



**LEK. ELŻBIETA OSTAŃSKA**

**OCENA SKUTECZNOŚCI CHEMIOTERAPII RAKA  
PIERSI Z ZASTOSOWANIEM CZASÓW RELAKSACJI  
REZONANSU MAGNETYCZNEGO I METODY  
FOTODYNAMICZNEJ**

**EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF  
CHEMOTHERAPY OF BREAST CANCER WITH THE  
APPLICATION OF MAGNETIC RESONANCE RELAXATION  
TIMES AND THE PHOTODYNAMIC METHOD**

**PRACA DOKTORSKA OPARTA NA CYKLU PRAC**

Promotor pracy:

dr hab. n. med. inż. Dorota Bartusik-Aebisher, Profesor UR

Rzeszów, 2022

*Jaśo ojciec starałem się wpoić dzieciom, jak ważne jest stawianie pytań- zawsze.  
Mój syn opowiedział raz w jednym z wywiadów, jak kiedyś zadał pytanie, które,  
jak sądzę, uważał wtedy za nieco głupie.*

*Chciał wiedzieć, czy wokół nas znajduje się wiele małych wszechświatów.  
Powiedziałem mu, aby nigdy nie obawiał się występować z jakąś hipotezą, choćby  
nie wiadomo, jak niedorzeczna mogła się ona wydawać.*

*Stephen Hawking*

**Składam serdeczne podziękowania**

*Pani Profesor UR, dr hab. n. med. inż. Dorocie Bartusik-Aebisher za poświęcony czas, cierpliwość, motywację, cenne rady i wskazówki, dzięki którym niniejsza praca mogła nabrać właściwego kształtu.*

**Na Komentarz do rozprawy doktorskiej pt. OCENA SKUTECZNOŚCI CHEMIOTERAPII RAKA PIERSI Z ZASTOSOWANIEM CZASÓW RELAKSACJI REZONANSU MAGNETYCZNEGO I METODY FOTODYNAMICZNEJ opartej na Cyklu Prac składa się:**

<b>1. WSTĘP I UZASADNIENIE TEMATU .....</b>	<b>5</b>
<b>2. NOTA INFORMACYJNA .....</b>	<b>10</b>
<b>3. WYJAŚNIENIE PROBLEMU BADAWCZEGO .....</b>	<b>11</b>
<b>4. OPIS PUBLIKACJI NR 1 WRAZ ZE SKANEM PRACY .....</b>	<b>13</b>
<b>5. OPIS PUBLIKACJI NR 2 WRAZ ZE SKANEM PRACY .....</b>	<b>27</b>
<b>6. OPIS PUBLIKACJI NR 3 WRAZ ZE SKANEM PRACY .....</b>	<b>41</b>
<b>7. PODSUMOWANIE.....</b>	<b>54</b>
<b>8. WNIOSKI.....</b>	<b>56</b>
<b>9. DOROBEK NAUKOWY .....</b>	<b>58</b>
<b>10. STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ.....</b>	<b>64</b>
<b>11. STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ W JĘZYKU ANGIELSKIM.....</b>	<b>65</b>
<b>12. ZGODA BIOETYCZNA .....</b>	<b>66</b>
<b>13. OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW .....</b>	<b>67</b>
<b>14. CERTYFIKATY .....</b>	<b>70</b>
<b>15. CURRICULUM VITAE.....</b>	<b>80</b>

## 1. WSTĘP I UZASADNIENIE TEMATU

Rak piersi jest najczęściej występującym nowotworem u kobiet i stanowi wiodącą przyczynę zgonów w społeczeństwie. Leczenie raka piersi jest leczeniem skojarzonym i obejmuje metody terapii miejscowej, tj. leczenie chirurgiczne i radioterapię oraz metody leczenia ogólnoustrojowego, jak chemioterapię i hormonoterapię czy leczenie celowane. Radioterapia i chemioterapia nie działają selektywnie, co wywołuje dużo skutków ubocznych. Stosowana chemioterapia aktywuje wtórną oporność komórek raka. Rozpoznanie raka możliwe jest dzięki badaniu patomorfologicznemu fragmentów guza. Aby uzyskać tkanki guza piersi, konieczny jest rozległy zabieg operacyjny. Trudności sprawia diagnostyka niewielkich ognisk i postać wielogniskowa raka trudno odróżniająca się od tkanek prawidłowych. Skutki uboczne diagnostyki i terapii raka piersi mają ujemny wpływ na sprawność fizyczną i psychiczną pacjentów. Diagnoza, jaką jest choroba nowotworowa, zmusza pacjenta do zmierzenia się z trudnym wyzwaniem na wielu płaszczyznach w obszarze medycznym, ale również i społecznym. Wiadomość o nowotworze wywołuje lęk i obawy, odnoszące się do wyników leczenia, lęk przed kalectwem, strach przed nieznanym rokowaniem. Rodzi to problemy osobiste i zawodowe i ma wpływ na psychikę kobiet. Szczególną rolę w chorobie nowotworowej odgrywa rehabilitacja psychiczna, która umożliwia powrót do normalnego funkcjonowania w życiu codziennym. Istnieje potrzeba, aby wdrożyć metody diagnostyczne i lecznicze o niskim stopniu inwazyjności. Pomimo ogromnego postępu jaki dokonał się w diagnostyce i terapii raka piersi, nadal choroba ta stanowi wyzwanie zarówno dla lekarzy jak i naukowców.

Patologia raka piersi męskiej jest w znacznym stopniu tożsama z patologią raka piersi u kobiet. Etapy diagnostyki raka piersi stanowią: wywiad i badanie fizykalne, badania obrazowe, badanie histopatologiczne, badania dodatkowe uzupełniające, ustalenie stopnia zaawansowania, ocena czynników rokowniczych i predykcyjnych, kwalifikacja do leczenia. Żadne z tych badań zastosowane pojedynczo, nie jest wystarczające do pełnej diagnostyki raka. Diagnostyka opiera się na zasadzie komplementarności. Najczęściej wykorzystywana jest mammografia (MMG), która jest badaniem radiologicznym wykonywanym w dwóch projekcjach (skośnej i górno-dolnej). Czulość badania mammograficznego w wykrywaniu raka zależy od budowy (gęstości) piersi. Czulość w MMG oceniana

jest na 50-90 %. W badaniu MMG dobrze widoczne są zwapnienia, będące często elementem budowy raka. Równie często jest stosowana ultrasonografia (USG), która jest badaniem uzupełniającym w stosunku do MMG. U kobiet u których jest przewaga tkanki gruczołowej, pacjentek karmiących lub będących w ciąży odgrywa pierwszoplanową rolę. Badanie USG w przeciwieństwie do MMG różnicuje zmiany torbielowe od litych, dostarcza informacji dotyczących zaawansowania raka. Swoistość i czułość badania USG zwiększa wykorzystanie opcji dopplerowskiej i sonoelastografii. Badanie USG służy jako badanie pomocnicze w wykonywaniu biopsji cienkoigłowej, w zakładaniu znaczników tkankowych, igieł lokalizacyjnych, kotwiczek przed leczeniem neoadiuwantowym (leczenie przed zabiegiem operacyjnym) lub w znakowaniu zmian niepalpacyjnych. Badanie USG jest badaniem subiektywnym. USG nie ma też możliwości standaryzacji obrazu. Obrazowanie z wykorzystaniem rezonansu magnetycznego (MRI) jest zaawansowaną diagnostycznie opcją. Czułość w MRI nie zależy od gęstości piersi. W badaniu tym po podaniu dożylnym środka kontrastowego poszukuje się ognisk gromadzących znacznik. MRI odgrywa rolę w diagnostyce raka ukrytego piersi (gdy są przerzuty, a ognisko guza pierwotnego jest niewidoczne w MMG i USG), ocenie rozległości raka zrazikowego (rak ten często jest wielogniskowy i niewidoczny w badaniach MMG i USG a jego wymiary zwykle nie korelują z obrazami histopatologicznymi, (szczególnie w przypadku zabiegów oszczędzających). Inne zastosowanie to różnicowanie pomiędzy blizną pooperacyjną a wznową raka, ocena implantów piersi po zabiegach rekonstrukcji, ocena odpowiedzi na leczenie neoadiuwantowe. U pacjentów w grupie wysokiego ryzyka na zachorowanie na raka piersi (mutacje BRCA1 i BRCA2) MRI jest metodą przesiewową. MRI jest badaniem długo trwającym, o raczej małej dostępności, nadmiernej czułości, co powoduje uwidacznianie ognisk o zmiennej gęstości, zależnych od wpływu hormonów egzogennych i endogennych, nie będących tkanką raka. Może to zacierać faktyczny obraz nowotworu lub wskazywać ogniska fałszywie dodatnie. W badaniu tym nie są wykrywane mikrozwapnienia, będące często składową zmian nowotworowych i jednocześnie ich markerem widocznym w MMG czy USG. Podstawą w podejmowaniu decyzji terapeutycznych jest właściwa diagnostyka histopatologiczna guza i histopatologiczna lub cytologiczna regionalnych węzłów chłonnych. W celu planowania leczenia konieczne jest pobranie tkanki guza pod kontrolą USG, MMG

