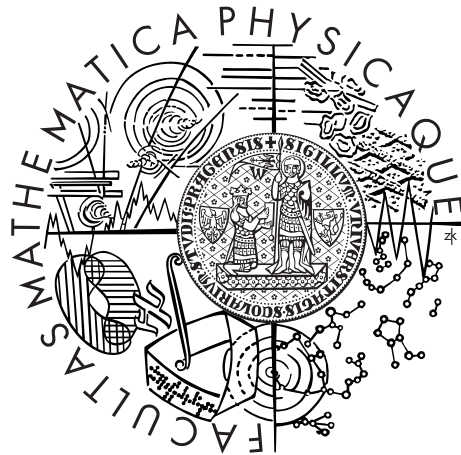


Univerzita Karlova v Praze  
Matematicko-fyzikální fakulta

## DIPLOMOVÁ PRÁCE



Adam Stíbal

## Fluorescenční detekce kožních nádorů

Katedra chemické fyziky a optiky

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Roman Dědic, Ph.D.

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: Biofyzika a chemická fyzika

Praha 2013

Děkuji vedoucímu mé diplomové práce doc. RNDr. Romanu Dědicovi, Ph.D. za ochotnou pomoc při jejím vypracování. Rád bych také poděkoval RNDr. Vojtěchu Vyklickému a Mgr. Marku Scholzovi za pomoc při přípravě a realizaci experimentů. Poděkování patří i mým blízkým, bez jejichž podpory a pomoci by tato práce nemohla vzniknout.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů.

Beru na vědomí, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona v platném znění, zejména skutečnost, že Univerzita Karlova v Praze má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle §60 odst. 1 autorského zákona.

V ..... dne .....

Podpis autora

Název práce: Fluorescenční detekce kožních nádorů

Autor: Adam Stíbal

Katedra: Katedra chemické fyziky a optiky

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Roman Dědic, Ph.D.

Abstrakt: Předkládaná práce pojednává o fotodynamické terapii (PDT) a její aplikaci pro diagnostiku rakoviny. Princip PDT je založen na produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) pomocí fotosenzibilizátorů (PS). PS jsou přednostně akumulovány v nezdravé tkáni, kde vznikající ROS způsobují selektivní destrukci cílové tkáně, zatímco okolní zdravá tkáň zůstává neporušena. Fotodynamická diagnostika využívá fluorescence PS pro digitální a spektrální zobrazování. Tato práce je zaměřena na detekci nádorů ze spektrálních charakteristik fluorescence protoporphyrinu IX, jenž je ve tkáni indukován pomocí methylesteru kyseliny aminolevulové. Hlavní část výzkumu byla provedena na jizvách potkanů *in vivo*, experimenty byly provedeny i na roztocích homogenizátu myších fibroblastů. Byla nalezena metoda umožňující rozlišit zdravou tkáň od nezdravé pomocí měření kinetik vybělování fluorescence.

Klíčová slova: Singletní kyslík, fotosenzibilizátor, fluorescence, fotodynamická terapie, fotodiagnostika

Title: Fluorescence Detection of Skin Tumours

Author: Adam Stíbal

Department: Department of Chemical Physics and Optics

Supervisor: doc. RNDr. Roman Dědic, Ph.D.

Abstract: This thesis discusses the photodynamic therapy (PDT) and its application for diagnostics of tumours. The PDT is based on production of reactive oxygen species (ROS) from the molecules of photosensitizers (PS). PS are preferentially accumulated in diseased tissues, where ROS are produced and cause selective destruction of the target tissue, while surrounding healthy tissue remains intact. The photodynamic diagnostics uses the fluorescence of PS for digital and spectral imaging. This thesis is focused on detection of tumours from spectral characteristics of protoporphyrin IX fluorescence induced in tissue by methylaminolevulinate. The main part of the research was realised on rats' scars *in vivo*, the solutions of homogenized mouse fibroblasts were also studied. The way to distinguish between diseased and healthy tissue was found using measurements of fluorescence bleaching kinetics.

Keywords: Singlet oxygen, photosensitizer, fluorescence, photodynamic therapy, photodiagnosics

# Obsah

Úvod	2
<b>1 Teorie</b>	<b>3</b>
1.1 Elektronová struktura molekul . . . . .	3
1.2 Singletní kyslík . . . . .	5
1.2.1 Elektronová struktura $O_2$ . . . . .	5
1.2.2 Zhášení $^1O_2$ . . . . .	6
1.2.3 Tvorba $^1O_2$ . . . . .	7
1.2.4 Využití ROS . . . . .	7
1.3 Základy optické spektroskopie . . . . .	7
1.3.1 Spektrální charakteristiky záření . . . . .	7
1.3.2 Základy emisní spektroskopie . . . . .	9
1.4 Fotodynamická terapie . . . . .	10
1.4.1 Fotosenzibilizátory v PDT . . . . .	11
1.4.2 Farmakokinetika a biodistribuce PS . . . . .	15
1.4.3 Excitace PS . . . . .	17
1.4.4 Fotofyzika a fotochemie PS . . . . .	18
1.4.5 Mechanismy buněčné smrti při PDT . . . . .	20
1.5 PDT dosimetrie . . . . .	21
<b>2 Materiály a metody</b>	<b>25</b>
2.1 Roztoky PpIX . . . . .	25
2.2 Buněčné suspenze . . . . .	25
2.3 Živá zvířata . . . . .	26
<b>3 Aparatura</b>	<b>27</b>
3.1 Popis aparatury . . . . .	27
3.1.1 Vláknový spektrometr Avantes . . . . .	27
3.1.2 Světlovody . . . . .	28
3.1.3 Filtry . . . . .	28
3.1.4 Držáky svělovodů a kyvet . . . . .	29
3.2 Kalibrace spektrální citlivosti spektrometru . . . . .	30
<b>4 Výsledky a diskuse</b>	<b>31</b>
4.1 Roztoky PpIX . . . . .	31
4.2 Buněčné suspenze . . . . .	33
4.3 Živá zvířata . . . . .	36
4.3.1 Místa měřená v jizvě s PS . . . . .	36
4.3.2 Místa měřená mimo jizvu s PS . . . . .	40
4.3.3 Místa měřená v jizvě a mimo jizvu bez PS . . . . .	43
4.3.4 Shrnutí . . . . .	45
<b>Závěr</b>	<b>47</b>

# Úvod

Fotodynamická terapie je slibná moderní metoda, která je používána převážně pro léčbu závažných onemocnění onkologického charakteru. Uplatnění ale nachází například i při léčbě lupénky, aktinické keratózy, ohraničených infekcí, většinou podmíněné degenerace makuly či v estetické medicíně. Princip fotodynamické terapie spočívá v použití speciálního barviva, fotosenzibilizátoru, které po ozáření světlem určité vlnové délky může díky svým tripletním stavům vytvářet vysoce reaktivní formy kyslíku. Díky odlišnostem v morfologii nebo metabolismu nezdravých buněk dochází k hromadění fotosenzibilizátoru právě v cílové tkáni, zatímco zdravá okolní tkáň je schopna fotosenzibilizátor odbourávat či vylučovat. Fotosenzibilizátor, aktivovaný světlem vhodné vlnové délky, pak v místech nahromadění může vytvářet reaktivní formy kyslíku, které způsobí selektivní destrukci postižené tkáně, zatímco okolní zdravá tkáň zůstane neporušena.

Fotosenzibilizátory jsou často dobrými fluorofory, v místě zvýšené koncentrace lze pozorovat jejich fluorescenci, která je využívána metodami fluorescenční diagnostiky. Fluorescence fotosenzibilizátorů je možné využít k lokalizaci lézí zobrazovacími metodami, citlivá spektroskopická měření pak poskytují kvalitativní i kvantitativní obraz charakteru tkáně. Včasná a přesná diagnóza přitom hraje klíčovou roli pro úspěšnou léčbu maligních onemocnění.

Unikátní spektroskopická aparatura postavená na MFF UK dovoluje měřit luminiscenci pocházející od fotosenzibilizátoru a singletního kyslíku současně z jednoho místa s paralelním spektrálním a časovým rozlišením. Cílem předkládané práce je prozkoumat možnosti luminiscenční diagnostiky a s pomocí fotosenzibilizátoru ověřit, zda je spektroskopicky možné odlišit zdravou tkáň od nemocné.

Předkládaná diplomová práce zahrnuje následující úkoly:

- Zvládnutí základní obsluhy vláknového spektrometru Avantes.
- Seznámení se s ovládáním argonového iontového laseru a diodových laserů.
- Rešerše dosud publikovaných výsledků.
- Návrh a testování metody pro měření luminiscenčního signálu z kůže pokusných zvířat a případně i pacientů.
- Nalezení vhodné metody pro zpracování naměřených dat vzhledem k diagnostickým možnostem.
- Posouzení vhodnosti tohoto zařízení pro praktické využití v diagnostice lézí.

# 1. Teorie

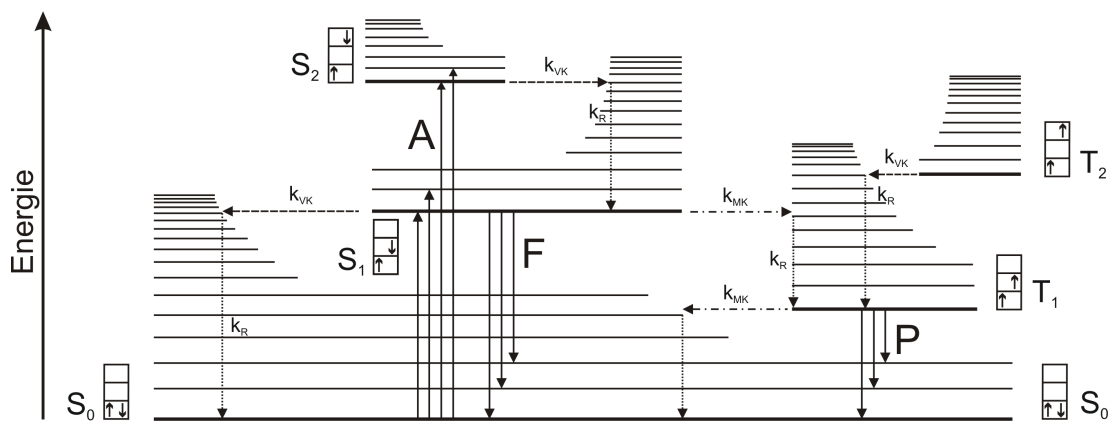
## 1.1 Elektronová struktura molekul

Z řešení Diracovy rovnice plyne existence jemné struktury jednoelektronových atomů a iontů, kterou je možno popsat jako štěpení hladin energie se stejnou hodnotou hlavního kvantového čísla  $n$  na podhladinu, podle hodnot kvantových čísel orbitálního a spinového momentu elektronu.

V biofyzice se pro teoretický popis složitějších objektů nelze vyhnout zobecnění, které popisuje případ pro více elektronů. Takové zobecnění je dáno Breitovou rovnicí, kde vystupují členy Coulombovské interakce, Darwinovy korekce, korekce zpoždování coulombovské interakce v důsledku konečné rychlosti světla, spin-orbitální interakce a dipól-dipólové interakce. Schrödingerova rovnice pro systém elektronů a jader tak představuje komplikovaný problém. Zjednodušení tohoto problému lze dosáhnout přijetím dodatečných předpokladů, umožňujících řešit pak rovnice v dané aproximaci. První, nejjednodušší aproximací je zanedbání pohybu jader vzhledem k pohybu elektronů v adiabatické aproximaci. Hmotnost jader je totiž mnohonásobně ( $10^3$ – $10^4$  krát) větší než hmotnost elektronů a pohyb elektronů a jader je možné díky tomu oddělit. V případě molekul je třeba zahrnout i vibrační strukturu v Born-Oppenheimerově přiblížení. Transformací souřadnic lze dosáhnout separace translačního a rotačního pohybu molekuly a v harmonickém přiblížení i vibračního pohybu molekuly. Celkovou energii molekuly potom lze popsat jako součet kinetické energie molekuly, její rotační energie, energie kmitů kolem rovnovážných poloh a elektronové energie. Translační energie se lze zbavit přechodem do těžiškové soustavy a rotační pohyb velkých molekul lze často zcela zanedbat pro malou statistickou pravděpodobnost přechodů mezi rotačními hladinami, jejichž energetické rozdíly jsou o řád až dva menší než rozdíly vibračních hladin [1]. Dominantní jsou tedy přechody mezi elektronovými hladinami a přibližně o řád menší rozdíly vibračních hladin.

Schematicky lze tyto hladiny a přechody mezi nimi vyjádřit pomocí Jablonského diagramu. V Obrázku 1.1 je zakreslen Jablonského diagram pro obecnou mnohoatomovou molekulu se sudým počtem elektronů. Čistě elektronové hladiny jsou zakresleny tučnými čarami a k nim příslušné elektronově-vibrační hladiny jsou vyznačeny tenkými liniemi. V rámečcích na okrajích je znázorněna elektronová konfigurace molekulového orbitalu, vystihující obsazení a spin dvou elektronů s nejvyšší energií. Celkový spin molekuly určují právě tyto dva nejvýše posazené elektrony, protože ostatní elektrony zůstávají spárovány a nepřispívají k celkovému spinu. Všechny skupiny elektronově-vibračních hladin se tedy mohou nacházet v singletním stavu  $S$  s celkovým spinem rovným nule, či tripletním stavu  $T$  s celkovým spinem rovným jedné. Nejnižše položená elektronová hladina se nazývá základní, všechny vyšší hladiny jsou excitované. Většina látek je v základním stavu singletní jako v Jablonského diagramu základní hladina  $S_0$  [1, 2]. Výjimku tvoří například molekula kyslíku, jejíž základní hladina je tripletní.

V Obrázku 1.1 jsou také svislými čarami se šipkami znázorněny přechody molekuly mezi různými energetickými hladinami. Absorpcí fotonu s dostatečnou energií přejde molekula ze základního stavu  $S_0$  do některé z vibračních hladin excitovaného stavu  $S_1, \dots, S_n$ . Tento proces, v obrázku vyznačený plnou čarou se



Obrázek 1.1: Jablonského diagram energetických hladin a přechodů mezi nimi [2].

šipkou A, nazýváme singlet-singletní absorpcí. K absorpci může docházet i z tripletní hladiny  $T_1$  do některé vyšší excitované hladiny  $T_2, \dots, T_n$ . Taková absorpce se nazývá triplet-tripletní. Popsané absorpce zachovávají spin, a proto jsou tyto přechody spinově dovolené.

Deexcitace molekuly je realizována buď zářivými přechody, označovanými jako luminiscence, nebo nezářivými přechody. Zářivé deexcitace jsou charakteristické uvolněním energie ve formě kvanta záření. Nezářivé přechody se dělí na izoenergetické, kdy nedochází k uvolnění energie, a na přechody se změnou energie.

### Nezářivé přechody

**Vnitřní konverze** je izoenergetický vnitromolekulový přechod mezi hladinami se stejnou multiplicitou a je tudíž spinově dovolený. V Obrázku 1.1 je vnitřní konverze znázorněna vodorovnou čárkovanou čarou se šipkou  $k_{VK}$ .

**Mezisystémová konverze** je izoenergetický vnitromolekulový přechod mezi stavy o různé multiplicitě. Z hlediska spinu jde o zakázaný přechod, přesto k němu vlivem spin-orbitální interakce často dochází. V Obrázku 1.1 je mezisystémová konverze znázorněna vodorovnou čerchovanou čarou se šipkou  $k_{MK}$ .

**Vibrační relaxace** je proces, při kterém se nadbytek vibrační energie molekul mění na pohybovou energii. Vibrační relaxace je v kondenzované fázi podstatně rychlejší než ostatní deaktivční procesy, a proto se tyto pomalejší přechody uskutečňují zpravidla ze základního vibračního stavu. Ve velmi zředěné plynné fázi nastává opačný případ, kdy molekula nestihne relaxovat a lze tak pozorovat charakteristické spektroskopické projevy plynné fáze. V Obrázku 1.1 jsou vibrační relaxace znázorněny svislou tečkovanou čarou se šipkou  $k_R$ .

### Zářivé přechody

**Fluorescence** je spinově dovolený přechod z energeticky vyššího stavu do nižšího stavu, přičemž se nemění spin molekuly. Zpravidla dochází k fluorescenci z nejnižší vibrační hladiny prvního excitovaného stavu  $S_1$  do některé z vibračních hladin základního stavu  $S_0$ . Tato zákonitost se označuje jako Ka-



shovo pravidlo. Existují látky, jako např. azulen a jeho deriváty, které vykazují dvojí luminiscenci i přechodem z  $S_2$  do  $S_0$  a vymykají se tak Kashovu pravidlu. V Obrázku 1.1 je fluorescence zakreslena svislou plnou čarou se šipkou F.

**Fosforescence** je spinově zakázaný přechod z energeticky vyššího stavu do nižšího stavu, přičemž dochází ke změně spinu molekuly. U většiny organických molekul dochází k fosforescenci přechodem z nejnižšího tripletního excitovaného stavu  $T_1$  do základního singletního stavu  $S_0$ . Fosforescence má ve srovnání s fluorescencí dlouhou dobu dohasínání. V Obrázku 1.1 je fosforescence zakreslena svislou plnou čarou se šipkou P.

**Zpožděná fluorescence** je spinově dovolený přechod z  $S_1$  do  $S_0$ , charakteristický dobou dohasínání srovnatelnou s fosforescencí stejné molekuly. Delší doba dohasínání je dána časem, po který molekula setrvá v metastabilním tripletním stavu. Molekula totiž přejde mezisystémovou konverzí do stavu  $T_1$  a zpět do  $S_1$ , odkud pak dojde k zářivému přechodu do  $S_0$  jako při fluorescenci.

Excitace a deaktivace molekuly může být uskutečněna i mechanismem bez účasti fotonu. K takovým procesům patří Försterův rezonanční přenos energie, Dexterův mechanismus, singlet-singletní či triplet-tripletní anihilace. Tyto mechanismy patří do širší skupiny zhášecích procesů [3]. Existuje navíc řada dalších způsobů excitace, kdy se přenosu energie účastní více než jeden foton.

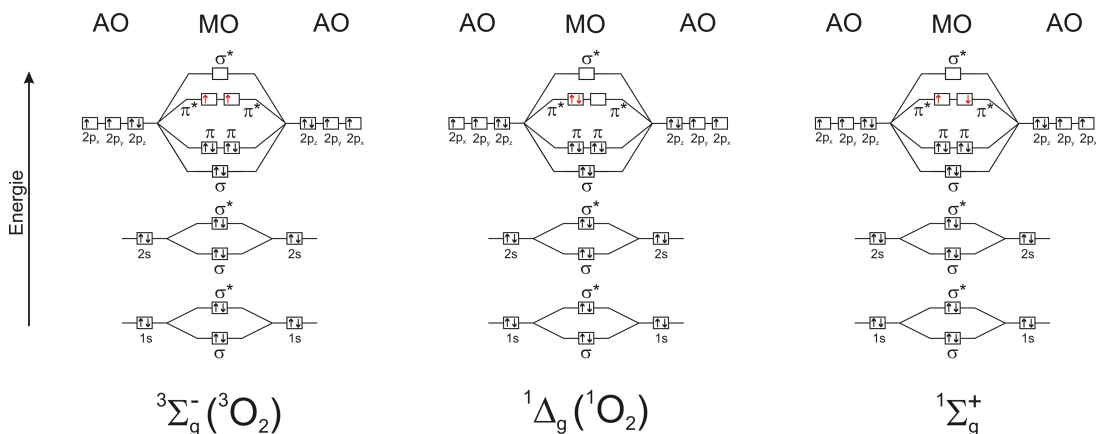
## 1.2 Singletní kyslík

Kyslík je jedním z nejběžnějších prvků vyskytujících se na Zemi a přesto se od většiny ostatních látek zásadně liší. Zvláštní chování kyslíku bylo pozorováno již v roce 1848 Michaelem Faradayem. Jeho experimenty prokázaly, že na rozdíl od ostatních plynů vykazuje kyslík paramagnetické vlastnosti. V roce 1925 tuto neobvyklou vlastnost vysvětlil Robert Mulliken přítomností nespárovaného elektronového páru v základním stavu molekuly.

### 1.2.1 Elektronová struktura $O_2$

Základní hladina molekuly kyslíku, pro níž bylo zavedeno označení  ${}^3\Sigma_g^-$ , je tripletní. Dva nejnižší excitované stavy jsou pak singletní, stav  ${}^1\Delta_g$  s energií přechodu  $95 \text{ kJ mol}^{-1}$  a stav  ${}^1\Sigma_g^+$  s energií  $158 \text{ kJ mol}^{-1}$  [4].

V Obrázku 1.2 je zakreslena elektronová konfigurace atomových a molekulových orbitalů kyslíku pro stav základní a dva excitované stavy. Jednotlivé stavy se liší pouze elektronovým obsazením nejvyšších antivazebných orbitalů. Přechod kyslíku ze singletního stavu  ${}^1\Delta_g$  do základního tripletního stavu je u izolované molekuly striktně zakázaný z hlediska spinu, symetrie a parity, takže tento přechod má relativně dlouhou dobu dohasínání. Přechod z  ${}^1\Sigma_g^+$  do  ${}^3\Sigma_g^-$  je také spinově zakázaný, častěji dochází k spinově povolené relaxaci do první excitované hladiny  ${}^1\Delta_g$  a následně k výše zmíněné fosforescenci. Z tohoto důvodu je spinově zakázaná fosforescence singletního kyslíku ze stavu  ${}^1\Sigma_g^+$  podstatně slabší než ze stavu  ${}^1\Delta_g$ . Zjednodušeně můžeme hovořit o základní hladině jako o tripletním stavu  ${}^3O_2$ .



Obrázek 1.2: Elektronové obsazení orbitalů molekuly kyslíku [2].

a o první excitované hladině jako o singletním stavu  $^1O_2$ . Doba života singletního kyslíku závisí na okolním prostředí, v kondenzované fázi se uvádí  $10^{-6}$ – $10^{-3}$  s [4]. Singletní kyslík je silně reaktivní a spolu s kyslíkovým radikálem, superoxidovým aniontem, excitovaným karbonylem a peroxidem vodíku tvoří skupinu reaktivních forem kyslíku (ROS, reactive oxygen species) [4].

### 1.2.2 Zhášení $^1O_2$

Nachází-li se molekula kyslíku v singletním excitovaném stavu, může být mimo zářivých a nezářivých přechodů zmíněných výše deaktivována také zhášení procesy. Zhášení  $^1O_2$  molekulou zhášeče je realizováno fyzikální nebo chemickou cestou.

**Fyzikální zhášení** má za následek pouze deaktivaci singletního kyslíku podle rovnice



přičemž se chemicky nemění ani molekula kyslíku ani molekula zhášeče a nevzniká žádný produkt. Fyzikální zhášení může probíhat prostřednictvím výměny energie a náboje.

**Chemické zhášení** probíhá podle rovnice



kde zhášeč reaguje se singletním kyslíkem za vzniku produktů.

V živých organismech mohou reaktivní formy kyslíku způsobovat oxidativní poškození aminokyselin, peptidů a proteinů, a to hlavně chemickou cestou [5]. ROS reagují také s nenasycenými mastnými kyselinami v lipidech i s DNA [6]. Proto se organismy brání oxidaci řadou způsobů, mezi něž patří snižování koncentrace ROS pomocí enzymů. Enzymy, jako jsou superoxid dismutázy, katalázy a peroxidázy, katalyzují přeměnu ROS na neškodné formy [7]. Obecně se všechny látky, které zabraňují oxidativnímu poškození buněk, nazývají antioxidanty.

### 1.2.3 Tvorba $^1\text{O}_2$

Podobně jako zhašecí procesy, dělí se i způsoby tvorby singletního kyslíku na fyzikální a chemické. V biologických systémech je  $^1\text{O}_2$  vytvářen chemickou cestou pomocí zvláštních enzymů, jako např. NADPH-oxidáza, myeloperoxidáza nebo NO-syntetáza [8]. Účelem tvorby  $^1\text{O}_2$  v buňkách přirozeným způsobem je obranný mechanismus proti různým patogenům, například virům [9]. Příkladem laboratorní metody tvorby singletního kyslíku je termální dekompozice endoperoxidů [9]. K fyzikálním metodám patří přímá absorpce, která je možná jen za specifických podmínek, metoda pulzní radiolýzy a další. V předkládané práci se omezíme na popis tvorby singletního kyslíku fotosenzibilizací pomocí fotosenzibilizátoru (PS). Fotosenzibilizátor je molekula schopná po absorpci fotonu o vhodné vlnové délce předat svou energii kyslíku v základním stavu a tím jej excitovat do singletního stavu. Princip této metody je detailněji vyložen v kapitole 1.4.4.

### 1.2.4 Využití ROS

Rané experimenty se singletním kyslíkem prokázaly jeho vysokou reaktivitu a oxidační vlastnosti, převyšující molekulu kyslíku v základním stavu. Této vlastnosti se v dnešní době využívá v řadě aplikací, ale existují i oblasti, kde je třeba oxidaci minimalizovat, protože je nežádoucí. Využití nachází  $^1\text{O}_2$  při syntéze čistých chemikálií nebo při čištění odpadních vod, kde oxiduje toxické látky, například fenoly či merkaptany [10]. Velmi povzbudivých výsledků dosahuje použití  $^1\text{O}_2$  v lékařství při léčbě řady závažných onkologických onemocnění i v estetické medicíně např. při odstraňování jizev. Terapie využívající produkci ROS pomocí fotosenzibilizátoru se označuje jako fotodynamická terapie. Fotodynamickou terapií se podrobně zabývá kapitola 1.4.

