



Zápis o konání obhajoby disertační práce v oboru Lékařská biofyzika

MUDr. RNDr. Martin Pola, lékař Radiologického oddělení Nemocnice ve Frýdku-Místku, p.o., student prezenční formy doktorského studijního programu Lékařská biofyzika na LF UP v Olomouci

Téma práce: „**Role kyslíku v účinnosti fotodynamické terapie na buněčných modelech v přítomnosti senzitizerů**“

Obhajoba se konala v Olomouci dne 23. února 2023 ve 12:00 hod.

Komise:

předsedkyně: doc. Ing. Kateřina Bartoň Tománková, Ph.D. ✓

místopředseda: doc. Ing. Josef Hanuš, CSc. ✓

členové: Mgr. Jaromír Vachutka, Ph.D. ✓

doc. Mgr. Vladan Bernard, Ph.D. ✓

prof. RNDr. Hana Kolářová, CSc. ✓

Oponenti:

doc. RNDr. Aleš Bezrouk, Ph.D. ✓

Ústav lékařské biofyziky LF UK

Mgr. Miroslav Vařecha, Ph.D. *AMLUVEN*

Mezinárodní centrum klinického výzkumu FNUSA

Školitel: MUDr. Mgr. Robert Bajgar, Ph.D. ✓

Předseda komise přednesl stručnou charakteristiku uchazeče, hodnocení školitele a vedoucího školicího pracoviště. Poté uchazeč vyložil podstatný obsah své disertace. Oponenti přednesli své posudky. Ve vědecké rozpravě vystoupili: viz příloha – zápis o diskusi.

Hlasování se účastnilo *5* členů komise. Kladně hlasovalo *5* členů, záporně *0* členů, neplatných lístků bylo odevzdáno *0*.

Usnesení:

Přítomní členové komise tajným hlasováním rozhodli, že **MUDr. RNDr. Martin Pola** obhájil/neobhájil* disertační práci a doporučili/nedoporučili* udělení akademického titulu doktor ve zkratce Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

.....
doc. Ing. Kateřina Bartoň Tománková, Ph.D.
předsedkyně komise

Role kyslíku v účinnosti fotodynamické terapie na buněčných modelech v přítomnosti senzitizerů

Otázky oponentů:

doc.RNDr.Aleš Bezrouk, Ph.D.

1. Je známo z nějakých (aktuálních) rešeršních prací, zda po podání PDT převažuje pozorování imunostimulace či imunoprese a případně v jakém poměru? Je z toho pohledu nějak výrazný rozdíl mezi typy senzitizerů, např. hydrofilní vs. Lipofilní apod.?

Odpověď:

PDT – indukce apoptózy/nekrózy, destrukce cévního zásobení, imunitní odpověď
RT/CHT vždy indukuje imunopresi

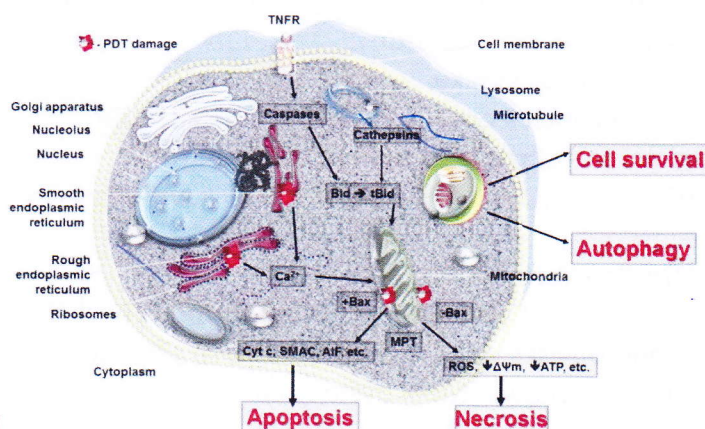
PDT indukce imunoprese - hlavně reakce na lokální topickou léčbu ve velkých oblastech ozáření, ovlivnění T lymfocytů

PDT indukce imunostimulace – prezentace antigenů buněčných struktur – akutní zánětlivá odpověď s uvolněním mediátorů zánětu -aktivizace neutrofilů, žírných buňek, makrofágů a dendritických buňek. Makrofágy fagocytují rakovinné buňky poškozené PDT a prezentují proteiny z těchto nádorů pomocným T lymfocytům CD4, které pak aktivují CD8 cytotoxické T lymfocyty.

Převaha nekrózy vede spíše k imunopresi a naopak převaha apoptózy k imunostimulaci. Zda převažuje ten či druhý typ buněčné smrti závisí nejen na typu senzitizeru, ale i jeho koncentraci a dávce záření. Lipofilní senzitizery jsou více spojovány s naprogramovanou buněčnou smrtí a hydrofilní s nekrózou. Ovšem i některé hydrofilní senzitizery mohou spustit kaskádu vedoucí k apoptóze.