lub MRI. Jako lekarz patomorfolog od kilkunastu lat zajmuję się diagnostyką raka piersi, która stanowi podłoże do leczenia tej choroby. Dzisiaj już wiadomo, że rak piersi jest przewlekłą chorobą ogólnoustrojową, tylko na krótko podczas swojego rozwoju jest obecny miejscowo. Nie zawsze odpowiedź może być zawarta w jednym raporcie. Można wyodrębnić dwa etapy diagnostyki patomorfologicznej: I etap – diagnostyka przed podjęciem leczenia; II etap – ocena materiału pooperacyjnego. Aby uzyskać tkanki guza, konieczne jest nawet kilkukrotne przerwanie ciągłości tkanek, często trzeba wykonać rozległy zabieg operacyjny. Trudność sprawia obecnie diagnostyka niewielkich zmian oraz zmian wieloogniskowych, które mało odróżniają się od tkanek prawidłowych. W raku piersi trudności sprawia obecnie diagnostyka niewielkich ognisk raka trudno odróżniających się od tkanek fizjologicznych. W wyniku terapii często pozostają resztki raka oraz skutki uboczne. Istotne jest wdrożenie metod diagnostycznych i terapeutycznych jak najmniej inwazyjnych cechujących się dużą czułością i swoistością.

Do celów pracy zalicza się:

**1**-ewaluacja parametrów fizyko-chemicznych tkanki zdrowej i nowotworowej piersi po chemioterapii przedoperacyjnej za pomocą oceny czasów relaksacji wody w badaniu MRI;

**2**-oszacowanie różnic pomiędzy tkanką nowotworową przed i po chemioterapii oraz przed i po terapii fotodynamicznej na podstawie oceny różnic w produkcji tlenu singletowego.

Metodyka dotyczyła następujących badań *in vitro* polegających na:

**1**-pobraniu w czasie zabiegu operacyjnego próbek tkankowych, które były badane przy użyciu rezonansu magnetycznego (MRI) na aparacie 1.5 Tesla (GE OPTIMA);

**2**-pobrane próbki tkankowe były badane metodą fotodynamiczną;

**3**-uzyskane pomiary fizykochemiczne tkanek zostały porównane z obrazami histopatologicznymi materiału pooperacyjnego.

Uzyskanymi efektami doświadczenia były:

**1**-zmiany czasów relaksacji w badaniu MRI w oparciu o zmiany w stężeniach wody w tkance zdrowej i nowotworowej poddanej chemioterapii;

2-zmiany stężenia tlenu singletowego w tkance zdrowej i nowotworowej poddanej chemioterapii w badaniu fotodynamicznym.

We współczesnej diagnostyce istotne jest wdrożenie metod jak najmniej inwazyjnych i cechujących się wysoką czułością i swoistością.

Jedną z takich metod może być ocena parametrów fizyko-chemicznych tkanki zdrowej i nowotworowej w oparciu o ocenę czasów relaksacji wody za pomocą MRI. Inną alternatywną metodą może być zastosowanie fotodynamiki dla oszacowania różnic pomiędzy tkanką nowotworową i zdrową, a także różnic pomiędzy tkanką nowotworową przed chemioterapią i po chemioterapii. Różnice są spowodowane inną zdolnością produkcji tlenu singletowego w tkankach. Metoda fotodynamiczna oraz ocena parametrów fizykochemicznych w MRI mogą być doskonałymi metodami alternatywnymi lub uzupełniającymi w leczeniu i diagnostyce raka piersi w stosunku do diagnostyki obrazowej i patomorfologicznej.

Dotychczas skuteczność PDT sprawdziła się w przypadku małych guzów powierzchniowych oraz w przypadku tymczasowego fotouczulenia skóry, podczas którego nie ma długoterminowych skutków ubocznych, jeśli przestrzegane są odpowiednie protokoły. Gojenie następuje z niewielkim bliznami lub bez nich, a procedurę można powtórzyć bez kumulacji toksyczności.

Biorąc pod uwagę skuteczność i brak długoterminowej toksyczności PDT oraz fakt, że pierwsze leczenie raka za pomocą PDT przeprowadzono ponad 100 lat temu, można oczekiwać, że leczenie to stało się już ustaloną terapią. Jednak PDT jest obecnie oferowane tylko w kilku wybranych ośrodkach, chociaż powoli zyskuje akceptację jako alternatywa dla konwencjonalnych terapii przeciwnowotworowych. Dane pokazują, że przy prawidłowym stosowaniu, PDT jest skuteczną alternatywną opcją leczenia w onkologii również w guzach położonych głębiej. Do wad terapii fotodynamicznej należą: światłowstręt oraz możliwość modyfikacji DNA zdrowych komórek przy długotrwałym podawaniu leku.

PDT jawi się jako obiecująca alternatywa w leczeniu raka piersi, ponieważ może być bardzo skuteczna przy jednoczesnym zachowaniu prawidłowej tkanki. Umiejscowienie guza często wymaga zastosowania wysoce precyzyjnej technologii w celu usunięcia go, gdy jest zlokalizowany pobliżu ważnych miejsc

anatomicznych. Miejsca, które są często niedostępne lub niebezpieczne do leczenia tradycyjnymi metodami chirurgicznymi i medycznymi, obejmują główne naczynia krwionośne, takie jak tętnice szyjne, krytyczne obszary mózgu, części oka i inne anatomiczne części ciała.

W trakcie realizacji tej pracy doktorskiej użyto metody PDT z zastosowaniem światłowodowego generatora tlenu singletowego, który może być używany jako precyzyjny fotochemiczny nóż chirurgiczny do niszczenia komórek nowotworowych w obszarach wymagających kontroli cytotoksycznej i w obszarach niedostępnych dla metod chirurgicznych.

W ciągu ostatnich dwóch dekad terapia PDT stała się potężną metodą leczenia nowotworów, takich jak nowotwory skóry i przełyku. PDT wykorzystuje podanie dożylnie fotouczulacze do generowania tlenu singletowego  $^1\text{O}_2$  do leczenia nowotworów. Podstawowymi wyzwaniami związanymi z PDT są:

- 1-** wolny fotouczulacz musi być skutecznie eliminowany z organizmu,
- 2-** musi zostać osiągnięty wystarczający uczulacz i natężenie światła, aby reakcja uczulająca wytworzyła odpowiednie stężenie tlenu singletowego w miejscu docelowym, oraz
- 3-** miejsca docelowe są często niedostępne, ponieważ chora tkanka znajduje się obok żywej tkanki. Strategie dostarczania proleku okazały się obiecujące, ale selektywność leku fotouczulającego w chorej tkance można poprawić. Tak więc istnieje krytyczna potrzeba opracowania strategii leczenia, które generowałyby tlen singletowy specyficznie dla miejsca w dużych stężeniach w celu zwiększenia niszczenia guza.

## 2. NOTA INFORMACYJNA

Niniejsza praca doktorska, zatytułowana *Ocena skuteczności chemioterapii raka piersi z zastosowaniem czasów relaksacji rezonansu magnetycznego i metody fotodynamicznej* opiera się na monotematycznym cyklu prac opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym indeksowanych w bazie Journal Citation Reports oraz znajdujących się w bazie Pubmed.

