

# Porovnání účinku porfyrinových fotosensitizerů při aplikaci fotodynamické terapie na buněčné nádorové i nenádorové linie a bakteriální kmeny

Adéla Hanáková<sup>1</sup>, Kateřina Bogdanová<sup>2</sup>, Milan Kolář<sup>2</sup>, Hana Kolářová<sup>1</sup>

(1) Ústav lékařské biofyziky, Ústav molekulární a translační medicíny

(2) Ústav mikrobiologie, Lékařská fakulta, UP v Olomouci

# Fotodynamická terapie (PDT)

## Úvod

- k léčbě nenádorových (terapie revmatoidní artritidy) i nádorových (terapie nádorů např. močového měchýře, prostaty, plic, oblasti hlavy ) onemocnění, poslední roky proniká i do řady jiných lékařských disciplín
- vzrůstá zájem v mikrobiální oblasti, především k léčbě lokálních infekcí (důvodem je rezistence bakterií vůči řadě antibiotikům)
- náhradní možnost terapie namísto antibiotik (výhodou je možnost opakování a nulové riziko vzniku rezistence oproti antibiotikální léčbě)

## Cíl práce

- 1) najít vhodné koncentrace a dávky ozáření pro jednotlivé buněčné linie i bakteriální kmeny
- 2) porovnat účinnost fotosensitizerů (zredukování růstových křivek)

## Praktické využití

**Nenádorová linie** – terapie revmatoidní artritidy: buňky vlastního imunitního systému po propuknutí nemoci začínají napadat výstelku kloubního pouzdra – tzv. kloubní eroze. Ta se podílí na omezení pohyblivosti kloubu a v pozdějších fázích i na způsobení deformit

**Nádorová linie** – terapie nádorů např. močového měchýře, prostaty, plic, oblasti hlavy ...

**Bakteriální kmeny** – náhradní možnost terapie namísto antibiotik (výhodou je možnost opakování a nulové riziko vzniku rezistence oproti antibiotikální léčbě)

# Postup při aplikaci PDT

## 1) Inkubace fotosensitizerů

Zinek-5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonafenyl) porfyrin

- ZnTPPS<sub>4</sub>

5,10,15,20-tetrakis(N-methylpyridinium-4-yl)porfyrin

- TM porfyrin

## 2) Ozáření a aktivace fotosenzitizerů

- záření vhodné vlnové délky s absorpčním maximem fotosensitizeru (LED 414 nm)

## 3) Detekce smrti buněčných linií a bakterií

\* NIH3T3 (myší fibroblasty)

\* *S. aureus* (Gram – pozitivní)

\* HeLa (karcinom děložního čípku)

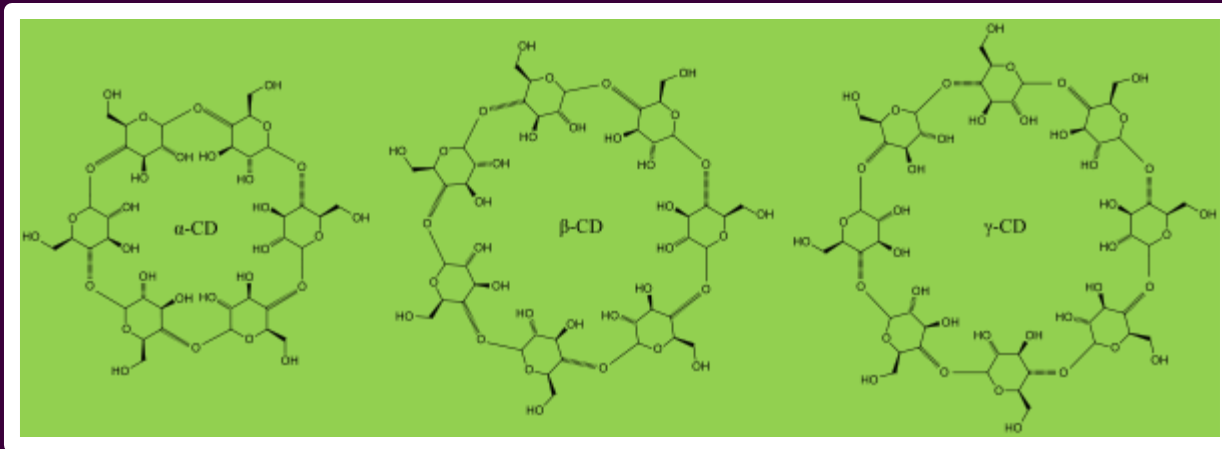
\* *P. aeruginosa* (Gram – negativní)