V potravinářském průmyslu oxidace způsobuje zkrácení trvanlivosti potravin, při výrobě polymerů může docházet k jejich fotodegradaci, mechanismus vzniku  $^1\text{O}_2$  se také podílí na blednutí barev [11, 12]. Proto studium tvorby a zhašení  $^1\text{O}_2$  může významně přispět, mimo jiné, ke zlepšení kvality a trvanlivosti potravin a barviv či vlastností polymerů.

## 1.3 Základy optické spektroskopie

Základní spektrální charakteristikou optického záření je frekvence kmitů  $\nu$  vektorů elektromagnetického pole. Elektromagnetické záření můžeme popsat v nejjednodušším případě jako rovinnou harmonickou vlnu

$$\varepsilon(\vec{r}, t) = \text{Re} \varepsilon^{(0)} e^{i(\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega t)}; \quad \omega = 2\pi\nu, \quad (1.3)$$

kde  $\vec{k}$  označuje vlnový vektor a  $\omega$  úhlovou frekvenci.

### 1.3.1 Spektrální charakteristiky záření

Vlnová délka záření  $\lambda$  je definována jako

$$\lambda = \frac{2\pi}{|\vec{k}|} = \frac{|\vec{v}|}{\nu}, \quad (1.4)$$

kde  $|\vec{v}|$  představuje fázovou rychlost vlny, která ve vakuu dosahuje rychlosti světla  $c = 2,998 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$ . V optickém prostředí je fázová rychlost nižší než  $c$ , což vystihuje index lomu  $n$

$$n = \frac{c}{|\vec{v}|}. \quad (1.5)$$

Alternativní spektrální charakteristikou je energie fotonu  $E$

$$E = h\nu, \quad (1.6)$$

kde  $h = 6,6 \times 10^{-34} \text{ J s}$  je Planckova konstanta [1].

Množství záření se v optické spektroskopii popisuje objektivními fotometrickými veličinami, z nichž nejčastěji užívanou veličinou je plošná hustota zářivého toku, neboli intenzita  $I$

$$I = \frac{dW}{dS_n dt}, \quad (1.7)$$

kde  $W$  je energie přenášená optickým zářením a  $S_n$  je normálová plocha, kolmá ke směru paprsku. Pro velmi slabá záření je výhodnější charakterizovat mohutnost optického záření, namísto zářivé energie  $W$ , pomocí počtu fotonů  $N_f$ . Dostáváme tak fotonový tok  $J$

$$J = \frac{dN_f}{dS_n dt}. \quad (1.8)$$

Průchodem optického záření absorbujícím prostředím dochází ke snižování intenzity záření. Velikost útlumu se vyjadřuje pomocí absorbance, neboli optické hustoty  $A$ , definované jako

$$A = \log \left( \frac{I_\nu^0}{I_\nu} \right), \quad (1.9)$$

kde  $I_\nu$  je velikost intenzity záření po průchodu látkou a  $I_\nu^0$  její počáteční hodnota. Podle Lambertova zákona je absorbance přímo úměrná dráze  $x$ , kterou světlo urazí v prostředí, tedy

$$A(\nu) = b(\nu) x, \quad (1.10)$$

kde  $b$  je látková konstanta, nazývaná extinkční koeficient. Lambertův zákon platí pro jednofotonovou absorpci v látkách, u kterých nedochází k narušení termodynamické rovnováhy vlivem procházejícího záření. V případě biologických vzorků se často pracuje se silně zředěnými roztoky absorbujících molekul v neabsorbujícím rozpouštědle. Za předpokladu, že absorbující molekuly spolu neinteragují, je extinkční koeficient úměrný molární koncentraci  $C$  těchto molekul, což vyjadřuje Beerův zákon

$$b = \varepsilon C, \quad (1.11)$$

kde látková konstanta  $\varepsilon$  se nazývá molární extinkční koeficient. Rovnice (1.10) a (1.11) se obvykle spojují do Lambert-Beerova zákona [1]

$$A(\nu) = \varepsilon(\nu) C x, \quad \text{neboli} \quad (1.12)$$

$$I_\nu = I_0 10^{-\varepsilon(\nu) C x}. \quad (1.13)$$

### 1.3.2 Základy emisní spektroskopie

Pro odlišení luminiscenčního záření od jiných optických pochodů, jako je rozptyl nebo Čerenkovovo záření se všeobecně užívá Vavilovovy definice: luminiscence je přebytek záření nad tepelným vyzařováním tělesa v tom případě, má-li toto přebytečné záření konečnou dobu trvání, jež podstatně převyšuje periodu světelných kmitů [1]. V kapitole 1.1 již byl pojem luminiscence vyjasněn z pohledu elektronové struktury jako zářivý přechod mezi dvěma energetickými hladinami luminiskující molekuly. Nastává-li přechod z hladiny s energií  $E_2$  do hladiny  $E_1$ , můžeme podle vztahu (1.6) vyjádřit vlnovou délku emitovaného fotonu jako

$$\lambda = \frac{hc}{E_2 - E_1}. \quad (1.14)$$

Přitom pro vlnovou délku luminiscence většiny fluoroforů platí Stokesův zákon

$$\lambda_{\text{lum}} \geq \lambda_{\text{exc}}, \quad (1.15)$$

podle kterého je vlnová délka luminiscenční emise větší nebo rovna vlnové délce excitačního záření. Na základě kvantových představ jde o vyjádření zákona zachování energie pro luminiscenci, protože se při emisi vyzáří pouze část energie, která byla luminoforem pohlcena při absorpci. Na snížení energie emitovaného záření se v roztocích podílí také dipólové elektrostatické interakce luminiskující molekuly s rozpouštědlem, když dochází ke změnám solvatace molekuly při absorpci a emisi světla a tím k disipaci části excitační energie. Spektroskopicky se luminiscence charakterizuje intenzitou  $J$  podle rovnice (1.8). Spektrální složení  $J_\lambda$  či  $J_\nu$  je vyjádřeno spektrální hustotou fotonového toku luminiscence na jednotkový interval vlnových délek či frekvencí

$$J_\lambda(\lambda) = \frac{dJ}{d\lambda} \quad \text{či} \quad (1.16)$$

$$J_\nu(\nu) = \frac{dJ}{d\nu}. \quad (1.17)$$

Dále je možno luminiscenci charakterizovat její polarizací, koherenčními vlastnostmi a délkou dohasínání, která je dána dobou života excitovaného stavu, ze kterého dochází k emisi.

Jinou základní veličinou, popisující luminiscenci, je kvantový výtěžek  $\phi$ , definovaný pro stacionární luminiscenci jako

$$\phi = \frac{N_e}{N_a}, \quad (1.18)$$

kde  $N_e$  a  $N_a$  jsou počty fotonů emitovaných a absorbovaných vzorkem za sekundu. V případě, kdy luminiscence není stacionární, platí pro kvantový výtěžek látky excitované v časovém intervalu 0 až  $t_1$  obecná definice

$$\phi = \frac{\int_0^\infty N_e dt}{\int_0^{t_1} N_a dt}. \quad (1.19)$$

Pro určení kvantového výtěžku luminiscence je třeba znát počet světelných kvant, která jsou v látce absorbována. Pokud zanedbáme reflexi a rozptyl světla na

kyvetě, ve které se luminiscence roztoků měří v biofyzice nejčastěji, je úbytek fotonového toku po průchodu dráhy  $l$  vzorkem dán absorpcí podle Bouguerova-Lambert-Beerova zákona (viz (1.13))

$$J_a = J_0(1 - 10^{-\varepsilon C l}). \quad (1.20)$$

Intenzita fluorescence  $J_f$  emitované vzorkem je úměrná intenzitě absorpce  $J_a$ , násobené kvantovým výtěžkem fluorescence  $\phi_f$

$$J_f = \kappa J_a \phi_f, \quad (1.21)$$

kde  $\kappa$  je faktor závislý na podmínkách experimentálního uspořádání.

Důležitými kvantovými charakteristikami absorpce a emise jsou pravděpodobnosti odpovídajících optických přechodů. Ty jsou dány Einsteinovými koeficienty spontánních a stimulovaných přechodů mezi základním a excitovanými stavy molekuly. Pro případ ideální fluorescence, kdy k úbytku počtu excitovaných částic dochází pouze zářivými přechody z rovnovážné vibrační hladiny excitovaného singletního stavu do všech vibračních hladin základního elektronového stavu, můžeme počet excitovaných molekul vyjádřit rovnicí

$$n_e(t) = n_{e0} e^{-A_e t}, \quad (1.22)$$

kde  $n_{e0}$  je počet excitovaných molekul v čase  $t = 0$ , kdy byla excitace vypnuta a  $A_e$  je úplná pravděpodobnost spontánních přechodů, definovaná jako součet pravděpodobností přechodů do všech vibračních hladin v základním stavu

$$A_e = \sum_n A_{e0,zn}, \quad (1.23)$$

kde  $A_{e0,zn}$  je Einsteinův koeficient spontánní emise z rovnovážné vibrační hladiny  $e0$  do  $n$ -té vibrační hladiny základního stavu. Intenzita fluorescence  $J_f(t)$  je úměrná rychlosti úbytku excitovaných částic, a proto dohasíná podle stejného zákona jako  $n_e(t)$  v rovnici (1.22). Střední hodnotu doby života molekuly v excitovaném stavu  $\bar{\tau}_e$  můžeme v případě exponenciálního dohasínání vyjádřit jako převrácenou hodnotu úplné pravděpodobnosti spontánní emise  $A_e$

$$\bar{\tau}_e = \frac{1}{A_e} = \tau_e^0, \quad (1.24)$$

kde  $\tau_e^0$  představuje vnitřní radiační dobu života bez zhášecích mechanismů. V případě složitějších zákonů časového ubývání  $n_e(t)$  neplatí rovnost  $\bar{\tau}_e = \tau_e^0$ , a pomocí pozorované doby dohasínání luminiscence můžeme pak nepřímo určit kvantový výtěžek

$$\phi = \frac{\tau}{\tau_e^0}. \quad (1.25)$$

## 1.4 Fotodynamická terapie

Fotodynamická terapie (PDT) je moderní metoda léčby povrchových onemocnění, zejména onkologického charakteru. U nádorových onemocnění byla potvrzena účinnost PDT při léčbě bronchogenních karcinomů, karcinomů močového

měchýře, jícnu, a zvláště pak nádorů kůže [13]. V dermatologii se pomocí PDT léčí závažná nádorová onemocnění, jako je např. aktinická keratóza, Bowenův karcinom, bazaliom nebo maligní melanom, ale i řada dalších onemocnění, jako je psoriáza nebo virová onemocnění způsobená např. lidským papilomavirem [14] nebo virem herpes simplex [15]. Úspěchů dosahuje PDT také při léčbě lokalizovaných bakteriálních infekcí včetně kmenů bakterií rezistentních vůči antibiotikům a jiným léčivům, jako je periodontitida či *acne vulgaris* nebo při sterilizaci chronických poškození tkání u pacientů s diabetem [16]. Stejným způsobem je možné využít fotodynamický efekt pro sterilizaci chirurgických nástrojů či operačních sálů. Prokázána byla možnost léčit pomocí PDT odolná houbová onemocnění, způsobená kvasinkou *Candida albicans* a řadu dalších mikrobiálních onemocnění, způsobených například parazitickým prvokem *Plasmodium*, nositelem malárie [15]. Další úspěchy zaznamenala PDT při léčbě věkem podmíněné degenerace makuly, která je hlavní příčinou slepoty u seniorů [16].

Odvětví fotodynamické terapie je věnováno velké experimentální úsilí a díky tomu je stále rozšiřována oblast, ve které PDT dokáže účinně zastoupit či nahradit konvenční léčiva a léčebné metody. Zvláště ceněna je přitom její minimální invazivnost a lokalizace přímo do postiženého místa, bez poškození zdravé okolní tkáně. Kromě samotného terapeutického účinku je navíc PDT možné současně využívat pro diagnostiku určitých onemocnění, protože fotosenzibilizátory, hromadící se v nezdravé tkáni, vykazují po ozáření světlem, kromě tvorby singletního kyslíku, také fluorescenci. Fluorescenci je pak možné pomocí digitálních zobrazovacích metod použít k lokalizaci a sledování průběhu onemocnění nebo spektroskopickými metodami provádět velmi citlivou kvalitativní i kvantitativní analýzu tkání [17–20]. Pro tyto účely se nabízí i možnost využít autofluorescence tkání bez použití fotosenzibilizátorů [17, 21]. Diagnostickými aspekty fluorescence se podrobně zabývá kapitola 1.5.

Léčba fotodynamickou terapií probíhá ve dvou krocích. Nejdříve je do těla pacienta aplikována léčivá látka, fotosenzibilizátor (PS), jenž se po určité době nahromadí v nezdravé tkáni. Následuje ozáření postiženého místa světlem o vhodné vlnové délce, a tím dojde k aktivaci léčiva. V místech s vysokou koncentrací fotosenzibilizátoru začne PS generovat singletní kyslík a další ROS, způsobí tak v tomto místě oxidativní poškození, vedoucí k apoptóze či nekróze nemocné tkáně [22].

### 1.4.1 Fotosenzibilizátory v PDT

Ideálním fotosenzibilizátorem pro fotodynamickou terapii je chemicky čistá a stabilní látka se známou chemickou strukturou, která se přednostně hromadí v nezdravé tkáni, je netoxická pro organismus, nevyvolává léčebný efekt, pokud pacient není vystaven světlu, a nemá vedlejší účinky, jako např. alergické reakce či hypotenze [6]. Měl by být ze zdravých tkání organismu rychle vylučován (platí zvláště pro oči a kůži) pro zkrácení doby, po kterou zůstává pacient fotocitlivý. Kvalitní fotosenzibilizátor by měl silně absorbovat světlo o vlnových délkách větších než 630 nm, aby mohlo být dosaženo dostatečné hloubky penetrace aktivací světla do tkáně, a také, aby se zamezilo fotosenzitivitě pokožky při ozáření slunečním světlem, jehož intenzita klesá pro vlnové délky větší než 600 nm [6]. Důležitou vlastností PS je vysoký kvantový výtěžek tvorby  $^1\text{O}_2$  a malá náchylnost

k tvorbě agregátů, vedoucí ke snížení fotochemické účinnosti fotosenzibilizátorů. Je výhodné, pokud je molekula PS amfifilní, tedy rozpustná ve vodě, ale zároveň obsahuje hydrofobní část, která napomáhá PS při prostupování buněčnými membránami.

Fotosenzibilizátory používané v onkologii se obvykle dělí do tří skupin podle etap technologického vývoje.

### PS první generace

První generace zahrnuje deriváty hematoporfyrinu (HpD) a jeho analogů, které představují nejstarší používané fotosenzibilizátory. Aktivní složky s terapeutickým účinkem tvoří komplexní směs dimerů a oligomerů HpD, spojených eterovými, esterovými nebo uhlíkovými vazbami. Purifikovaná PDT léčiva z první generace, zbavená monomerů pod komerčním označením Photofrin, byla homologována pro klinické použití v roce 1993 a používána např. při léčbě kožních nádorů, nádorů močového měchýře a plic. Terapeutické dávky těchto PS vyvolávají kožní fotosenzitivitu, trvající 4–12 týdnů. Absorpčními pásy mezi 440–650 nm je určeno použitelné excitační světlo, jehož hloubka průniku do tkání je omezena přibližně na 5 mm [4].

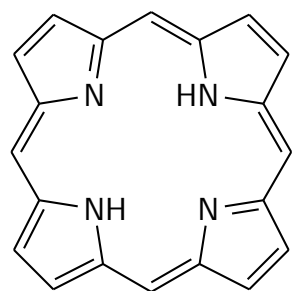
### PS druhé generace

Nová skupina fotosenzibilizátorů byla vyvinuta pro zlepšení vlastností léčiv první generace. Díky známé chemické struktuře těchto látek o jediné substanci je zjednodušena interpretace experimentů a umožněna reprodukovatelnost experimentů i přípravy léčiva. Další zlepšení se týká posunutí absorpce k vyšším vlnovým délkám, do rozmezí 650–800 nm [23], což umožní zvýšit hloubku průniku excitačního záření na 1–2 cm do tkání [14]. Vyšší selektivita akumulace PS druhé generace do patologické tkáně snižuje fototoxicitu a nežádoucí fotosenzitivita je výrazně potlačena díky rychlejšímu odbourávání PS této generace z organismu [4]. Mezi PS druhé generace patří deriváty porfyrinů, ftalocyaniny, chloriny, purpuriny a další.

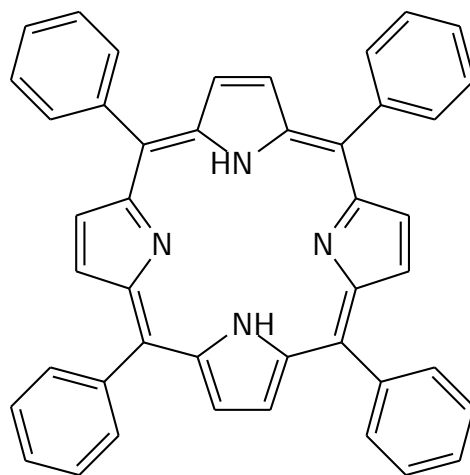
**Porfyriny** s různě upravenými postranními řetězci jsou přirozenými pokračovateli porfyrinů a hematoporfyrinů první generace, od nichž se liší hlavně tím, že jsou to čisté látky se známou chemickou strukturou. Struktura porfyrinového jádra je patrná z Obrázku 1.3a a příklad jeho modifikace na meso-tetrafenylporfyrin (TPP) je zobrazen na Obrázku 1.3b. TPP je možné snadno syntetizovat, ale pro svou hydrofobicitu není vhodný pro vodní prostředí typické pro živé organismy. Jednoduchými modifikacemi fenylových postranních skupin je možné dosáhnout lepší rozpustnosti ve vodě [4] jako v případě meso-tetra(4-sulfonatofenyl)porfyrinu (TPPS<sub>4</sub>), jenž má však nevýhodu ve své neurotoxicitě [14]. Záslouhou českých vědců, jejichž modifikovaná příprava TPPS<sub>4</sub> zahrnující závěrečnou purifikaci preparátu chromatografií na Sephadexu, byla jeho neurotoxicita minimalizována [24,25]. Vhodnými substituenty lze také měnit náboj molekuly, a tím vzniká možnost cílit lokalizaci derivátů porfyrinů do určitých míst v buňce [26]. Například kladný náboj meso-tetrakis(4-N-methylpyridyl)porfyrinu (TMPyP) způsobuje interkalaci TMPyP s DNA v jádře buňky [27].

**ALA** První komerčně dostupný fotosenzibilizátor druhé generace, homologovaný pro léčbu aktinické keratózy v roce 1999 pod označením Levulan, obsahuje kysel-

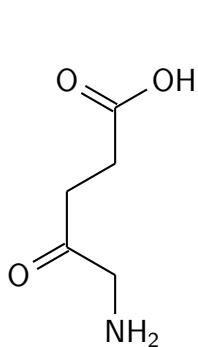




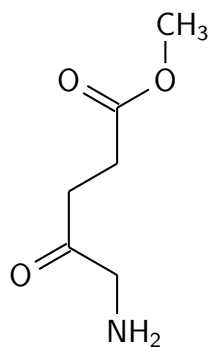
(a) Porfyrinové jádro.



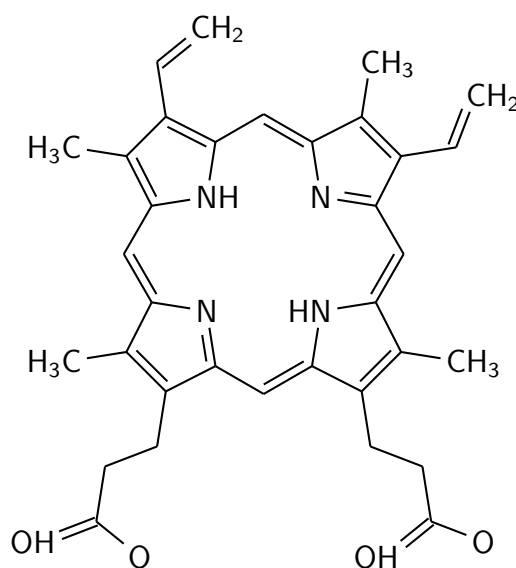
(b) TPP.



(c) Kyselina 5-aminolevulová.



(d) Methylester kyseliny 5-aminolevulové.



(e) Protoporfyrin IX.

Obrázek 1.3: Příklady fotosenzibilizátorů druhé generace.

linu 5-aminolevulovou (ALA), která sama o sobě nemá žádný terapeutický účinek. V buňce je však ALA prekurzorem protoporfyrinu IX (PpIX), vlastního fotosenzibilizátoru, v dráze biosyntézy hemu. ALA je tedy tzv. endogenní fotosenzibilizátor [13, 28]. ALA i PpIX jsou látky přirozeně se vyskytující v buňkách, a proto jsou dávky ALA do  $20 \text{ mg kg}^{-1}$  bez vedlejších efektů, ve vyšších dávkách se však mohou projevit příznaky akutní porfyrie, jako je zvracení, hypotenze nebo porucha jaterní funkce [29]. Nevýhodou ALA je její silná hydrofilita, která jí znesnadňuje průnik přes lipidní buněčnou membránu, a při povrchové aplikaci je pak produkce PpIX omezena na hloubku 2–3 mm, což může být pro úspěšnou PDT nedostačující [28]. Proto byla vytvořena řada modifikací ALA, z nichž zatím nejúspěšnější jsou estery ALA. V roce 2001 byl v Evropské Unii pro PDT registrován přípravek Metvix, obsahující methylester ALA (MAL), u něhož byla prokázána schopnost pronikat hlouběji do lézí [30]. Při povrchové aplikaci prokázaly hexyla a oktyl estery ALA ještě lepší schopnost průniku přes svrchní vrstvu pokožky než MAL [31]. Chemická struktura ALA, jejího methylesteru a protoporfyrinu IX je zobrazena v Obrázku 1.3. Doba fotosenzitivita kůže je proti první generaci PS zkrácena na 1–2 dny [6, 13]. Podrobný popis metabolismu ALA a princip hromadění PpIX je uveden v kapitole 1.4.2.

**Ftalocyaniny** s maximem absorpce v rozmezí 650–700 nm dovolují použití excitačního záření, které v porovnání s porfyriny proniká hlouběji do tkání. Maximální koncentrace po intravenózní aplikaci je dosaženo již po 2–3 hodinách, temná fotocitlivost je zanedbatelná a poločas rozpadu dostatečně krátký [14]. Díky těmto vlastnostem je kožní fotosenzitivita minimální. V buňce se lokalizují převážně do mitochondrií a lyzozomů [6].

**Chloriny** jsou tetrapyroly, které se od porfyrinů liší v absenci dvojnásobné vazby v jednom z pyrolových kruhů, mají absorpci vzhledem k porfyrinům posunutou směrem k větším vlnovým délkám. Do této skupiny se řadí meso-tetra(hydroxyfenyl)chlorin (mTHPC), zástupce komerčních fotosenzibilizátorů pro léčbu rakoviny, registrovaný v roce 2001 pod značkou Foscan. Své předchůdce předčí maximem absorpční vlnové délky na 652 nm, což umožní hlubší průnik excitačního záření do tkáně. Ještě větší výhodou je ale mimořádně nízké ozáření, potřebné pro PDT, které je ve srovnání s ALA asi 5–10 krát nižší [13]. Kožní fotosenzitivita, vyvolaná mTHPC po léčbě, je oproti první generaci snížena na 2–4 týdny.

### PS třetí generace

Jako nejnovější generace fotosenzibilizátorů se podle [4] označují PS druhé generace se schopností selektivní distribuce přímo do nezdravé tkáně pomocí cílených přenašečů. Novější literatura definuje PS třetí generace jako komplex PS druhé generace s nanočásticemi, které slouží k primární absorpci světla a následně předají excitační energii vlastnímu fotosenzibilizátoru pomocí Försterova rezonančního přenosu energie [16]. Definice fotosenzibilizátorů třetí generace podle [23] charakterizuje tyto PS vazbou na molekulu přenašeče nebo konverzí prekurzoru na fotosenzibilizátor. V současnosti probíhá intenzivní výzkum této generace PS s cílem maximalizovat specificitu PS pro cílové tkáně a minimalizovat tak akumulaci PS do zdravých tkání. Použití pasivních nanočástic, biodegradabilních na-

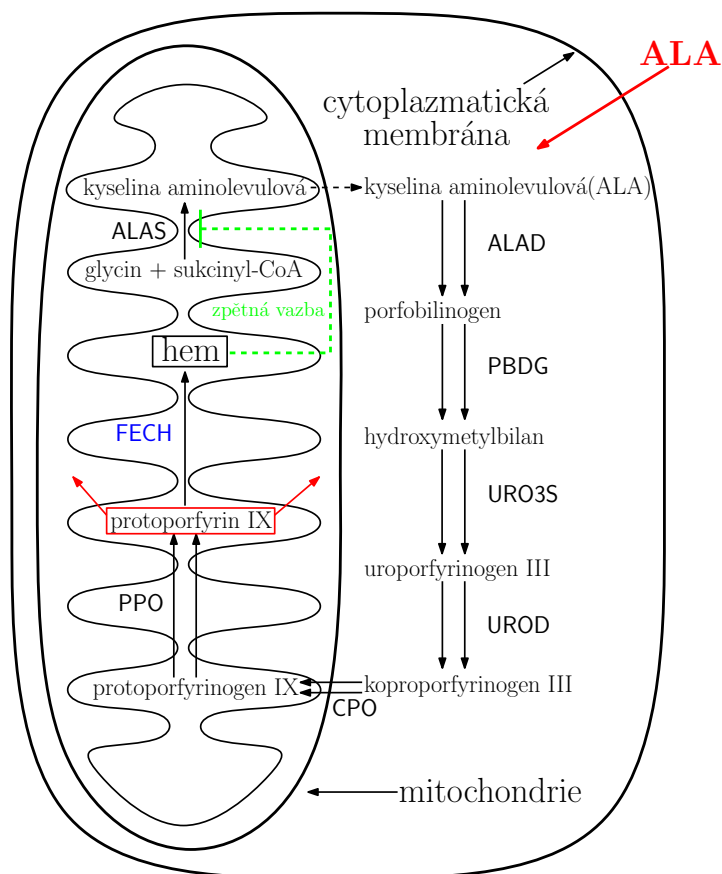
nočástic, kvantových teček a cílených lipozomických přenašečů se jeví jako slibná metoda, stále se však nachází ve stádiu výzkumu [23]. Kromě zesílení terapeutického účinku je možné s použitím nanočásticových fotosenzibilizátorů mimořádně zlepšit i fluorescenční diagnostiku [32].

