových charakteristik. AFM je k tomu velmi vhodný nástroj, neboť poskytuje trojrozměrný obraz povrchu studovaných systémů. Na obr. 22 lze porovnat spodní a svrchní stranu gelového polymeru kyseliny hyaluronové. Spodní substrátová strana je hladká s ojedinělými prachovými částicemi a škrábanci. Horní strana vykazuje agregátní struktury. Pravděpodobná příčina vzniku agregátů leží ve výrobním procesu. Filmy jsou totiž tvořeny ze směsi solventů s různým tlakem par, s rozdílnou rychlostí vypařování, a agregáty tedy vznikají při sušení (Foglarova *et al.*, 2016).



Obr. 22: Zobrazení polymeru kyseliny hyaluronové ze spodní (A) a svrchní (B) strany. Snímání probíhalo hrotem z nitridu křemíku o nominální hodnotě konstanty tuhosti 0,12 N/m s rychlostí skenování 0,2 Hz, velikost skenu je 50×50 µm.

6.2. Charakterizace Ni-Ti endodontických nástrojů

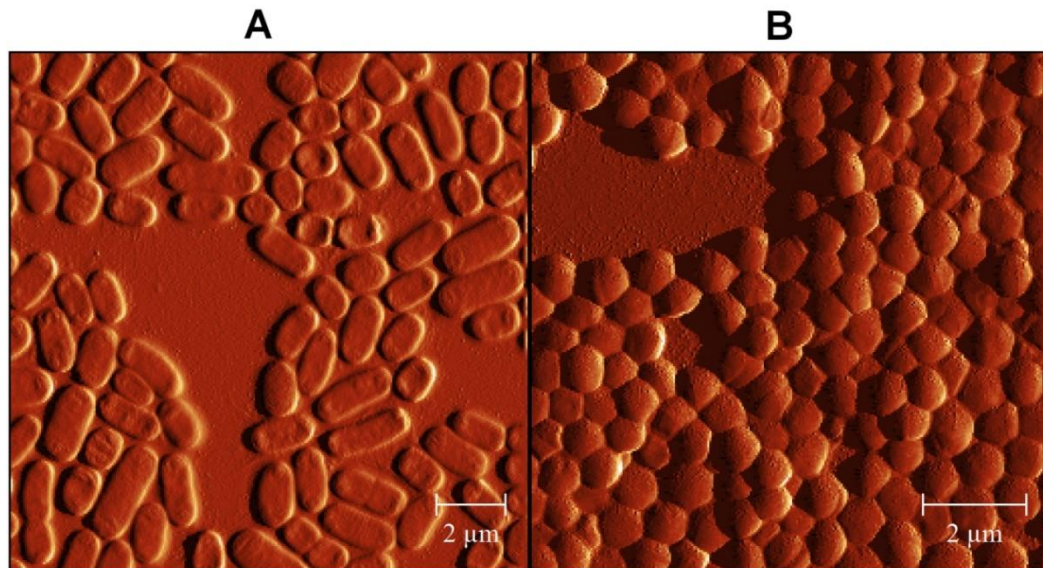
Nikl-titanové (Ni-Ti) rotační nástroje si získaly velkou popularitu v zubařské praxi, zejména v oblasti endodoncie. Ni-Ti nástroje mají oproti nástrojům z nerezové oceli několik výhodných vlastností, jimiž jsou zejména superelastická a zvýšená odolnost vůči torzním frakturám, což přináší zjednodušení, urychlení a zkvalitnění endodontického ošetření (Gutmann *et* Gao, 2012). Přestože Ni-Ti rotační nástroje mají mnoho předností, jejich použití mohou přesto provázet komplikace, z nichž nejobávanější je fraktura nástroje v kořenovém kanálku. K frakturám endodontických nástrojů nedochází zcela nahodile, ale mají původ v povrchových nedokonalostech, které mohou vznikat např. při výrobě, ale také opakovaným používáním a vystavováním desinfekčním a výplachovým roztokům (Inan *et al.*, 2007). Charakterizace povrchových struktur pomocí AFM přináší možnost kontroly nástrojů v nanometrickém měřítku a možnost zkvalitnit tak výrobní procesy. Obr. 23 zobrazuje povrch Ni-Ti endodontických nástrojů českého výrobce Medin, a. s. a světového výrobce Dentsply Maillefer. Pro zhodnocení kvality povrchu je často používán parametr RMS, střední kvadratická odchylka. Při porovnání nástrojů jednotlivých výrobců byly nalezeny signifikantní rozdíly.



Obr. 23: Povrch Ni-Ti rotačních endodontických nástrojů. A – nástroj Unicore fy Medin, a. s., B – nástroj WaveOne GOLD fy DentsplyMaillefer. Zobrazení probíhalo hrotem z nitridu křemíku o nominální hodnotě konstanty tuhosti 0,4 N/m s rychlostí 0,8 Hz, velikost skenu je $5 \times 5 \mu\text{m}$.

6.3. Studium bakterií

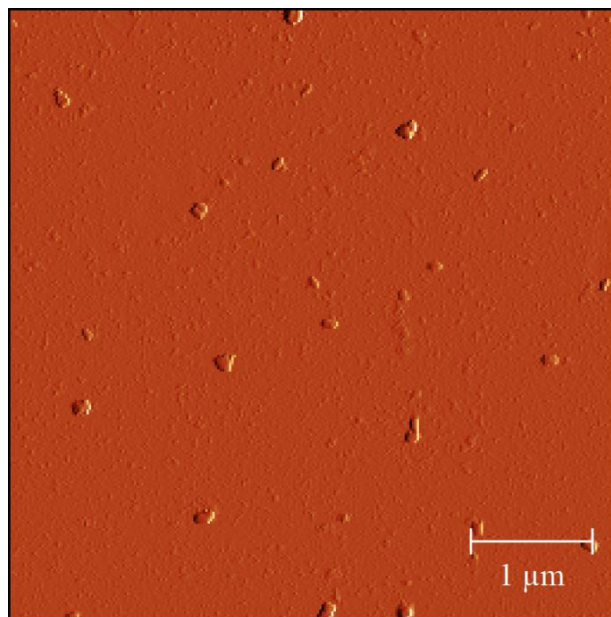
Bakterie patří mezi prvotní formy života na Zemi a v dnešní době jejich biomasa značně převyšuje biomasu rostlin a živočichů. Velikost bakterií se obvykle pohybuje v rozmezí 0,3 – 5 μm a zaujímá širokou škálu tvarů, jako jsou koule, tyčinky, spirály (Kasas, Longo *et* Dietler, 2013). V porovnání s živočišnými buňkami je zobrazení mikrobiálních buněk jasnější a spolehlivější díky rigidní povaze buněčného povrchu. Živé buňky jsou velmi dynamické struktury a neustále reagují na změnu okolí. Výhodou AFM je schopnost sledovat dynamickou změnu struktury a remodelaci buňky, která nastává na popud okolního prostředí nebo aplikováním terapie. Zobrazování interakcí patogenů s léčivými v reálném čase umožňuje nalézt nové poznatky o fungování antibiotik a umožňuje screening nových antimikrobiálních molekul (Müller *et* Dufrene, 2011). Na obr. 24 jsou zobrazeny gram pozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* a gram negativní bakterie *Klebsiella pneumoniae*.