# Cyklodextriny

- cyklické oligosacharidy, běžné ve 3 formách  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD a  $\gamma$ -CD
- kužel s vnitřní dutinou (vazba látek)

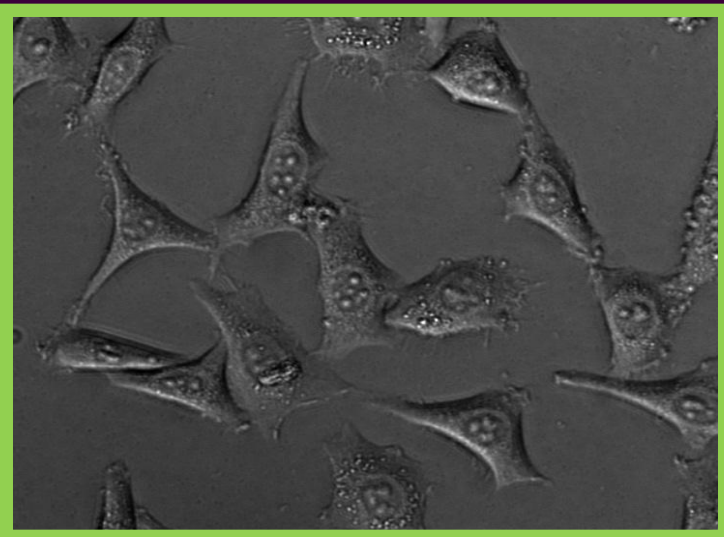
## Funkce

- netoxické přenašeče sloučenin pro transport do cílového místa
- podpora průniku do požadovaného místa zájmu

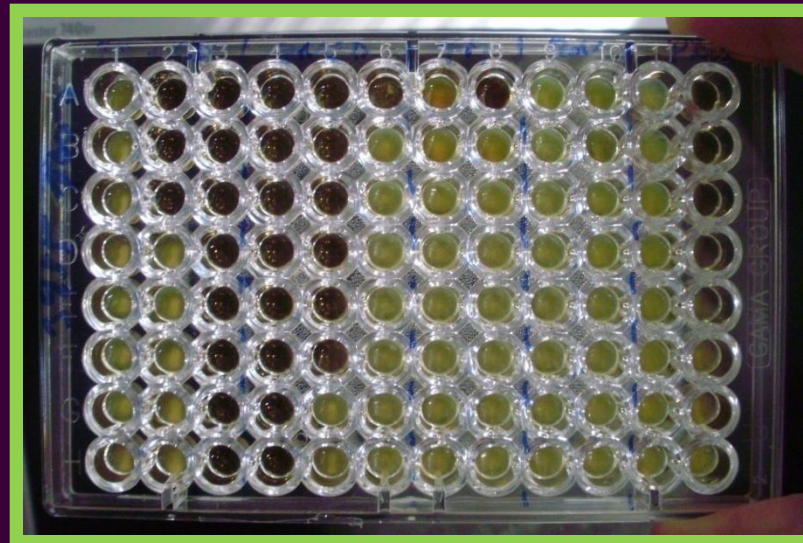


Obr. Struktura  $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ -cyklodextrinu

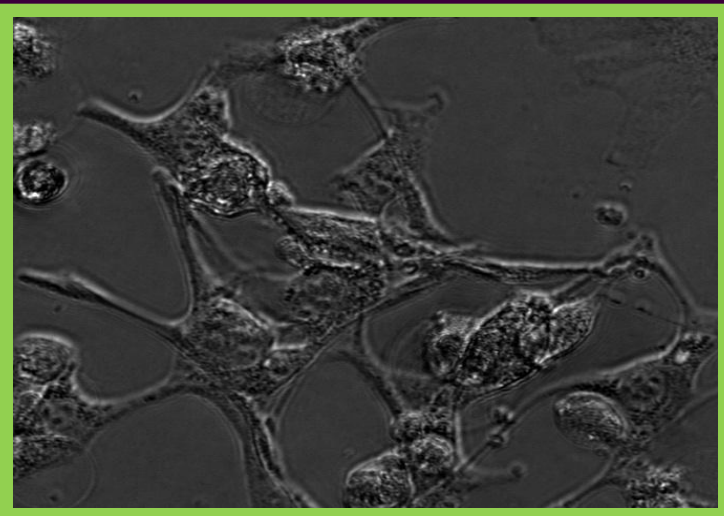
<http://en.wikipedia.org/wiki/Cyclodextrin>