Převážně pro ostatní antimikrobiální, antimykotické a protivirové fotoinaktivizační účely, zmíněné výše, byla testována přírodní nebo umělá barviva, která nejsou odvozena od tetrapyrolové struktury. Příkladem syntetických PS je bengálská červeně nebo toluidinová modř O [6]. Mezi přírodní fotosenzibilizátory patří např. hypericin z třezalky tečkované [6], který je, mimo jiné, zodpovědný za hypericismus dobytka po spasení třezalky, otravy projevující se popáleninami pokožky po vystavení slunci [33]. Hypericin má kromě antidepressivního účinku také protivirovou aktivitu, která byla zkoumána v souvislosti s léčbou HIV a dalších virových onemocnění. Využití pro PDT nachází v léčbě psoriázy, bradavic a rakoviny kůže [33]. Nejnovější výzkum se zaměřuje na účinky kurkuminu, přírodního žlutého barviva, používaného jako koření. Prokázána byla účinnost kurkuminu při fotodynamické léčbě infekce, způsobené odolnou kvasinkou *Candida albicans* [34].

#### 1.4.2 Farmakokinetika a biodistribuce PS

Fotosenzibilizátor je možné pacientovi aplikovat třemi způsoby, v závislosti na povaze onemocnění. PS lze podat lokálně mastí či injekčně přímo do nádoru (intralezionálně) nebo intravenózně, kdy je PS přenesen do celého těla pomocí krevního řečiště. Po aplikaci fotosenzibilizátoru dojde po určité době k jeho nahromadění v nezdravé tkáni. Hromadění PS v nádoru je způsobeno tím, že proliferující tkáně mají zvýšenou tendenci PS absorbovat z krve, nebo jej nedokáží metabolizovat s takovou rychlostí jako zdravé tkáně. Ačkoliv detailní mechanismus vedoucí k hromadění PS v nádoru nebyl ještě u řady léčiv zcela objasněn, jsou známy cesty, jež mohou do této problematiky zasahovat.

Po intravenózní aplikaci je léčivo rozpuštěno v krvi, kde může docházet k desintegraci PS od přenašeče nebo jeho deagregaci a vazbě na krevní buňky (erythrocyty, leukocyty) nebo různé sérové proteiny. Následně se PS váže na cévní stěnu, jejíž variabilita mezi zdravou a nezdravou tkání a rozmanitost v různých orgánech může být důvodem odlišného sklonu k hromadění PS. Dále fotosenzibilizátor projde přes cévní stěnu a difuzí pronikne do cílové tkáně, kde ještě může být chemicky modifikován metabolickými enzymy. Díky zvýšené produkci membránových receptorů pro LDL lipoproteiny, která byla u nádorů v některých případech pozorována, mohou být PS, vázané často právě na lipoproteiny s nízkou hustotou, nádorem vychytávány [35]. Dalším důležitým prvkem, který napomáhá akumulaci PS v proliferující tkáni, je snížené intersticiální pH nádoru. Anionické PS, které jsou za fyziologického pH ionizované, neutralizují svůj náboj ve sníženém pH, což jim napomáhá při prostupování buněčnými membránami v nádoru [36]. PS je z tkání vyloučen převážně lymfatickou cestou, nádory však obvykle mívají zhoršenou lymfatickou drenáž a PS tak nemůže být účinně z nezdravé tkáně odstraněn [37]. Každá kombinace těchto prvků vede k vlastní biodistribuci a farmakokinetice PS v organismu, jež musí být pro úspěšný průběh PDT důkladně prostudována. Čas, který je potřebný pro vytvoření několikanásobně vyšší koncentrace PS v cílové tkáni oproti zdravé tkáni, je závislý i na dalších faktorech, mezi něž patří typ PS, médium obsahující PS nebo přenašeč PS, způsob apli-



Obrázek 1.4: Schéma biosyntézy hemu.

kace i druh onemocnění [37]. Fotosenzibilizátory mohou pronikat do buněčných organel jako je mitochondrie, lyzozom, endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát nebo plazmatická membrána. Přesná lokalizace PS v cílových buňkách určuje typ a stupeň poškození vyvolaný PDT, protože ROS díky své krátké době života způsobují poškození pouze v blízkém okolí místa jejich tvorby. Porozumění těmto principům hraje klíčovou roli při volbě nejvhodnějšího PS pro danou aplikaci.

### Metabolismus a farmakokinetika ALA

Kyselina aminolevulová je prekurzor protoporfyrinu IX při biosyntéze hemu. ALA je endogenní fotosenzibilizátor, terapeutický účinek je zprostředkován díky zvýšení koncentrace PpIX v proliferujících buňkách po exogenní aplikaci ALA. Princip akumulace PpIX v nádorových buňkách je tedy odlišný od ostatních fotosenzibilizátorů zmíněných výše.

Biosyntéza hemu začíná v mitochondrii kondenzací glycinu a sukcinyl-CoA za vzniku ALA [28], jak je naznačeno v Obrázku 1.4. Tento krok, regulovaný negativní zpětnou vazbou hemem (v Obrázku 1.4 vyznačeno zelenou čárkovanou linkou), určuje rychlost přirozené syntézy hemu [14]. Následuje tvorba porfobilinogenu (PBG) a enzymatická kondenzace čtyř molekul PBG na uroporfyrinogen I a III, z něhož dalšími reakcemi vzniká PpIX. Zabudováním atomu železa do PpIX pomocí enzymu ferrochelataza pak vzniká hem. Exogenní aplikací ALA dojde k přeskočení prvního kroku syntézy hemu, a tím je znemožněna přirozená regulace tvorby PpIX. Koncentrace protoporfyrinu IX v buňce vzroste, a díky

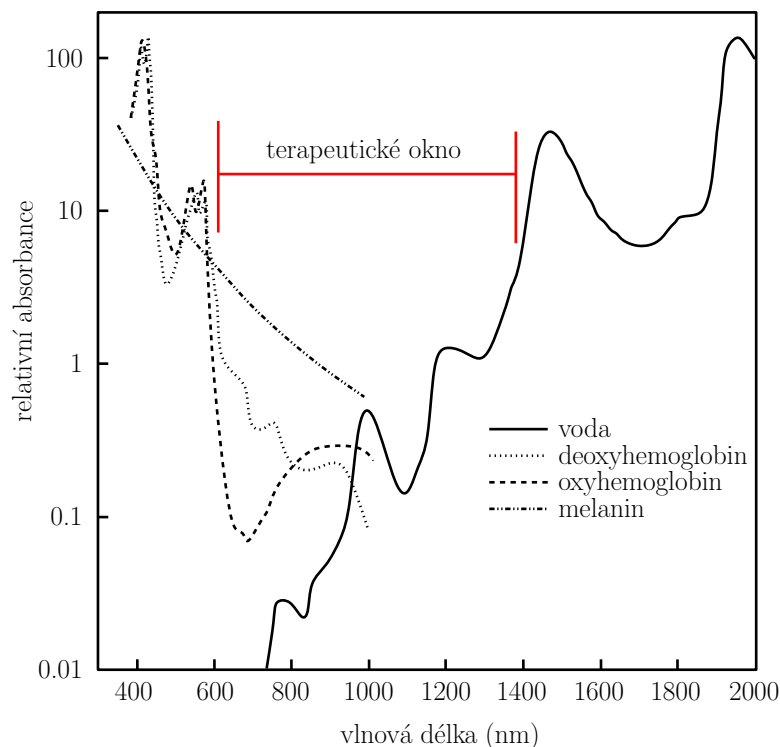
tomu, že proliferující buňky vykazují nižší účinnost ferrochelatasy a mají omezené množství železa, začne se PpIX v mitochondrii hromadit [14]. V nádorech byla rovněž pozorována zvýšená aktivita enzymů, vedoucí k produkci PpIX, což urychlí nárůst jeho koncentrace uvnitř buněk. Vliv na produkci PpIX může mít podle některých studií i teplota tkáně, pH nebo dostupnost kyslíku [28]. Zdravé tkáně dokáží terapeutické dávky ALA metabolizovat.

Obvykle je ALA aplikována intravenózně, povrchově mastí nebo, v případě rakoviny močového měchýře, intravezikálně. Na rozdíl od jiných PS je možné i orální podání ALA, které se jeví zvláště výhodné pro léčbu gastrointestinálního traktu [28]. Při povrchové aplikaci ALA je penetrace do pokožky omezena svrchní vrstvou zrohovatělých buněk (SC, *stratum corneum*), jež tvoří špatně propustnou lipidní síť. Hloubka, do které ALA proniká, nepřesahuje podle fluorescenčních měření 0,6 mm [28], může se však měnit v závislosti na pozici v rámci těla [38]. Pronikání povrchově aplikované ALA do epidermis, kde se převážně tvoří indukovaný PpIX, lze zlepšit mechanicky odstraněním SC, použitím speciálních akcelerantů transdermální permeace [39] nebo chemickými modifikacemi ALA, např. esterifikací na MAL a další estery [31].

### 1.4.3 Excitace PS

Pro aktivaci PS, lokalizovaných v nádorech, je možné použít širokospektrální zdroje světla, např. obloukovou lampu. Takové lampy jsou levné a jednoduché, ale jejich světlo se obtížně váže do optických vláken a není jednoduché spočítat efektivní ozáření dodané během PDT. Navíc je potřeba odfiltrovat škodlivé UV záření i infračervenou oblast spektra, která může způsobovat zahřívání tkání [13]. Plynové výbojky našly rovněž v PDT využití, ovšem i s těmito zdroji záření byla PDT omezena na snadno dostupná místa, především při léčbě kožních onemocnění. Použití laserů vybavených optickými vlákny mimořádně rozšířilo možnosti fotonodynamické terapie v medicíně, neboť tak byl umožněn přenos excitačního záření endoskopicky, pomocí vláken, na téměř libovolné místo v těle. Lasery umožňují výběr přesné vlnové délky excitačního záření odpovídající absorpčnímu spektru právě použitého PS. Jejich nevýhodou je vysoká cena, složitější obsluha a větší rozměry ve srovnání s výše zmíněnými zdroji, které činí lasery relativně imobilní. Pokrok v polovodičové technice umožnil snížit cenu i rozměry zdrojů laserového záření díky laserovým diodám [14]. Pro klinické použití je možné použít i LED diody, které jsou levnější a menší než ostatní zdroje, ale přitom dostatečně výkonné (až  $150 \text{ mW cm}^{-2}$ ), a je možné zvolit vlnovou délku jejich emise v rozmezí 350–1100 nm [13].

Pro PDT je podstatné umět předpovědět prostorovou distribuci záření v cílové tkáni. Vstupem do tkáně je světlo absorbováno a rozptýleno v poměru závislém na typu tkáně a použité vlnové délce. Rozptyl je způsobován mikroskopickými nehomogenitami tkáně, jako jsou makromolekuly, buněčné orgány, organizované buněčné struktury aj. Hlavními složkami tkání, které absorbují světlo, jsou chromofory, jako hemoglobin, myoglobin a cytochromy. Hlavní omezení penetrace záření do většiny tkání způsobuje zpravidla rozptyl, absorpce bývá méně významná. Absorpce hemoglobinem na kratších vlnových délkách v kombinaci se snižujícím se rozptylem na delších vlnových délkách a absorpcí záření vodou pro vlnové délky větší než 1300 nm vytváří tzv. optické okno (terapeutické okno),

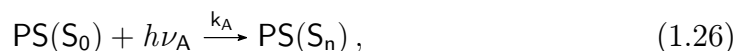


Obrázek 1.5: Terapeutické okno kůže, absorpční spektra vody, deoxy- a oxyhemoglobinu a melaninu v logaritmické škále [6].

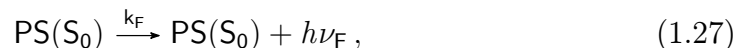
kteří omezuje vlnovou délku světla použitelného pro excitaci PS ve tkáni zhruba do rozmezí 600–1200 nm [14, 37]. Absorpční spektra hlavních složek tkání, které vymezují terapeutické okno, jsou zobrazena v Obrázku 1.5.

#### 1.4.4 Fotofyzika a fotochemie PS

Terapeutický účinek fotosenzibilizátoru spočívá ve schopnosti jeho excitované formy generovat reaktivní formy kyslíku. Excitace PS ze základního  $S_0$  stavu do některého excitovaného singletního stavu  $S_n$  je zpravidla dosaženo jednofotonovou absorpcí podle rovnice



kde  $k_A$  je rychlostní konstanta přechodu a  $\nu_A$  frekvence absorbovaného světla. Z vyššího excitovaného stavu  $S_n$  fotosenzibilizátor relaxuje obvykle do prvního excitovaného stavu  $S_1$ . Odtud může do základního stavu  $S_0$  přejít zářivým přechodem



kde  $k_F$  je rychlostní konstanta fluorescence a  $\nu_F$  frekvence emitovaného fotonu. Fotosenzibilizátor se může deaktivovat také nezářivým přechodem do  $S_0$  vnitřní konverzí a následnou vibrační relaxací



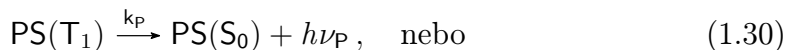
kde  $k_{VK}$  je rychlostní konstanta vnitřní konverze a  $k_R$  rychlostní konstanta vibrační relaxace. Dále může PS mezisystémovou konverzí přejít z  $S_1$  do tripletních

excitovaných hladin a následně relaxovat do hladiny  $T_1$

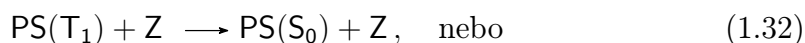


kde  $k_{MK}$  představuje rychlostní konstantu mezisystémové konverze.

Z první tripletní hladiny může PS přejít na základní singletní hladinu zářivými nebo nezářivými procesy

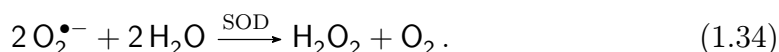


kde  $k_P$  je rychlostní konstanta fosforescence a  $\nu_P$  frekvence emitovaného fotonu. Jinou možností je deaktivace PS pomocí molekuly zhášече podle rovnic



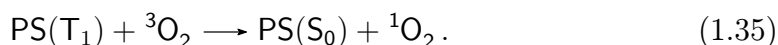
Nevzniká-li produkt a zhášec se chemicky nemění, jde o nefotochemické zhášení (1.32), v opačném případě dochází k fotochemickému zhášení (1.33). Doba života tripletního stavu PS je podstatně delší ( $\mu\text{s}$ ) než singletního stavu (ns) [4]. Dlouhá doba života umožňuje tripletnímu stavu PS reagovat s okolními molekulami dvěma způsoby.

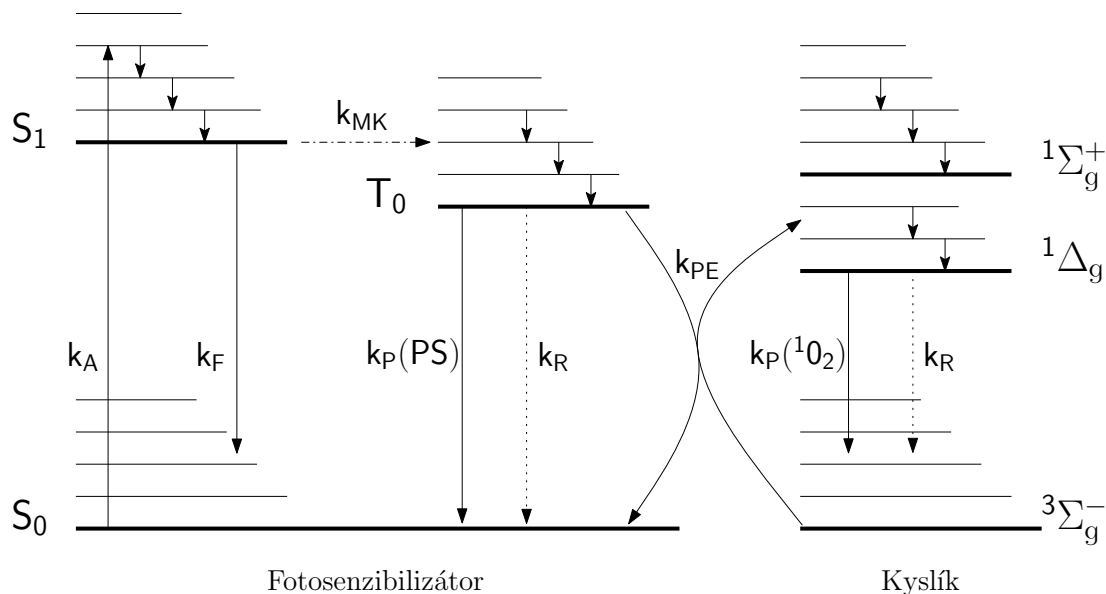
**Fotoefekt I. typu** je reakce PS v tripletním stavu s molekulou v jeho okolí, kdy dochází k přenosu elektronu nebo protonu v závislosti na rozdílu elektronegativit obou molekul. Reakce prvního typu vedou ke vzniku volných radikálů, které mohou reagovat s kyslíkem, za vzniku reaktivních forem, jako je superoxidový aniont. Ten sám o sobě v buňkách nevytváří významné oxidativní poškození, ale může reagovat s dalším superoxidovým aniontem a vodíkovým kationtem, za vzniku peroxidu vodíku [6]



Tato reakce může být katalyzována enzymem superoxid-dismutázou (SOD). Superoxidový aniont se rovněž podílí na produkci vysoce reaktivního hydroxylového radikálu  $HO^\bullet$  a reakcí s ním pak může tvořit singletní kyslík [6]. Hydroxylový radikál nemůže být z buněk odčerpán, protože difuzí snadno prostupuje buněčnými membránami po spádu koncentračního gradientu. Poškození způsobené  $HO^\bullet$  je limitováno jeho difuzní rychlostí v daném prostředí. Tento vysoce reaktivní radikál může reagovat s organickými molekulami, např. hydroxylovat mastné kyseliny nebo může okolní molekuly oxidovat. Hydroxylované mastné kyseliny jsou opět radikály, stejně jako oxidované molekuly, které mohou dále reagovat např. s kyslíkem, za vzniku peroxylového radikálu ( $ROO^\bullet$ ). Vznikající radikály tak mohou dále tvořit další radikály v řetězové reakci. Takovýto typ řetězové reakce, obvyklý pro oxidativní poškození mastných kyselin a dalších lipidů, demonstruje způsob, jakým dosahuje poškození tkání vznikajícími radikály nečekaných rozměrů.

**Fotoefekt II. typu** je označení pro jev přenosu energie z PS v tripletním stavu na molekulu kyslíku, singletní kyslík tak vzniká přímou cestou





Obrázek 1.6: Princip tvorby  $^1\text{O}_2$  fotosenzibilizací.

Zmíněné přechody mezi energetickými stavy fotosenzibilizátoru jsou zobrazeny v levé části Obrázku 1.6. V pravé části schématu jsou zakresleny energetické hladiny molekuly kyslíku a dále je zde vyznačen přenos energie mezi oběma systémy.

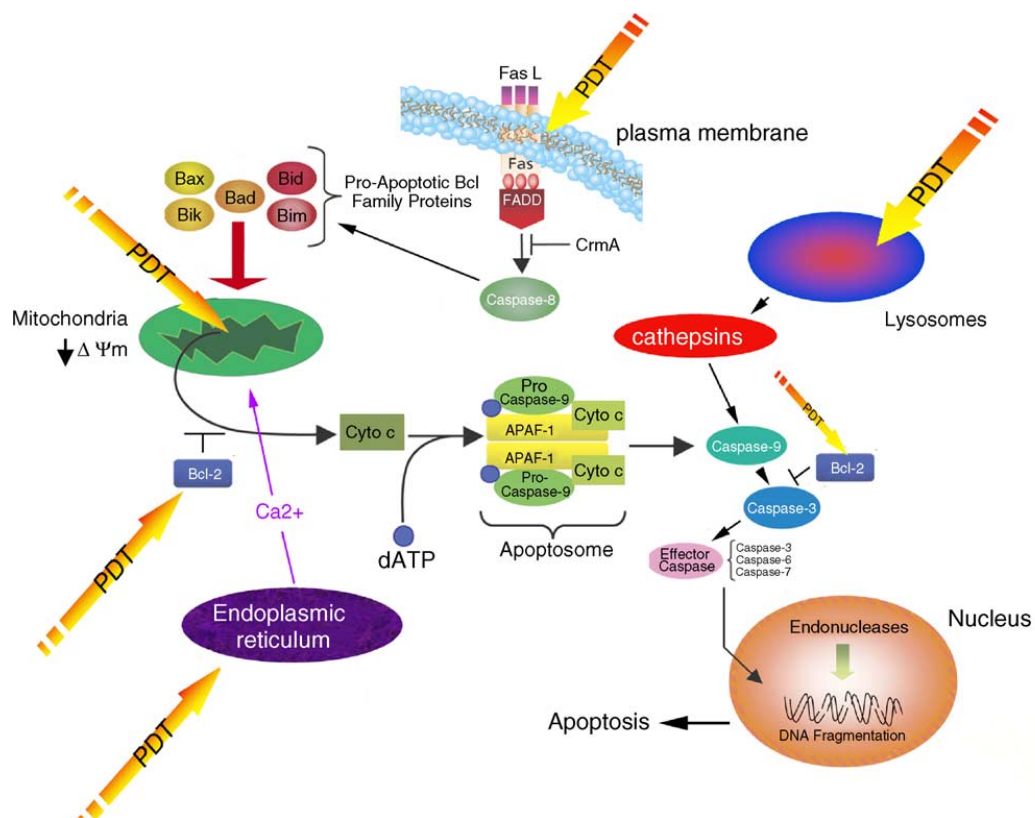
### 1.4.5 Mechanismy buněčné smrti při PDT

Při fotodynamické terapii mohou probíhat reakce typu I a II současně, přitom poměr mezi těmito procesy je dán druhem PS, jeho koncentrací a koncentrací  $^1\text{O}_2$  [6]. Typická molekula PS je schopna vyprodukovat  $10^3$ – $10^5$  molekul  $^1\text{O}_2$ , než je degradována některým z procesů vybělování PS [4]. V důsledku vysoké reaktivity a krátké doby života ROS mohou být poškozeny pouze molekuly v oblasti střední difuzní délky ROS, tedy v případě PDT v okolí PS. Doba života  $^1\text{O}_2$  v biologických systémech je kratší  $1,5 \mu\text{s}$ , a proto vzdálenost možného působení singletního kyslíku se pohybuje do 20 nm [6, 13].

V biologickém prostředí napadá  $^1\text{O}_2$  nenasycené vazby mezi atomy uhlíku, neutrálními nukleofily, jako jsou sulfidy a aminy, a díky své vysoké elektrofilitě také všechny anionty [4]. Všechny reaktivní formy kyslíku jsou oxidačními činidly a mohou přímo reagovat s řadou biologických molekul. Aminokyseliny obsažené v proteinech, zvláště cystein, methionin, tyrosin, histidin a tryptofan jsou častým cílem oxidace. Dále jsou nejčastěji oxidovány nenasycené lipidy a DNA může podléhat oxidativnímu poškození nukleových bazí i cukrfosfátové kostry [14, 37].

Singletní kyslík, vytvořený v průběhu fotochemické reakce, může nádorové buňky usmrtit přímo tím, že vyvolá jejich apoptózu, nekrózu a autofagickou buněčnou smrt. Bylo zjištěno, že pro vyvolání nekrózy tkáně je potřeba vytvořit  $10^{18}$ – $10^{19}$  molekul  $^1\text{O}_2$  na  $\text{cm}^3$  [16]. Současně může být porušen i vaskulární systém nádoru a zdravé tkáně, která ho bezprostředně obklopuje. Díky tomu je nádor vystaven hypoxickému stresu a nedostatku živin. Navíc je pomocí PDT možné vyvolat imunitní reakci proti zbývajícím nádorovým buňkám. Výsledek terapie je závislý na průběhu všech zmíněných mechanismů, jejichž relativní příspěvek se mění v závislosti na lokalizaci a druhu PS v buňce, na typu buňky a dávce ozá-





Obrázek 1.7: Buněčné signální cesty vedoucí k apoptóze tkáně po PDT [37].