Obr. 24: Zobrazení bakteriálních kmenů *Klebsiella pneumoniae* (A) a *Staphylococcus aureus* (B). Snímání probíhalo hrotem z nitridu křemíku o nominální hodnotě konstanty tuhosti 0,7 N/m s rychlostí 0,5 Hz, velikost skenu je 15×15 μm (A) a 10×10 μm (B).

6.4. Studium nanočástic stříbra

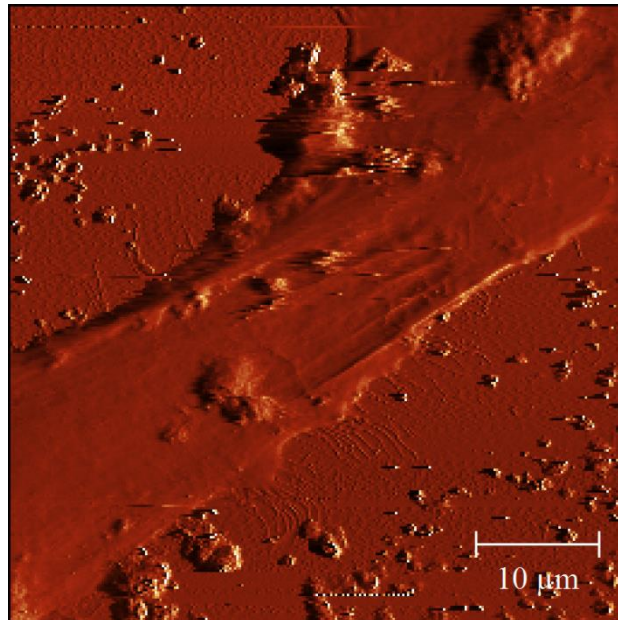
Nanočástice stříbra mají charakteristické fyzikálně chemické vlastnosti, mezi něž patří vysoká elektrická a tepelná vodivost, chemická stabilita, katalytická aktivita a nelineární optické vlastnosti. Díky jejich baktericidním účinkům jsou stříbrné nanočástice nejčastějším používaným nanomateriálem. Lze je nalézt např. v textiliích, kosmetice, čisticích prostředcích pro domácnost, obalech pro potraviny, chladničkách, dezinfekcích vody atd. Nezanedbatelnou úlohu také hrají v nemocnicích a medicínských zařízeních např. při ošetření ran a popálenin (Chopra, 2007). Komerčně dostupné nanočástice jsou obvykle dostupné ve velikostech 1 – 100 nm a jejich povrch je často modifikován. Vodní suspenze nanočástic jsou často monodispersní a tvorbu aglomerátů lze ovlivnit roztoky s různou iontovou silou, specifickými kationty a přítomností dalších biologických molekul a organických sloučenin (MacCuspie *et al.*, 2011). Charakterizace nanočástic je důležitým krokem ve studiu jejich účinků, neboť zásobní roztoky komerčně dostupných nanočástic nejsou dostatečně charakterizovány a mohou obsahovat nečistoty. Obr. 25 představuje topografii nanočástic stříbra.



Obr. 25: Nanočástice stříbra. Ke snímání byl použit hrot z nitridu křemíku o nominální hodnotě konstanty tuhosti 0,4 N/m. Rychlost skenu byla 0,3 Hz, velikost je 5×5 μm.

6.5. Studium nanočástic oxidu titaničitého

Oxid titaničitý (TiO_2) patří mezi často užívaný nanomateriál. Primárně se používá jako pigment díky vysokému refrakčnímu indexu, jasů a odolnosti vůči přebarvení. Téměř 70% produkce TiO_2 nanočástic se používá jako pigment v barvách, glazurách, plastech, papíru, vláknech, farmacii a kosmetice. Kromě toho může být také použit jak antimikrobiální agens a UV filtr (Weir *et al.*, 2012). TiO_2 nanočástice byly klasifikovány jako potenciální karcinogen. Taktéž by neměl být podceňován jeho genotoxický potenciál. Na druhou stranu bylo provedeno mnoho toxikologických studií, které poukázali na to, že nanočástice kovů nepenetrují do kůže a tudíž kosmetické produkty obsahující tyto nanočástice mohou být považovány za bezpečné. Obr. 26 zobrazuje pokrytí buněčné linie BJ agregáty nanočástic oxidu titaničitého v koncentraci 156 mg.l^{-1} .



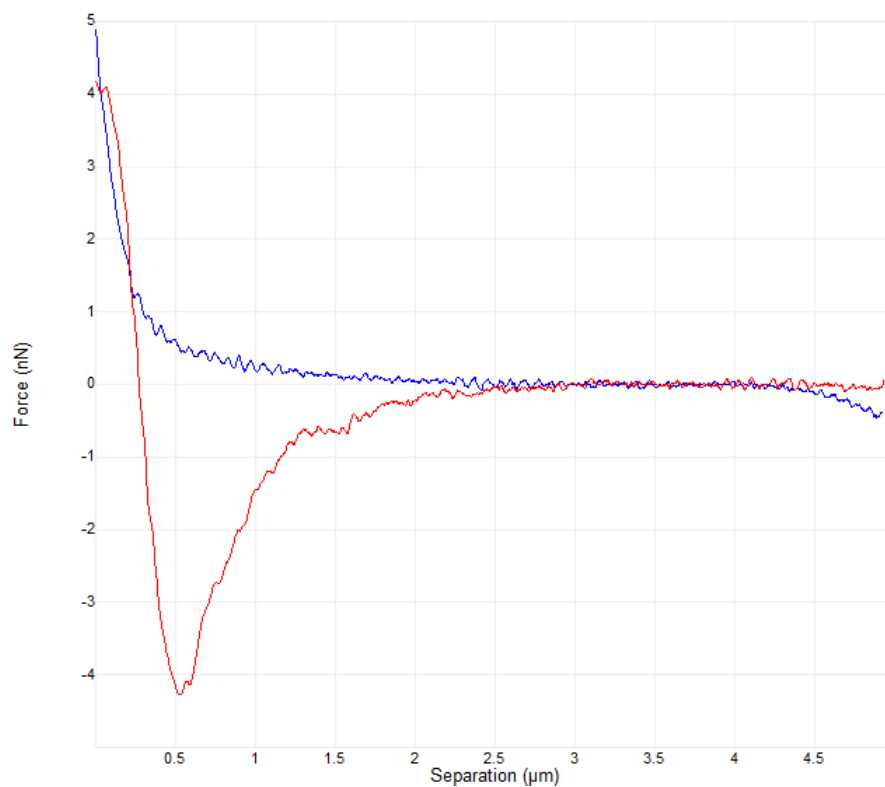
Obr. 26: *Buněčná linie BJ s nanočásticemi oxidu titaničitého. Koncentrace částic TiO_2 je 156 mg.l^{-1} . Snímání probíhalo hrotem z nitridu křemíku o nominální hodnotě konstanty tuhosti $0,12 \text{ N/m}$ s rychlostí skenování $0,2 \text{ Hz}$, velikost skenu je $50 \times 50 \text{ μm}$*

6.6. Vazebné síly a adheze

AFM spektroskopie je schopna kvantifikovat množství inter a intramolekulárních interakcí, které určují vlastnosti biologických molekul a biomateriálů. AFM je často používána k určení mezimolekulárních vazebných sil u mnoha systému *in vitro*. Může tak být např. změřena vazebná síla párů receptor – ligand, např. biotin – streptavidin, nebo antigen – protilátka (Franz *et Puech*, 2008).