Obrázek 1: buněčná nádorová linie HeLa před terapií



Obrázek 3: experimentální destička k kmeny testovaných bakterií



Obrázek 2: buněčná nenádorová linie NIH3T3 před terapií



Obrázek 4: Petriho miska s krevním agarem pro kultivaci bakterií  
<http://cs.wikipedia.org/wiki/Bakterie>

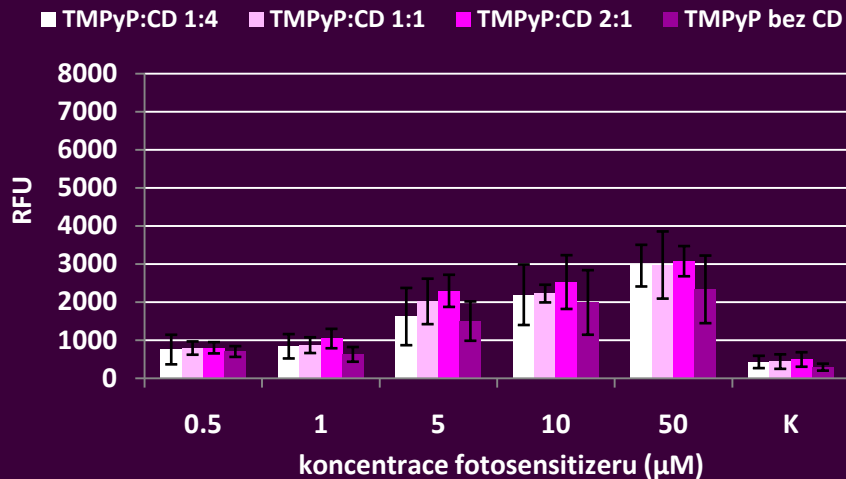
# Experimenty

- **buněčné linie:** nádorová (HeLa), nenádorová (NIH3T3)
- **bakteriální kmeny:** Gram-pozitivní *S. aureus* a Gram-negativní *P. aeruginosa*
- **použité 2 fotosensitizer:** ZnTPPS<sub>4</sub> a TMPyP +/- hp-β-cyklodextrin (CD)
- **testované koncentrace:** 0,5; 1; 5; 10 a 50 μM (buněčné linie) a 0,78; 1,56; 3,1; 6,25; 12,5 ; 25; 50 a 100 μM (bakterie)
- **použité poměry fotosensitizer:CD – 1:4, 1:1, 2:1**
- **dávky ozáření:** 0, 1, 5 a 10 J/cm<sup>2</sup> (buněčné linie) a 0, 100, 125 a 150 J/cm<sup>2</sup> (bakterie)
- provedena **fotografická dokumentace** (fluorescenční i klasická)

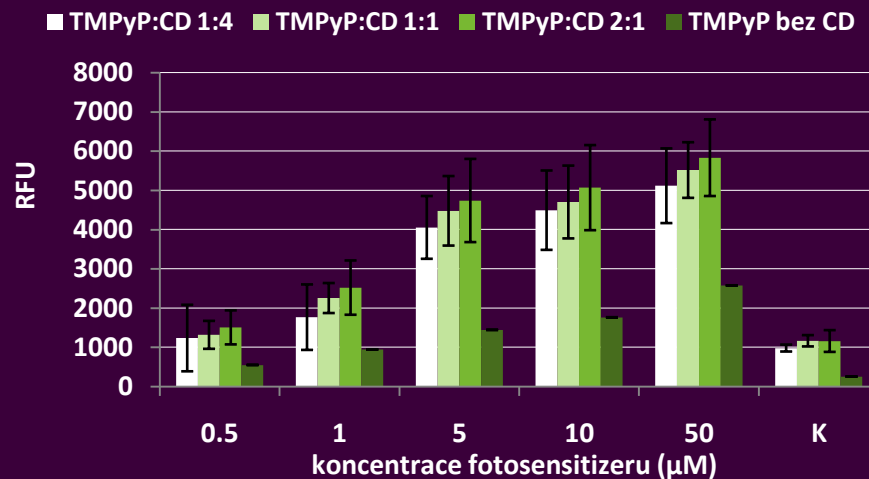
# Detekce redukce životnosti buněčných linií

- **kultivace buněčných linií s fotosensitizerem (+/- 2-hydroxypropyl- $\beta$ -CD) po dobu 24 hodin**
- **vždy použita kontrola s PBS, a také neozářená deska se stejným rozložením chemikálií a buněčných linií**
- **ozáření světlem o vlnové délce 414 nm**
- **provedení detekce ROS (fluorimetr Synergy HT)**
- **inkubace v živném mediu dalších 24 hodin**
- **provedení MTT testu**
- **mikroskopická detekce**

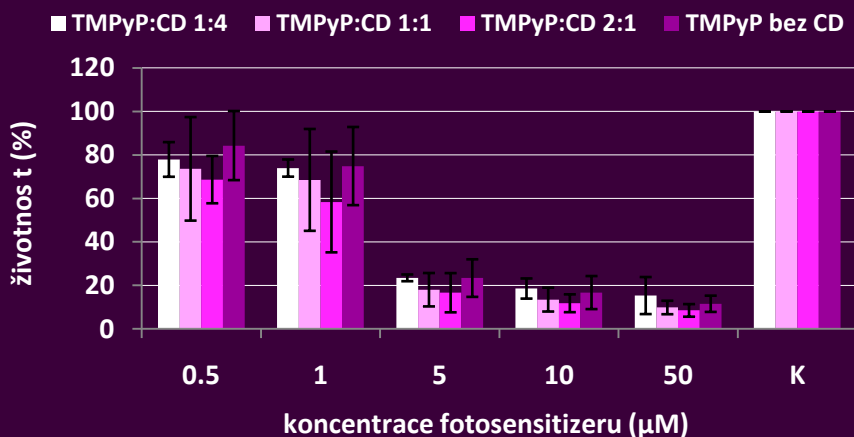
# Výsledky PDT na buněčných liniích



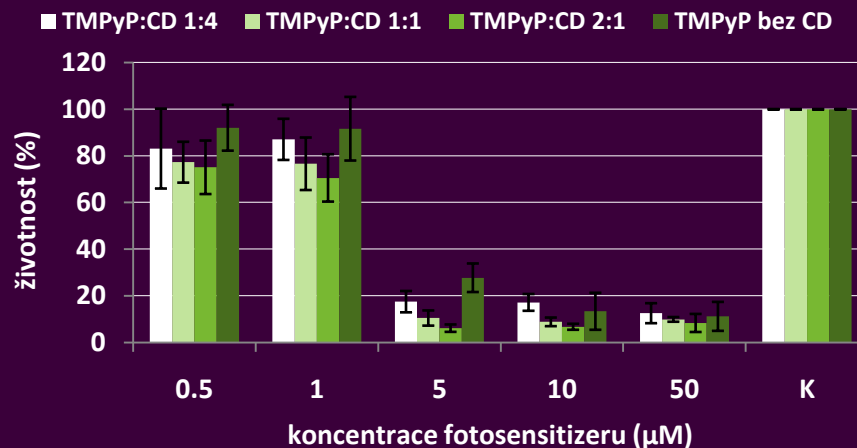
Graf 1: Závislost RFU na koncentraci fotosensitizeru TMPyP pro buněčnou nádorovou linii HeLa při dávce ozáření 1 J/cm<sup>2</sup>



Graf 3: Závislost RFU na koncentraci fotosensitizeru TMPyP pro buněčnou nenádorovou linii NIH3T3 při dávce ozáření 1 J/cm<sup>2</sup>



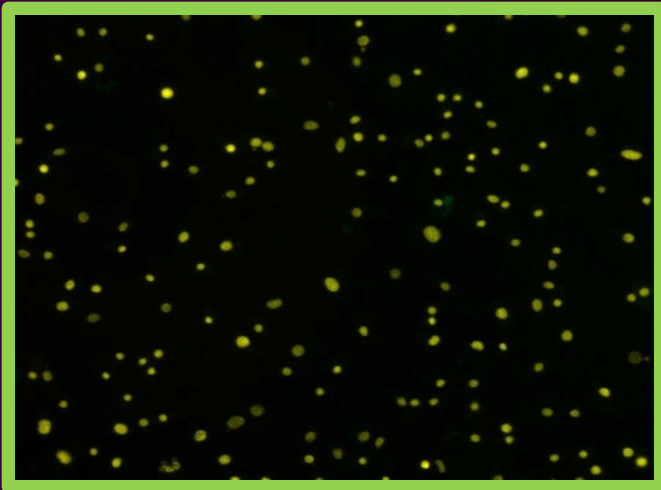
Graf 2: Závislost životnosti buněčné nádorové linie HeLa na koncentraci fotosensitizeru TMPyP při dávce ozáření 1 J/cm<sup>2</sup>



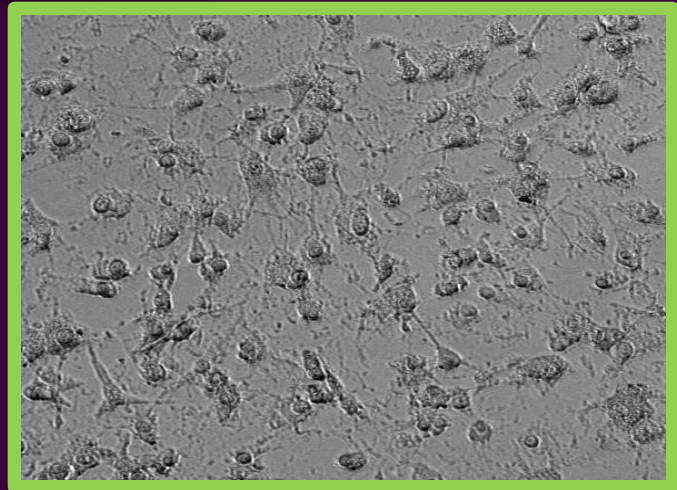
Graf 4: Závislost životnosti buněčné nenádorové linie NIH3T3 na koncentraci fotosensitizeru TMPyP při dávce ozáření 1 J/cm<sup>2</sup>



# Dokumentace z fluorescenčního mikroskopu



Obrázek 1: koncentrace 5  $\mu\text{M}$  pro fotosensitizer TMPyP u buněčné linie NIH3T3 a dávce ozáření 5  $\text{J}/\text{cm}^2$



Obrázek 2: koncentrace 5  $\mu\text{M}$  pro fotosensitizer TMPyP u buněčné linie NIH3T3 a dávce ozáření 1  $\text{J}/\text{cm}^2$

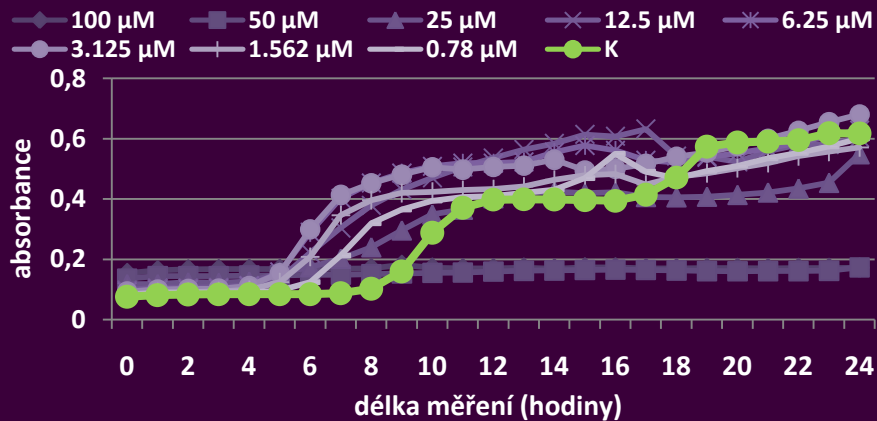


Obrázek 3: koncentrace 5  $\mu\text{M}$  pro fotosensitizer TMPyP u buněčné linie HeLa a dávce ozáření 5  $\text{J}/\text{cm}^2$

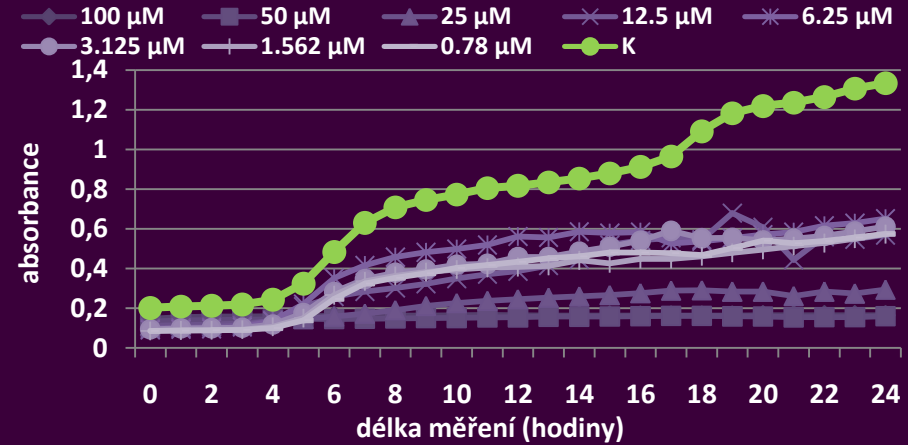
# Detekce redukce životnosti bakteriálních kmenů

- kultivace bakteriálních kmenů s fotosensitizery (+/- 2-hydroxypropyl- $\beta$ -CD) po dobu 90 minut
- vždy použita kontrola s PBS, a také neozářená deska se stejným rozložením chemikálií a bakterií
- ozáření světlem o vlnové délce 414 nm
- proměření ihned po ozáření, a poté během 24 hodin pro sestrojení růstové křivky bakterií z naměřených hodnot absorbancí (při vlnové délce 630 nm)
- výhled: mikroskopické ověření

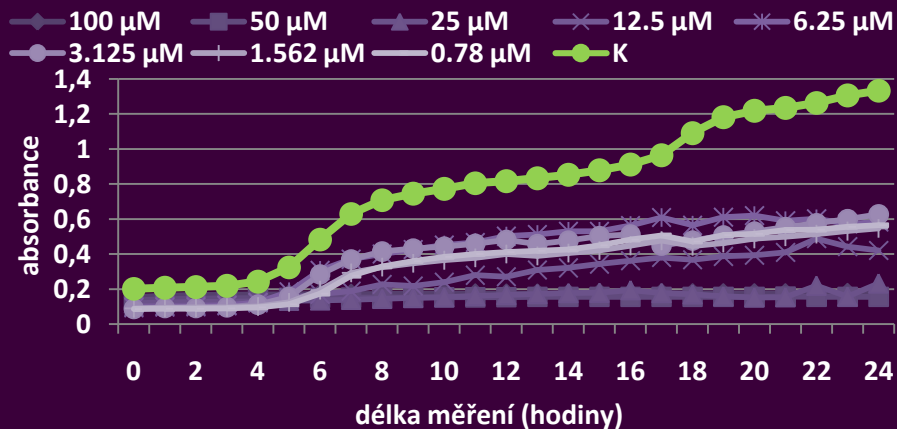
# Výsledky PDT na bakteriálních kmenech



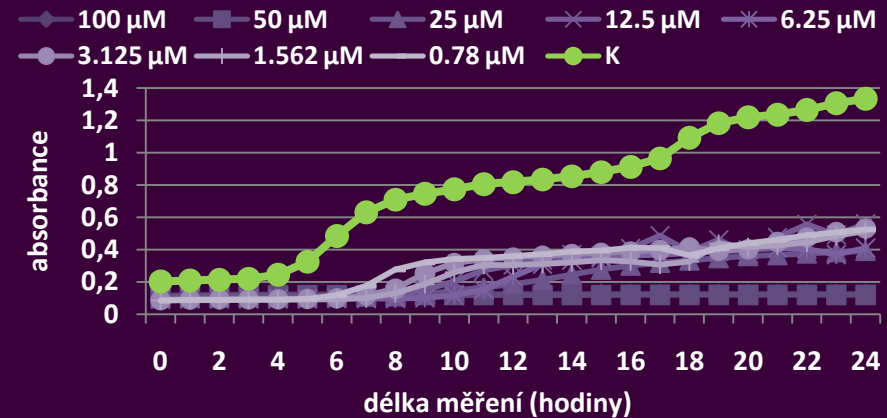
Graf 1: růstová křivka *S. aureus* pro TMPyP v poměru s CD 2:1 a dávce ozáření 125 J/cm<sup>2</sup>



Graf 2: růstová křivka *S. aureus* pro TMPyP v poměru s CD 2:1 a dávce ozáření 150 J/cm<sup>2</sup>



Graf 3: růstová křivka *S. aureus* pro TMPyP v poměru s CD 1:1 a dávce ozáření 150 J/cm<sup>2</sup>



Graf 4: růstová křivka *S. aureus* pro ZnTPPS4 v poměru s CD 2:1 a dávce ozáření 150 J/cm<sup>2</sup>

# Předběžná statistika k výsledkům aplikace PDT na buněčné linie

- Byly porovnány poměry fotosensitizer:CD a typy buněčných linií vůči sobě

## Použité testy:

- testy normality Shapiro-Wilk + parametrické dvouvýběrové t-testy a U-testy (neparametrické metody Mann-Whitney), také byly porovnávány buněčné linie neparametrickým Kruskal-Wallisovým testem
- Mann-Whitney U-testy byly prokázány statisticky významně vyšší hodnoty životnosti u buněk HeLa při koncentraci 5 ( $p = 0,001$ ), 10 ( $p = 0,002$ ) a 50 ( $p = 0,039$ )  $\mu\text{M}$
- Kruskal-Wallisovy testy prokázaly statisticky významné rozdíly mezi poměry při koncentraci 1  $\mu\text{M}$ . Následně byly provedeny testy mnohonásobného porovnání Mann-Whitney U-testy s Bonferroniho korekcí - statisticky významné rozdíly mezi skupinami dle poměrů neprokázaly
- pouze mezi poměry 1:4 a 2:1 je pozorován určitý trend - při poměru 1:4 jsou vyšší hodnoty, hladina dosažené statistické významnosti je snížena  $p = 0,054$

# Shrnutí a vyhodnocení výsledků

**Buněčné linie:** potvrzena účinnost fotosensitizeru TMPyP na obou typech

- životnost poklesla u NIH3T3 na 8% u 50  $\mu\text{M}$  a na 6% u 5  $\mu\text{M}$  koncentrace, pro HeLa na 8,5% u 50  $\mu\text{M}$  a na 16,5% u 5  $\mu\text{M}$  koncentrace
- hodnoty RFU jsou u NIH3T3 2579 pro 50  $\mu\text{M}$  a 4741 pro 5  $\mu\text{M}$ , pro HeLa 3072 pro 50  $\mu\text{M}$  a 2293 pro 5  $\mu\text{M}$

**Bakteriální kmeny:** z předběžných studií potvrzena účinnost fotosensitizeru TMPyP a ZnTPPS<sub>4</sub> na *S. aureus* (gram – pozitivní bakterie)

**Vyhubení bakterií:** pro nejvyšší koncentrace úplné, pro nižší koncentrace pod 50%

- TMPyP:CD v poměru 2:1, ozáření 125 a 150  $\text{J}/\text{cm}^2$ , koncentrace 100, 50 a 25  $\mu\text{M}$
- TMPyP:CD v poměru 1:1, ozáření 150  $\text{J}/\text{cm}^2$ , koncentrace 100, 50 a 25  $\mu\text{M}$
- ZnTPPS<sub>4</sub>:CD 2:1, ozáření 150  $\text{J}/\text{cm}^2$ , koncentrace 100 a 50  $\mu\text{M}$

**Pro zájemce jsou další výsledky této práce v rozšířené podobě na posteru**

**Děkuji za pozornost**

Práce vznikla za podpory projektů 2192/2011/G3, 303/09/H048, CZ.1.05/2.1.00/01.0030 a  
LF\_2011\_009