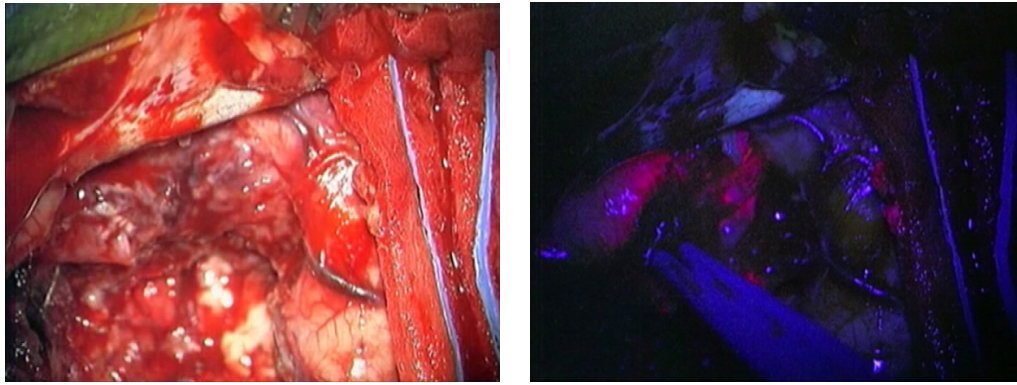
ření [37]. Některé známé buněčné a molekulární signální cesty, ústící v apoptózu, pozorované *in vitro* při PDT, jsou znázorněny v Obrázku 1.7.

## 1.5 PDT dosimetrie

Průběh fotodynamické terapie závisí na množství tří hlavních komponent v léčené tkáni; fotosenzibilizátoru, kyslíku a světla. V průběhu terapie se mění koncentrace PS i ROS, jejich luminiscence se během PDT vyvíjí složitým způsobem a různě v odlišných tkáních [38]. Aby byla léčba touto metodou maximálně úspěšná a přitom šetrná k pacientovi, je potřeba hlavní složky PDT monitorovat před terapií i během terapie a zajistit tak možnost okamžitého přizpůsobení. Podle [16] jsou možné tři přístupy dosimetrie PDT: přímá dosimetrie singletního kyslíku, explicitní dosimetrie PS, kyslíku a světla nebo implicitní dosimetrie, např. měřením vybělování fluorescence PS.

Přímá detekce fosforescence PS a  $^1\text{O}_2$  je možná, ale pro slabou intenzitu vyžaduje měření citlivé a drahé vybavení, navíc pro dostatečný počet emitovaných fotonů pro detekci fosforescence  $^1\text{O}_2$  je potřeba excitovat větší objem tkáně ( $10\text{ mm}^3$ ) [16]. To také znemožňuje přímou detekci singletního kyslíku pomocí optických vláken, jejichž efektivní detekční objem je menší než  $1\text{ mm}^3$ .

Hlavní směr pro fotodynamickou diagnostiku se odvíjí od fluorescence fotosenzibilizátorů. Spektrum fluorescence je pro daný PS charakteristické, obvykle v červené oblasti viditelného spektra [19]. Při použití nízké intenzity excitačního záření může být fluorescence PS nahromaděného v tkáni pozorována a tím umožňuje fotodetekci stavu nezdravé tkáně, lokalizaci lézí před samotnou terapií,



(a)

(b)

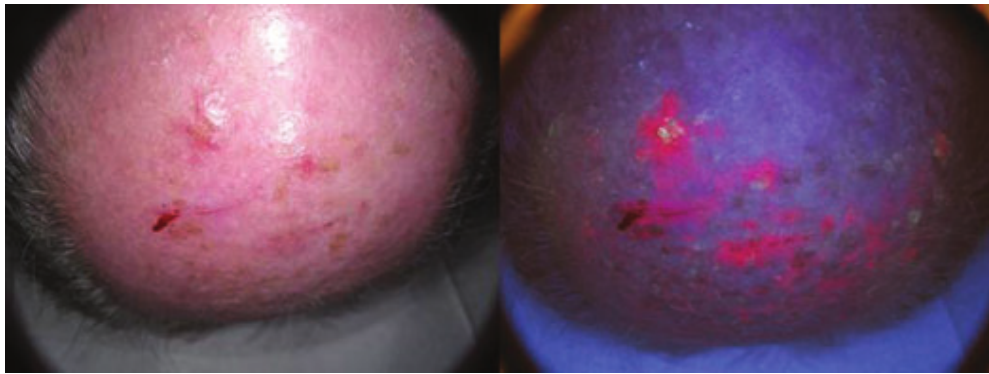
Obrázek 1.8: Multifonní glioblastom v bílém světle (a) a v modrém světle s fluorescencí indukovanou ALA (b) [40].

slouží jako pomůcka pro diagnostiku a po PDT může být měřením poklesu intenzity fluorescence stanovena doba, kdy přestane být pacient fotocitlivý. Pomocí fluorescenční diagnostiky (FD) je možné ohraničit lézi a nasměrovat tak např. provedení biopsie přesně do místa podezřelého z onemocnění. Tím se urychlí a usnadní exaktní diagnóza a v případě následující chirurgické terapie se zákrok omezí na nezbytně nutnou oblast. Pacient je tak ušetřen vícečetných biopsií a dalších nepříjemných vyšetření, jeho zotavení po případném zákroku s minimalizovaným rozsahem je rychlejší [18] a celá terapie pro pacienta komfortnější. Fluorescenci PS je navíc možné sledovat přímo během operačního zákroku, kdy kontrast mezi fluoreskující nezdavou tkání a zdravou tkání bez fluorescence může chirurg využít pro vedení operace. Fluorescencí řízená chirurgie (FGS, fluorescence guided surgery) a metody FD prokázaly významné úspěchy např. při složitých operacích nádorů mozku [40], gliomů s vysokým stupněm malignicity [29, 41], nádorů míchy [42], gynekologických nádorů [43] nebo rakoviny močového měchýře [33]. Předmětem výzkumu jsou další oblasti možného využití, úspěch byl prokázán např. u FGS rakoviny slinivky břišní a střev [44, 45]. FGS umožňuje dokonalejší odstranění rakovinné tkáně v porovnání s běžným postupem, fluorescence PS pomáhá identifikovat okolní léze a residua, která by v bílém světle nebylo možné odhalit. To přispívá k vyšší úspěšnosti zákroků a omezení recidivy. Příklad FGS nádoru mozku je vyobrazen v Obrázku 1.8. Metody FD, FGS a další postupy, odvozené od fluorescence PS, jsou ceněné pro svou relativní jednoduchost, možnost neinvazivní diagnostiky bez nutnosti použití drahého vybavení a přesnost a citlivost, se kterou je možné nezdavou tkáň detekovat.

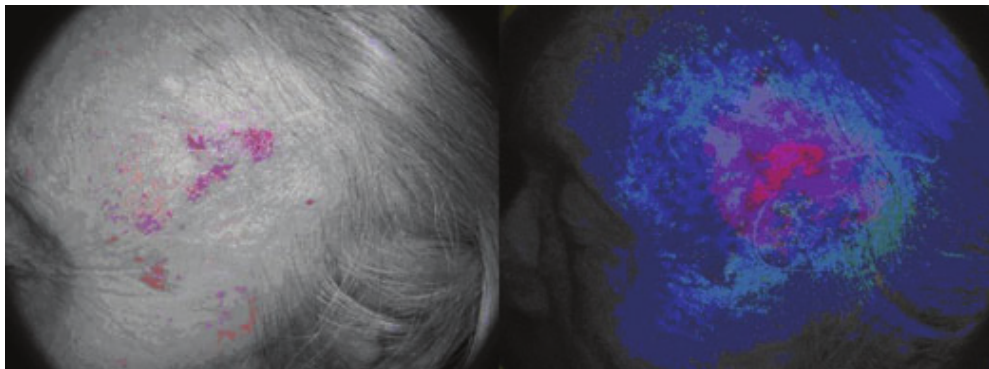
Většina FD se provádí pomocí porfyrinových fotosenzibilizátorů, nejčastěji indukovaných ALA nebo MAL. Fluorescenční diagnostika pak může být uskutečněna bodovým měřením nebo zobrazovacími metodami. Při bodovém měření se zaznamená spektrum záření z malé oblasti tkáně, zobrazováním se monitoruje širší oblast, zpravidla s výrazně nižším spektrálním rozlišením.

### Digitální zobrazování

Pro lékařskou dokumentaci se dnes standardně používá digitální fotografie. Pomocí moderních přístrojů je možné zobrazovat fluorescenci s větší citlivostí než



(a)



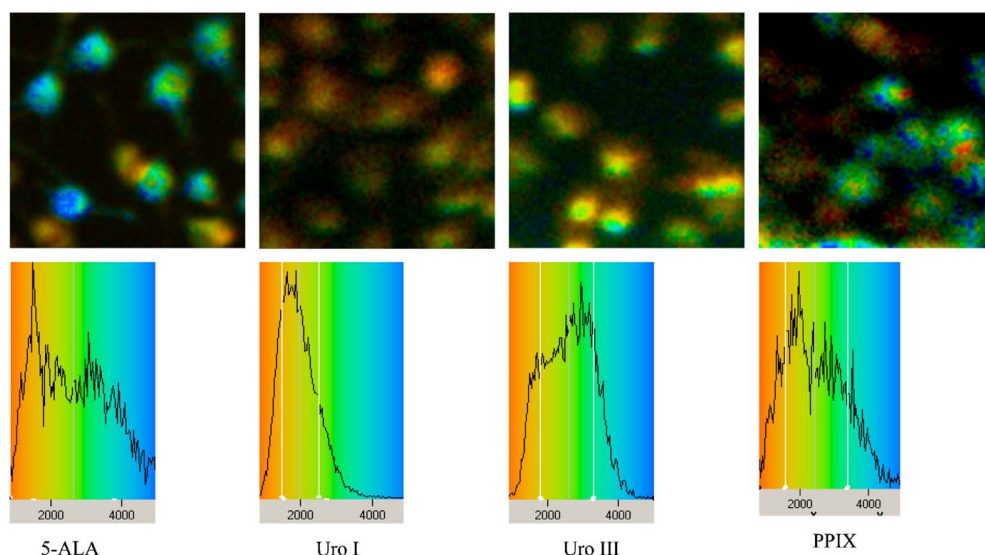
(b)

Obrázek 1.9: (a) ALA indukovaná fluorescence aktinicky pozměněné pokožky hlavy (vpravo) v porovnání se snímkem v bílém světle bez fluorescence (vlevo), (b) MAL indukovaná fluorescence karcinomu bazálních buněk, zvýrazněná softwarovými úpravami fotografií [17].

při pozorování okem. Existují speciální fotoaparáty, určené pro zaznamenání fluorescence, které mají vlastní zdroj excitačního UV záření a speciální filtr pro potlačení zpětně reflektovaného excitačního záření. Dražší a mnohem citlivější přístroje pro detekci fluorescence dokáží zaznamenat obraz tkáně na mikroskopické i makroskopické úrovni. Poté se softwarovými úpravami může vytvořit obraz tkáně s nepravými barvami, které odstupňují intenzitu fluorescence nebo např. dobu života fluorescence. Dosáhne se tak lepšího a přesnějšího vyhodnocení obrazu [17, 19, 20]. Příklad použití metod digitálního zobrazování fluorescence pro diagnostické účely je na Obrázku 1.9.

### Spektrální zobrazování

Spektroskopie fluorescence PS zprostředkuje kvalitativní a kvantitativní obraz stavu tkáně. Nejpoužívanější technika fluorescenční spektroskopie užívá pro diagnostiku emisní spektra fluorescence, ale např. rozdíly ve vlnové délce maxim excitačních spekter nebo polarizace fluorescence podávají také hodnotné informace pro diagnostiku. S použitím optických vláken není spektroskopie omezena pouze na povrchová měření, ale dostupné jsou i vnitřní orgány, jako např. plíce, močový měchýř nebo cervix [17, 33]. Při FD je třeba brát ohled na to, že i některé zdravé tkáně vykazují určitou intenzitu autofluorescence, jako například lym-



Obrázek 1.10: Rozlišení ALA a jejích metabolitů pomocí měření doby života fluorescence buněk metodou FLIM s histogramy střední doby života. V případě ALA lze rozlišit přinejmenším dvě hlavní střední doby života; delší (modrá) pro plazmatickou membránu a vnější cytoplasmu, kratší (zelená) pro cytoplasmu buněk. Z ostatních snímků lze rozeznat PPIX s delší dobou života od uroporfyrinů I a III s kratšími dobami života. Na snímku uroporfyrinu III je čas metabolizována na PPIX [48].

fatické uzliny, omentum, plodová tkáň, placenta a hojící se poranění. Autofluorescenci způsobují fluorofory, jako je kolagen, elastin, složky pojivové tkáně, tryptofan a nikotinamid adenin dinukleotid (NAD). Pomocí doby života fluorescence je možné jednotlivé fluorofory odlišit, a dokonce autofluorescenci tkání použít k diagnostice [17, 21]. Pro většinu fluoroforů nezávisí doba života fluorescence na jeho koncentraci, ale na charakteristikách fluoroforu a vlastnostech okolního molekulárního prostředí. Toho využívají techniky zobrazování doby života fluorescence (FLIM, fluorescence lifetime imaging), protože obvykle není koncentrace PS v tkáni známa [46]. Metody FLIM jsou úspěšné v rozlišování signálů různých druhů fluoroforů, ale jejich hlavní přínos je ve schopnosti separace fluorescenčních signálů jednoho fluoroforu v různých stavech interakce s okolním prostředím [47]. Příkladem je využití FLIM pro mapování parametrů jako pH, koncentrace iontů, kyslíkové saturace, refraktivního indexu, konformace proteinů nebo stupně agregace, a mnoha dalších vlastností tkání na mikroskopické a makroskopické úrovni [46, 48]. Užitečnost metody FLIM pro rozlišení ALA a jejích metabolitů PPIX, uroporfyrinu I a III na buněčné úrovni je demonstrována v Obrázku 1.10.

Potenciál FLIM metod pro FD je mimořádně významný a intenzivní výzkum neustále zvyšuje specificitu diagnostiky nádorů [21]. Dostatečně rychlé detekční systémy, potřebné pro okamžitou FD, použitelnou v klinické praxi, jsou však stále poměrně drahé.

## 2. Materiály a metody

### 2.1 Roztoky PpIX

Rozpustnost PpIX byla testována v ethanolu, acetonu a dimethylsulfoxidu (DMSO). Pro tento účel byly připraveny tři různé roztoky PpIX v rozpouštědle. Nejlepší rozpustnost PpIX byla zaznamenána v DMSO, proto byl čtvrtý základní roztok vytvořen právě rozpuštěním PpIX v DMSO. V ethanolu a acetonu se PpIX nerozpustil dokonale, pro měření byly tedy použity nasycené roztoky. Koncentrace všech základních roztoků je zaznamenána v Tabulce 2.1. Pro výpočet koncentrace roztoků byla použita molární hmotnost PpIX, uvedená na pouzdru použité látky,  $562,66 \text{ g mol}^{-1}$ .

Z dalších experimentů byl roztok s ethanolem z důvodu slabé rozpustnosti PpIX vyřazen. Pro vytvoření prostředí, které je podobné živočišným tkáním, byly dále připraveny vzorky smísením základních roztoků s fosfátovým pufrům (PBS) o  $\text{pH}=7,4$ , jak je uvedeno v Tabulce 2.2 na prvních dvou řádcích.

	PpIX [mg]	rozpuštědlo [ml]	koncentrace PpIX [mM]
roztok v ethanolu	0,98	10	nasycený
roztok v acetonu	1,27	2	nasycený
roztok 1 v DMSO	1,19	1	2,11
roztok 2 v DMSO	8,62	1	15,32

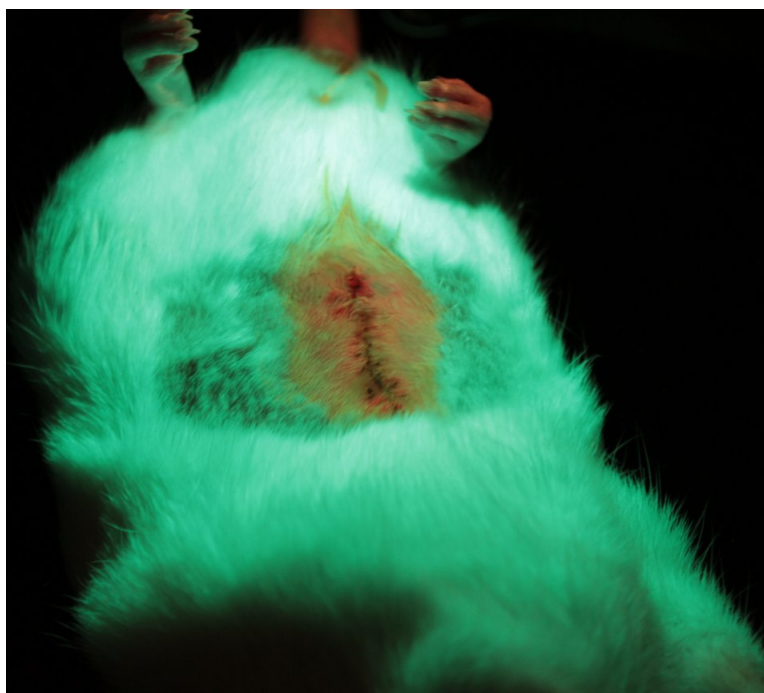
Tabulka 2.1: Přehled základních roztoků.

### 2.2 Buněčné suspenze

Ve spolupráci s Mgr. Scholzem byly pěstovány 3T3 myší fibroblasty v médiu (9 dílů DMEM, 1 díl fetálního bovinního séra a antibiotika) až do konfluence. Monovrstva buněk, rostoucí na dně kultivační lahve, byla třikrát opláchnuta roztokem fosfátového pufru, aby byl vzorek zbaven fenolové červeně, která je součástí DMEM jakožto pH indikátor. Buňky byly poté trypsinem odloučeny ode dna kultivační lahve. Vzniklá suspenze buněk byla dvakrát centrifugována a resuspendována za účelem odstranění trypsinu. Suspenze byla následně homogenizována

základní roztok	množství zákl. roztoku [ml]	množství PBS pH 7,4 [ml]	množství homogenizátu [ml]	látková koncentrace PpIX [mM]
aceton	0,20	1,80	0,00	nasycený
DMSO(1)	0,20	1,80	0,00	0,21
DMSO(1)	0,10	0,90	1,00	0,11
DMSO(2)	0,10	0,99	1,00	0,73
DMSO(2)	0,20	0,98	1,00	1,41

Tabulka 2.2: Vzorky použité pro měření.



Obrázek 2.1: Fotografie jizvy potřené Metvixem, pořízená v modrém světle. Patrná je červená fluorescence jizvy a jejího okolí, kam zasahuje fotosenzibilizátor. Širší okolí jizvy již nevykazuje fluorescenci a je patrné pouze ohraničení oblasti zbavené srsti. V horní části obrázku se nachází ocas a zadní nohy zvířete.

homogenizátorem podle Pottera a Elvehjema. Do homogenizátu, který obsahuje buněčné organely, čímž napodobuje prostředí uvnitř živé buňky, byl přidán roztok PpIX v DMSO, aby tak vznikly tři roztoky PpIX o koncentracích 0,11 mM, 0,73 mM a 1,41 mM. Tím vznikl systém napodobující prostředí při experimentech se živými zvířaty. Množství jednotlivých komponent, tvořících výsledné roztoky, je uvedeno v Tabulce 2.2.

## 2.3 Živá zvířata

Ve spolupráci s doc. Fraňkem z 3. Lékařské fakulty UK bylo pro měření připraveno deset potkanů ve čtyřech skupinách (dvakrát tři a dvakrát dva potkani). Potkanům byly v oblasti břicha chirurgicky vytvořeny jizvy o délce zhruba 4 cm s následnou suturou. Potkani byli pro tento účel v místě zákroku zbaveni srsti oholením. Tři dny staré jizvy byly následně potřeny mastí fotosenzibilizátoru Metvix, obsahující MAL, vždy tři hodiny před začátkem měření. V případě potkanů číslo 4 a 5 byly jizvy dvoudenní. Jizvy byly poté zakryty obvazem, aby nedošlo k jejich mechanickému porušení a aby se zabránilo přístupu světla k jizvám. Kontrolní vzorek potkanů č. 3 a 10 byl připraven stejným způsobem, ale bez natření jizvy PS. Fotografie typické jizvy potřené Metvixem je zobrazena v Obrázku 2.1.

Během měření byla zvířata udržována v anestezii, umístěna na vyhřívané podložce pro zachování tělesné teploty. Pro lepší okysličení krve byl některým potkanům přiveden kyslík k tlamě.

# 3. Aparatura

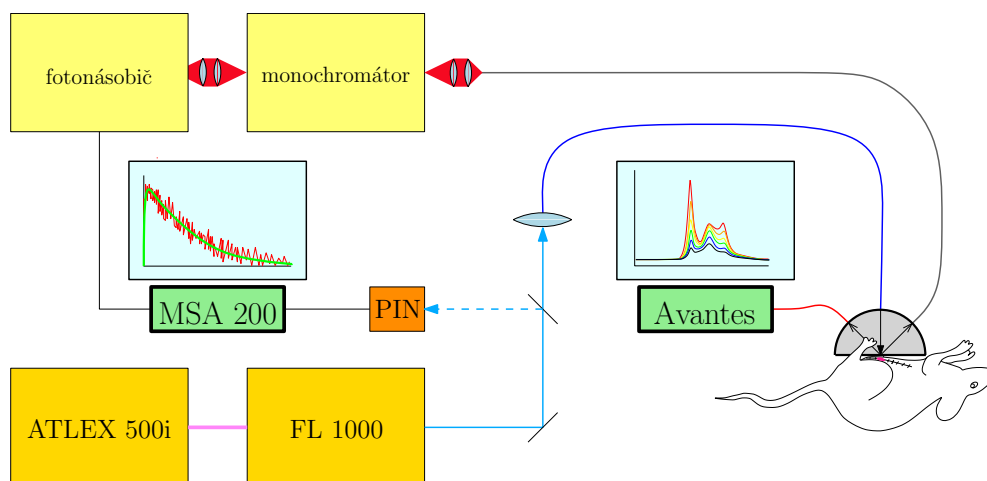
## 3.1 Popis aparatury

Aparatura vybudovaná na Katedře chemické fyziky a optiky MFF UK umožňuje měřit fosforescenci  $^1\text{O}_2$  a luminiscenci PS s časovým a spektrálním rozlišením v kyvetách i z povrchu vzorků s pomocí optických vláken. Aparatura je unikátní tím, že měření fluorescence PS a luminiscence  $^1\text{O}_2$  je možné provádět současně ze stejného místa vzorku. K tomuto účelu byl zhotoven originální přípravek, který fixuje excitační a sběrná vlákna v přesně definované poloze vůči sobě. Díky tomuto přípravku je možné uskutečnit měření nejen na pevných vzorcích a v kyvetách, ale i na živých zvířatech. Podrobně je popsán v kapitole 3.1.2.

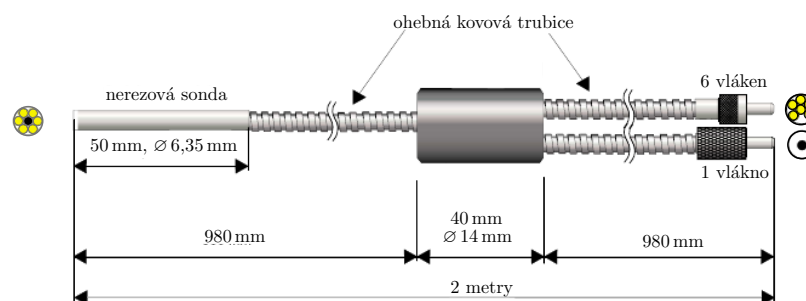
Uspořádání aparatury je patrné z Obrázku 3.1. Zdrojem excitačního záření je barvivový laser Lambda Physik FL1000, čerpaný excimerovým UV laserem ATL Lasertechnik ATLEX-500i. Výstupní záření charakterizují pulsy o délce přibližně 7 ns s opakovací frekvencí 200 Hz a energií přibližně 6  $\mu\text{J}$  v jednom pulsu. Vlnová délka excitačního záření je určena použitým barvivem Stilben 3 na 420 nm. Tato vlnová délka je zvolena s ohledem na to, že nejlépe excituje studovaný PpIX. Před navázáním excitačního paprsku do světlovodu je pomocí děliče svazku přivedena část záření na spouštěcí PIN fotodiodu, jejíž odezva je sledována osciloskopem pro kontrolu tvaru a intenzity pulsu. Fotodioda synchronizuje časovou základnu multikanálového čítače Becker-Hickl MSA 200 s laserovým pulsem. Detekce fosforescence  $^1\text{O}_2$  je realizována prostřednictvím fotonásobiče Hamamatsu R5509, na jehož vstup dopadá spektrálně rozlišené záření z vysoce světelného monochromátoru Jobin-Yvon H20IR. Na vstupní šterbinu monochromátoru je přiveden signál z detekčního optického vlákna. Fotonásobič je chlazen kapalným dusíkem na teplotu  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ , aby se potlačil temný signál vzniklý teplotními excitacemi fotokatody. Spektrální měření fluorescence PS je zprostředkováno vláknovým spektrometrem Avantes AvaSpec 2048, na jehož vstup je přiveden signál z druhého detekčního vlákna.

### 3.1.1 Vláknový spektrometr Avantes

Model spektrometru, použitý v aparatuře pro měření ustálené fluorescence PS, je vybaven symetrickým monochromátorem v uspořádání Czerny-Turner s CCD detektorem o šířce 2048 pixelů. Mřížka monochromátoru je zvolena tak, že dovoluje detekci světla v intervalu vlnových délek 285–840 nm s rozlišením 0,3 nm. Vstup je zajištěn standardním konektorem SMA, používaným ve vláknové optice. Integrační dobu lze pomocí počítače měnit v rozmezí 1,1 ms až 10 min. V provedených experimentech byla integrační doba volena ve většině případů v rozmezí 1–5 s. Výsledná spektra pak byla tvořena zprůměrováním několika měření tak, že celková doba pro jedno výsledné spektrum zpravidla nepřesáhla 30 s. Detekovaný signál je poté zpracován spektrometrem čtrnáctibitovým AD převodníkem a pomocí sběrnice USB2.0 jsou data uložena do počítače. Pro ovládání spektrometru i ukládání dat slouží program AvaSoft-basic 7.1 dodávaný výrobcem spektrometru.