Kromě jednotlivých interakcí mezi jednotlivými molekulami, lze využít AFM spektroskopii k charakterizaci mechanismů zapříčiňující buněčnou adhezi. Interakce adhezních proteinů s okolním prostředím může spustit signální dráhy různých buněčných funkcí, jako jsou migrace, genová exprese, buněčné přežití, organizace a diferenciaci. Kvantifikace adheze je velmi složitá a neexistuje obecný model nebo teoretická analýza, která by přednesla systematickou a kvantitativní interpretaci experimentálních pozorování. Samotná adheze buněk k extracelulární matrix je dána klastry adhezních receptorů a proteiny propojených s cytoskeletem. Buněčná adheze se tak skládá z množství jednotlivých vazebných míst, což vede k jinému dynamickému chování v porovnání s interakcemi jednotlivých molekul. Navíc většina adhezních komplexů je mechanicky propojena s cytoskeletem, a na ně vyvíjená tažná síla je přenášena i na síť mikrofilamentů (Rico *et al.*, 2007).

Typické měření adheze se skládá ze záznamu závislosti *síla – vzdálenost*. Pro zhodnocení adheze se analyzuje retrakční část závislosti a určuje se nejvyšší působící síla, případně práce potřebná k celkovému odtrhnutí hrotu. Adheze je často brána jako síla potřebná k odtržení hrotu (Rico *et al.*, 2007). Obr. 27 představuje typickou silovou křivku, ze které se odvozují jednotlivé mechanické vlastnosti.



Obr. 27: Silová křivka. Záznam proveden v operačním módu *Force Volume*, při měření mechanických vlastností buněčné linie HeLa. Snímání probíhalo hrotem z nitridu křemíku o nominální hodnotě konstanty tuhosti 0,12 N/m. Rychlost záznamu F-d křivek je 5,58 Hz.

7. Závěr

Od vzniku mikroskopických metod skenující sondou a objevení mikroskopie atomárních sil, se tyto mikroskopické metody rozvíjí značným tempem a objevují se nové aplikace v nejrůznějších oborech. Pravděpodobně největší výhodou mikroskopie atomárních sil je její schopnost zobrazovat živé biologické vzorky v přirozeném prostředí a poskytovat detailní obraz v řádu nanometrů. Během posledního desetiletí se AFM také stalo široce používaným nástrojem ke studiu mechanických vlastností napříč různými vědeckými obory, včetně oblasti živých systémů. Komplexnost biologických struktur však představuje nejednu výzvu při propojování experimentálních dat s teoretickými modely.

V této práci byla využita mikroskopie atomárních sil spolu s fluorescenční konfokální mikroskopií k evaluaci fotodynamicky aktivních látek na živé systémy. Tyto látky po ozáření a za přístupu kyslíku mohou vyvolávat značný oxidativní stress, které může vést k nevratným změnám v místě působení. Tento způsob interakce je základem pro fotodynamickou terapii, což je jedna z možných terapeutických metod léčby některých nádorových onemocnění. PDT se těší značné pozornosti mimo jiné díky své selektivitě a specifitě. Fotodynamicky aktivní látky jsou zde označovány jako fotosensitizéry, a již několik typů bylo schváleno pro klinické použití. V práci byly hodnoceny sensitizéry porfyrinové povahy TMPyP a deriváty TPPS₄, jež se řadí mezi PS druhé generace. Pro vyšší účinek fotodynamické terapie se využívá navázání centrálních kovů a polokovů, z nichž některé prodlužují trvání tripletového stavu sensitizéru a zvyšují tak jeho účinnost. Živé systémy představovaly nádorové buněčné linie HeLa (karcinom děložního hrdla), G361 (lidský melanom) a nenádorové buněčné linie NIH 3T3 (myší fibroblasty). Jako zdroj ozáření k navození fotodynamické reakce byl užit ozařovač z LED diod vhodné vlnové délky – 414 nm.

Cytoskeletální systém je nedílnou součástí buňky a účastní se mnoha buněčných funkcí, např. adheze, motility, dělení a poskytuje strukturální integritu. Změny napříč sítí cytoskeletálních proteinů se projeví mimo jiné i ve změně mechanických vlastností. Aplikace PDT na zkoumané buněčné linie vyvolala reorganizaci cytoskeletu, která byla pozorována fluorescenčním značením jednotlivých složek. Jako projev změny mechanických vlastností byl použit Youngův modul pružnosti. Po fotodynamickém ovlivnění došlo také ke změně hodnoty YM, což bylo statisticky průkazné u nádorových buněčných linií. Změnu mechanických charakteristik lze např. využít k rozpoznání benigních a maligních buněk v pleurálním výtoku pacientů s podezřením na metastáze adenokarcinomu (Cross *et al.*, 2007). Stanovení lokálních elastických vlastností buněk v jejich přirozeném prostředí tak otvírá možnost detekce vlivu různých faktorů na mechanické vlastnosti buněk. Odhad mechanických vlastností buněk pomocí AFM se tak zdá být perspektivní metodou diagnostiky různých chorob. Avšak spolu s rostoucím

počtem důkazů o propojení mechanických a chemických vlastností s biologickými funkcemi je potřeba zpřesnit jejich získání a následnou analýzu.

Reference

- ABDELGHANY S. M., SCHMID D., DEACON J., JAWORSKI J., FAY F., MCLAUGHLIN K. M., GORMLEY J. A., BURROWS J. F., LONGLEY D. B., DONNELLY R. F., SCOTT C. J. Enhanced antitumor activity of the photosensitizer meso-tetra(N-methyl-4-pyridyl) porphine tetra tosylate through encapsulation in antibody-targeted chitosan/alginate nanoparticles. *Biomacromolecules*. 2013, **14**(2), 302-310.
- ADAMCIK J., BERQUAND A., MEZZENGA R. Single-step direct measurement of amyloid fibrils stiffness by peak force quantitative nanomechanical atomic force microscopy. *Applied Physics Letters*. 2011, **98**(19), 193701.
- AGOSTINIS P., BERG K., CENGEL K. A., FOSTER T. H., GIROTTI A. W., GOLLNICK S. O., HAHN S. M., HAMBLIN M. R., JUZEINE A., KESSEL D., KORBELIK M., MOAN J., MROZ P., NOWIS D., PIETTE J., WILSON B. C., GOLAB J. Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2011, **61**(4), 250-281.
- ALBERTS B., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WALTER P. *Molecular biology of the cell*. 4th edition. New York: Garland Science, 2002, 907-982. ISBN 0-8153-4072-9.
- ALEXIADES-ARMENAKAS M. Laser-mediated photodynamic therapy. *Clinics in Dermatology*. 2006, **24**(1), 16-25.
- ALLISON R. R., CUENCA R., HU X. H., CHILDS C. J. H., SIBATA C. H. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2004, **1**(1), 27-42.
- ALLISON R. R., SIBATA C. H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2010, **7**(2), 61-75.
- AUSTEN J.D., MCCONNELL S., CARRANO C.J., TSUTSUL M. Intracellular localization of meso-Tetra(p-sulfophenyl)porphine: a potential tumor localizing agent. *Cancer treatment reports*. 1978, **62**(4), 511-518.
- BABJUK M., STEPP H., JIRSA M., HOFSTETTER A., DVOŘÁČEK J. Hodnocení fotodynamického účinku syntetického porfyriu TPPS4 [meso-tetra(4-sulfonatophenyl) porphine] na buňky lidského nádoru močového měchýře. *Česká urologie*. 2000, **4**(4), 11-16.
- BARATA J. F. B., ZAMARRÓN A., NEVES M. G. P. M. S., FAUSTINO M. AMPARO F., TOMÉ A. C., CAVALEIRO J. A. S., RÖDER B., JUARRANZ A.,