**Łączna wartość współczynnika IF w cyklu prac wyniosła 9.289, zaś liczba punktów MEiN = 240**

**W dotychczasowym dorobku naukowym wartość współczynnika IF wyniosła 12.533, zaś liczba punktów MEiN = 820.**

### Artykuł 1

**Ostańska E, Aebisher D, Bartusik-Aebisher D.** The potential of photodynamic therapy in current breast cancer treatment methodologies. **Biomedicine and Pharmacotherapy.** 2021;137, id. art. 111302. **Impact Factor: 6.529, Punktacja MEiN: 100.000.**

### Artykuł 2

**Ostańska E, Barnaś E, Bartusik-Aebisher D, Dynarowicz K, Szpunar M, Skręt-Magierło J, Aebisher D.** Histopathological Analysis of the Effect of Photodynamic Action on Post-Chemotherapy Excised Breast Cancer Tissue. **Medicina.** 2022; 58(6):700. **Impact Factor: 2.430, Punktacja MEiN: 40.000.**

### Artykuł 3

**Barnaś E, Ostańska E, Bartusik-Aebisher D, Dynarowicz K, Skręt-Magierło JE, Aebisher D.** Breast cancer tissue treated using photodynamic therapy. **Acta Poloniae Pharmaceutica.** 2022; 78(6), 835-843. **Impact Factor: 0.330, Punktacja MEiN: 100.000**

### 3. WYJAŚNIENIE PROBLEMU BADAWCZEGO

Profilaktyka, diagnostyka i leczenie są wiodącymi tematami w badaniach klinicznych nad rakiem piersi. Jedną z nowoczesnych metod, która również daje szansę na wyleczenie raka, jest terapia fotodynamiczna (PDT), którą zwykle stosuje się głównie w dermatologii w leczeniu raka skóry i zmian przedrakowych oraz raka głowy, szyi i prostaty. Badania wykazały, że połączenie PDT i chemioterapii, czyli chemioterapii fotodynamicznej, może zwiększać podatność komórek nowotworowych na chemioterapeutyki, zapewniając tym samym lepszy synergiczny efekt przeciwnowotworowy. Podstawą działania PDT jest zastosowanie fotouczulacza (PS) oraz źródła światła o dobrze zdefiniowanej i odpowiedniej długości fali. Te dwa składniki tworzą tzw. reaktywne formy tlenu (ROS). Powstały produkt reakcji inicjuje proces apoptotyczny prowadzący do śmierci komórek rakowych i guza. Znane są dwa rodzaje reakcji PDT. W reakcji typu I elektrony są transportowane do poszczególnych organelli komórkowych, w których powstają wolne rodniki lub jony rodnikowe. Produktem reakcji typu II są wysoce reaktywne formy tlenu singletowego ( $^1\text{O}_2$ ). Reakcje I i II w obrębie danej tkanki lub narządu zachodzą jednocześnie. Interakcja obu występujących reakcji zależy od postaci i charakteru podawanego PS. Apoptoza komórek rakowych nie jest jedynym skutkiem PDT. Stopień zaawansowania choroby nowotworowej piersi ma wpływ na powodzenie leczenia. Priorytetem w diagnostyce jest wykrywanie choroby nowotworowej na etapie jej wczesnego rozwoju. W raku piersi, który jest najczęstszym nowotworem złośliwym u kobiet, istnieje potrzeba wdrożenia metod czułych i swoistych, wykrywających małe ogniska choroby i jej postać wieloogniskową pierwotną oraz małych resztkowych ognisk raka po leczeniu chemioterapią oraz metod terapeutycznych działających ściśle wybiórczo na tkankę raka bez niszczenia tkanek zdrowych i przezwyciężających lekooporność. Obecnie istnieje możliwość rozpoznawania małych ognisk raka piersi w badaniu histopatologicznym w materiale pooperacyjnym po zabiegu chirurgicznym. Wyzwaniem a zarazem celem eksperymentu było wdrożenie innych narzędzi diagnostycznych obrazowych i terapeutycznych na tyle swoistych i czułych, aby ich wynik można porównać do diagnostyki histopatologicznej.

W tym celu pobrano po rutynowym zabiegu operacyjnym tkanki raka piersi od pacjentki po chemioterapii oraz analizowano materiał w identyfikacji obszaru

tkanki chorej i zdrowej piersi. Obie próbki tkanek zdrowych i chorych były badane przy użyciu MRI oraz metody fotodynamicznej.

W raku piersi trudności sprawia obecnie diagnostyka niewielkich ognisk raka trudno odróżniających się od tkanek fizjologicznych. W wyniku terapii często pozostają resztki raka oraz skutki uboczne. Istotne jest wdrożenie metod diagnostycznych i terapeutycznych jak najmniej inwazyjnych cechujących się dużą czułością i swoistością.

Obrazy histopatologiczne pokazują, że tkanki raka po chemioterapii mają niejednorodną morfologię. Istotą eksperymentu była odpowiedź na pytanie: Czy niejednorodność zmian po chemioterapii w tkankach nowotworu widoczna w obrazie histopatologicznym, jest możliwa do oceny za pomocą MRI i metody fotodynamicznej oraz czy reakcja fotodynamiczna niszczy komórki raka i jak wpływa na komórki zdrowe?

Obecnie chemioterapia, radioterapia oraz chirurgia są głównymi i uzupełniającymi się metodami leczenia raka piersi. Każda z tych metod oprócz działania terapeutycznego niesie za sobą powikłania miejscowe w postaci pozostawienia blizn, zwłóknień i ubytków mogących zaburzyć motorykę ciała lub w przypadku chemioterapii powodować uszkodzenie toksyczne tkanek. Obecnie (głównie drogą eksperymentów *in vitro*) poszukuje się nieinwazyjnych metod diagnostycznych i terapeutycznych działających selektywnie, miejscowo. Wprowadzenie przedoperacyjnej chemioterapii i hormonoterapii, w niektórych przypadkach przyczyniło się do zmniejszenia tkanki guza oraz redukcji zakresu zabiegu operacyjnego i wykonywania operacji oszczędzających pierś i tkankę limfatyczną pachy, dzięki wykonywaniu procedury węzła wartownika.

Wszystkie prezentowane badania zostały wykonane na podstawie zgody etycznej (nr 10.11.2018) Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Rzeszowskiego.

## 4. OPIS PUBLIKACJI NR 1 WRAZ ZE SKANEM PRACY

Biomedicine & Pharmacotherapy 137 (2021) 111302



Contents lists available at ScienceDirect

Biomedicine & Pharmacotherapy

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bioph](http://www.elsevier.com/locate/bioph)



Review

### The potential of photodynamic therapy in current breast cancer treatment methodologies



Elżbieta Ostańska<sup>a</sup>, David Aebisher<sup>b</sup>, Dorota Bartusik-Aebisher<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Phatomorphology, Hospital No. 1, Rzeszów, Poland

<sup>b</sup> Department of Photomedicine and Physical Chemistry, Medical College of The University of Rzeszów, Rzeszów, Poland

<sup>c</sup> Department of Biochemistry and General Chemistry, Medical College of The University of Rzeszów, Rzeszów, Poland

#### ARTICLE INFO

##### Keywords:

Breast cancer  
Photodynamic therapy  
Photosensitizer

#### ABSTRACT

Photodynamic Therapy (PDT) has been known for over a hundred years, and currently gaining in acceptance as an alternative cancer treatment. Light delivery is still a difficult problem in deep cancer treatment with PDT. Only near-infrared light in the 700–1100 nm range can penetrate deeply into the tissue because most tissue chromophores, including oxyhemoglobin, deoxyhemoglobin, melanin and fat, poorly absorb in the near infrared window. The light sources used in PDT are lasers, arc lamps, light-emitting diodes and fluorescent lamps. PDT has been used for many different clinical applications. PDT may be excellent alternative in the treatment and diagnosis of breast cancer compared to the conventional surgery, chemotherapy and radiotherapy. The basic elements of PDT are an appropriate photosensitizer (PS), oxygen, and light. The effectiveness of photodynamic therapy depends on the induction of photocytotoxic reactions, which are the result of light activation of PS, pre-administered to the body. The condition for initiating PDT processes is light absorption by PS and subsequent localized generation of cytotoxic reactive oxygen species. This study is a review of empirical research aimed at improving the therapy and diagnosis of breast cancer using PDT based on the physicochemical differences in healthy and diseased tissues and the tissues undergoing treatment.