Obrázek 3.1: Uspořádání aparatury.



Obrázek 3.2: Dvojranný světlovod Avantes.

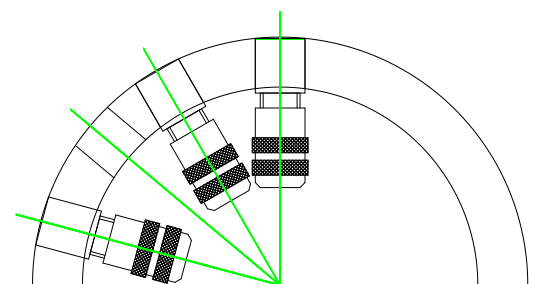
### 3.1.2 Světlovody

Pro měření fluorescence na laboratorních potkanech bylo použito uspořádání s držákem světlovodů, jak je naznačeno na Obrázku 3.1. Sběrný světlovod byl v tomto případě tvořen křemenným vláknem o průměru  $600\ \mu\text{m}$  s aperturou 0,22. Měření provedená na vzorcích v kyvetách byla uskutečněna pomocí dvojranného luminiscenčního světlovodu Avantes FCR-7IR400-2-ME ve speciálním držáku kyvet, který je přizpůsoben právě pro detekci tímto vláknem. Vlákná tohoto světlovodu mají průměr  $400\ \mu\text{m}$  a jsou uspořádána tak, že šest detekčních vláken obklopuje jedno excitační vlákno, jak je vidět z Obrázku 3.2.

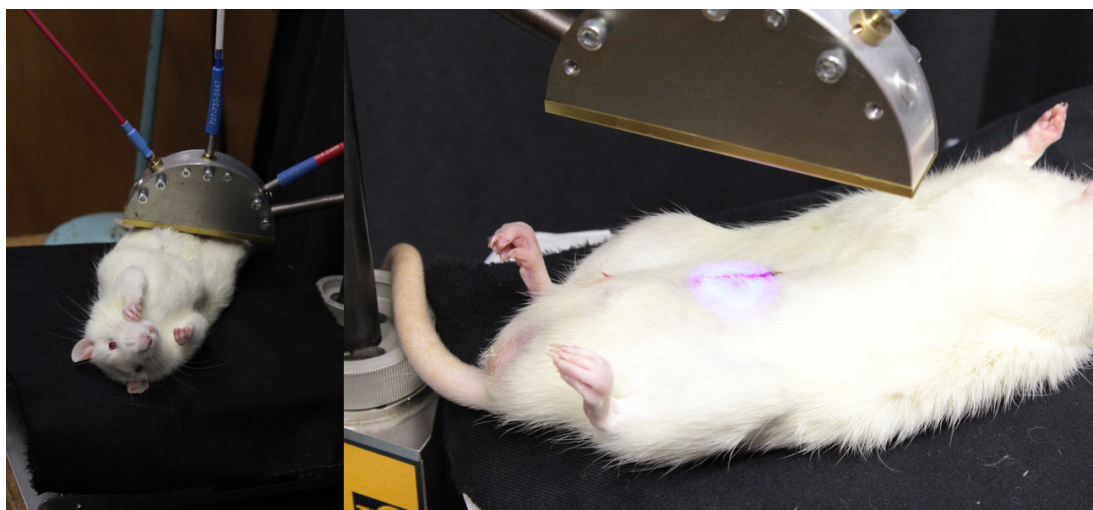
### 3.1.3 Filtry

Pro potlačení excitačního záření, které by mohlo být vzorkem reflektováno a rozptýleno do detekčních světlovodů, byly použity filtry umístěné před vstupní šterbinu spektrometru. Použit byl žlutý kruhový filtr typu GL-OG515 o průměru  $1/2$  palce a síle 3 mm, propouštějící vlnové délky vyšší než  $515\ \text{nm}$ . Na potlačení průniku excitačního záření do detekčních světlovodů má rovněž vliv naklonění světlovodu vůči směru excitačního záření dopadajícího na měřený povrch.





(a) Přípravek fixující excitační a detekční vlákna.



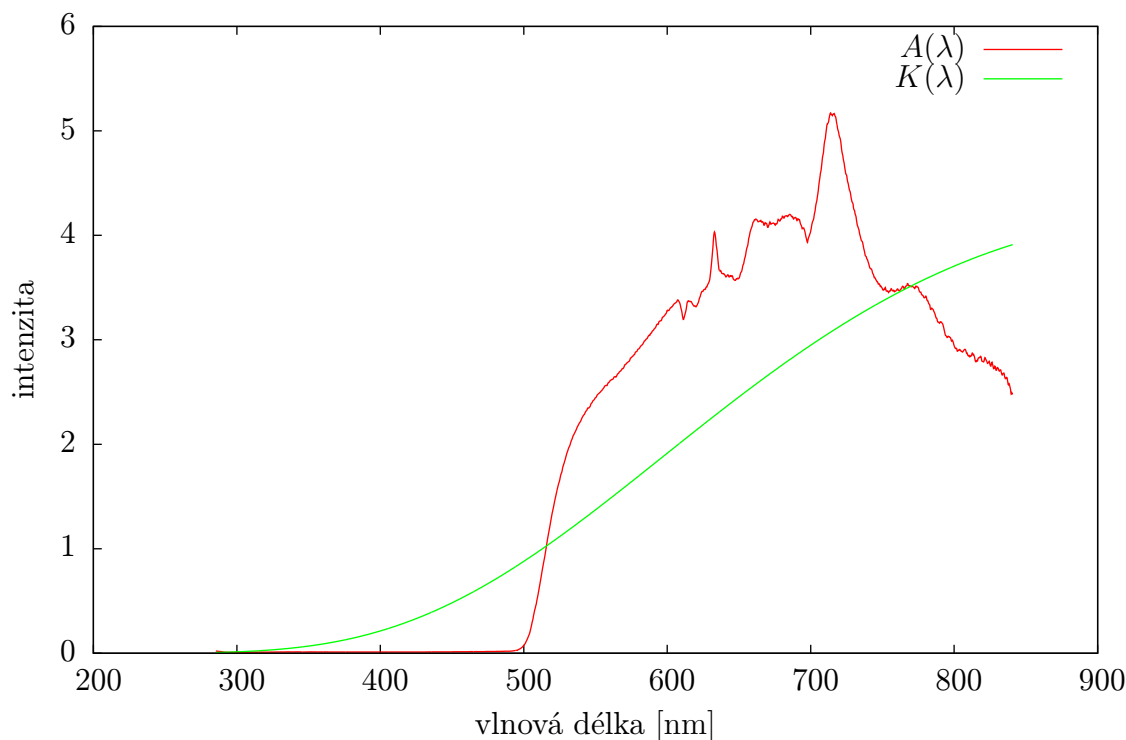
(b) Fotografie zachycující experimentální uspořádání s držákem světlovodů.

Obrázek 3.3: Přípravek umožňující současnou detekci luminiscence PS a  $^1\text{O}_2$  z laboratorních zvířat.

### 3.1.4 Držáky světlovodů a kyvet

Nákres přípravku, vyrobeného speciálně pro účely současné detekce luminiscence  $^1\text{O}_2$  a fluorescence PS, je patrný v Obrázku 3.3a. Prostřední světlovod je uchycen svisle, kolmo k rovině vzorku, ke kterému je přípravek přiložen. Slouží k přivedení excitačního záření na vzorek. Po stranách jsou upevněny detekční světlovedy pod úhlem  $50^\circ$  vzhledem k směru excitačního světlovodu. Osy všech světlovodů se protínají právě v jednom bodě, ve kterém probíhá měření z povrchu vzorku. Z Obrázku 3.3b je patrné uspořádání experimentu s potkany na dvou fotografiích. Vlevo je fotografie naznačující přiložení držáku světlovodů k měřenému místu na potkanovi. Prostřední vlákno je excitační, krajní vlákna jsou detekční. Pro měření bylo nutné přiložit držák světlovodů co nejbližší měřenému místu, ale přitom ponechat dostatek prostoru pro dýchací pohyby potkana. Vpravo v Obrázku 3.3b je dobře patrná červená fluorescence PS lokalizovaného v podélné jizvě, která je buzena použitým modrým laserem. Na fotografiích je rovněž vidět i vyhřívaná podložka, pomocí které byla potkanům udržována tělesná teplota.

Pro měření vzorků v kyvetách byl použit držák kyvet, kterým lze měřit luminiscenci vláknem Avantes. Excitační záření přichází na leštěné dno kyvety pod úhlem  $21^\circ$  tak, aby se minimalizoval odraz excitačního záření do detekčních světlovodů.



Obrázek 3.4: Spektrum vyzařování lampy Oriol a data naměřená spektrometrem Avantes s filtrem.

### 3.2 Kalibrace spektrální citlivosti spektrometru

Spektrální kalibrace spektrometru Avantes byla provedena pomocí kalibrační lampy Oriol standard 250–2400 nm, 7 V, 6,5 A. Spektrometrem Avantes bylo změřeno spektrum kalibrační lampy ze vzdálenosti 50 cm, za lampou byla ve vzdálenosti 1 m umístěna černá stěna. Kalibrace experimentálních dat  $S$  byla provedena zvlášť pro oba používané světlovody podle vztahu

$$S_c(\lambda) = S(\lambda) \cdot \frac{K(\lambda)}{A(\lambda) - T(\lambda)}, \quad (3.1)$$

kde  $S_c$  označuje kalibrovaná data,  $K$  je kalibrační křivka použité lampy a  $T$  představuje temný signál spektrometru. Kalibrační spektrum lampy Oriol s daty změřenými spektrometrem, včetně instalovaného filtru, jsou zobrazeny v Obrázku 3.4.

## 4. Výsledky a diskuse

Spektrální měření byla provedena na experimentálních roztocích PpIX v kyvetě a na vzorku osmi *in vivo* potkanů s aplikovaným PS Metvix a dvou potkanů bez aplikovaného PS. Celkem bylo na těchto deseti potkanech změřeno přes 1100 spekter ze 170 různých míst. V naměřených spektrech byly pozorovány tři významné pásy, označené jako pás 1, pás 2 a pás 3 na vlnových délkách po sobě 636 nm, 675 nm a 705 nm. Jejich maxima jsou po sobě vyznačena červenými, modrými a černými body, zvláště pro každé spektrum. Ve všech grafech jsou spektra pro nulovou expozici vykreslena červenou barvou, se vzrůstající expozicí se barva mění přes žlutou, zelenou, modrou, fialovou až na černou barvu pro nejvyšší expozici v daném experimentu. Měření z jednotlivých míst proběhla zpravidla v rozmezí 1–12 min, čímž byl omezen i rozsah dosažené expozice. Součástí grafů je v pravé horní části i zmenšený graf, ve kterém jsou vykreslena maxima intenzity pásů 1, 2 a 3 v závislosti na dosažené expozici. Expozice  $E$  pro dané spektrum je spočítána ze známé numerické apertury křemenného excitačního vlákna  $NA = 0,22$  a vzdálenosti  $l = 2$  mm od konce excitačního vlákna o průměru  $d$  k měřenému místu, odkud lze spočítat ozářenou plochu  $S$ , podle vztahu

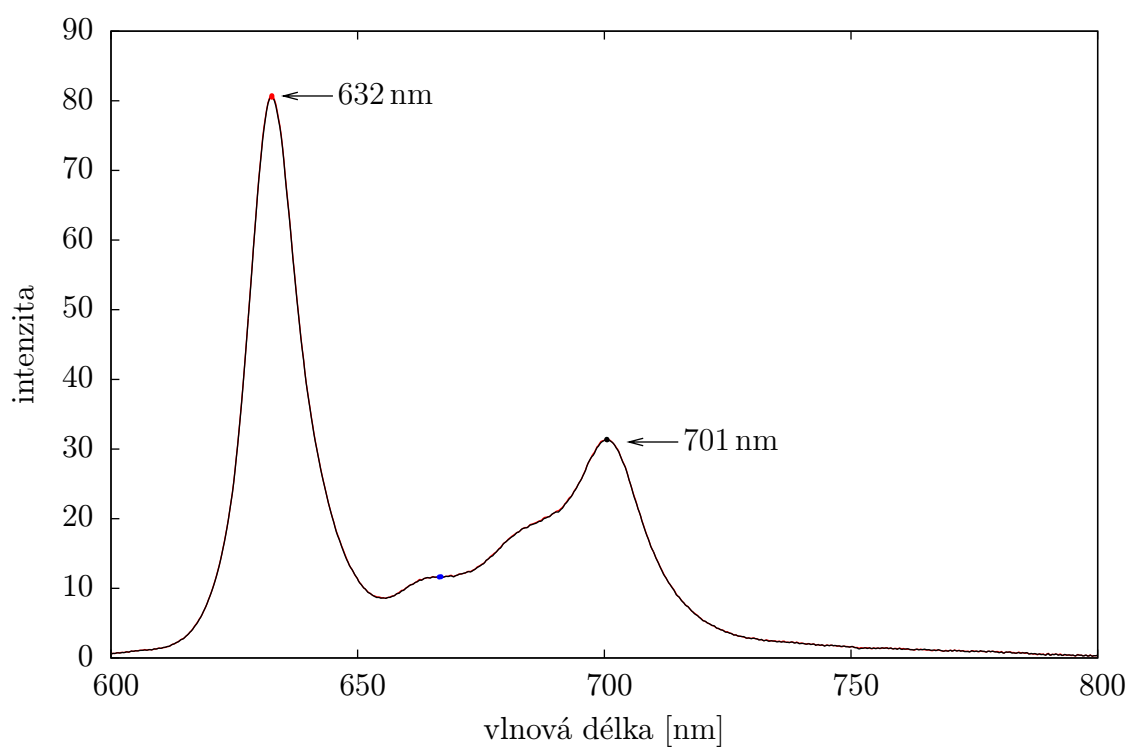
$$E = \frac{f_p \cdot t}{S} \cdot E_p = \frac{f_p \cdot t}{\pi \cdot \left( \frac{NA \cdot l}{\sqrt{1-NA^2}} + \frac{d}{2} \right)^2} \cdot E_p, \quad (4.1)$$

kde  $E_p \cong 6 \mu\text{J}$  je energie jednoho pulsu,  $f_p = 200$  Hz je opakovací frekvence pulsů a  $t$  je doba, která uplynula od zapnutí excitace do začátku daného měření.

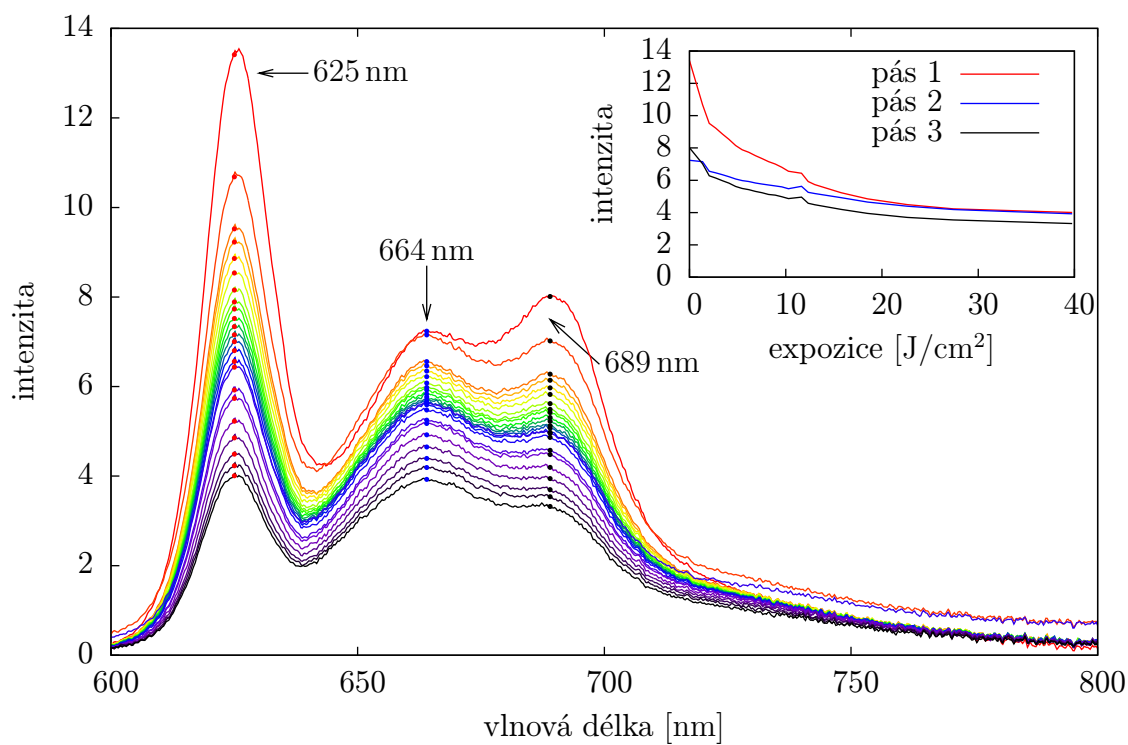
### 4.1 Roztoky PpIX

Fluorescenční spektrum čistého PpIX bylo získáno měřením nasyceného roztoku PpIX v acetonu podle Tabulky 2.2. Byla změřena dvě spektra, první okamžitě po přivedení excitačního záření do roztoku a druhé po expozici trvající 63 s, čemuž odpovídá expozice  $4,3 \text{ J/cm}^2$ . Obě spektra jsou vykreslena v Obrázku 4.1, společně s polohou tří významných pásů. Z grafu je patrné, že po expozici nedošlo k zeslabení intenzity fluorescence.

V živých organismech je pro zachování stabilních životních podmínek udržována stálá hodnota pH krve. Pro přiblížení experimentálního systému podmínkám panujícím v živočišném prostředí byl podroben studiu roztok PBS s PpIX v DMSO o  $\text{pH}=7,4$  podle Tabulky 2.2, jelikož  $\text{pH}=7,4$  odpovídá lidské krvi. Výsledkem jsou spektra změřená při nulové expozici až do expozice téměř 10 min, jež jsou vykreslena v Obrázku 4.2. Se vzrůstající expozicí klesá monotónně intenzita spekter, jak je možné pozorovat i ve zmenšeném grafu, kde jsou vykresleny intenzity maxim tří význačných pásů v závislosti na expozici. Ve srovnání se spektrem čistého roztoku PpIX v Obrázku 4.1 je v oblasti 664 nm podstatně výraznější pás 2. První dvě křivky, vykreslené červenou barvou, klesají v oblasti pásu 2 pomaleji než ostatní spektra pro vyšší expoziční doby. Z polohy pásu 1 a 3 je zřejmé posunutí spektra fluorescence do nižších vlnových délek v porovnání s roztokem PpIX v acetonu. Došlo také ke zúžení spektra ve srovnání s roztokem PpIX v acetonu.



Obrázek 4.1: Fluorescence nasyceného roztoku PpIX v acetonu.



Obrázek 4.2: Fluorescence roztoku PBS s PpIX v DMSO o pH=7,4.

## 4.2 Buněčné suspenze

Fotosenzibilizátor v buněčném prostředí může interagovat s buněčnými organelami, agregovat, podléhat chemickým změnám metabolickými procesy nebo může být zhasen a oxidován ROS, především  $^1\text{O}_2$ . Aproximace takového prostředí bylo dosaženo pomocí homogenizátu 3T3 myších fibroblastů v PBS o pH=7,4, do něhož byl přidán roztok PpIX v DMSO, jak je uvedeno v Tabulce 2.2. Tyto vzorky byly připraveny ve třech různých koncentracích PpIX, a to 0,11 mM, 0,73 mM a 1,41 mM.

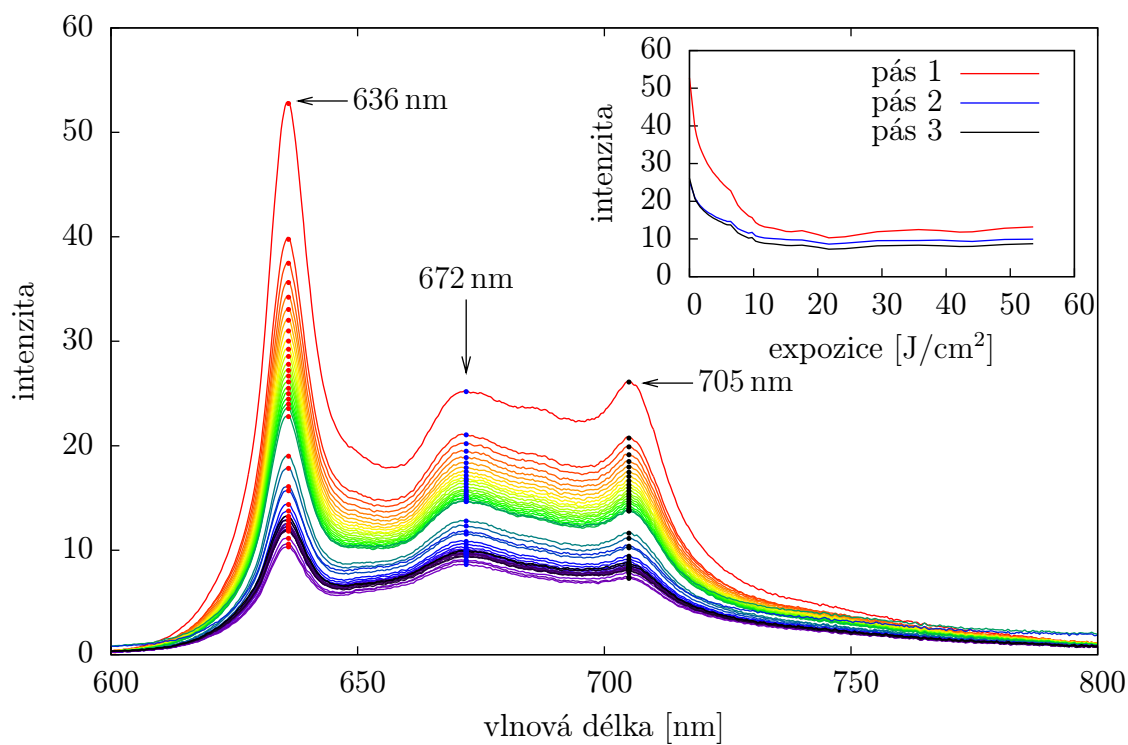
Fluorescenční spektra vzorku s nejnižší koncentrací PpIX jsou vykreslena v Obrázku 4.3. Spektrum je posunuto k vyšším vlnovým délkám oproti vzorku bez myších fibroblastů v Obrázku 4.2, přibližně do oblasti čistého PpIX v acetonu, jako v Obrázku 4.1, s polohou pásu 1 na 636 nm a pásu 3 na 705 nm. Pozorovaný posun dokládá změnu polarizace okolí fotosenzibilizátoru po jeho zabudování do buněčných struktur, je tedy důkazem toho, že PpIX interaguje s prostředím buněčných organel. V oblasti vlnové délky 672 nm je opět patrný pás, jehož intenzita klesá monotónně s ozářením, stejně jako zbytek spektra.

Vzorek homogenizátu fibroblastů se střední koncentrací PpIX, jehož emisní spektra jsou vynesena v Obrázku 4.4, má shodnou polohu hlavních pásů jako předchozí vzorek. Pásky 1 a 3 s expozicí monotónně klesají, vysoká počáteční rychlost poklesu se po krátké době ustálí přibližně na konstantní hodnotě. Pás v okolí 672 nm se v tomto případě ale chová odlišně, jak lze pozorovat i z průběhu modré křivky ve zmenšeném grafu Obrázku 4.4. Počáteční pokles je záhy vystřídán mírným vzrůstem maxima pásu a následuje opět obrat k poklesu. Tento pás je zpočátku sotva znatelný, ale s expozicí se stává dominantním a maximum jeho intenzity převyší ostatní pásy.