- SANZ-RODRÍGUEZ F. Photodynamic effects induced by meso-tris(pentafluorophenyl)corrole and its cyclodextrin conjugates on cytoskeletal components of HeLa cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015, **92**, 135-144.
- BARDEL D. The invention of the microscope. *BIOS*. 2004, **75**(2), 78-84.
- BINNIG G., QUATE C. F., GERBER C. Atomic force microscope. *Physical Review Letters*. 1986, **56**(9), 930-933.
- BRANCALEON L., MOSELEY H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers in Medical Science*. 2002, **17**(3), 173-186.
- BUTT H.-J., CAPPELLA B., KAPPL M. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surface Science Reports*. 2005, **59**, 1-152.
- BUYTAERT E., DEWAELE M., AGOSTINIS P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007, **1776**(1), 86-107.
- CAILLE N., THOUMINE O., TARDY Y., MEISTER J. J. Contribution of the nucleus to the mechanical properties of endothelial cells. *Journal of Biomechanics*. 2002, **35**(2), 177-187.
- CAPPELLA B., DIETLER G. Force-distance curves by atomic force microscopy. *Surface Science Reports*. 1999, **34**(1-3), 1-104.
- CASAS A., SANZ-RODRIGUEZ F., DI VENOSA G., RODRIGUEZ L., MAMONE L., BLÁZQUEZ A., JAÉN P., BATLLE A., STOCKERT J. C., JUARRANZ A. Disorganisation of cytoskeleton in cells resistant to photodynamic treatment with decreased metastatic phenotype. *Cancer Letters*. 2008, **270**(1), 56-65.
- CASTANO A. P., DEMIDOVA T. N., HAMBLIN M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2004, **1**(4), 279-293.
- CASTANO A. P., DEMIDOVA T. N., HAMBLIN M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two – cellular signalling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2005, **2**(1), 1-23.
- CASTANO A. P., DEMIDOVA T. N., HAMBLIN M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part three – photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2005, **2**(2), 91-106.

- CROSS S. E., JIN Y. S., RAO J. GIMZEWSKI J. K. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nature Nanotechnology*. 2007, **2**(12), 780-783.
- DI VENOSA G., PEROTTI CH., BATLLE A., CASAS A. The role of cytoskeleton and adhesion proteins in the resistance to photodynamic therapy. Possible therapeutic interventions. *Photochemical and Photobiological Sciences*. 2015, **14**(8), 1451-1464.
- ETHIRAJAN M., SAENZ C., GUPTA A. DOBHAL M. P., PANDEY R. K. Photosensitizers for photodynamic therapy and imaging. HAMBLIN M. R., MRÓZ P., ed. *Advances in photodynamic therapy: Basic, translational, and clinical*. Norwood (Massachusetts): Artech House, 2008, 13-39. ISBN 978-1-59693-277-7.
- FOGLAROVÁ M., CHMELAŘ J., HUERTA-ANGELES G., VÁGNEROVÁ H., KULHÁNEK J., BARTOŇ TOMÁNKOVÁ K., MINAŘÍK A., VELEBNÝ V. Water-insoluble thin films from palmitoyl hyaluronan with tunable properties. *Carbohydrate Polymers*. 2016, **144**, 68-75.
- FRANZ C. M., PUECH P. H. Atomic force microscopy: A versatile tool for studying cell morphology, adhesion and mechanics. *Cellular and Molecular Bioengineering*. 2008, **1**(4), 289-300.
- GACZYNSKA M., OSMULSKI P. A. AFM of biological complexes: What can we learn? *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. 2008, **13**(5), 351-367.
- GOLEK F., MAZUR P., RYSZKA Z., ZUBER S. AFM image artifacts. *Applied Surface Science*. 2014, **304**, 11-19.
- GUO Q., XIA Y., SANDIG M., YANG J. Characterization of cell elasticity correlated with cell morphology by atomic force microscope. *Journal of Biomechanics*. 2012, **45**(2), 304-309.
- GUTMANN J. L., GAO Y. Alteration in the inherent metallic and surface properties of nickel-titanium root canal instruments to enhance performance, durability and safety: a focused review. *International Endodontic Journal*. 2012, **45**(2), 113-128.
- HANAKOVA A., BOGDANOVA K., TOMANKOVA K., PIZOVA K., MALOHLAVA J., BINDER S., BAJGAR R., LANGOVA K., KOLAR M., MOSINGER J., KOLAROVA H. The application of antimicrobial photodynamic therapy on *S. aureus* and *E. coli* using porphyrin photosensitizers bound to cyclodextrin. *Microbiological Research*. 2014, **169**, 163-170.
- HAMBLIN M. R., MRÓZ P. History of PDT: The first hundred years. HAMBLIN M. R., MRÓZ P., ed. *Advances in photodynamic therapy: Basic, translational, and clinical*. Norwood (Massachusetts): Artech House, 2008, 1-12. ISBN 978-1-59693-277-7.

- HAMBLIN M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Current Opinion in Microbiology*. 2016, **33**, 67-73.
- HU M., WANG J., ZHAO H., DONG S., CAI J. Nanostructure and nanomechanics analysis of lymphocyte using AFM: from resting, activated to apoptosis. *Journal of Biomechanics*. 2009, **42**(10), 1513–1519.
- CHAN A. L., JUAREZ M., ALLEN R., VOLZ W., ALBERTSON T. Pharmacokinetics and clinical effects of mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6) photodynamic therapy in adult patients with primary or secondary cancer of the skin and mucosal surfaces. *Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine*. 2005, **21**(2), 72-78.
- CHEN Q., XIAO P., CHEN J. N., CAI J. Y., CAI X. F., DING H., PAN Y. L. AFM studies of cellular mechanics during osteogenic differentiation of human amniotic fluid-derived stem cells. *Analytical Science*. 2010, **26**(10), 1033-1037.
- CHOPRA I. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: A useful development or a cause for concern? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007, **59**(4), 587-590.
- INAN U., AYDIN C., UZUN O., TOPUZ O., ALACAM T. Evaluation of the surface characteristics of used and new ProTaper instruments: An atomic force microscopy study. *Journal of Endodontics*. 2007, **33**(11), 1334-1337.
- JANDT K. D. Atomic force microscopy of biomaterials surfaces and interfaces. *Surface Science*. 2001, **491**(3), 303-332.
- JEROME W. G., PRICE R. L. Fluorescence microscopy. PRICE R. L., JEROME W. G., ed. *Basic confocal microscopy*. New York: Springer Science+Business Media, 2011, 29-59. ISBN 978-0-387-78174-7.
- JIN H., XING X., ZHAO H., CHEN Y., HUANG X., MA S., YE H., CAI J. Detection of erythrocytes influenced by aging and type 2 diabetes using atomic force microscope. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010, **391**(4), 1698-1702.
- JORI G. Tumour photosensitizers: Approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1996, **36**(2), 87-93.
- JUARRANZ A., ESPADA J., STOCKERT J. C. VILLANUEVA A., POLO S., DOMINGUEZ V., CANETE M. Photodamage induced by zinc(II)-phthalocyanine to microtubules, actin, α -actinin and keratin of HeLa cells. *Photochemistry and Photobiology*. 2001, **73**(3), 283-289.