#### 1. Photodynamic therapy (PDT)

Photodynamic Therapy (PDT) is local, not systemic treatment; therefore, it is only suitable for localized disease. The wavelength light used to excite current photosensitizers can cause photochemically induced tissue necrosis up to a maximum of 10 mm. This means that in the case of superficial illuminations, the indication for PDT as primary treatment should be limited to small available tumors. It can also be administered in conjunction with conventional surgery or chemotherapy to remove residues in the palliative treatment of larger tumors. The big advantage of limited light penetration is that it protects healthy tissue from phototoxicity. Modern fiber optic technology facilitates the delivery of light with the desired wavelength and fluency rate to tumors located virtually anywhere in the body. Localized lighting along with a cover of sensitive tissues in the field margin allows specific cancer treatment without destroying critical normal tissues outside the treated area. In contrast, surgery and radiation therapy for tumors located near critical structures can be very crippling and lead to loss of organ function. PDT requires three components: a photosensitizer which localizes

in tumor tissue sensitizing it to light, and a light source of the appropriate wavelength that excites the photosensitizer (PS) accumulated in the tumor tissue and dissolved oxygen. The condition for initiating the photochemical reaction is the correlation of the light source emission band with the PS absorption band [1]. PS can localize in mitochondria, lysosomes, endoplasmic reticulum, Golgi apparatus and plasma membranes. Artificial light sources are often used such as lamps with filters, diodes and arrays of luminescent and superluminescent LED/SLED diodes and various types of lasers. Until now, the most popular devices, equipped with monitors and archiving systems, by the Canadian company Xilix Corporation, using blue lasers as a source of radiation, are highly appreciated. Photon absorption by a photosensitizer molecule (PS, photosensitizer) causes its excitation and transition from the singlet ground state ( $S_0$ ) to the singlet excited state ( $S_1$ ). Then the photosensitizer intersystem crosses to the excited triplet state ( $T_1$ ). Two competing mechanisms occur. In the type I mechanism, electron transfer processes generate radicals leading to reactive oxygen species (ROS) such as superoxide and hydroxyl radical. In the type II mechanism, excess energy is transferred to the oxygen molecule to form cytotoxic singlet oxygen

\* Corresponding author.

E-mail address: [dbartusik-aebisher@ur.edu.pl](mailto:dbartusik-aebisher@ur.edu.pl) (D. Bartusik-Aebisher).

<https://doi.org/10.1016/j.bioph.2021.111302>

Received 10 June 2020; Received in revised form 12 January 2021; Accepted 18 January 2021

Available online 28 January 2021

0753-3322/© 2021 The Authors.

Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY license

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

which destroys cells in an oxidative process. The ratio of the contribution of both mechanisms depends on many factors, including: oxygen concentration, dielectric constant of tissues, pH of the environment, and PS structure [1,2]. In experiments carried out by Triesscheijn M. et al., four clinically approved PSs were compared with the new PS. Phthalocyanine photosensitizers showed a greater tendency to form radicals, whereas porphyrins tended towards type II reaction producing singlet oxygen [3]. 5-aminolevulinic acid (ALA) was used for local treatment of skin cancers. After some time, as a result of endogenous processes, protoporphyrin is produced, which acts as a photosensitizer. After injection of PS into the bloodstream, they bind to various serum proteins, which may affect their pharmacokinetics and biodistribution. An anti-vascular effect of PDT is leading to thrombosis and hemorrhage in tumor blood vessels, which then leads to the death of the tumor by depriving oxygen and nutrients. The next effects of PDT are direct death of cancer cells by apoptosis or necrosis if the cancer cells absorb PS; acute inflammation and release of cytokines and proteins of stress-induced PDT tumor responses which can lead to an influx of leukocytes, which can both contribute to tumor destruction and stimulate the immune system to recognize and destroy cancer cells even in remote locations [4,5]. The data show that, when used correctly, PDT was an effective alternative treatment option in oncology also in deeper tumors [6–13]. It is a multi-stage reaction whose effectiveness depends on the induction of cytotoxic transformations [10–17]. Intravenously or topically administered photosensitizer is absorbed by all cells. It is removed from healthy tissues after a few hours and remains in the tumor tissue for several days. At the site of proliferation of cancer cells, lymphatic vessels are poorly developed, which slows down the removal of photosensitizer [18–21]. All these studies show the importance of damage to blood vessels in achieving effective anti-tumor activity after PDT *in vivo* [22]. New clinical protocols could reduce the time intervals between drug administration, and if they show an improvement in the result then the drug dose may also be reduced, resulting in less generalized phototoxicity. The bystander effect is damage or death to a non-irradiated cancer cells adjacent to irradiated cancer cells. This happens when using ionizing radiation using the so-called micro-beam with a diameter less than 1  $\mu\text{m}$ , which, when hitting one cell or cellular organelle, causes the death of neighboring cells. The role nitric oxide (NO) in damaging intracellular signaling pathways and in cytokine production are still under investigation. NO is a relaxation factor for blood vessels and stimulates angiogenesis. Both of these factors promote the growth of cancer. The ability to control the spectator effect may be an alternative way to increase the effectiveness of cancer treatment [23].

When PS is irradiated, there is an acute reaction to stress leading to changes in calcium and lipid metabolism and the production of cytokines and stress proteins. Protein kinases or enzymes that react to the phosphorylation are activated. Phosphorylation usually leads to a change in the conformation of the protein molecule and, as a consequence, to a change in its activity, ability to bind to other proteins or to move a molecule within the cell. In addition, transcription factors are activated. Many cellular responses are focused on mitochondria. These effects often lead to the induction of apoptosis or the mitochondrial pathway involving caspases and cytochrome c release. Pathways involving ceramide receptors are also activated. However, under certain circumstances, cells subjected to PDT undergo necrosis. It was reported that the hematoporphyrin derivative (HpD) in combination with red light can completely eliminate mouse breast tumor growth. Then clinical trials of HpD were started to treat patients with bladder cancer and skin cancers. After these successful studies, numerous trials involving various types of cancers and photosensitizers were initiated. This resulted in PDT approval of porfimer sodium (Photofrin®; Axcan Pharma Inc., Mont-Saint-Hilaire, Canada) in the treatment of bladder cancer in Canada in 1993. Currently, several PS are approved for clinical use including 5-aminolevulinic acid (ALA, Levulan®; DUSA Pharmaceuticals Inc., Wilmington, MA), ALA methyl ester (Metvix®, Photocure ASA, Oslo,

Norway) and meso-tetra-hydroxyphenyl chlorine (mTHPC, temoporfin, Foscan®; Biolitec Pharma Ltd., Dublin, Ireland) - and PDT is becoming an established treatment method for localized cancers [9]. In a study by Dos Santos, A.F. et al., it was observed that monolayers of human cells derived from mammary adenocarcinomas (MDA-MB-231 and MCF-7) react completely differently to fluence indicators (cells were irradiated for 6 or 16 min) at a fixed dose of light ( $4.5 \text{ J}/\text{cm}^2$ ) supplied with LEDs in a typical PDT protocol with methylene blue. While MDA-MB-231 cell death rates showed their insensitivity to fluency index, MCF-7 cells showed quite impressive (three times) cell susceptibility in a shorter irradiation protocol. Independent of cell death, both cell types experienced a decrease in intracellular glutathione and, as a consequence, redox imbalance [24]. Cancer metastases are associated with most deaths from breast cancer; thus, metastatic inhibition may provide a therapeutic direction for breast cancer [25]. A study of photodynamic therapy mediated by pyropheophorbide- $\alpha$  methyl ester (MPPa-PDT) to suppress metastasis in MCF-7 breast cancer cells was reported [26]. After MPPa-PDT, migration and invasion were reduced in MCF-7 cells. MPPa-PDT downregulates the expression of MMP2 and MMP9, which are responsible for the initiation of metastasis. MPPa-PDT reduced the phosphorylation of Akt and NF- $\kappa$ B. MPPa-PDT also reduced F-actin expression in the cytoskeleton of MCF-7 cells. These effects were blocked by the reactive NAC oxygen scavenger or Akt SC79 activator, while the PI3K LY294002 inhibitor or Akt triciribin inhibitor potentiated these effects. In addition, MPPa-PDT inhibited tumor metastasis and destroyed F-actin *in vivo*. Taken together, these results show that MPPa-PDT inhibits metastasis of MCF-7 cells both *in vitro* and *in vivo* and can be involved in the Akt/NF- $\kappa$ B dependent MMP-9 signaling pathway. Thus, MPPa-PDT can be a promising treatment to suppress metastasis [26]. Human breast cancer cell lines MDA-MB-231, MCF-7, and BT-474 were intensively tested with *in vitro* PDT. These studies focused on the efficacy of photosensitizers and derivatives such as: methylene blue [24], pyropheophorbide- $\alpha$  methyl ester [26] and 5-aminolevulinic acid [27]. Table 1 presents lists photosensitizers can have been used for *in vitro* PDT treatment in various breast cancer cells cultures *in vitro*. Another major function of this *in vitro* research is synthesis of nanoparticles. For example, the introduction of chlorin gold nanorods Ce6-AuNR@SiO<sub>2</sub>-D-CPP as agents with functionalized antibodies or proteins enhanced toxicity [28–30]. For example, the nanostructure Ce6-AuNR@SiO<sub>2</sub>-D-CPP is fabricated by synthesizing Au nanorods that serve as photothermal conversion material, and coating a PEGylated