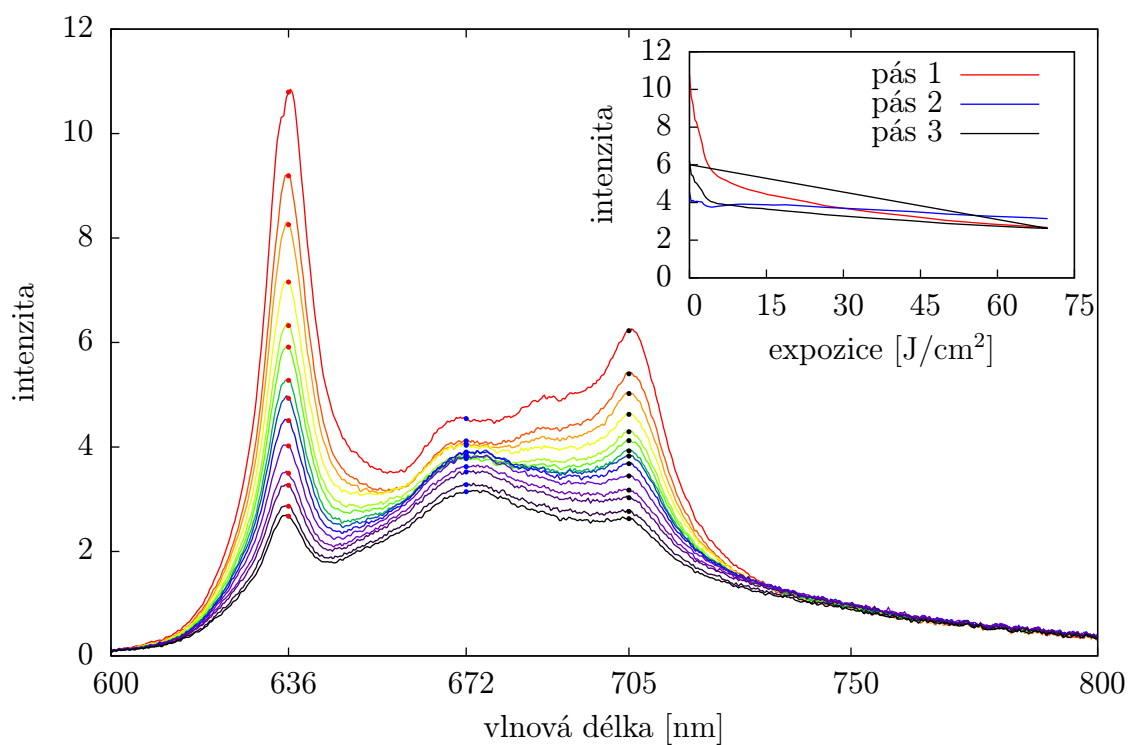
Poslední vzorek homogenizátu fibroblastů s nejvyšší koncentrací PpIX, vyobrazený v Obrázku 4.5, má maxima pásů 1, 2 a 3 na vlnových délkách po sobě 636 nm, 675 nm a 705 nm. Pokles krajních pásů se vzrůstající expozicí není překvapující, ale pozornost upoutá vývoj prostředního pásu. Na zmenšeném grafu, kde je průběh maxima pásu 2 vykreslen modrou křivkou, lze pozorovat zřetelný rychlý nárůst jeho intenzity, maximální intenzity nabývá při expozici  $11 \text{ J/cm}^2$  a poté zvolna klesá přibližně konstantní rychlostí. Toto pozorování je kvalitativně ve shodě s literaturou [49], kde byl pozorován nárůst a pokles intenzity fluorescence na 675 nm v suspenzi WiDr buněk, jimž byl PpIX indukován ALA o koncentraci 1,0 mM. Pro nižší koncentraci PpIX, indukované ALA o koncentraci 0,1 mM, byl v [49] pozorován pouze nárůst pásu 2. V obou případech byla maxima pásu 2 korigována na vybělování fluorescence podle vztahu

$$F_{\text{kor}}(675) = F(675) - F(635) \cdot \frac{F_0(675)}{F_0(635)}, \quad (4.2)$$

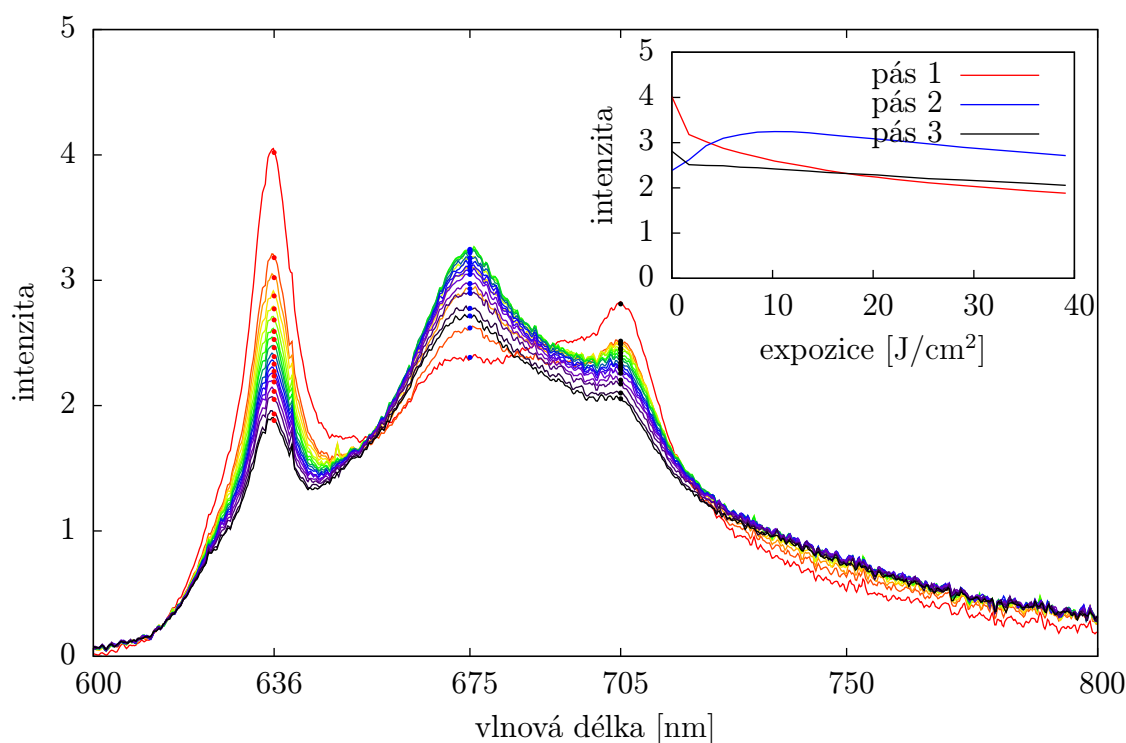
kde  $F_0(635)$  resp.  $F_0(675)$  jsou počáteční hodnoty maxima pásu 1 resp. 2 a hodnoty  $F(635)$  a  $F(675)$  jsou hodnoty intenzity fluorescence pásů 1 a 2 v průběhu měření. Tuto závislost na koncentraci PpIX lze pozorovat v provedených měřeních s homogenizátem, pokud je pás 2 vykreslen se stejnou korekcí na vybělování fluorescence, jako v [49]. Pro porovnání s výsledky [49] v Obrázku 4.6b, byly vytvořeny kinetiky fluorescence pásu 2 korigované podle 4.2 v Obrázku 4.6a. Z grafu v Obrázku 4.6a je zřejmé, že se v rozmezí studovaných koncentrací PpIX ve shodě s [49] křivka pro nižší koncentrace napřimuje.



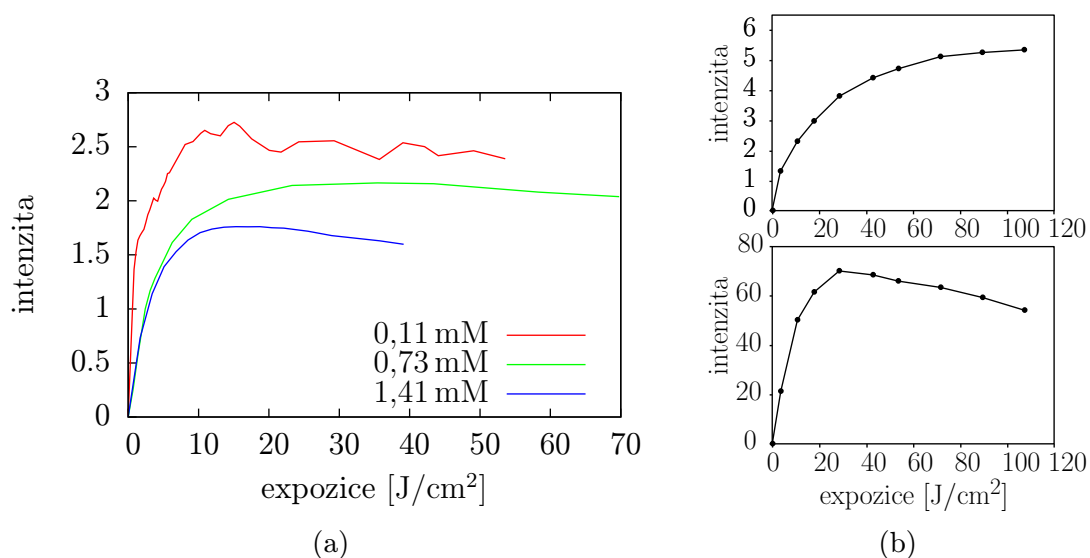
Obrázek 4.3: Fluorescence homogenizátu myších fibroblastů s nejnižší koncentrací PpIX 0,11 mM.



Obrázek 4.4: Fluorescence homogenizátu myších fibroblastů se střední koncentrací PpIX 0,73 mM.



Obrázek 4.5: Fluorescence homogenizátu myších fibroblastů s nejvyšší koncentrací PpIX 1,41 mM.



Obrázek 4.6: (a) Kinetiky fluorescence  $F_{kor}(675)$  pásu 2 v homogenizátu fibroblastů pro tři koncentrace PpIX. Data jsou korigována podle vztahu 4.2 z [49] na vybělování fluorescence, stejně jako (b). Intenzita červené křivky je snížena koeficientem 0,66. (b) Kinetiky fluorescence pásu na 675 nm v suspenzi buněk podle [49] pro dvě koncentrace PpIX indukované ALA o koncentraci 0,1 mM (nahore) a 1,0 mM (dole). Data jsou korigována na vybělování fluorescence.

## 4.3 Živá zvířata

Experimentům bylo podrobena deset potkanů s uměle vytvořenými jizvami, které byly použity jako model nádorů. Výsledkem všech měření bylo přes 1100 spekter fluorescence ze 170 různých míst v jizvě s PS, mimo jizvu s PS a z dvou kontrolních potkanů i měření bez PS. Po aplikaci PS byly ve fluorescenčních spektrech potkanů pozorovány pásy 1, 2 a 3 na vlnových délkách po sobě 636 nm, 675 nm a 705 nm. Poloha pásů odpovídá provedeným experimentům s myšimi fibroblasty, což svědčí o interakci PpIX s buněčným prostředím studovaných zvířat. Bylo pozorováno, že expozice excitačnímu světlu o vlnové délce 420 nm způsobuje vybělování fluorescence pásů. Byla provedena analýza dat a následné porovnání výsledků v jizvě s aplikovaným PS, mimo jizvu s PS a v místech bez PS.

### 4.3.1 Místa měřená v jizvě s PS

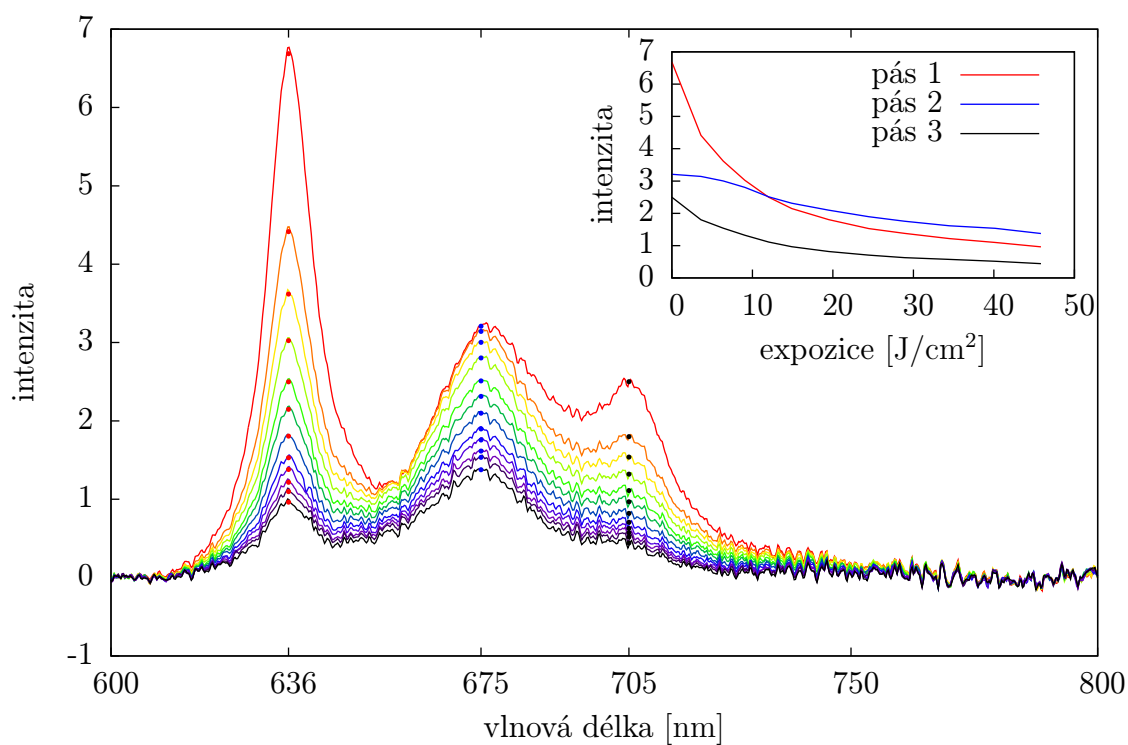
Typické spektrum jizvy s PS je vykresleno v Obrázku 4.7. Pro jizvu s PS je charakteristické vybělování fluorescence pásů 1 a 3, pás 2 je v jizvě s PS vybělován zpravidla pomaleji než ostatní pásy, se vzrůstající expozicí se vybělování celého spektra stává přibližně rovnoměrné. Ve výřezu Obrázku 4.7 je možné pozorovat, že se počáteční vysoká rychlost vybělování pásů 1 a 3 se vzrůstající expozicí snižuje, křivky pásů 1 a 3 proto nabývají konvexní formy. Ve zmenšeném grafu lze také pozorovat, že pro expozici vyšší než  $11 \text{ J/cm}^2$  se ve spektru stává dominantní maximum pásu 2, které je také vybělováno, ale pro expozice nižší než přibližně  $18 \text{ J/cm}^2$  probíhá vybělování pásu 2 s podstatně nižší rychlostí než u ostatních pásů.

Nežádoucí bylo pozorováno maximum pásu 2 s přibližně konstantní intenzitou v průběhu celého měření, jako v Obrázku 4.8. Vybělování ostatních pásů je zde podobně jako v předchozím případě monotónní, jeho rychlost se s expozicí také snižuje. Pro expozici  $25 \text{ J/cm}^2$  převyší maximum pásu 2 maximum pásu 1, extrapolace vybělování pásu 1 do vyšší expozice naznačuje, že podobně jako v předchozím případě nabude pás 2 dominantního postavení ve spektru. Intenzita fluorescence je v obou případech srovnatelná.

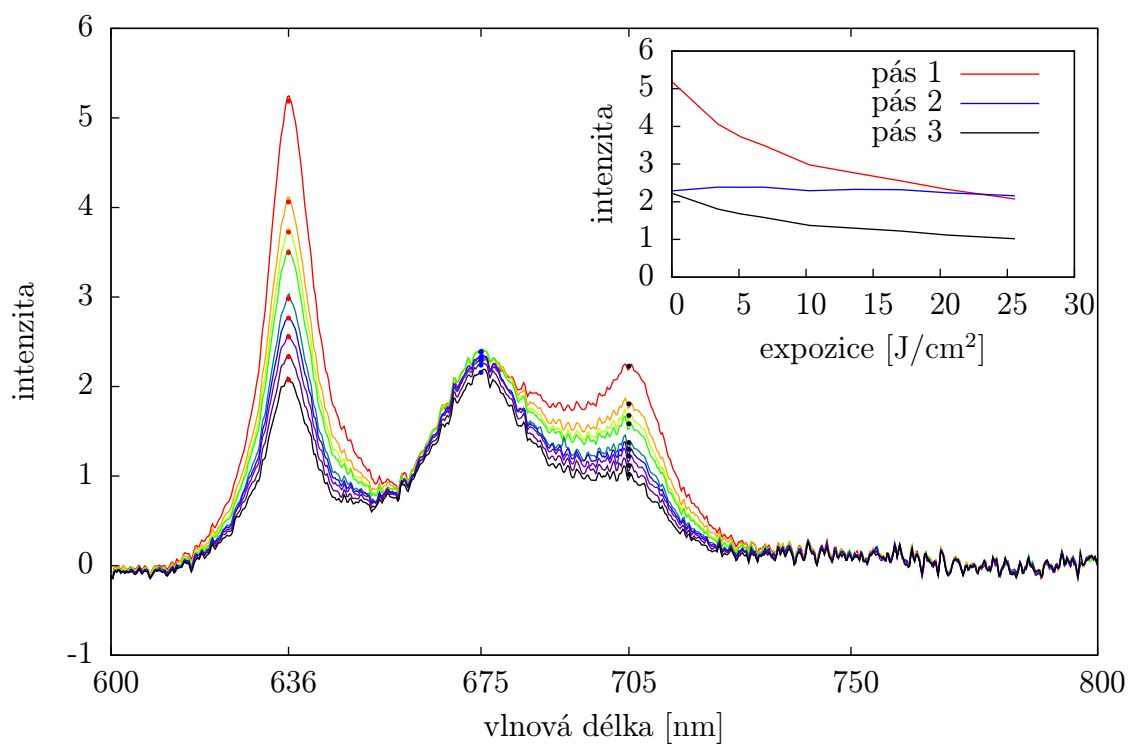
V některých případech nebyl pás 2 při prvních měřeních vůbec patrný, jak je vidět v Obrázku 4.9. První spektra s nejnižší expozicí, vykreslená červenou barvou, mají v tomto případě typický tvar fluorescence PpIX z Obrázku 4.1. Pásy 1 a 2 se jako v předchozích případech postupně vybělují, na rozdíl od pásu 3. Intenzita pásu 2 v průběhu expozice mírně vzroste a posléze zůstává konstantní až do konce měření, maximum intenzity pásu 1 zůstává pro všechny expozice nejvyšší. Intenzita fluorescence je přibližně dvojnásobná oproti předchozím případům.

Pozorování nárůstu pásu 2 s rostoucí expozicí nebylo výjimečné, avšak mimořádně nápadný nárůst pásu 2 byl pozorován v experimentu se sedmým potkanem v Obrázku 4.10. Toto měření je jinak velmi podobné předchozímu případu, kde pro nejnižší expozice není pás 2 rozeznatelný a spektrum má typický tvar fluorescence PpIX. Výsledky tohoto experimentu jsou neobyčejně podobné třetímu experimentu s homogénizátem myších fibroblastů v Obrázku 4.5.

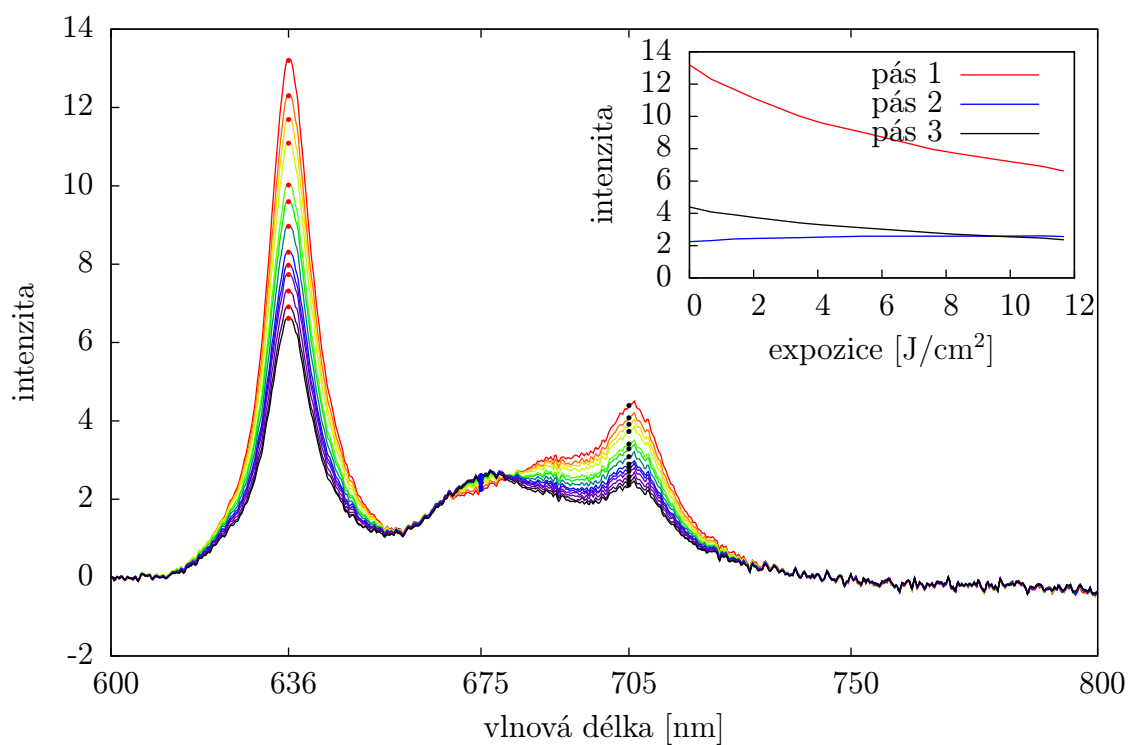




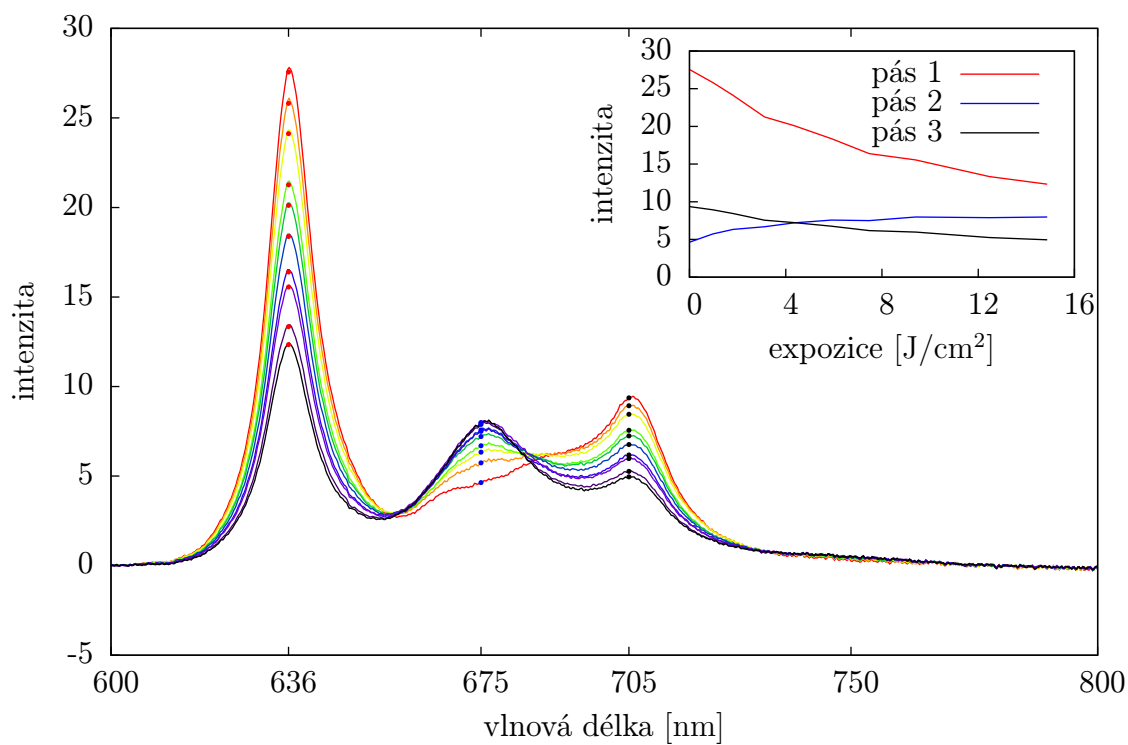
Obrázek 4.7: Fluorescence jizvy s PS potkana č. 1 v místě 3.



Obrázek 4.8: Fluorescence jizvy s PS potkana č. 1 v místě 5.



Obrázek 4.9: Fluorescence jizvy s PS potkana č. 6 v místě 3.



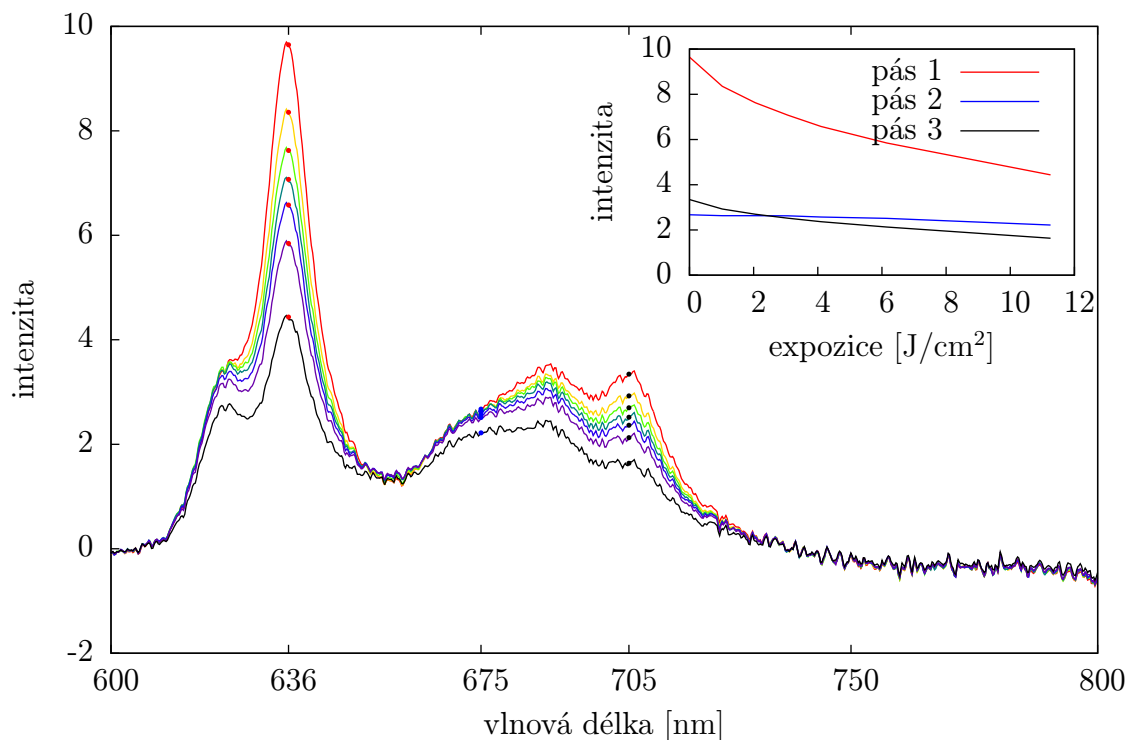
Obrázek 4.10: Fluorescence jizvy s PS potkana č. 7 v místě 13.

Pro PpIX jsou charakteristické dva pásy s maximy na vlnové délce 636 nm a 705 nm [19,20,49,50]. Jejich poloha se může změnit v závislosti na rozpouštědle, ve kterém je fluorofor rozpuštěn. Tyto pásy byly pozorované jako pás 1 a 3 jak v roztocích PpIX, tak při experimentech s potkany. Pozorované vybělování fluorescence PpIX je ve shodě s literaturou [49–52]. Vybělování fluorescence PpIX v suspenzi buněk je podle [49] rychlejší pro vysoké koncentrace PpIX (1 mM) než pro střední (0,1 mM) koncentrace, nejrychlejší vybělování však nastává pro nejnižší koncentrace 0,02 mM. Rychlost vybělování PpIX indukovaného ALA ve zdravé kůži myši závisí podle [52] na celkovém ozáření, světelném toku, počáteční koncentraci PpIX a lokální koncentraci  $^1\text{O}_2$ . V provedených měřeních v jizvách s PS bylo pozorováno, že rychlost vybělování PpIX roste s vyšší počáteční intenzitou jeho pásů, a tedy i s koncentrací PpIX, což je v souladu s literaturou [49,51,53].

V literatuře [49,50] byla popsána tvorba několika fotoproduktů PpIX při experimentech *in vitro* a *in vivo*. Podle [49,50,54,55] je jako hlavní fotoprodukt vytvářen fotoprotoporfyrin (Ppp), charakteristický maximem v oblasti 675 nm, širokým pásem v oblasti 710–780 nm a fotostabilitou podobnou PpIX. O přítomnosti Ppp podle literatury svědčí pomalé vybělování pásu v okolí 675 nm, jehož intenzita může zpočátku narůstat a později, po delší expozici, klesat. Toto chování bylo pozorováno v provedených experimentech s roztoky i laboratorními zvířaty u pásu 2, jehož poloha maximální intenzity odpovídá právě Ppp. Srovnáním dosažených výsledků s publikovanou literaturou a z diskutované kvalitativní shody kinetik fluorescence pásu 2 v Obrázku 4.6, bylo pozorování pásu 2 vysvětleno vznikem Ppp v měřeném místě jako fotoproduktu PpIX.

Druhý hlavní fotoprodukt PpIX, popsáný v [49,54,55], s maximem fluorescence v oblasti 652 nm, je podle literatury pravděpodobně dimer PpIX či heterodimer, např. porfyrin-chlorin. Jeho fluorescenci není podle [49] snadné spektroskopicky odlišit od fluorescence PpIX a v provedených měřeních nebyl prokazatelně pozorován.

Dalšími fotoprodukty PpIX, pozorovanými v [49,50,54], jsou uroporfyriny (Up) a koproporfyriny (Cp), jejichž maximum fluorescence se nachází v oblasti 620 nm. V několika experimentech s potkanem č. 6 byly skutečně pozorovány pásy na 620 nm a 688 nm, jak je dobře vidět v Obrázku 4.11. Po srovnání spekter potkana č. 6 s dostupnou literaturou lze konstatovat, že byl v těchto měřeních na vlnové délce 620 nm pravděpodobně pozorován vznik Up a Cp. Fluorescence Up a Cp může být podle [54] způsobena poškozením mitochondrií indukovaným PDT. Tyto porfyriny jsou totiž syntetizovány v cytosolu a jejich akumulace může být projevem toho, že nemohou být v mitochondriích skutečně jejich finální přeměny na PpIX a hem. Pás v okolí 688 nm, patrný v Obrázku 4.11, se z veškeré dostupné literatury nepodařilo identifikovat. Pozorování je však ve shodě s tvrzením [49], že oblast v rozmezí 660–690 nm je superpozicí alespoň dvou procesů, vybělování PpIX a tvorby fotoproduktů.



Obrázek 4.11: Fluorescence v jizvě s PS potkana č. 6 v místě 1.

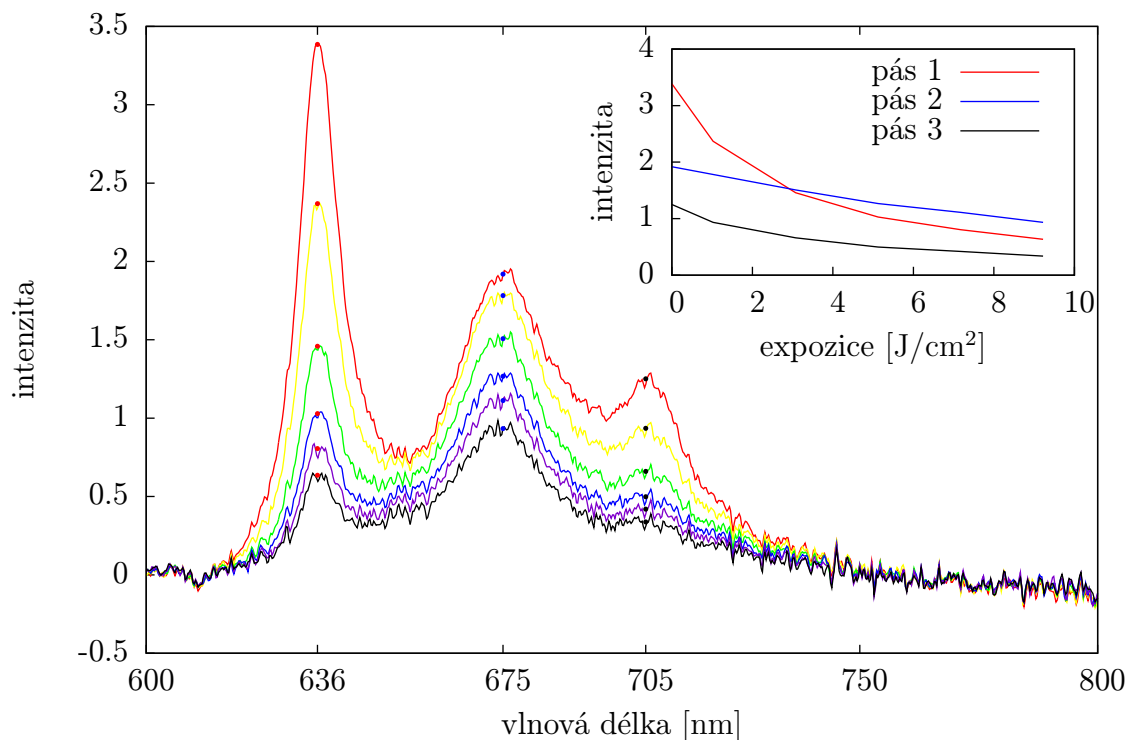
### 4.3.2 Místa měřená mimo jizvu s PS

V měřeních provedených na místech mimo jizvu, kde byl aplikován PS, byly pozorovány pásy PpIX i Ppp. Pro fluorescence kůže měřených potkanů mimo jizvu s aplikovaným PS je typická nižší intenzita, jak je patrné z Obrázku 4.12. Nižší intenzita fluorescence mimo jizvu svědčí o nižší počáteční koncentraci PpIX ve zdravé tkáni než v jizvě, což je v souladu s očekáváním, že PpIX se po aplikaci PS hromadí přednostně v poškozených místech. Vybělování fluorescence PpIX bylo pozorováno ve všech měřeních, s rychlostí klesající s rostoucí expoziční, analogicky s místy v jizvě s PS.

Vybělování pásu 2 bylo zpravidla rovněž pozorováno, většinou však s nižší rychlostí než u krajních pásů, podobně jako v jizvě s PS. V Obrázku 4.12 tuto charakteristiku demonstruje modrá křivka pásu 2, jejíž maximum již po expoziční nižší než  $3 \text{ J/cm}^2$ , převyší maximum pásu 1.

V Obrázku 4.13 zůstává konstantní maximum pásu 2, podobně jako v případě zachyceném v Obrázku 4.8. Z průběhu křivek ve výřezu grafu lze extrapolovat, že pás 2 by po expoziční přibližně  $6 \text{ J/cm}^2$  převyšil ostatní pásy. Intenzita fluorescence je v obou případech srovnatelná. Spektra byla v tomto případě filtrována Fourierovým filtrem, aby tak byl potlačen rušivý šum, který je při nižších intenzitách vždy patrný. Filtrování bylo provedeno převedením fluorescenčního signálu na Fourierův obraz algoritmem rychlé Fourierovy transformace v programu Octave. Vysokofrekvenční signál byl poté potlačen přenásobením obrazu Butterworthovým filtrem tvaru

$$y = \frac{1}{1 + \left(\frac{f}{f_0}\right)^{2n}}, \quad (4.3)$$

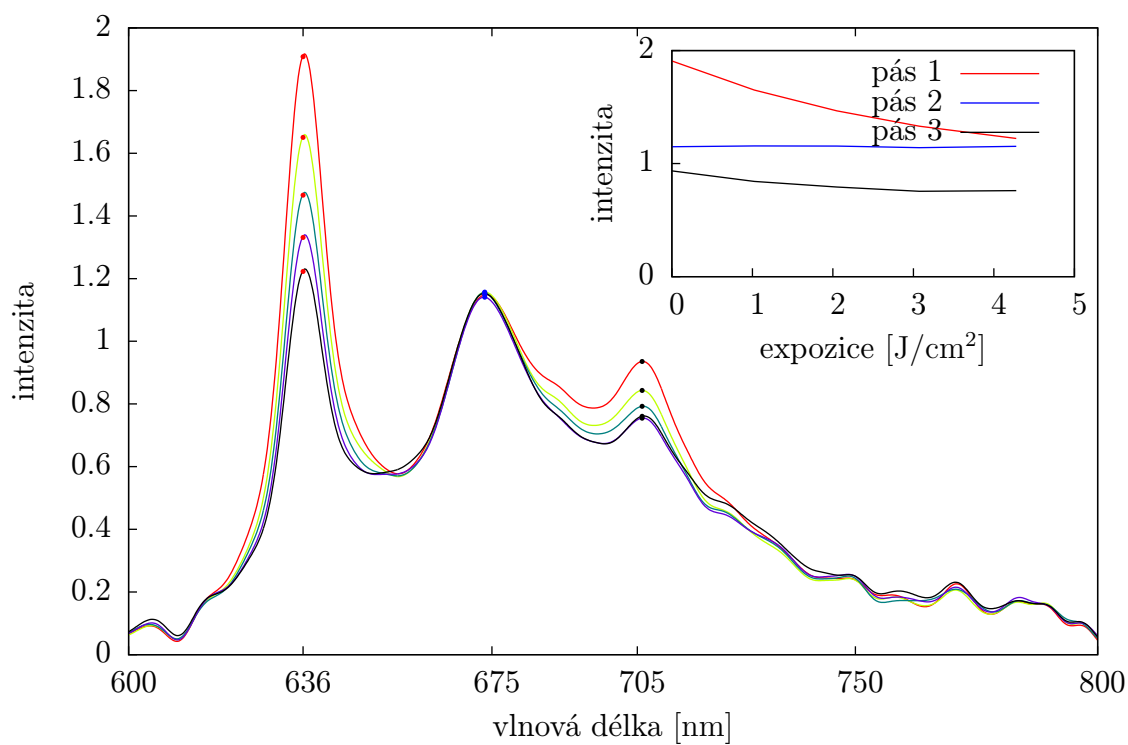


Obrázek 4.12: Fluorescence mimo jizvu s PS potkana č. 6 v místě 22.

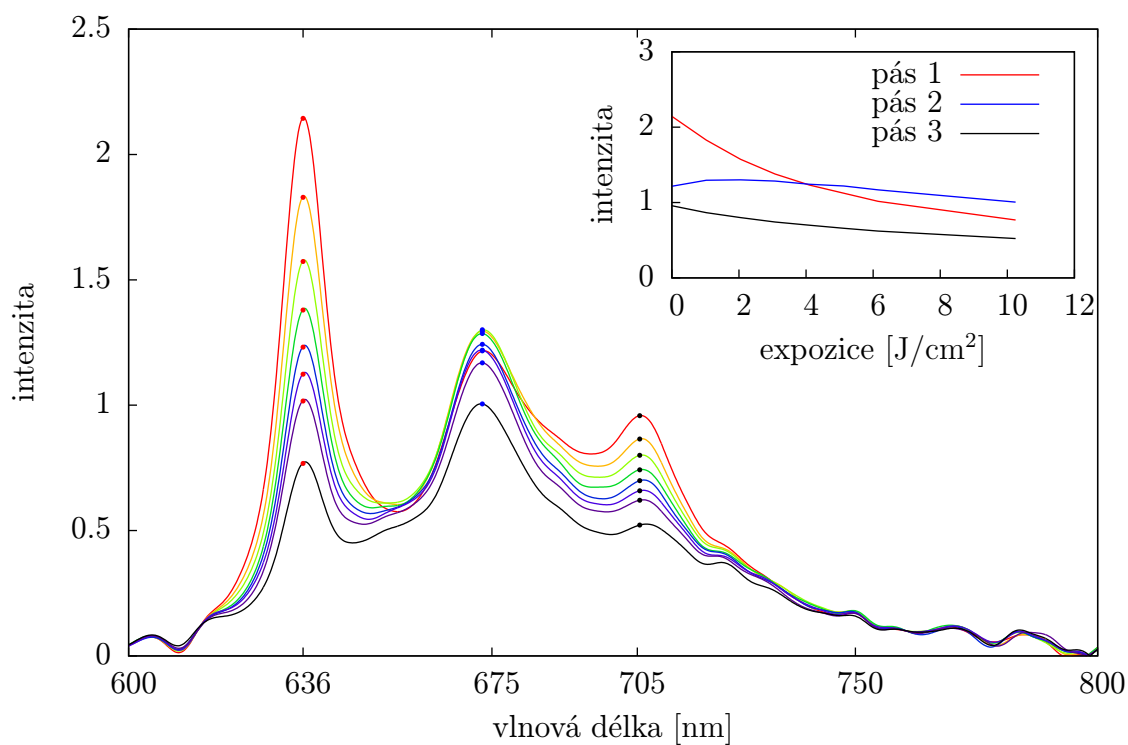
kde  $f$  představuje frekvenční rozsah odpovídající Fourierovu obrazu fluorescenčního spektra,  $f_0$  je frekvence filtru, pro kterou klesne amplituda o 3 dB a určuje tedy jeho šířku a  $n$  udává stupeň filtru, neboli rychlost poklesu jeho ramen. Pro filtrování dat byl zvolen stupeň  $n = 4$  a šířka odpovídající  $f_0 = 0,12 \text{ rad/s}$ .

V několika experimentech byl pozorován počáteční rychlý nárůst a následný pokles pásu 2, jak je vidět v Obrázku 4.14. Při expoziční nižší než  $4 \text{ J/cm}^2$  je pás 1 vybělen tak, že dominantním prvkem spektra se stává jako v předchozím případě pás 2. Toto měření bylo rovněž filtrováno Fourierovým filtrem pro potlačení šumu. Ve srovnání se spektry v jizvě s PS stačí mimo jizvu s PS, podle diskutovaných pozorování, nižší ozáření, aby pás 2 v mnoha pozorovaných případech byl nejvyšší, a tedy aby se vybělila podstatná část PpIX.

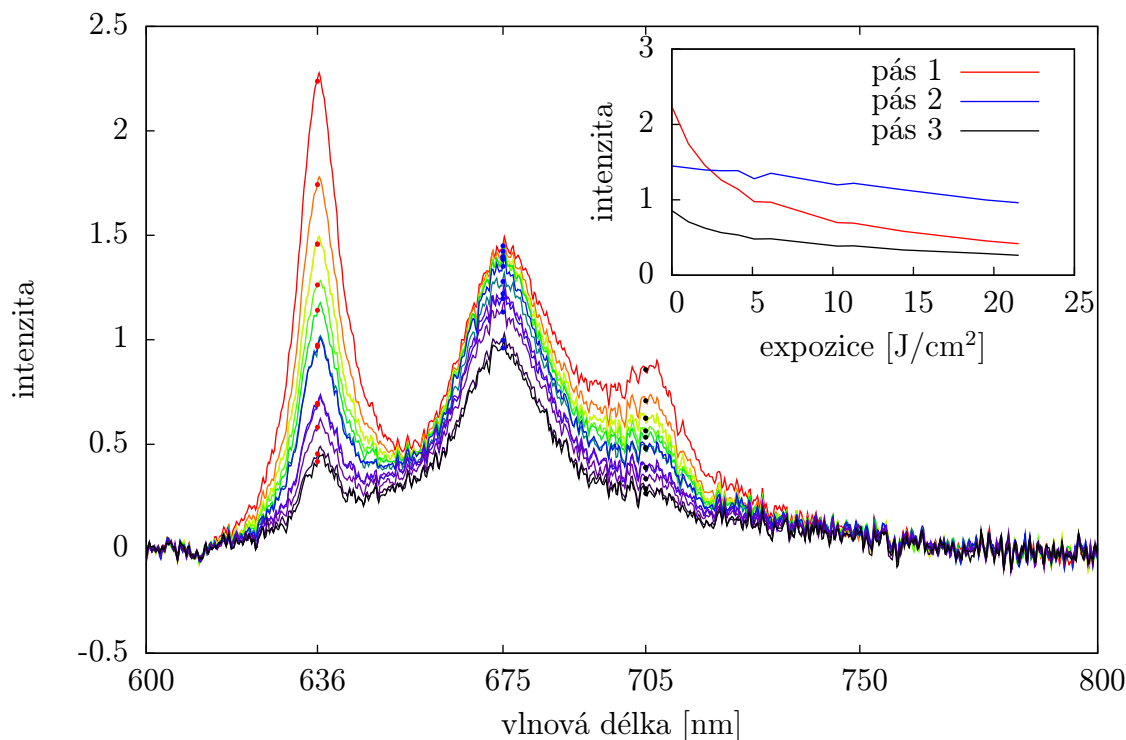
Bylo zjištěno, že pro místa mimo jizvu s aplikovaným PS je obvyklé rychlejší relativní vybělování pásů 1 a 3 než v jizvách s PS. Například v Obrázku 4.12 je maximum intenzity pásu 1 sníženo na  $1/e$  počáteční hodnoty již po expoziční  $4 \text{ J/cm}^2$ , v typickém spektru z jizvy s PS v Obrázku 4.7 je stejného relativního vybělení dosaženo až po expoziční delší než  $12 \text{ J/cm}^2$ .



Obrázek 4.13: Fluorescence mimo jizvu s PS potkana č. 5 v místě 9. Spektra byla filtrována Fourierovým filtrem pro potlačení šumu.



Obrázek 4.14: Fluorescence mimo jizvu s PS potkana č. 5 v místě 11. Spektra byla filtrována Fourierovým filtrem pro potlačení šumu.

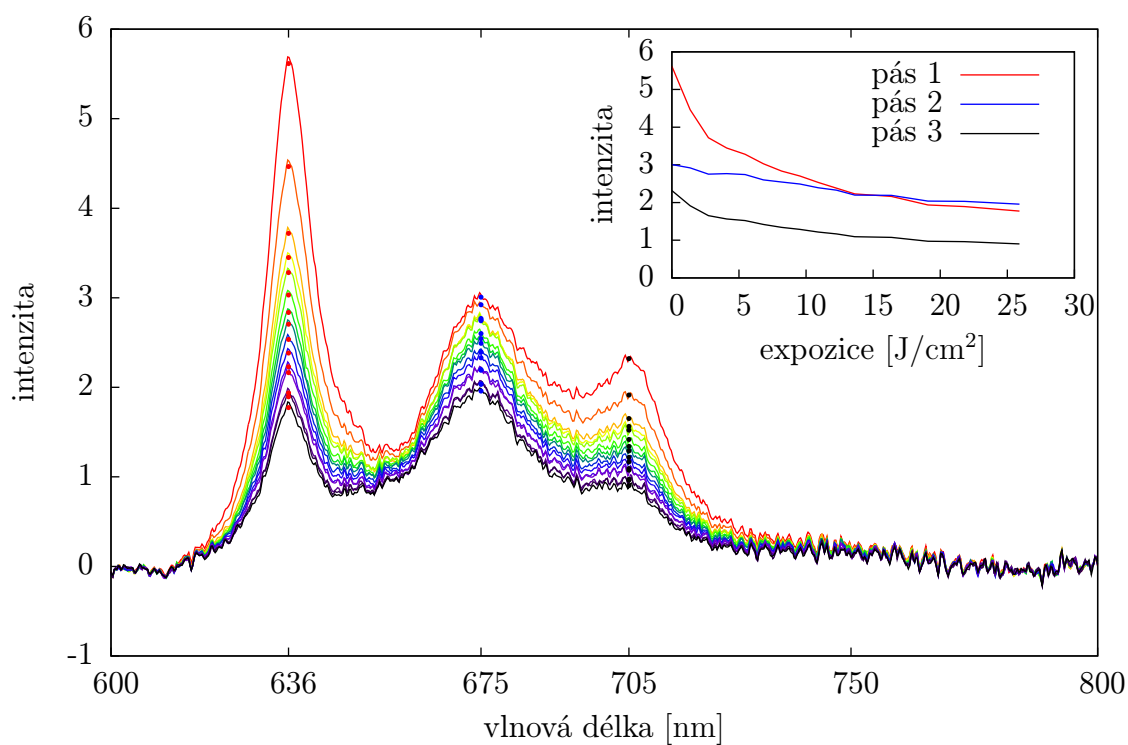


Obrázek 4.15: Fluorescence v jizvě bez PS potkana č. 10 v místě 5.

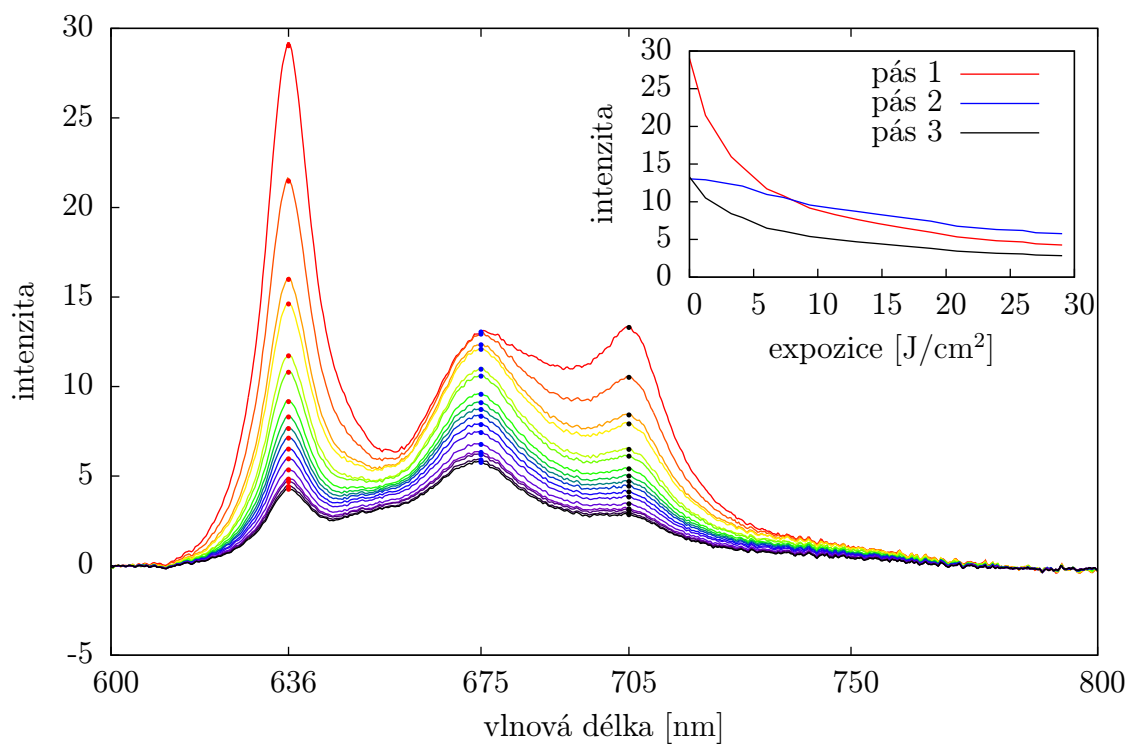
### 4.3.3 Místa měřená v jizvě a mimo jizvu bez PS

Jako v předchozích diskutovaných případech byly na potkanech bez PS pozorovány pásy PpIX i Ppp. Typické spektrum pro místa v jizvě i mimo jizvu je vykresleno v Obrázku 4.15. Na rozdíl od předchozích případů nebyl pozorován signifikantní rozdíl v intenzitě fluorescence mezi jizvou bez PS a mimo jizvu bez PS, a proto jsou oba případy diskutovány současně. Vybělování fluorescence bylo pozorováno i v těchto případech, s kinetikami analogickými výše zmíněným typickým případům, tedy rychlejší vybělování PpIX a pomalejší vybělování Ppp. V některých případech bylo maximum intenzity Ppp konstantní pro nejnižší expozice a následně došlo k vybělování fluorescence Ppp. Narůstání intenzity Ppp nebylo zpravidla prokazatelné. Většinou po velmi krátké expozici se dominantní stala fluorescence Ppp, jak je vidět i v Obrázku 4.15, kde maximum Ppp překonalo PpIX již po expozici  $2,4 \text{ J/cm}^2$ . V řadě případů bylo maximum intenzity Ppp nejvyšší již od začátku měření, což poukazuje na velmi nízkou koncentraci PpIX, jehož fluorescence se rychle vybělila v průběhu měření prvního spektra nebo při manipulaci s potkanem během přípravy experimentu.

Intenzita fluorescence v experimentech bez PS byla nejčastěji srovnatelná s intenzitou fluorescence na kůži s PS, avšak výjimečně byla pozorována vysoká intenzita fluorescence v jizvě bez PS u potkana č. 3, jak je patrné v Obrázku 4.16 a v Obrázku 4.17. I v těchto případech bylo vyhasínání fluorescence Ppp pomalejší než PpIX, ale k dominantnímu postavení se Ppp dostal až po delší expozici, typickou spíše pro místo v jizvě s aplikovaným PS.



Obrázek 4.16: Fluorescence v jizvě bez PS potkana č. 3 v místě 2.



Obrázek 4.17: Fluorescence v jizvě bez PS potkana č. 3 v místě 4.



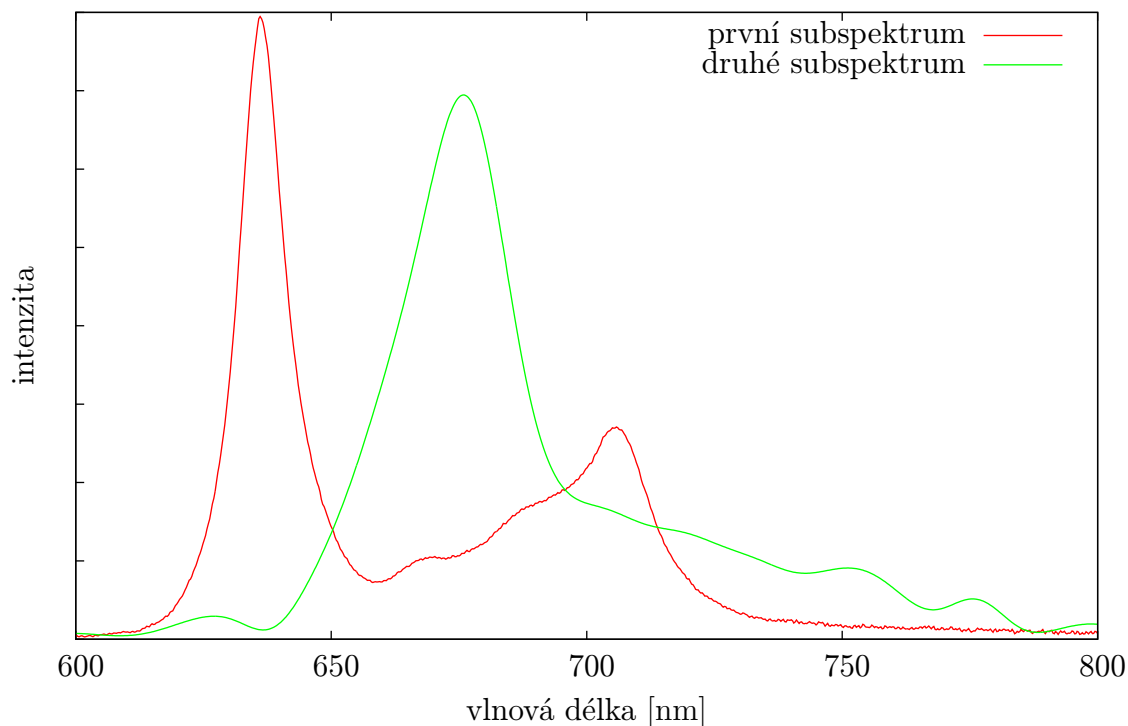
### 4.3.4 Shrnutí

Z pozorovaných výsledků, diskutovaných výše, je patrné, že ve všech provedených experimentech byla pozorována fluorescence PpIX s charakteristickými pásy na 636 nm a 705 nm. Intenzita fluorescence PpIX byla většinou nižší v místech, kde se očekávala nižší koncentrace PpIX, tj. mimo jizvu s PS a u potkanů bez PS. Bylo vždy pozorováno monotónní vybělování fluorescence PpIX, jehož rychlost se s rostoucí expozicí zpravidla snižovala. Jak bylo již dříve diskutováno, rychlost vybělování fluorescence PpIX souvisí mimo jiné s jeho koncentrací, z čehož lze usoudit, že snižování rychlosti vybělování fluorescence PpIX s rostoucí expozicí je způsobeno snižováním koncentrace PpIX v měřeném místě. Rychlost vybělování fluorescence, definovaná jako doba, za kterou poklesne intenzita pásu 1 na  $1/e$  počáteční hodnoty, byla nejvyšší v měřeních mimo jizvu s aplikovaným PS s průměrným časem  $(89 \pm 7)$  s, čemuž odpovídá expozice  $(6,0 \pm 0,5)$  J/cm<sup>2</sup>. Nejpomalejší vybělování fluorescence PpIX bylo pozorováno u jizev s PS s průměrným časem  $(150 \pm 19)$  s a odpovídající expozicí  $(10,0 \pm 1,3)$  J/cm<sup>2</sup>. Rychlost vybělování PpIX potkanů bez PS se však výrazně nelišila od jizev s PS, kde byl průměrný čas  $(140 \pm 18)$  s, jemuž odpovídá expozice  $(9,0 \pm 1,2)$  J/cm<sup>2</sup>. Nejistoty průměrných hodnot jsou přitom spočteny jako střední chyba průměru.

Ve většině experimentů byl patrný výrazný pás 2 na 675 nm, který podle literatury náleží fluorescenci Ppp, hlavního fotoproduktu PpIX. V některých případech nebyl tento pás rozeznatelný při nejnižších hodnotách expozice, ale se vzrůstající expozicí jej bylo možné jednoznačně identifikovat. Nezřídka, zvláště při měřeních s PS, bylo možné pozorovat počáteční nárůst a následně pokles intenzity Ppp, v některých případech byla intenzita Ppp v průběhu měření přibližně konstantní. Vyhasínání fluorescence Ppp bylo zpravidla pomalejší než vyhasínání PpIX, v mnoha případech nabyl pás Ppp v průběhu dosažené expozice ve spektru dominantního postavení. Až na výjimky bylo možné pozorovat, že nejrychleji dosáhl Ppp dominance v experimentech bez PS po expozici trvající průměrně  $(46 \pm 14)$  s, prostředních dob do překonání pásu 1 pásem 2 bylo dosaženo mimo jizvy s aplikovaným PS s časem  $(62 \pm 9)$  s, výrazně nejdelší doby však byly zaznamenány pro jizvy s aplikovaným PS, kde byla tato doba průměrně  $(320 \pm 79)$  s. Rozdíl v době dominance mezi experimenty s PS a bez PS je statisticky signifikantní s pravděpodobností nulové hypotézy  $P = 0,04$ . Pro srovnání jsou hodnoty doby překonání pásu 1 pásem 2 i rychlosti vybělování s odpovídajícími expozicemi sestaveny v Tabulce 4.1. Vznik různých fotoproduktů PpIX je podle [49] závislý na prostředí, ve kterém se PpIX nachází, např. na stupni oxygenace, lipofilitě, pH aj. Z pozorovaných rozdílů v rychlosti vyhasínání pásů 1 a 2 mezi zkouma-

charakteristické místo	dominance pásu 2		vyhasínání fluorescence PpIX	
	doba [s]	expozice [J/cm <sup>2</sup> ]	doba [s]	expozice [J/cm <sup>2</sup> ]
jizva s PS	$320 \pm 79$	$22,0 \pm 5,3$	$150 \pm 19$	$10,0 \pm 1,3$
mimo jizvu s PS	$62 \pm 9$	$4,2 \pm 0,6$	$89 \pm 7$	$6,0 \pm 0,5$
bez PS	$46 \pm 14$	$3,1 \pm 0,9$	$140 \pm 18$	$9,0 \pm 1,2$

Tabulka 4.1: Přehled doby vyhasínání fluorescence PpIX a doby dominance intenzity Ppp.



Obrázek 4.18: Dvě hlavní složky spekter potkana č. 7 v místě 13 získané pomocí metody SVD.

nými případy by tedy bylo možné, alespoň s použitím PS, odlišit zdravou tkáň od nezdravé. Měření potkana č. 7 v místě 13 ukázalo největší dynamiku ve vývoji pásu Ppp, a proto byla na těchto datech provedena analýza metodou singulárního rozkladu (SVD, singular value decomposition) v programu Octave s cílem rozložit spektrum na spektra čistých složek. Dvě hlavní složky získané z analýzy SVD jsou vykresleny v Obrázku 4.18. První složka, vykreslená červenou křivkou, odpovídá fluorescenci čistého PpIX, jako v Obrázku 4.1. Druhé subspektrum, vykreslené zelenou barvou, s maximem na 675 nm a širokým pásem v oblasti 700–800 nm, souhlasí s popisem spektra Ppp v literatuře [49]. Domníváme se proto, že toto spektrum odpovídá spektru čistého Ppp.

# Závěr

Práce pojednává o studiu fluorescenční spektroskopie PpIX ve vzorcích *in vitro* a na deseti laboratorních potkanech *in vivo*. Spektroskopie byla provedena na roztoku PpIX v acetonu a na roztocích PBS s PpIX v DMSO. Na vzorcích homogenizátu myších fibroblastů byla pozorována interakce PpIX s prostředím buněčných organel, vybělování fluorescence PpIX a tvorba fotoproduktů PpIX. Dosažené výsledky byly srovnány s dostupnou literaturou [49], se kterou se kvalitativně shodují. Studium fluorescence PpIX *in vivo* bylo provedeno na jizvách laboratorních potkanů, jimž byl PpIX indukován pomocí ALA. Na tomto jednoduchém modelu rakovinné tkáně byla pozorována interakce indukovaného PpIX prostředím buněčných organel, vybělování fluorescence a tvorba fotoproduktů PpIX, které se kvalitativně shodují s dostupnou literaturou [49–52, 54, 55]. Byla provedena analýza dat získaných v jizvách s PS, mimo jizvy s PS a na kontrolních potkanech bez PS. U těchto tří charakteristických skupin bylo provedeno srovnání celkové intenzity fluorescence, doby vyhasínání fluorescence PpIX a rozdílu ve vyhasínání fluorescence PpIX vzhledem k fluorescenci jeho fotoproduktů. Ve většině případů byla pozorována nejvyšší intenzita fluorescence v jizvách s PS oproti zdravé kůži s PS a vzorkům bez PS. Rozdíl v intenzitě fluorescence mezi místy mimo jizvu s PS a vzorky bez PS nebylo možné jednoznačně stanovit. Nejkratší doba vyhasínání fluorescence PpIX byla pozorována ve skupině měření mimo jizvu s PS, měření v jizvě s PS resp. vzorky bez PS prokázala srovnatelně dlouhé doby dohasínání. U všech skupin bylo pozorováno, že vybělování fluorescence fotoproduktů PpIX je zpravidla pomalejší než vybělování PpIX. Původně silná fluorescence PpIX tak byla vybělena v mnoha případech natolik, že dominantní se stal signál fotoproduktů PpIX. Srovnáním doby, za kterou je PpIX vybělen pod úroveň signálu fotoproduktů, byl statisticky prokázán signifikantní rozdíl mezi skupinou měření s PS a skupinou a bez PS. Tento rozdíl naznačuje, že podle doby dominance je s použitím PS možné odlišit zdravou tkáň od nezdravé tkáně. Pro všechny časové údaje byly spočítány i hodnoty odpovídající expozice, které jsou sestaveny v Tabulce 4.1.

Na modelu potkanů s jizvami, zvoleném pro experimentální studium fluorescenční detekce nádorů, byla demonstrována metoda pro měření luminescenčního signálu z kůže pokusných zvířat a byl navržen postup, umožňující odlišit zdravou tkáň od nezdravé. Studium tohoto jednoduchého modelu však nemůže postačovat pro dokonalé ověření diskutované metodiky pro diagnostiku onemocnění pacientů. V tomto směru je zapotřebí otestovat nalezenou metodiku experimenty na systémech se skutečnými nádory. Výsledky práce budou prezentovány jako součást připravované práce v mezinárodním impaktovaném časopise.

Úkoly, které byly pro tuto práci vytčeny, se podařilo naplnit.

# Literatura

- [1] V. Prosser. *Experimentální metody biofyziky*. Praha: Academia, 1989.
- [2] Vojtěch Vyklický. In situ luminiscenční detekce singletního kyslíku. Master's thesis, Univerzita Karlova v Praze, 2009.
- [3] J. R. Lakowicz. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer London, Limited, 2009.
- [4] Maria C. DeRosa and Robert J. Crutchley. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 233–234(0):351 – 371, 2002.
- [5] Hwa-Jin Suh, Kyung-Seok Lee, Seong-Ryul Kim, Myoung-Ho Shin, Sanggyu Park, and Shin Park. Determination of singlet oxygen quenching and protection of biological systems by various extracts from seed of rumex crispus l. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 102(2):102 – 107, 2011.
- [6] Ana P. Castano, Tatiana N. Demidova, and Michael R. Hamblin. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1(4):279–293, December 2004.
- [7] I. Fridovich. Oxygen: How do we stand it? *Medical Principles and Practice*, 22(2):131–137, 2013.
- [8] Thomas W. Stief. The physiology and pharmacology of singlet oxygen. *Medical Hypotheses*, 60(4):567 – 572, 2003.
- [9] Konstanze Müller-Breitkreutz, Harald Mohr, Karlis Briviba, and Helmut Sies. Inactivation of viruses by chemically and photochemically generated singlet molecular oxygen. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 30(1):63 – 70, 1995.
- [10] Alexander Molnár. *Spectroscopic Study of Singlet Oxygen in Biological Systems*. PhD thesis, Charles University Prague, Prague, 2008.
- [11] S. N. Batchelor, D. Carr, C. E. Coleman, L. Fairclough, and A. Jarvis. The photofading mechanism of commercial reactive dyes on cotton. *Dyes and Pigments*, 59(3):269 – 275, 2003.
- [12] N. S. Allen. Photofading and light stability of dyed and pigmented polymers. *Polymer Degradation and Stability*, 44(3):357 – 374, 1994.
- [13] Martijn Triesscheijn, Paul Baas, Jan H. M. Schellens, and Fiona A. Stewart. Photodynamic therapy in oncology. *Oncologist*, 11(9):1034–1044, 2006.
- [14] K. Kalka, H. Merk, and H. Mukhtar. Photodynamic therapy in dermatology. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 42(3):389–413, March 2000.

- [15] Lenka Ryskova, Vladimir Buchta, and Radovan Slezak. Photodynamic antimicrobial therapy. *Central European Journal of Biology*, 5(4):400–406, AUG 2010.
- [16] B. C. Wilson and M. S. Patterson. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Physics In Medicine and Biology*, 53(9):R61–R109, May 2008.
- [17] J. Hegyi, V. Hegyi, T. Ruzicka, P. Arenberger, and C. Berking. New developments in fluorescence diagnostics. *Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 9(5):368–372, May 2011.
- [18] M. Kriz, J. Hegyi, T. Ruzicka, and C. Berking. Fluorescence diagnostics as a guide for demarcation and biopsy of suspected anal cancer. *International Journal of Dermatology*, 51(1):31–34, January 2012.
- [19] F. Fischer, E. F. Dickson, R. H. Pottier, and H. Wieland. An affordable, portable fluorescence imaging device for skin lesion detection using a dual wavelength approach for image contrast enhancement and aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX. part I. design, spectral and spatial characteristics. *Lasers In Medical Science*, 16(3):199–206, 2001.
- [20] F. Fischer, E. F. Dickson, J. C. Kennedy, and R. H. Pottier. An affordable, portable fluorescence imaging device for skin lesion detection using a dual wavelength approach for image contrast enhancement and aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX. part II. in vivo testing. *Lasers In Medical Science*, 16(3):207–212, 2001.
- [21] A. Ruck, C. Hulshoff, I. Kinzler, W. Becker, and R. Steiner. Slim: A new method for molecular imaging. *Microscopy Research and Technique*, 70(5):485–492, May 2007.
- [22] Esther Buytaert, Michael Dewaele, and Patrizia Agostinis. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Cancer*, 1776(1):86–107, SEP 2007.
- [23] Edyta Paszko, Carsten Ehrhardt, Mathias O. Senge, Dermot P. Kelleher, and John V. Reynolds. Nanodrug applications in photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 8(1):14 – 29, 2011.
- [24] V. Mandys, K. Jirsová, M. Jirsa, and J. Vrana. Neurotoxicity of tetraphenylporphinesulfonate (tpps4) and a hematoporphyrin derivative (photosan) in organotypic cultures of chick embryonic dorsal root ganglia. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 47(2–3):197 – 201, 1998.
- [25] Milan Jirsa and Bohumil Kakáč. Způsob čištění a odsolení meso-tetra-/p-sulfofenyl/ porfinu, 1987. Patent 7488.
- [26] P. Mojzes, S. G. Kruglik, V. Baumruk, and P. Y. Turpin. Interactions of electronically excited copper(II)-porphyrin with DNA: resonance raman evidence for the exciplex formation with adenine and cytosine residues. *Journal of Physical Chemistry B*, 107(31):7532–7535, AUG 7 2003.

- [27] Gabriella Csík, Marianna Egyeki, Levente Herényi, Zsuzsa Majer, and Katalin Tóth. Role of structure-proteins in the porphyrin–dna interaction. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 96(3):207 – 215, 2009.
- [28] M. Wachowska, A. Muchowicz, M. Firczuk, M. Gabrysiak, M. Winiarska, M. Wanczyk, K. Bojarczuk, and J. Golab. Aminolevulinic acid (ALA) as a prodrug in photodynamic therapy of cancer. *Molecules*, 16(5):4140–4164, May 2011.
- [29] Michael J. Colditz, Karin van Leyen, and Rosalind L. Jeffree. Aminolevulinic acid (ALA)–protoporphyrin IX fluorescence guided tumour resection. part 2: Theoretical, biochemical and practical aspects. *Journal of Clinical Neuroscience*, 19(12):1611 – 1616, 2012.
- [30] R. H. Pottier, B. Krammer, and H. Stepp. *Photodynamic Therapy With ALA: A Clinical Handbook*. Comprehensive Series in Photochemical & Photobiological Sciences. Royal Soc. of Chemistry, 2006.
- [31] Fernanda Scarmato De Rosa, Antônio Cláudio Tedesco, Renata Fonseca Vianna Lopez, Maria Bernadete Riemma Pierre, Norbert Lange, Juliana Maldonado Marchetti, Jeane Cristina Gomes Rotta, and Maria Vitória Lopes Badra Bentley. In vitro skin permeation and retention of 5-aminolevulinic acid ester derivatives for photodynamic therapy. *Journal of Controlled Release*, 89(2):261 – 269, 2003.
- [32] Anurag Gupta, Shouyan Wang, Paula Pera, K. V. R. Rao, Nayan Patel, Tymish Y. Ohulchansky, Joseph Missert, Janet Morgan, Yong-Eun Koo-Lee, Raoul Kopelman, and Ravindra K. Pandey. Multifunctional nanoplat-forms for fluorescence imaging and photodynamic therapy developed by post-loading photosensitizer and fluorophore to polyacrylamide nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 8(6):941 – 950, 2012.
- [33] Marie-Ange D’Hallewin, Lina Bezdetsnaya, and François Guillemin. Fluorescence detection of bladder cancer: A review. *European Urology*, 42(5):417 – 425, 2002.
- [34] Livia N. Dovigo, Ana Claudia Pavarina, Ana Paula D. Ribeiro, Iguatemy L. Brunetti, Carlos Alberto de S. Costa, Denis P. Jacomassi, Vanderlei S. Bagnato, and Cristina Kurachi. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against candida albicans. *Photochemistry and Photobiology*, 87(4):895–903, 2011.
- [35] Laura Polo, Giuliana Valduga, Giulio Jori, and Elena Reddi. Low-density lipoprotein receptors in the uptake of tumour photosensitizers by human and rat transformed fibroblasts. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34(1):10 – 23, 2002.
- [36] Halina Mojzisova, Stephanie Bonneau, Christine Vever-Bizet, and Daniel Brault. The pH-dependent distribution of the photosensitizer chlorin e6 among plasma proteins and membranes: A physico-chemical approach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1768(2):366 – 374, 2007.

- [37] Ana P. Castano, Tatiana N. Demidova, and Michael R. Hamblin. Mechanisms in photodynamic therapy: Part three—photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2(2):91–106, June 2005.
- [38] Andrea Lesar, James Ferguson, and Harry Moseley. An investigation of the fluorescence induced by topical application of 5-aminolaevulinic acid and methyl aminolaevulinate at different body sites on normal human skin. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 8(2):97 – 103, 2011.
- [39] Andrzej Bugaj, Asta Juzeniene, Petras Juzenas, Vladimir Iani, Li Wei Ma, and Johan Moan. The effect of skin permeation enhancers on the formation of porphyrins in mouse skin during topical application of the methyl ester of 5-aminolevulinic acid. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 83(2):94 – 97, 2006.
- [40] M. Sam Eljamel. Fluorescence image-guided surgery of brain tumors: Explained step-by-step. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 5(4):260 – 263, 2008.
- [41] Michael J. Colditz and Rosalind L. Jeffree. Aminolevulinic acid (ALA)–protoporphyrin IX fluorescence guided tumour resection. part 1: Clinical, radiological and pathological studies. *Journal of Clinical Neuroscience*, 19(11):1471 – 1474, 2012.
- [42] Carl Muroi, Javier Fandino, Daniel Coluccia, Sven Berkmann, Ali-Reza Fathi, and Hans Landolt. 5-aminolevulinic acid fluorescence-guided surgery for spinal meningioma. *World Neurosurgery*, (0), 2012. In press.
- [43] Peter Hillemanns, Philipp Soergel, and Martin Löning. Fluorescence diagnosis and photodynamic therapy for lower genital tract diseases – a review. *Medical Laser Application*, 24(1):10 – 17, 2009.
- [44] Cristina A. Metildi, Sharmeela Kaushal, Chanae R. Hardamon, Cynthia S. Snyder, Minya Pu, Karen S. Messer, Mark A. Talamini, Robert M. Hoffman, and Michael Bouvet. Fluorescence-guided surgery allows for more complete resection of pancreatic cancer, resulting in longer disease-free survival compared with standard surgery in orthotopic mouse models. *Journal of the American College of Surgeons*, 215(1):126 – 135, 2012.
- [45] Cristina A. Metildi, Sharmeela Kaushal, Cynthia S. Snyder, Robert M. Hoffman, and Michael Bouvet. Fluorescence-guided surgery of human colon cancer increases complete resection resulting in cures in an orthotopic nude mouse model. *Journal of Surgical Research*, 179(1):87 – 93, 2013.
- [46] W. Becker. Fluorescence lifetime imaging - techniques and applications. *Journal of Microscopy*, 247(2):119–136, August 2012.
- [47] W. Becker, A. Bergmann, and C. Biskup. Multispectral fluorescence lifetime imaging by tcspc. *Microscopy Research and Technique*, 70(5):403–409, May 2007.

- [48] Angelika Rück, Frank Dolp, Christian Hülshoff, Carmen Hauser, and Claudia Scalfi-Happ. Fluorescence lifetime imaging in pdt. an overview. *Medical Laser Application*, 20(2):125 – 129, 2005.
- [49] S. Bagdonas, L. W. Ma, V. Iani, R. Rotomskis, P. Juzenas, and J. Moan. Phototransformations of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin ix in vitro: A spectroscopic study. *Photochemistry and Photobiology*, 72(2):186–192, August 2000.
- [50] P. Juzenas, V. Iani, S. Bagdonas, R. Rotomskis, and J. Moan. Fluorescence spectroscopy of normal mouse skin exposed to 5-aminolaevulinic acid and red light. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-biology*, 61(1-2):78–86, August 2001.
- [51] Karsten König, Marie-Therese Wyss-Desserich, Yona Tadir, Urs Haller, Bruce Tromberg, Michael W. Berns, and P. Wyss. Modifications of protoporphyrin IX fluorescence during ala-based photodynamic therapy of endometriosis. *Medical Laser Application*, 21(4):291 – 297, 2006.
- [52] Dominic J. Robinson, Henriëtte S. de Bruijn, Nynke van der Veen, Mark R. Stringer, Stanley B. Brown, and Willem M. Star. Fluorescence photobleaching of ALA-induced protoporphyrin IX during photodynamic therapy of normal hairless mouse skin: The effect of light dose and irradiance and the resulting biological effect. *Photochemistry and Photobiology*, 67(1):140–149, 1998.
- [53] Johan Moan, Giedre Streckyte, Saulius Bagdonas, Øystein Bech, and Kristian Berg. Photobleaching of protoporphyrin IX in cells incubated with 5-aminolevulinic acid. *International Journal of Cancer*, 70(1):90–97, 1997.
- [54] Jarod C. Finlay, David L. Conover, Edward L. Hull, and Thomas H. Foster. Porphyrin bleaching and pdt-induced spectral changes are irradiance dependent in ala-sensitized normal rat skin in vivo¶. *Photochemistry and Photobiology*, 73(1):54–63, 2001.
- [55] Raymond Bonnett and Gabriel Martinez. Photobleaching of sensitisers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron*, 57(47):9513 – 9547, 2001.