- JUNG S. H., PARK J. Y., YOO J. O., SHIN I., KIM Y. M., HA K. Identification and ultrastructural imaging of photodynamic therapy-induced microfilaments by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*. 2009, **109**(12), 1428-1434.
- KASAS S., DIETLER G. Probing nanomechanical properties from biomolecules to living cells. *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology*. 2008, **456**(1), 13-27.
- KASAS S., LONGO G., DIETLER G. Mechanical properties of biological specimens explored by atomic force microscopy. *Journal of Physics D - Applied Physics*. 2013, **46**(13), 133001.
- KASAS S., WANG X., HIRLING H., MARSAULT R., HUNI B., YERSIN A., REGAZZI R., GRENNINGLOH G., RIEDERER B., FORRO L., DIETLER G., CATSICAS S. Superficial and deep changes of cellular mechanical properties following cytoskeleton disassembly. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 2005, **62**(2), 124-132.
- KESSEL D. Hematoporphyrin and HpD: Photophysics, photochemistry and phototherapy. *Photochemistry and Photobiology*. 1984, **39**(6), 851-859.
- KESSEL D. Photodynamic therapy: from the beginning. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2004, **1**(1), 3-7.
- KOLÁŘOVÁ H. Optické metody a přístrojová technika. NAVRÁTIL L., ROSINA J., ed. *Medicínská biofyzika*. Praha: Grada Publishing, 2005, 241-256. ISBN 80-247-1152-4.
- KOUDINOVA N. V., PINTHUS J. H., BRANDIS A., BRENNER O., BENDEL P., RAMON J., ESHHAR Z., SHERZ A., SALOMON Y. Photodynamic therapy with Pd-bacteriopheophorbide (Tookad): Successful *in vivo* treatment of human prostatic small cell carcinoma xenografts. *International Journal of Cancer*. 2003, **104**(6), 782-789.
- KUBÁT P., MOSINGER J. Photophysical properties of metal complexes of meso-tetrakis(4-sulphonatophenyl)porphyrin. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 1996, **96**(1-3), 93-97.
- KUBÍNEK R., VŮJTEK M., MAŠLÁŇ M. *Mikroskopie skenující sondou*. Olomouc: Vydavatelství Univerzity Palackého v Olomouci, 2003. ISBN 80-244-0602-0.
- KÜBLER A. C. Photodynamic therapy. *Medical Laser Application*. 2005, **20**(1), 37-45.
- KUDINOVA N. V., BEREZOV T. T. Photodynamic therapy of cancer: Search for ideal photosensitizer. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2010, **4**(1), 95-103.

KUZNETSOVA T. G., STARODUBTSEVA M. N., YEGORENKOV N. I., CHIZHIK S. A., ZHDANOV R. I. Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron*. 2007, **38**(8), 824-833.

LANG K., MOSINGER J., WAGNEROVÁ D. M. Photophysical properties of porphyrinoid sensitizers non-covalently bound to host molecules; models for photodynamic therapy. *Coordination Chemistry Reviews*. 2004, **248**(3-4), 321-350.

LEE S. M., NGUYEN T. H., NA K., CHO I. J., WOO D. H., OH J. E., LEE C. J., YOON E. S. Nanomechanical measurement of astrocyte stiffness correlated with cytoskeletal maturation. *Journal of Biomedical Material Research A*. 2015, 103, 365–370.

LEKKA M., LAIDLER P., GIL D., LEKKI J., STACHURA Z., HRYNKIEWICZ A. Z. Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*. 1999, **28**(4), 312-316.

LEKKA M., POGODA K., GOSTEK J., KLYMENKO O., PRAUZNER-BECHCICKI S., WILTOWSKA-ZUBER J., JACZEWSKA J., LEKKI J., STACHURA Z. Cancer cell recognition – Mechanical phenotype. *Micron*. 2012, **43**(12), 1259-1266.

LI M., LIU L. Q., XI N., WANG Y. C., DONG Z. L., XIAO X. B., ZHANG W. J. Drug-induced changes of topography and elasticity in living B lymphoma cells based on atomic force microscopy. *Acta Physico-Chimica Sinica*. 2012, **28**(6), 1502-1508.

LI Q. S., LEE G. Y. H., ONG C. N., LIM C. T. AFM indentation study of breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008, **374**(4), 609-613.

LI Y., WEN C., XIE H., YE A. P., YIN Y. J. Mechanical property analysis of stored red blood cell using optical tweezers. *Colloids and Surfaces B – Biointerfaces*. 2009, **70**(2), 169-173.

LIM H. S. Development and optimization of a diode laser for photodynamic therapy. *Laser Therapy*. **20**(3), 195-203.

LIU J., ZHENG L., LI Y., ZHANG Z., ZHANG L., SHEN L., ZHAN X., QIAO H. Effect of DTPP-mediated photodynamic therapy on cell morphology, viability, cell cycle, and cytotoxicity in a murine lung adenocarcinoma cell line. *Lasers in Medical Science*. 2015, **30**(1), 181-191.

LIU T., WU L. Y., BERKMAN C. E. Prostate-specific membrane antigen-targeted photodynamic therapy induces rapid cytoskeletal disruption. *Cancer Letters*. 2010, **296**(1), 106-112.

- LU P. J. Confocal scanning optical microscopy and nanotechnology. YAO N., WANG Z. L., ed. *Handbook of microscopy for nanotechnology*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2005, 3-24. ISBN 1-4020-8006-9
- LULEVICH V., ZINK T., CHEN H. Y., LIU F. T., LIU G. Y. Cell mechanics using atomic force microscopy-based single-cell compression. *Langmuir*. 2006, **22**(19), 8151-8155.
- MACCUSPIE R. I., ROGERS K., PATRA M., SUO Z., ALLEN A. J., MARTIN M. N., HACKLEY A. Challenges for physical characterization of silver nanoparticles under pristine and environmentally relevant conditions. *Journal of Environmental Monitoring*. 2011, **13**(5), 1212-1226.
- MANG T. S. Lasers and light sources for PDT: past, present and future. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2004, **1**(1), 43-48.
- MERTZ J. *Introduction to optical microscopy*. Greenwood Village (Colorado): Roberts and company publishers, 2010. ISBN 978-09815194-8-7.
- MILOVANOVIC P., POTOČNIK J., DJONIC D., NIKOLIC S., ZIVKOVIC V., DJURIC M., RAKOCEVIC Z. Age-related deterioration in trabecular bone mechanical properties at material level: Nanoindentation study of the femoral neck in women by using AFM. *Experimental Gerontology*. 2012, **47**(2), 154-159.
- MORRIS V. J., KIRBY A. R., GUNNING A. P. *Atomic force microscopy for biologist*. Singapore: Imperial College Press, 1999, 254-310. ISBN 1-86094-199-0.
- MOSINGER J., MIČKA Z. Quantum yields of singlet oxygen of metal complexes of meso-tetrakis (sulphonatophenyl) porphine. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 1997, **107**(1-3), 77-82.
- MÜLLER D. J., DUFRENE Y. F. Atomic force microscopy: A nanoscopic window on the cell surface. *Trends in Cell Biology*. 2011, **21**(8), 461-469.
- MURRAY J. M. Confocal Microscopy, deconvolution, and structured illumination methods. GOLDMAN R. D., SWEDLOW J. R., SPECTOR D. L., ed. *Life cell imaging: A laboratory manual*. 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2010, 139-181. ISBN 978-0-87969-893-5
- MUSTATA N., RITCHIE K., MCNALLY H. A. Neuronal elasticity as measured by atomic force microscopy. *Journal of Neuroscience Methods*. 2010, **186**(1), 35-41.
- NYMAN E. S., HYNINEN P. H. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2004, **73**(1-2), 1-28.