**Table 1**  
An examples of *in vitro* PDT treatments.

Human Breast Adenocarcinoma Cells	Photosensitizer	Concentrations	irradiated at
MDA-MB-231	methylene blue [24]	20 $\mu\text{M}$ per $4.0 \times 10^4$ cells/mL	640 nm, with energy density * $4.5 \text{ J}/\text{cm}^2$
	5-aminolevulinic acid (5-ALA) [27]	1000 $\mu\text{M}$ and 2500 $\mu\text{M}$	diode laser at different doses 1.5, 3, 6, 9 and $12 \text{ J}/\text{cm}^2$
	pyropheophorbide- $\alpha$ methyl ester [26]	2 $\mu\text{M}$ per $4.0 \times 10^4$ cells/mL	630 nm, with energy density * 0.9, 1.8, 2.7, 3.6, or $5.4 \text{ J}/\text{cm}^2$
MCF-7	5-aminolevulinic acid (5-ALA) [27]	1000 $\mu\text{M}$ and 2500 $\mu\text{M}$	diode laser, with energy density* 1.5, 3, 6, 9 and $12 \text{ J}/\text{cm}^2$
	chlorin gold nanorods (Ce6-AuNR@SiO <sub>2</sub> -d-CPP) [28]	10–40 $\mu\text{g}/\text{mL}$	808 nm

\* Energy density ( $\text{J}/\text{cm}^2$ ) = power ( $\text{mW}/\text{cm}^2$ )  $\times$  irradiation time (s).

mesoporous SiO<sub>2</sub> shell for entrapping photosensitizer Ce6 and for linking the  $\alpha$ -type cell receptor [28]. Also, medicinal plants are used in drug discovery in modern PDT medicine. Both synthesized nanoparticles and plant derived PDT drugs induce cell death via different mechanisms including the regulation of various cell signaling pathways, apoptosis, necrosis and/or autophagy [31].

Breast cancer is the most common cancer in women and is a leading cause of cancer deaths in women. The recent advances in PDT technology resulted in broadening of PDT applications in breast cancer patients. The breast area is also easily approachable using PDT apparatus. Proper energy used in clinical studies is very important because the amount of energy should be different for each tissue and organ. In study by Ahn and coworkers, the effect of PDT on breast cancer models was found to be 90 J/cm<sup>2</sup> in less than 10 mm sized breast cancers [32]. The fluence at tissue surface for PDT patients for recurrent breast carcinoma in Phase II clinical trial of motexafin lutetium (MLu)-mediated chest wall was studied [33]. Patients were given MLu either 4 mg/kg with light at 18 h or 5 mg/kg with light at 24 h using an irradiance of 150 J/cm<sup>2</sup> at 730 nm, with an incident fluence rate of 75 mW/cm<sup>2</sup> [33]. Wang and coworker studies suggest that PDT offers a promising less-invasive alternative associated with the standard treatment option for Paget's disease which is an extremely rare form of intraepithelial adenocarcinoma that may have an underlying tumor component [34]. It was also reported that low-dose Photofrin-induced PDT offers patients with chest wall progression a treatment option with an excellent clinical response [35]. Nine subjects were enrolled with chest wall progression of breast cancer following mastectomy. Eight subjects demonstrated 100 % histologic response to treatment as evidenced by either tumor apoptosis or regression using 630 nm laser energy and intravenously administered porfyrin sodium as the photosensitizer [36]. Photodynamic technique offers a minimal-invasive, outpatient treatment modality for recurrent breast cancer on the chest wall with few side effects, high patient's satisfaction and with possible repetitive application. PDT was performed as compassionate use in seven patients aged 57.6 years  $\pm$  12.6. A total of 89 metastatic skin nodes were treated in 11 PDT sessions. The photosensitizer meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) was applied intravenously. Three patients were treated with a dose of 0.10 mg/kg bodyweight and irradiated 48 h after drug application at a dose of 5 J/cm<sup>2</sup>. Four patients were illuminated by an optical dose of 10 J/cm<sup>2</sup> 96 h after photosensitization with 0.15 mg/kg. Laser light at a wavelength of 652 nm was generated by a diode laser and applied by a front lens light diffuser using a fluence rate of 20–25 mW/cm<sup>2</sup>. PDT using m-THPC resulted in complete response in all patients [37]. The accumulation, photocytotoxicity and intracellular localization of mTHPC were examined using the doxorubicin selected MCF-7/DXR human breast cancer cells, expressing P-glycoprotein, and the wild-type parental cell line, MCF-7. No significant difference in mTHPC accumulation was observed between the two cell lines up to 3 h contact. The photodynamic activity of mTHPC, measured 24 h after irradiation with red laser light ( $\lambda = 650$  nm), was significantly greater in MCF-7/DXR as compared to MCF-7 cells. A light dose of 2.5 J/cm<sup>2</sup> inducing 50 % of cytotoxicity in MCF-7, resulted in 85 % cytotoxicity in MCF-7/DXR [38]. Photodynamic therapy consisted of outpatient intravenous infusion of 0.8 mg/kg of Photofrin, followed 48 h later by 630 nm light treatment of 135–170 J/cm<sup>2</sup> delivered by a KTP:YAG laser coupled to dye unit. Two patients underwent a second PDT procedure due to new lesion formation [39]. By using PDT mortality rates are gradually declining in some developed countries due to the development of modern technologies and early diagnosis and awareness. In other studies, invasive ductal carcinoma (IDC) was treated with 0.4 mg/kg of Verteporfin with 690 nm, power 150 mW/cm of diffuser tip. We hope that continued research on alternative methods of treatment such as photodynamic therapy done will continue to be a factor in reduction of deaths caused by breast cancer [40]. Unfortunately, most photosensitizers available have absorption bands at wavelengths shorter than 700 nm. Porphyrins have weak absorption maxima around 430 nm, and