Dąbrowski J.M. Reactive oxygen species in photodynamic therapy: Mechanisms of their generation and potentiation. Adv. Inorg. Chem. 2017;70:343–394

Castano A.P., Mroz P., Hamblin M.R. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. Nat. Rev. Cancer. 2006;6:535–545. doi: 10.1038/nrc1894



Mroz P et al., Cancers 2011

Cesty buněčné smrti v PDT. Způsob buněčné smrti pozorovaný po PDT do jisté míry závisí na intracelulární lokalizaci PS a s PDT souvisejícím poškozením této organely. PDT s PS lokalizovaným v mitochondriích povede ke ztrátě permeability membrány a uvolnění pro-apoptotických mediátorů, zatímco poškození ER uvolní buněčná depozita vápníku. PS, který se hromadí v lysosomech, uvolní po osvětlení proteolytické enzymy. Lysosomy se mohou také sloučit s autofagozomy k hydrolýze poškozených organel a jejich recyklaci během autofagie. Při nadměrném poškození buňka nepřežije navzdory zahájení autofagie. Nekróza, stejně jako autofagie, může být dominantním režimem buněčné smrti po PDT, pokud je apoptóza dysfunkční. Je třeba mít na paměti, že některé

PS se můžou lokalizovat ve více než jedné organelce a aktivace různých cest buněčné smrti může probíhat současně (upraveno podle Oleinick et al. [132]).

2. Ve své práci uvádíte, že kombinace PDT s metodami zvyšujícími koncentraci molekulárního kyslíku nebude nezbytná, .. Pokud PDT využije mechanismus typu I, jak se to jeví pro fotosenzitizér ZnPcS2. Pokročili jste nějak v tomto směru vlastním výzkumem, nebo jej připravujete, případně objevily se již nějaké studie tuto hypotézu podporující?

Odpověď:

ne, ale vidíme zaměření na senzitivizéry akumulujících se v mitochondriích a absorbujících v červeném spektru nebo NIR.

Yaqoob M.D., Xu L., Li Ch., Leong M.M.L., Xu D.D., Targeting mitochondria for cancer photodynamic therapy, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy 38 (2022) 102830

Huang Z., Li D., Guo F., Xian T., Hu H.S., Xu J., Luo Y.F., Chen Z.Z., Wang B.CH., Zhang Y.M., Mitochondria-targeted photosensitizer based nanoplatfrom loading glutathione inhibitor for enhanced breast cancer photodynamic therapy, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 220 (2022) 112956

Kadkhoda J., Tarighatnia A., Nader N.D., Aghanejad A., Targeting mitochondria in cancer therapy: Insight into photodynamic and photothermal therapies, Life Sciences, 307 (2022) 120898

Wang Z., Liu F., Liu Y., Huyan Y., Muhammad M., Xu Y., Li H., Sun S., Mitochondria-targeted nanoplatfroms building for in situ ROS generating photodynamic tumor therapy through reinforcing mitochondria apoptotic pathway, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 653, (2022) 129973

Karaman O., Almammadov T., Gedik E., Gunaydin G., Kolemen S., Gunbas G., Mitochondria-Targeting Selenophene-Modified BODIPYBased Photosensitizers for the Treatment of Hypoxic Cancer Cells, ChemMedChem 2019, 14, 1879–1886

Ajesh P. Thomas, L. Palanikumar, M. T. Jeena, Kibeom Kim and Ja-Hyoung Ryu, Cancer-mitochondria-targeted photodynamic therapy with supramolecular assembly of HA and a water soluble NIR cyanine dye, Chem. Sci., 2017, 8, 8351–8356

3. Uvedené experimentální činnosti vycházejí z prací publikovaných kolektivem autorů, nůžete specifikovat Váš příspěvek k výsledkům?

Odpověď:

Vyhledávání literárních zdrojů – rešerše literatury

Práce v laboratoři

v bioboxu, kultivace buněk, měření intenzity vyzařování diodového zdroje, měření fluorescenčním spektrofluorimetrem, spektrometrické měření absorbance, zobrazování světelným a fluorescenčním mikroskopem, práce s hyperbarickou komůrkou, příprava hermeticky uzavřených kyvet pro měření výtěžku singletového kyslíku

Příprava designu experimentů

měření difuzibilitidy kyslíku

měření excitačních a emisních spekter fotosenzitizérů

Týmová práce – vlastní provedení experimentů

Spoluúčast na vyhodnocení a sepsání publikovaných prací

Mgr. Miroslav Vařecha, Ph.D.

1. Na str. 9 uvádíte: „Cytozolové enzymy jsou méně náchylné k poškození k PDT. Tato pozorování souvisí s velice krátkou životností singletního kyslíku ve vodném prostředí oproti lipidové vrstvě.“ Mohl byste zmínit, jaké jsou přibližně doby života singletového kyslíku ve vodném prostředí a v lipidech. Jak si vysvětlujete vyšší náchylnost k poškození ve spojitosti s rozdílnými dobami života singletového kyslíku. Jak se liší koeficienty difuze singletového kyslíku v těchto rozdílných prostředích a jak třeba samotná rychlost difuze může ovlivnit míru poškození?

Odpověď:

Deaktivace singletového kyslíku (1O_2):

zářením 1270nm (doba života singletového kyslíku v plynu 72minut)

fyzikálně a chemicky – interakce s rozpouštědlem, fotosenzitizerem, buněčnými molekulami (voda $3.5 \pm 0.5 \mu\text{s}$ zhášení vibracemi OH skupin a chemicky za vzniku H_2O_2 , lipidy $14 \pm 2 \mu\text{s}$, buněčná suspence $10 \pm 3 \mu\text{s}$, v buňce $3 \mu\text{s}$, fibroblasty $1,7 \mu\text{s}$)

V buňce $^1\text{O}_2$ může urazit řádově 100nm , velikost živočišné buňky $10 - 100\mu\text{m}$.

Difuzní koeficient O_2 ve vodě $2.01 \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$, v lipidech nízká rozpustnost a difuzní koeficient O_2

Difuzní koeficient O_2 lipidovou membránou ($1.2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ při 25°C).

V cytosolu je řada enzymů v nadbytku, a proto jejich oxidace/poškození může být snadno nahraditelná než struktura v biomembránách.

Když ve vodném prostředí je doba života $^1\text{O}_2$ $3 \mu\text{s}$ a urazí řádově 100 nm , pak při stejném koncentračním spádu, když je doba života $^1\text{O}_2$ v lipidech 4x větší, ale difuzní koeficient poloviční, teoreticky může $^1\text{O}_2$ v lipidech urazit dvojnásobnou vzdálenost a jeho rádius pro poškození membránových struktur je dvojnásobný.

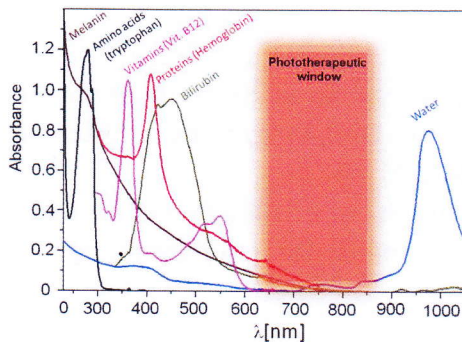
Dědic R., Vyklický V., Svoboda A., Hála J., Singlet oxygen lifetime dependence on photosensitizer concentration in lipid films, *Journal of Luminescence* 131(2011)442–444

Baier J., Fuß T., Polmann C., Wiesmann Ch., Pindl K., Engl R., Baumer D., Maier M., Landthaler M., Baumler W., Theoretical and experimental analysis of the luminescence signal of singlet oxygen for different photosensitizers, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 87 (2007) 163–173

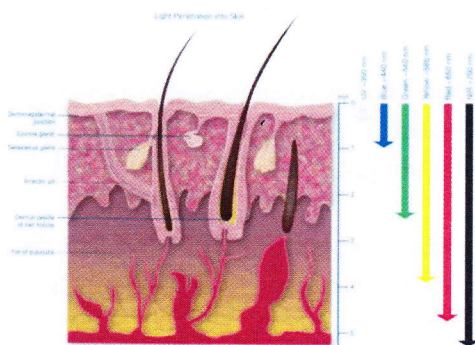
(Baier J., Maier M., Engl R., Landthaler M., Baumler W., Time-Resolved Investigations of Singlet Oxygen Luminescence in Water, in Phosphatidylcholine, and in Aqueous Suspensions of Phosphatidylcholine or HT29 Cells, *J. Phys. Chem. B* 2005, 109, 3041-3046)

2. Při porovnávání různých senzitizerů uvádíte nižší tkáňovou pronikavost světla kratších vlnových délek. Mohl byste alespoň přibližně kvantifikovat rozdíly v pronikavosti světla delších a kratších vlnových délek.

Odpověď:



Dąbrowski J.M., Arnaut L.G., Photodynamic therapy (PDT) of cancer: from local to systemic treatment, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2015, 14, 1765



Clement M, Daniel G, Trelles M (2005) Optimising the design of a broad band light source for the treatment of skin. *J Cosmetic Laser Ther* 7:177–189

3. Při měření produkce singletového kyslíku ve fosfátovém pufru u senzitivizérů ZnTPPS₄ a ZnPcS₂ jste nezměřil žádný významný rozdíl mezi vzorkem pufru s nízkou (0,4 mg/l) a vysokou (36 mg/l) hladinou kyslíku, avšak při měření produkce singletového kyslíku v HeLa buňkách vystavených dusíkové atmosféře byl u těchto senzitivizérů změřen významný rozdíl v produkci singletového kyslíku. Čím si to vysvětlujete?

Odpověď:

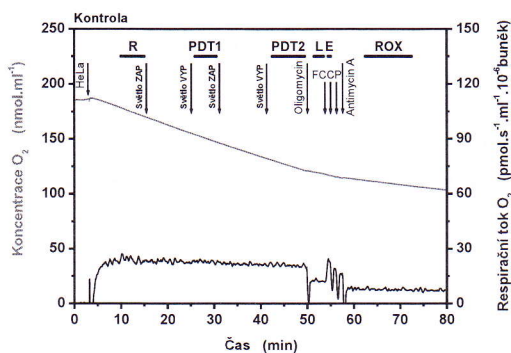
Ve tkáni je parciální tlak kyslíku od 30 do 60.0 mmHg (tj. od 1.2 do 2.4 mg/l)

Otázkou je, zda může u dýchacích buněk klesnou koncentrace O₂ významně pod 0,4 mg/l

Při měření respirace bylo asi 1 mil. buněk v 1 ml média, u měření na destičkách 40 tis.

buněk na jamku v 100 ml, tj. v relativním přepočtu pouze 2,5x více média než v respirační cele, kde bylo 1 mil. buněk na 1 ml.

Respirační křivky ukazují, že úbytky kyslíku v čase jsou velké – viz počáteční respirace R, dalo by se spočítat, na základě těchto toků, jaká je teoretická zbytková koncentrace kyslíku v médiu s buňkami za 20 minut inkubace při N₂ atmosféře.



Úbytek O₂ v médiu v nmol·ml⁻¹·s⁻¹ = 1,5; tj. 0,024 mg·ml⁻¹·s⁻¹; tj. za 20 minut 29 mg·ml⁻¹

-v médiu o objemu 2,5x větším a počáteční koncentraci O₂ 0,4 mg/ml by buňkách při stejných respiračních tocích vystačil O₂ na 0,4/(0,024/2,5) = 42 s

-lze tedy usoudit, že v případě měření na živých buňkách bez přísunu O₂ vystavených N₂ atmosféře bude celková koncentrace kyslíku významně menší než u měření s čistým pufrům

Vědecká rozprava – otázky:

1. **Mgr. Jaromír Vachutka, Ph.D** – Měřili jste fluorescenční absorpční spektra za různých podmínek atmosfér. Jak může atmosféra fluorescenční spektrum změnit. Existují nějaké práce, kde by pozorovali změny v důsledku vnějších faktorů nebo jak vás napadlo takovou věc měřit?

Odpověď: Pokud je fotosenzitivizér v okolním prostředí tak jsme si chtěli být jistí, že to okolní prostředí nezmění vlastnosti fotosenzitivizéru a proto jsme to změřili abychom nastavili podmínky pro měření optimálním způsobem.

2. **doc. Ing. Josef Hanuš, CSc.** – Říkali jste, že jeden fotosenzitivizér působí na jedny struktury v buňce, druhý syntetizér na jiné struktury v buňce. Co by se stalo, kdyby se dva fotosenzitivizéry smíchaly?

Odpověď: Nesetkal jsem se s tím, že by se používala směs fotosenzitivizérů. Je to

možnost k úvaze.

doc. Ing. Kateřina Bartoň Tománková a MUDr. Mgr. Robert Bajgar, Ph.D : se taky vyjádřili, že o použití směsi ještě neslyšeli.

3. **doc. Mgr. Bernard Vladan, Ph.D.** – otázka ke zdroji světla; To, co jste používali byl svépomocně vyrobený zdroj světla, pospájené komerčně dostupné diody. Bylo by možno ho použít jako zdravotnický prostředek?

Odpověď: Každý přístroj, když se nazve zdravotnickým prostředkem se dostává do schvalovacího schématu, kde ho musí schválit příslušné authority a je potřeba jej vyrábět v certifikovaném provozu. Ale dnes jsou zdroje, které se mohou použít a mají CE certifikaci.

mpola@email.cz