- O'CONNOR A. E., GALLAGHER W. M., BYRNE A. T. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: Preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*. 2009, **85**(5), 1053-1074.
- OLEINICK N. L., NIEMINEN A. L., CHIU S. Cell killing by photodynamic therapy. HAMBLIN M. R., MRÓZ P., ed. *Advances in photodynamic therapy: Basic, translational, and clinical*. Norwood (Massachusetts): Artech House, 2008, 115-133. ISBN 978-1-59693-277-7.
- ORTEL B., SHEA C. R., CALZAVARA-PINTON P. Molecular mechanisms of photodynamic therapy. *Frontiers in Bioscience*. 2009, **14**, 4157-4172.
- PERVAIZ S., OLIVO M. Art and science of photodynamic therapy. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2006, **33**(5-6), 551-556.
- PETROLL W. M. , CAVANAGH H. D., JESTER J. V. Dynamic three-dimensional visualization of collagen matrix remodeling and cytoskeletal organization in living corneal fibroblasts. *Scanning*. 2004, **26**(1), 1-10.
- PITTENGER B., ERINA N., SU C. Quantitative Mechanical Property Mapping at the Nanoscale with PeakForce QNM. *Bruker Application Note #128* 2010.
- PLAETZER K., KIESSLICH T., VERWANGER T., KRAMMER B. The modes of cell death induced by PDT: An overview. *Medical Laser Application*. 2003, **18**, 7-19.
- PLÁŠEK J. Konfokální mikroskop. *Vesmír*. 1995, **74**(9), 508.
- PLÁŠEK J., REISICH J. Kontrast v optické mikroskopii. *Vesmír*. 1995, **74**(11), 638.
- PLODINEC M., LOPARIC M., AEBI U. Atomic-force microscopy for biological imaging and mechanical testing across length scales. GOLDMAN R. D., SWEDLOW J. R., SPECTOR D. L., ed. *Life cell imaging: A laboratory manual*. 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2010, 182-202. ISBN 978-0-87969-893-5.
- POGODA K., JACZEWSKA J., WILTOWSKA-ZUBER J., KLYMENKO O., ZUBER K., FORNAL M., LEKKA M. Depth-sensing analysis of cytoskeleton organization based on AFM data. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*. 2012, **41**(1), 79-87.
- PRABHUNE M., BELGE G., DOTZAUER A., BULLERDIEK J., RADMACHER M. Comparison of mechanical properties of normal and malignant thyroid cells. *Micron*. 2012, **43**(12), 1267-1272.

- PROSKURYAKOV S. Y., KONOPLYANNIKOV A. G., GABAI V. L. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Experimental Cell Research*. 2003, **283**(1), 1-16.
- RICCI D., BRAGA P.C. Recognizing and avoiding artifacts in AFM imaging. BRAGA, P. C. RICCI D., ed. *Atomic force microscopy: Biomedical methods and applications*. Totowa (New Jersey): Humana Press, 2004, 25-37. ISBN 1-58829-094-8.
- RICO F., ROCA-CUSACHS P., GAVARA N., FARRÉ R., ROTGER M., NAVAJAS D. Probing mechanical properties of living cells by atomic force microscopy with blunted pyramidal cantilever tips. *Physical Review E*. 2005, **72**(2), 021914.
- RICO F., ROCA-CUSCHS P., SUNYER R., FARRE R., NAVAJAS D. Cell dynamic adhesion and elastic properties probed with cylindrical atomic force microscopy cantilever tips. *Journal of Molecular Recognition*. 2007, **20**(6), 459-466.
- ROBERTSON C. A., EVANS D. H., ABRAHAMSE H. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2009, **96**(1), 1-8.
- RODUIT C., SEKATSKI S., DIETLER G., CATSICAS S., LAFONT F., KASAS S. Stiffness tomography by atomic force microscopy. *Biophysical Journal*. 2009, **97**(2), 674-677.
- RODUIT C., LONGO G., BENMESSAOUD I., VOLTERRA A., SAHA B., DIETLER G., KASAS S. Stiffness tomography exploration of living and fixed macrophages. *Journal of Molecular Recognition*. 2012, **25**(5), 241-246.
- ROTSCH C., RADMACHER M. Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: An atomic force microscopy study. *Biophysical Journal*. 2000, **78**(1), 520-535.
- RUIZ-GONZÁLEZ R., ACEDO P., SÁNCHEZ-GARCÍA D., NONELL S., CANETE M., STOCKERT J. C., VILLANUEVA A. Efficient induction of apoptosis in HeLa cells by a novel cationic porphycene photosensitizer. *European Journal of Medical Chemistry*. 2013, **63**, 401-414.
- SANABRIA L. M., RODRIGUEZ M. E., COGNO I. S., VITTAR N. B. R., PANSA M. F., LAMBERTI M. J., RIVAROLA V. A. Direct and indirect photodynamic therapy effects on the cellular and molecular components of the tumor microenvironment. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013, **1835**(1), 36-45.
- SNYDER J. W., LAMBERT J. D. C., OGILBY P. R. 5,10,15,20-tetrakis(N-methyl-4-pyridyl)21H,23H-porphine (TMPyP) as a sensitizer for singlet oxygen imaging in cells:

- Characterizing the irradiation-dependent behavior of TMPyP in a single cell. *Photochemistry and Photobiology*. 2006, **82**(1), 177-184.
- SONG Z., ADEYEME A. O., BAKER J., TRAYLOR S. M., LIGHTFOOT M. L. Structure of porphyrin TPPS4 and its interaction with metal ions as elucidated by ¹H NMR and UV-visible spectra. *Georgia Journal of Science: Official publication of the Georgia Academy of Science*. 2011, **69**(2-3), 89-101.
- SURESH S. Biomechanics and biophysics of cancer cells. *Acta Biomaterialia*. 2007, **3**(4), 413-438.
- SWEERS K., VAN DER WERF K., BENNINK M., SUBRAMANIAM V. Nanomechanical properties of alpha-synuclein amyloid fibrils: a comparative study by nanoindentation, harmonic force microscopy, and Peakforce QNM. *Nanoscale Research Letters*. 2011, **6**, 270.
- SZURKO A. RAMS M., SOCHANIK A., SIEROŃ-STOŁTNY K., KOZIELEC A. M., MONTFORTS F.-P., WRZALIK R., RATUSZNA A. Spectroscopic and biological studies of a novel synthetic chlorin derivative with prospects for use in PDT. *Biorganic and Medicinal Chemistry*. 2009, **17**(24), 8197-8205.
- TADA-OIKAWA S., OIKAWA S., HIRAYAMA J., HIRAKAWA K., KAWANISHI S. DNA damage and apoptosis induced by photosensitization of 5,10,15,20-tetrakis (N-methyl-4-pyridyl)-21H,23H-porphyrin via singlet oxygen generation. *Photochemistry and Photobiology*. 2009, **85**(6), 1391–1399.
- THORMANN E., PETTERSSON T., KETTLE J., CLAESSESON P. M. Probing material properties of polymeric surface layers with tapping mode AFM: Which cantilever spring constant, tapping amplitude and amplitude set point gives good image contrast and minimal surface damage? *Ultramicroscopy*. 2010, **110**(4), 313-319.
- TSAI J. C., WU C. L., CHIEN H. F., CHEN C. T. Reorganization of cytoskeleton induced by 5-aminolevulinic acid – mediated photodynamic therapy and its correlation with mitochondrial dysfunction. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2005, **36**(5), 398-408.
- UZDENSKY A., KOLPAKOVA E., JUZENIENE A., JUZENAS P., MOAN J. The effect of sub-lethal ALA-PDT on the cytoskeleton and adhesion of cultured human cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects*. 2005, **1722**(1), 43-50.
- VALENTA J. Spektroskopie jednotlivých molekul v blízkém poli. *Vesmír*. 1995, **74**(3), 126.