chlorine and bacteriochlorins have strong absorption maxima at around 650 and 710 nm respectively. Visible light is commonly used as an excitation source in PDT, although these wavelengths have limited tissue penetration [41,42]. An alternative to external light sources may be internal light sources based on bioluminescent systems with Luciferase-substrate. Shramova El et al. proposed the NanoLuc-furimazine system as an internal light source. This system can be successfully used to induce the miniSOG photosensitizer and to induce phototoxicity of this flavoprotein in cancer cells during bioluminescent resonance energy transfer (BRET) [43]. The local PDT system, aminolevulinic acid HCL (Levulan Kerastick) and large format BLU-U PDT illuminator, was developed by DUSA Pharmaceuticals, Inc. for the treatment of actinic keratosis of the face and scalp and approved in the USA in 2000. Topical PDT is used in a wide range of skin cancers and precancerous conditions. In 2001, Novartis introduced the PDT laser-based system of verteporfin (Visudyne) as the first pharmacological treatment of age-related macular degeneration. Development programs are still testing PDT for the potential treatment of various diseases, bringing therapeutic results with minimal toxicity [44]. Photosensitizers activated at a wavelength near the tissue absorption range (red area) are ideal for therapeutic purposes. It is necessary for PS to maintain high triplet efficiency of ROS synthesis after irradiation [45]. Practical application of PDT requires easy-to-synthesize, water-soluble PSs that have low dark toxicity, high <sup>1</sup>O<sub>2</sub> quantum efficiency and effective near-infrared (NIR) absorption of light 650–850 nm, which deeply penetrates the tissue [46–50]. PDT photosensitizer should have the following features: it should 1) have a constant composition, 2) be simple in synthesis and easily accessible, 3) be non-toxic in the absence of light, 4) show specificity, 5) have energy of your excited state higher than 94 kJ/mol (0.97 eV, singlet oxygen energy), 6) be quickly removed from the body, 7) have minimal self-regulation and 8) be photostable (without photobleaching) [51]. A photosensitizer with high phototoxicity, low toxicity in the dark and good water solubility is crucial for successful PDT. In one study, a new class of water soluble porphyrin derivative and its isomers, photohexser-1 (P-1) and photohexser-2 (P-2), was synthesized and tested, and their anti-tumor activity tested. Both isomers, P-1 and P-2, can be used as potential PDT sensitizers. Chlorin e6 (Ce6) is very popular as a promising second generation photosensitizer for PDT. However, in vivo availability of Ce6 is significantly limited by its low water solubility and poor ability to target tumors. To overcome these Ce6 limitations, albumin nanoparticles were used. The produced albumin nanoparticles consisted of bovine serum albumin (BSA), Ce6-BSA and beta-carotene as carrier, photosensitizing agent and cross-linking agent, respectively. These albumin nanoparticles (Ce6-BSA-BC-NP) did not contain any toxic chemotherapeutic agents, but instead contained naturally safe beta-carotene and Ce6, which was only activated after irradiation with 660 nm laser light. Ce6-BSA-BC-NP are about 120 nm in size and spherical, similar to Abraxane® and show good physicochemical stability. Nanoparticles showed significant cytotoxicity to 4T1 cells as assessed by MTT, and Live / Dead and TUNEL tests. In particular, the results of the TUNEL test showed that cell death induced by Ce6-BSA-BC-NP and light radiation (660 nm) occurred by an apoptotic route. Ce6-BSA-BC-NP showed a significantly enhanced tumor suppression effect after irradiation with 660 nm light compared to free Ce6 (tumor volume 90  $\pm$  39 mm<sup>3</sup> and 487  $\pm$  69 mm<sup>3</sup> respectively). Overall, this improvement in anti-tumor efficacy in vivo appeared to be the targeting ability of albumin nanoparticles. Ce6-BSA-BC-NP with PDT represents a promising new potential therapeutic platform in the treatment of breast cancer [52,53]. The effectiveness of PDT in solid tumor is hampered by many aspects, including its oxygen consumption, insufficient oxygen levels in the hypoxic tumor microenvironment and limited penetration of photosensitizers within tumors. This is problematic, given that hypoxia occurs in the vast majority of malignant tumors. Therefore, increasing the oxygen concentration in malignant tumors improves the results of PDT treatment [54–59]. Studies show that MnO<sub>2</sub> nanoparticles can produce oxygen when they react with endogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In a study

by Chudal et al., protoporphyrin IX (PPIX) was placed in a liposome bilayer (PPIX-Lipo), which was then coated with MnO<sub>2</sub> nanoparticles to construct PPIX-Lipo-MnO<sub>2</sub> (PPIX-Lipo-M). This was to increase the effectiveness of PDT in cancer hypoxia. PDT results show that PPIX-Lipo-M was more cytotoxic to breast cancer cells than PPIX-Lipo under hypoxia, indicating that the production of oxygen gas under hypoxia improved treatment outcomes. After combining PPIX with the liposome, the solubility of PPIX in water improved significantly. Consequently, cellular uptake of both PPIX-Lipo and PPIX-Lipo-M also increased significantly compared to naked PPIX. In general, PPIX-Lipo-M has the ability to act as a therapeutic agent that alleviates hypoxia and thus improves the efficacy of PDT [59].

Cancer immunotherapy has achieved promising clinical responses in recent years due to the potential to control metastatic disease. However, there are limited studies on the therapeutic efficacy of immunotherapy for breast cancer compared to melanoma and non-small cell lung cancer due to limited PD-L1 expression, low infiltration of cytotoxic T lymphocytes (CTL) and high levels of bone marrow suppressor cells (MDSC). In a study by Chen L. et al., the role of the multifunctional nanoplatform (nanocomposites FA-CuS/DTX @ PEI-PpIX-CpG, designated as FA-CD @ PP-CpG) for synergistic phototherapy PDT, photothermal therapy PTT with docetaxel were examined. Nanocomposites show excellent PDT efficiency and photothermal conversion capacity at 650 and 808 nm of irradiation, respectively. More importantly, FA-CD @ PP-CpG with no apparent side effects can significantly inhibit tumor growth in vivo based on studies with 4T1 tumor mice. The low dose of loaded DTX in FA-CD @ PP-CpG may promote CTL infiltration to improve the effectiveness of anti-PD-L1 (aPD-L1) antibody, suppress MDSC, and effectively polarize MDSC towards the M1 phenotype to increase anti-tumor efficacy. In summary, FA-CD @ PP-CpG nanocomposites offer effective synergistic therapeutic modality in docetaxel-enhanced immunotherapy for clinical use in breast cancer [60].

## 2. Methods to increase the selectivity and bioavailability of photosensitizers

The concept of theranostics was first used by John Funkhouser in 2002. Theranostics is a close combination of diagnostics and therapy to personalize treatment. Currently, it is based on the latest technologies such as nanotechnologies, biomaterials, nanomaterials. These new generation biomimetics allow the diagnosis of disease processes in patients but also serve as therapeutic particles in targeted therapies. Studies show that nanomaterials in combination with photosensitizers can increase the efficiency of photodynamic therapy and eliminate its side effects. By manipulating the size of nanoparticles, the penetration of toxic photosensitizer into healthy tissues can be avoided [61–68].

Among the various types used in biology, gold nanoclusters (AuNP) are most commonly used because of their wide availability and unique properties [67–70]. Many therapeutic drugs have various limitations, including low water solubility and reduced half-life. This requires the need to design a drug delivery system that will improve the half-life and specificity of the target drug. Over the years, conventional drug delivery systems have shown some efficacy to some extent because these systems are now overwhelmed by the challenge of successfully providing drug delivery for many other drugs. Nanoparticle assisted drug delivery is the podium to adjust the simple properties of drug molecules by improving the half-life, solubility, biocompatibility and release characteristics of the drug. Although many products focused on nanoparticles have been made available on the market, more and more are being developed, and some are already undergoing clinical and preclinical studies [71]. To serve as PDT agents, nanoparticles selected to enhance the photosensitizer must meet the following requirements:

- The emission spectrum of nanoparticles must be consistent with the absorption spectrum of the photosensitizer. Matching the emission band of nanoparticles to the wavelength of photosensitizer

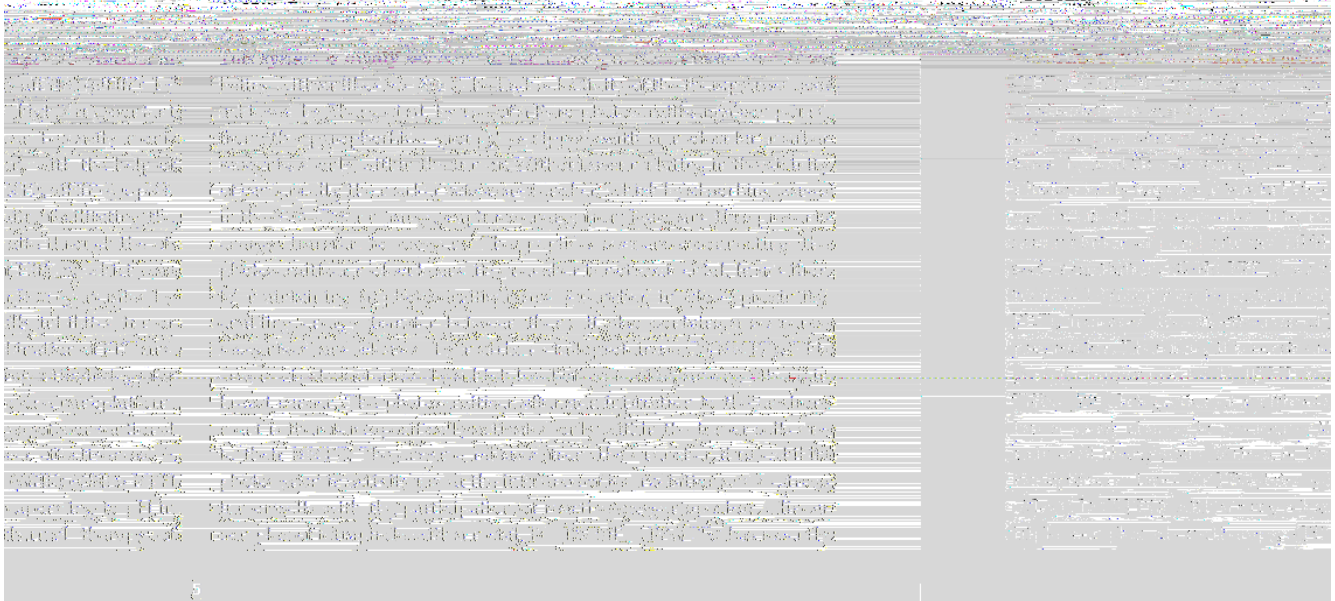
absorption guarantees efficient photosensitizer activation and singlet oxygen production.

- Nanoparticles must have high luminescence efficiency, i.e. excitation by an energy source should result in strong emission by the nanoparticle. For example, if a scintillation nanoparticle is used, luminescence is created as a result of excitation by radiation (scintillation luminescence), and the nanoparticle should emit strongly if it is excited by x-rays and other forms of radiation.
- Nanoparticles must be easily attached to or linked to photosensitizers.
- Nanoparticles must be non-toxic, water-soluble and stable in the biological environment.

Very small size gold nanoclusters (AuNCs) have been shown to be promising in PDT as new inorganic photosensitizers, but their use has been limited due to short blood circulation. It is therefore important to develop stimulus-responsive AuNC-based nanoprobe to achieve highly efficient PDT. Zhang L. et al. synthesized an organometallic skeleton (MOF, ZIF-8) encapsulated AuNC (AuNCs @ MOF), which was then loaded with doxorubicin (DOX) to obtain pH-responsive nanoprobe (AuNCs @ MOF-DOX) with modulated release for PDT / chemotherapy. In the acid micro-environment of the tumor, the ZIF-8 structure collapsed, accelerating the release of AuNC and DOX in tumor cells, and increasing the efficiency of PDT / chemotherapy. Under irradiation with 670 nm laser, a large amount of singlet oxygen was generated and the DOX release rate increased to 77.1 % at pH 5.5. By separate PDT activity and separate non-PDT-conjugated chemotherapy tumors were only partially inhibited, but completely disappeared after a combination of PDT and chemotherapy. Prepared AuNC @ MOF-DOX nanoprobe responsive to modulated release pH have demonstrated excellent PDT / chemotherapy performance and will be important biofunctional nanoprobe for synergistic therapy [67]. AuNPs have the highest potential to cross cancer cell membranes during therapy. In PDT, the most important factor to overcome is how to internalize the photosensitizer in the cells so that when excited, ROS production in the cells is sufficient. Many PS, including hypericin, are hydrophobic and poorly soluble in water, which limits their ability to move through membranes. Therefore, a carrier system is necessary to improve the efficiency of PDT using Hypericin. Therefore, AuNP labeling on hypericin increases their movement across membranes by increasing their water solubility, bioavailability and stability [65–70]. In vivo, AuNPs also have the ability to avoid recognition and possible interference by the immune system. Physiologically, the immune system recognizes all foreign substances, including therapeutic drugs, as invaders. Following intravenous or intramuscular injection, PS may potentially be affected by the host's immune response. This causes either denaturation of the drug or any other interference with the pharmacodynamics of the drug in the body. Nanoparticles, including AuNP, mimic biological components in the body and therefore remain unnoticed by the barriers of the immune system, creating an excellent delivery system for therapeutic drugs [67]. Silica-coated gold nanoparticles have recently been described as biocompatible contrast agents with increased X-ray absorption. Metallic nanoparticles can increase the therapeutic effectiveness of radiation therapy by such selective scattering and / or absorption of ionizing radiation, thereby allowing reduction in radiation dose, minimizing side effects. Scintillating nanoparticles are studied as a light source for PDT for deep cancer treatment. Recently, gold (III) porphyrins are of great interest as anti-cancer drugs not only because of the stability of gold (III), but also for the functionalization of porphyrins to allow bridging with other metal, such as platinum (II). Toubia and others for the first time presented a synthesis of three new bimetallic compounds containing gold (III) porphyrin conjugated to a diamine platinum moiety by bridging malonate to obtain increased cytotoxicity from both metals in combination with the phototoxicity of porphyrin. These three syndromes differ from the type of diamine ligand around platinum (II): ammonia (NH<sub>3</sub>), cyclohexanediamine (CyDA) and pyridylmethylamine

(Py). The synthesis was carried out using complexation of activated malonic acid derivatives with aquadiaminoplatinum (II) complexes, and the products were characterized by IR, NMR, mass spectra and elemental analysis. The cytotoxic activity of the conjugates was screened in both healthy cell lines and cancer cell lines, human fibroblast cells (FS-68) and human breast cancer cells (MCF-7) and compared with the activity of the respective platinum (II) complexes. The cyclohexyl diamine derivative (CyDA) showed the greatest cytotoxic effect among the series. The results showed that the Au (III) / Pt (II) conjugates are 2–5.6 times stronger than the corresponding platinum complexes. Moreover, diada AuP-PtCyDA is 18 % stronger and more selective for cancer cells than parental gold porphyrin substituted with malonic acid. On the other hand, the IC50 AuP-PtCyDA dye is 43 % lower than AuTPP, but is more selective for healthy cells. The findings suggest that the inclusion of two different cytotoxic metals in the same molecule is an unusual cytotoxic effect compared to traditional Pt (II) homometallic drugs [68]. A study evaluated photodynamic effects after delivery of a multiple particle delivery complex (MPDC) and irradiation at 10 J/cm<sup>2</sup> laser fluence using a 680 nm diode laser in a breast cancer cell line (MCF-7). Laser-activated MPDC induced a significant change in the morphology of PDT-treated cells, with the appearance of morphological-like apoptotic features. An increase in cytotoxicity, caspase activity, cell depolarization, and cytochrome C release in PDT-treated cells has been identified. Finally, upregulation of BAX, BCL-2, CASP-2 and ULK-1 genes was observed. MPDC gave an effective and stable hybrid agent with strong photodynamic abilities [69]. Poor tumor selectivity and hypoxia-induced resistance greatly limit the efficacy of PDT. To further increase the potency of PDT, a drug delivery system based on liposome combining PDT and chemotherapeutics has been developed. Lipophilic IR780 was loaded into the lipid bilayer, while the hydrophilic chemotherapeutic agent tirapazamine (TPZ) was encapsulated in a hydrophilic core. IR780 can generate reactive oxygen species and microenvironmental hypoxia in a local area due to constant oxygen consumption, which causes TPZ encapsulated in the aqueous liposomal chamber to extract TPZ radicals, resulting in double-stranded DNA cracks and chromosomal aberrations. In vivo studies have shown that IR780 closing liposomes and TPZ have shown high anti-tumor efficacy by combining photodynamic therapy with chemotherapy. Therefore, the study combines PDT and hypoxia-activated chemotherapy with TPZ. It is a simple but effective liposome platform to achieve many synergistic anti-tumor effects and has the potential for clinical use [71]. Abnormal glycolytic metabolism is one of the features of malignant tumors; therefore, reversing metabolic transformation is a promising drug target in cancer treatment strategies. Sun et al. developed a new type of multifunctional microbubble inoculated with cationic lipid porphyrin (CPGL) coated with IRE-1α siRNA (CPGL@siRNA). Due to the amphiphilic structure of

breast cancer. GNR was first determined with mercaptopropionyl hydrazide (MPH) and monomethoxylated poly (ethylene glycol) thiol terminated (mPEG-SH) by binding with Au-thiol, and then conjugated with chemotherapeutic doxorubicin (DOX) and 5-aminolevulinic acid photosensitizer (ALA) via susceptible to acid hydrazone bonds between drugs and MPH molecules. The resulting nanoplatform GNR-MPH-ALA / DOX - PEG showed excellent stability in physiological solutions and pH-sensitive release of DOX and ALA. In vitro studies have shown that GNRs-MPH-ALA / DOX-PEG can successfully enter human MCF-7 breast cancer cells and release DOX and ALA into the cytoplasm. In addition, DOX could be located in the cell nucleus and ALA was productively metabolized to protoporphyrin IX (PpIX). After irradiation in near infrared (NIR), PpIX produced a sufficient number of reactive oxygen species for PDT, while GNR could effectively induce hyperthermia for PTT. Compared with single CT and bimodal CT/PDT or CT/PTT treatment, triple combined CT/PDT/PTT treatment could more effectively kill MCF-7 cells through the superadditive anti-tumor effect. In addition, the circulating blood half-life of GNRs-MPH-ALA/DOX-PEG was approximately 52 min and showed tumor accumulation at 3.3 %. Triple-combined CT/PDT/PTT treatment can completely suppress tumor growth without obvious systemic toxicity. The study paves the way for multimodal therapy for breast cancer. Developing a simple but effective strategy for building a versatile nanoplatform for combination therapy is still a huge challenge [73]. The bioavailability of hydrophobic porphyrins effectively increases their conjugation with a hydrophilic polymer, such as PEG. Studies on meso-tetra-4-hydroxyphenylporphyrin (mTHPP) molecules, covalently linked to a PEG molecule with different number of units, showed that the complex formed increased the solubility of porphyrin residues and reduced their aggregation in the aqueous environment [74]. Photosensitizer constructs with silicon nanoparticles have proved to be extremely stable and well absorbed by cancer cells. It is important that in the body they are degraded to silicic acid, which is easily eliminated. In addition, silicon nanoparticles can generate singlet oxygen without the use of a photosensitizer [75–77]. Researchers at the University of Michigan have obtained a stable methylene blue complex with non-toxic polyacrylamide nanoparticles. This compound does not undergo enzymatic degradation, but is permeable to singlet oxygen, which diffuses outside the capsule and starts a cytotoxic reaction. The use of a polymer coating reduced the photosensitizer toxicity [78,79]. Photosensitizers of the next generation are photosensitizers of the PUNP type (Photon Upconverting Nanoparticles). They are made of photosensitive compound and nanoparticles whose core has the ability to convert energy obtained from photons - PUNPs. The uniqueness of the system lies in the fact that the radiation emitted by the core has higher energy than absorbed. In addition, the core has the ability to absorb infrared radiation, which penetrates the



been developed that meets most of these criteria. This complex is extremely effective as PS for PDT against triple negative breast cancer (TNBC), but it does not absorb the NIR light that is needed to treat deeper tumors. To enable NIR activation, a new Pd derivative [DMBi1] -PEG 5000-SH has been synthesized that has thiol functionality that facilitates conjugation with NIR-absorbing gold nanoshells (NS). After excitation with pulsed light of 800 nm, NS emit photoluminescence induced by two photons 500–700 nm long, which can sensitize attached PS to PDT initiation. In addition, NS produce heat after irradiation of 800 nm, giving NS-PS conjugates additional photothermal ability in therapeutic therapy (PTT). NS-PS conjugates are potent mediators of activated NIR tandem PDT / PTT against TNBC cells in vitro. It has been proved that Pd [DMBi1] -PEG 5000 -SH retains the photophysical properties of the parent Pd complex [DMBi1] and that NS-PS generates  $^1\text{O}_2$  by pulsed irradiation of 800 nm confirming the activation of PS by photoluminescence emitted from NS. TNBC cells easily internalize NS PS conjugates that generate reactive oxygen species in cells after pulsed NIR irradiation to damage DNA and induce apoptosis. Together, these findings show that the use of photoluminescent NS as efficient carriers for PS Pd [DMBi1] is an effective strategy for enabling NIR light activation of tandem PDT/PTT.3. Currently approved PSs have poor water solubility, which can cause problems after intravenous administration. To circumvent this limitation, new types of PS are needed. In their study, Oshiro-Junior Ja et al. evaluated the potential of phthalocyanine loaded nanostructured lipid carrier (NLC -phthalocyanine-loaded nanostructured lipid carrier) functionalized with folic acid (FA). To prepare FA-labeled NLC, the PF127 polymer was first esterified with FA and emulsified with an o-phase funnel containing polyoxyethylene 40 stearate, capric / caprylic acid triglycerides, ethoxylated hydrogenated castor oil 40 and zinc phthalocyanine PS. The resulting PS loaded FA-NLC had a hydrodynamic diameter of 180 nm and was stable in suspension for > 90 days. Interestingly, the amount of singlet oxygen produced after light activation for PS-FA with a PS charge was much higher than for free PS, but at a lower PS concentration. PS was released from NLC on a permanent basis, with  $4.13 \pm 0.58\%$  and  $27.7 \pm 3.16\%$  after 30 min and 7 days, respectively. Finally, cytotoxicity tests showed that NLC at concentrations of  $99.1 \mu\text{M}$  PS is non-toxic at  $> 80 \pm 6.8\%$  viability, and after 90 s of light exposure, the results show a statistically significant decrease in cancer cell viability ( $57 \pm 4\%$ ). The obtained results allow us to conclude that functionalized NLC included in PS associated with the PDT technique has features that make them potential candidates for alternative treatment of breast cancer). In a study by Gao et al., 2D nanostructural metal-organic skeletons Sm-H<sub>2</sub> TCPP nanoparticles, were first synthesized through coordination based on Sm<sup>3+</sup> with a porphyrin derivative (tetrakis (4-carboxyphenyl) porphyrin (H<sub>2</sub> TCPP)) to obtain highly effective PDT in breast cancer. The prepared Sm-H<sub>2</sub> TCPP had the morphology of nanoplates with an ultra-thin thickness below 10 nm and a plane ultra-small size below 100 nm. Compared to free H<sub>2</sub>TCPP, the outstanding ability to generate ROS of well-defined Sm-H<sub>2</sub> TCPP nanoparticles is mainly due to their improved physicochemical properties and increased intersystem crossing caused by heavy Sm nodes. The significantly improved PDT efficacy of Sm-H<sub>2</sub> TCPP nanoparticles was further tested in vitro and in vivo in a MCF-7 breast cancer model. It is anticipated that the Sm-H<sub>2</sub> TCPP nanoparticles will be a new development path for a new class of PDT [81]. Buchner et al. designed and synthesized transforming nanoparticles (UCNP) functionalized with Rose Bengal photosensitizer (RB) for PDT of breast cancer cells. The use of UCNP shifts the required excitation wavelength for the production of  $^1\text{O}_2$  to near-infrared (NIR) light, thus enabling deeper tissue penetration. The system has been designed to maximize  $^1\text{O}_2$  production through efficient transfer of Förster resonance energy (FRET) from UCNP to a photosensitizer. Highly luminescent NaYF<sub>4</sub>: Yb, Er, Gd @ NaYF<sub>4</sub>, a core-shell UCNP was synthesized that showed two major anti-Stokes emission bands at 541 and 652 nm after 980 nm irradiation. RB was chosen as the photosensitizer because its absorption band coincides with the green UCNP

emission. To achieve effective energy transfer from nanoparticles to photosensitizer, functionalized UCNP contained a short L-lysine linker to attach RB to the nanocore, resulting in UCNP functionalized with RB-lysine. Efficient FRET from UCNP to RB has been confirmed by measuring luminescence lifetime. The light emitted by UCNP at 541 nm, when excited at 980 nm, generates  $^1\text{O}_2$  by RB. Multiphoton and confocal laser scanning microscopes confirmed the internalization of RB-lysine-UCNP by SK-BR-3 breast cancer cells. Cell viability studies showed that RB-lysine-UCNP induced low dark toxicity in cells prior to PDT treatment. