

Doc. RNDr. Jiřina Škorpíková. CSc.

Můžete mi zdůvodnit, proč jste si vybral pro *in vitro* studium buněčného poškození právě linie A549, G361, B16F0, Hela a NIH3T3? Ověřoval jste účinky fotodynamických reakcí i na jiných modelech?

Tyto linie byly vybrány s ohledem na aplikaci fotodynamické terapie v případné klinické praxi. PDT se dá obecně využít všude tam, kde je možné aplikovat světlo prostřednictvím světelného zdroje, např. lokálního ozařovače nebo za pomoci endoskopu (světlovodu). Použité nádorové linie byly tedy vybrány původem z míst lidského těla, která jsou potencionálně vhodná pro aplikaci PDT. Například A549 – adenokarcinom plic – světlo je možno přivést bronchoskopem. G361 – lidský melanom + B16F0 – myší melanom – povrchové ozáření, HeLa – nádor děložního hrdla virového původu – světlo je možné přivést endoskopem. Pouze linie NIH3T3 – myší fibroblasty, byla použita jako univerzální model na kterém je běžně ověřována cytotoxicita léčiv a zároveň jako model nenádorové buněčné linie pro ověření netoxicity sensitizérů bez přístupu světla.

Jaké je využití nově zavedené metody měření mechanických vlastností buněk v klinické praxi?

Předpokládáme, že v klinické praxi je možné AFM využít pro stanovení tuhosti primárních buněčných linií před a po aplikované terapii nebo léčiv. Kromě hodnocení změny ve vlastnostech nádorových linií je možno tuto metodu použít také pro stanovení změny v morfologických a mechanických vlastností u nenádorových buněčných linií pohybového aparátu (chondrocyty, osteoblasty) po aplikaci léčby. Dále je možné ověřovat vlastnosti i opotřebením použitých tkáňových náhrad například v zubním lékařství a ortopedii (zubní náhrady, kloubní výplně a kloubní náhrady). Primárně ovšem AFM slouží jako metoda základního výzkumu.

Na straně 53 používáte pro modul pružnosti jednotku Arb. Můžete vysvětlit použití této jednotky ve vztahu k interpretaci vašich výsledků?

Pokud bychom chtěli při měření mechanických vlastností prostřednictvím AFM dosáhnout absolutních jednotek Youngova modulu (Pa), je nezbytné nakalibrovat pomocí standardních vzorků (pro měkké vzorky, jako jsou buněčné linie a některé tkáňové náhrady (matrice z kys. hyaluronové a nanovláken), užíváme měkké a měkčené polymerní vrstvy; pro tvrdé vzorky, jako jsou tvrdé tkáňové náhrady, užíváme kovové a safírové substráty. Pokud nebudeme kalibrovat, budou jednotky Youngova modulu stanoveny v relativní jednotce, tzv. arbitrární jednotce Arb.

MUDr. Dagmar Jírová, CSc.

Na straně 55 je nedostatečný popis obrázku č. 15. Pokud obrázek definuje změny mechanických vlastností po fotodynamické reakci, chybí údaje definující ozáření buněk.

Pro ozáření byly použity LED diody s vlnovou délkou emisního maxima 660 nm, FWHM 25 nm. Intenzita světla byla 10 mW/cm² kontinuálně po dobu 25 min až do dávky záření 15 J/cm².

Pro studium buněčné životnosti jste používal MTT test. Jaké další metody pro studium buněčného poškození by se daly použít?

- Stanovení životnosti pomocí **trypanové modři**
- **MTS** (3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)- 5-(3-carboxymethoxyphenyl)- 2-(4-sulfophenyl) -2H-tetrazolium). MTS je vodou rozpustná a tím překonává nevýhody metody MTT (rozpustný pouze v organickém rozpouštědle)
- **XTT** 3-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzene-sulfonic acid hydrate, detekuje buněčnou metabolickou aktivitu. Je podobný MTT testu
- **FDA** je acetylový derivát zeleného fluorescenčního barviva fluoresceinu. Díky acetylovým skupinám barvivo nefluoreskuje a je schopné difundovat skrz fosfolipidovou dvojvrstvu. FDA je přítomna v cytoplazmě.

Pro studium buněčného poškození je možné využít celou řadu fluorescenčních a molekulárních metod.

- Často využívaná je metoda detekce produkce **reaktivních forem kyslíku** (kyslíkové nebo dusíkové radikály),
- dále je možné stanovit **buněčný cyklus** poškozené buňky
- stanovit počet **apoptotických a nekrotických** buněk v kultuře

- stanovit změnu **mitochondriálního membránového potenciálu**, který udává pravděpodobnost rané fáze (vzniku) apoptózy
- stanovení hladiny **intracelulárního vápníku**
- stanovení aktivace **kaspáz** vedoucích k apoptóze
- stanovení **genotoxicity kometovou analýzou**
- stanovení **exprese stresových genů** atd.....

Jaký je pathofyziologický mechanismus přednostního vychytávání fotodynamicky aktivní látky v nádorové tkáni?

Důvodů pro preferenční vychytávání sensitizérů je několik:

- jiné pH v nádorových buňkách
- zvýšený metabolismus nádorové buňky
- aplikace a typ fotosensitizeru (1. a 2. generace) – systémové fotosensitizer se hromadí v každé lézi, lokální fotosensitizer se aplikují do každé léze zvlášť.
- keratinové vrstvy v nádorových epitelech mají zvýšenou permeabilitu
- zvýšená propustnost kapilár v okolí nádoru

Pro zvýšení účinnosti preferenčního vychytávání můžeme sensitizér konjugovat se specifickými nosiči – tzv. sensitizéry 3. generace.

- **LDL** (Low Density Lipoprotein) a **albumin**.
- **HDL** (High Density Lipoprotein) zvýšené množství receptorů pro lipoproteiny, které váží molekuly PS.
- **Fotoimunoterapie** – jedná se o metodu, která umožňuje několikanásobně zvýšit koncentraci fotosensitizeru v nádoru a zároveň omezit jeho množství ve zdravé tkáni díky užitím **monoklonálních protilátek, růstových faktorů nebo peptidů**, které se váží na receptory růstových faktorů.
- **Elektro-PDT** – při použití elektrických impulsů na plazmatickou membránu se výrazně zvýší transport látky do buněk. Působením intenzivního elektrického pole mohou vzniknout póry, kterými fotosensitizer může za určitých podmínek snadněji pronikat do buňky.
- **Teranostická terapie** (léčba kombinující diagnostiku s terapií). Využívá **nanomateriály** (např. magnetické částice), které umožňují zejména prodloužit čas, po který je látka schopna cirkulovat v krvi, minimalizovat degradaci látky a vykazují také vysokou schopnost specificky rozpoznat a navázat se na určitý povrch prostřednictvím specifického ligandu (náhrada za **lipozomy**).
- **Ultrazvuk** – působením mechanického vlnění je možno zvýšit propustnost membrán nebo posílit cytotoxický účinek léčiva.

Prof. ing. Jan Hálek, CSc.

- **Od koho odebíráte sensitizéry?** – fy Syntezia, volně prodejně.
- **Proč využíváte pro experimenty právě myší fibroblasty?** - NIH3T3 – myší fibroblasty, byla použita jako univerzální model na kterém je běžně ověřována cytotoxicita léčiv a zároveň jako model nenádorové buněčné linie pro ověření netoxicity sensitizérů bez přístupu světla. Mít stejné vzorky je podmínkou na in vivo experimentech.

Doc. ing. Josef Hanuš, CSc.

- **Jaký typ reakce funguje u sonosensitizérů?** – Mechanické vlnění funguje jako donor energie.
- **Může se v této souvislosti využít i diatermie?** – Ano, pokud budou sensitizéry citlivé na teplo, při lokální hypertermii je to také donor energie.