- VILENO B., SIENKIEWICZ A., LEKKA M., KULIK A. J., FORRO L. (2004): In vitro assay of singlet oxygen generation in the presence of water-soluble derivatives of C60. *Carbon*. 2004, **42**(5-6), 1195–1198.
- WAKATSUKI T., SCHWAB B., THOMPSON N. C., ELSON E. L. Effects of cytochalasin D and latrunculin B on mechanical properties of cells. *Journal of Cell Science*. 2001, **114**(5), 1025-1036.
- WEERSIN R. A., LILGE L. Light dosimetry and light sources for photodynamic therapy. HAMBLIN M. R., MRÓZ P., ed. *Advances in photodynamic therapy: Basic, translational, and clinical*. Norwood (Massachusetts): Artech House, 2008, 93-113. ISBN 978-1-59693-277-7.
- WEIR A., WESTERHOFF P., FABRICIUS L., HRISTOVSKI K., VON GOETZ N. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environmental Science and Technology*. 2012, **46**(4), 2242-2250.
- WEISS A., VAN DEN BERGH H., GRFFIOEN A. W., NOWAK-SLIWINSKA P. Angiogenesis inhibition for the improvement of photodynamic therapy: The revival of a promising idea. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012, **1826**(1), 53-70.
- WEIZMAN E., ROTHMANN C., GREENBAUM L., SHAINBERG A., ADAMEK M., EHRENBERG B., MALIK Z. Mitochondrial localization and photodamage during photodynamic therapy with tetraphenylporphines. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2000, **59**(1-3), 92-102.
- WITHERS J. R., ASTON D. E. Nanomechanical measurements with AFM in the elastic limit. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2006, **120**(1-3), 57-67.
- YOOM I., LI J. Z., SHIM Y. K. Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. *Clinical Endoscopy*. 2013, **46**(1), 7-23.
- ZHOU E. H., QUEK S. T., LIM C. T. Power-law rheology analysis of cells undergoing micropipette aspiration. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*. 2010, **9**(5), 563-572.
- ZIMČÍK P., MILETÍN M. Fotodynamická terapie jako nová perspektivní metoda léčby nádorových onemocnění I. Historie, základní princip. *Česká a slovenská farmacie*. 2004, **53**(5), 219-224.
- ZIMČÍK P., MILETÍN M. Fotodynamická terapie jako nová perspektivní metoda léčby nádorových onemocnění I. Přehled fotosenzitizérů. *Česká a slovenská farmacie*. 2004, **53**(6), 271-279.

Internetové zdroje:

Dojindo Molecular Technologies

Measuring cell viability. *Dojindo Molecular Technologies* [online]. Dojindo Molecular Technologies Inc., © 2017 [cit. 2017-02-27] Dostupné z:

https://www.dojindo.com/Protocol/Cell_Proliferation_Protocol_Colorimetric.pdf

Duke University

Spinning disk confocals. Light Microscopy Core Facility [online]. Duke University and Duke University Medical Center [cit. 2017-03-07]. Dostupné z:

<http://microscopy.duke.edu/learn/introtomicroscopy/spinningdisks.html>

Nikon Instruments

Introduction to phase contrast microscopy. *MicroscopyU* [online]. Nikon Instruments Inc., ©2016 [cit. 2016-09-05]. Dostupné z:

<http://www.microscopyu.com/techniques/phase-contrast/introduction-to-phase-contrast-microscopy>

Introductory confocal concepts. *MicroscopyU* [online]. Nikon Instruments Inc., ©2016 [cit. 2016-09-08]. Dostupné z:

<http://www.microscopyu.com/techniques/confocal/introductory-confocal-concepts>

NT-MDT

Adhesion forces. *NT-MDT Spectrum Instruments* [online]. MT-NDT SI, © 1998-2016 [cit. 2016-12-16]. Dostupné z: <https://www.ntmdt-si.com/spm-basics/view/adhesion-forces>

Olympus Micro

Anatomy of the microscope: Introduction. *Microscopy Resource Center* [online].

Olympus America Inc., ©2012 [cit. 2016-09-01]. Dostupné z:

<http://www.olympusmicro.com/primer/anatomy/introduction.html>

Introduction to phase contrast. *Microscopy Resource Center* [online]. Olympus America Inc., ©2012 [cit. 2016-09-05]. Dostupné z:

<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/phasecontrast/phase.html>

Differential interference contrast: Introduction. *Microscopy Resource Center* [online].

Olympus America Inc., ©2012 [cit. 2016-09-05]. Dostupné z:

<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/dic/dicoverview.html>

Basic concepts in fluorescence. *Microscopy Resource Center* [online]. Olympus America Inc., ©2012 [cit. 2016-09-07]. Dostupné z: <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/fluorescenceintro.html>

Introduction to confocal microscopy. *Microscopy Resource Center* [online]. Olympus America Inc., ©2012 [cit. 2016-09-08]. Dostupné z: <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/confocal/confocalintro.html>

Soukup

SOUKUP A. Fluorescenční mikroskopie. *Katedra experimentální biologie rostlin* [online]. ©2004 [cit. 2016-09-07]. Dostupné z: <http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/mikro/mscope/fluor/fluor.htm>

Universität Heidelberg

Atomic force microscopy. *Kirchhoff institute for physics* [online]. Universität Heidelberg [cit. 2017-03-07]. Dostupné z: http://www.kip.uni-heidelberg.de/ag_pucci/instrumentation/afm

Zeiss

Image formation in the microscope. *Zeiss* [online]. [cit. 2016-09-01]. Dostupné z: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/imageformation.html>

Enhancing contrast in optical microscopy. *Zeiss* [online]. [cit. 2016-09-05]. Dostupné z: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/contrast.html>

Introduction to fluorescence microscopy. *Zeiss* [online]. [cit. 2016-09-07]. Dostupné z: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/fluorescence.html>

Introduction to spinning disc confocal microscopy. *Zeiss* [online]. [cit. 2016-09-08]. Dostupné z: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/spinningdisk/introduction.html>

Introduction to superresolution microscopy. *Zeiss* [online]. [cit. 2016-09-15]. Dostupné z: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/superresolution/introduction.html>

Introduction to photoactivated localization microscopy. *Zeiss* [online]. [cit. 2016-09-15]. Dostupné z: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/superresolution/palm/introduction.html>

Publikační činnost autora

Původní vědecké publikace uveřejněné v časopisech s IF

Jiravova J., Barton Tomankova K., Harvanova M., Malina L., **Malohlava J.**, Luhova L., Panacek A., Manisova B., Kolarova H. The effect of silver nanoparticles and silver ions on mammalian and plant cells in vitro. *Food and Chemical Toxicology*. 2016, 96, 50-61. **IF 3,584**

Malina L., Barton Tomankova K., **Malohlava J.**, Jiravova J., Manisova B., Zapletalova J., Kolarova H. The in vitro cytotoxicity of metal-complexes of porphyrin sensitizer intended for photodynamic therapy. *Toxicology in Vitro*. 2016, 34, 246-256. **IF 3,338**

Malohlava J., Tomankova K., Malina L., Jiravova J., Hanakova A., Pizova K., Zapletalova J., Kolarova H. Effect of porphyrin sensitizer MgTPPS4 on cytoskeletal system of HeLa cell line – microscopic study. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2016, 74, 419-425. **IF 1,627**

Venit T., Kalendova A., Petr M., Dzijak R., Pastorek L., Rohozkova J., **Malohlava J.**, Hozak P. Nuclear myosin I regulates cell membrane tension. *Scientific Reports*. 2016, 6, 30864. **IF 5,228**

Hanakova A., Bogdanova K., Tomankova K., Pizova K., **Malohlava J.**, Binder S., Bajgar R., Langova K., Kolar M., Mosinger J., Kolarova H. The application of antimicrobial photodynamic therapy on *S. aureus* and *E. coli* using porphyrin photosensitizers bound to cyclodextrin. *Microbiological Research*. 2014, 169 (2-3), 163-170. **IF 1,939**

Kolar P., Tomankova K., **Malohlava J.**, Zapletalova J., Vujtek M., 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*. 2013, 32, 337-346. **IF 0,852**

Původní vědecké publikace uveřejněné v recenzovaném časopise

Zapletalová H., Bartoň Tománková K., **Malohlava J.**, Vůjtek M., Kolářová H. Combination of atomic force microscopy and comet assay analysis of DNA damage induced by PDT. *Clinician and Technology Journal*. 2017, in press.

Hanakova A., Bogdanova K., Tomankova K., Pizova K., **Malohlava J.**, Binder S., Bajgar R., Langova K., Kolar M., Mosinger J., Kolarova H. Fototoxický vliv porfyrinových sensitizerů a viditelného záření na gram pozitivní methicillin rezistentní kmen *S. aureus*. *Lékař a technika*. 2013, 43 (1), 19-23.

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*. 2012, 42 (4), 18-22.

Tománková K., Kolář P., **Malohlava J.**, Kolářová H.: Vliv fotodynamické terapie na cytomechaniku nádorové buněčné linie HeLa. *Lékař a technika*. 2012, 42 (3), 32-36.

Přehledná vědecká publikace uveřejněná v recenzovaném časopise

Malohlava J., Tománková K., Kolář P., Kolářová H.: Studium mechanických vlastností s využitím mikroskopie atomárních sil. *Lékař a technika*. 2013 43 (3), 5-9.

Kapitoly v monografii

Malohlava J., Zapletalova H., Tomankova K., Kolarova H.: Atomic force microscopy: Studying mechanical properties of a cell. Méndez-Vilas A. ed. *Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology*. Badajoz: Formatex Research Center, 2012, 528-531. ISBN 978-84-939843-5-9.

Tomankova K., Kolar P., **Malohlava J.**, Kolarova H.: Mechanical Characterisation of HeLa Cells using Atomic Force Microscopy, Méndez-Vilas A. ed. *Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology*. Badajoz: Formatex Research Center, 2012, 549-554. ISBN 978-84-939843-5-9.

Publikace abstrakt ve sbornících z konferencí

Malohlava J., Tománková K., Kolářová H. Vliv PDT na cytoskeletární systém buněčné linie HeLa, XXXVIII. Dny lékařské biofyziky, str. 23, Staré Splavy, 2015

Malohlava J., Tománková K., Kolářová H. Vliv porfyrinů na mechanické vlastnosti buněčné linie HeLa, Studentská vědecká konference 2015, Ostrava, 2015

Malohlava J., Tománková K., Kolářová H. Effect of porphyrine sensitizer on cell cytoskelet – microscopic study, XXXVII. Dni lekárskej biofyziky, str. 44, Demänovská Dolina, 2014

Malohlava J., Tománková K., Kolářová H. Measuring mechanical properties by AFM, XXXVI. Dny lékařské biofyziky, str. 53, Lázně Bělohrad, 2013

Malohlava J., Tománková K., Kolářová H. Mikroskopie atomárních sil – operační módy, XXXV. Dny lékařské biofyziky, str. 60, Rožnov pod Radhoštěm, 2012

Ostatní publikace

Původní vědecké publikace uveřejněné v časopisech s IF

Tomankova K., Horakova J., Harvanova M., Malina L., Soukupova J., Hradilova S., Hradilova S., Kejlova K., **Malohlava J.**, Licman L., Dvorakova M., Jirova D., Kolarova H. Cytotoxicity, cell uptake and microscopic analysis of titanium dioxide and silver nanoparticles in vitro. *Food and Chemical Toxicology*. 2015, 82, 106-115. IF 2,895

Tomankova K., Polakova K., Pizova K., Binder S., Havrdova M., Kolarova M., Kriegova E., Zapletalova J., Malina L., Horakova J., **Malohlava J.**, Kolokithas-Ntoukas A., Bakndritsos A., Kolarova H., Zboril R. In vitro cytotoxicity analysis of doxorubicin-loaded/superparamagnetic iron oxide colloidal nanoassemblies on MCF7 and NIH3T3 cell lines. *International Journal of Nanomedicine*. 2015, 10, 949-961. IF 4,383

Tomankova K., Kolarova H., Pizova K., Binder S., Konecny P., Kriegova E., Malina L., Horakova J., **Malohlava J.**, Kejlova K., Jirova D. Cytotoxicity and antioxidative effects of herbal and fruit extracts in vitro. *Food Biophysics*. 2014, 9, 267-276. IF 1,642

Původní vědecké publikace uveřejněné v recenzovaném časopise

Zapletalová H., Pížová K., **Malohlava J.**, Vůjtek M., Kolářová H. Analýza povrchu magnetických mikročástic prostřednictvím mikroskopie atomárních sil. *Lékař a technika*. 2014, 44 (2), 34-41.

Kapitoly v monografii

Horakova J., Tomankova K., Harvanova S., Hradilova S., Masek V., **Malohlava J.**, Malina L., Manisova B., Kejlova K., Jirova D., Kolarova H. Study of the penetration of silver nanoparticles into SVK14 cells. Méndez-Vilas A. ed. *Microscopy: advances in scientific research and education*. Badajoz: Formatex Research Center, 2014, 173-178. ISBN 978-84-942134-3-4.

Publikace v recenzovaných sbornících z konference

Kolarova H., Tomankova K., Harvanova M., Horakova J., **Malohlava J.**, Cenklova V., Bajgar R., Kejlova K., Jirova D. Cell uptake of titanium dioxide nanoparticles, *IICBE Int'l Conference International Conference on Medical Genetics, Cellular & Molecular Biology, Pharmaceutical and Food Sciences*, str. 140-142, Istanbul, Turecko, 2015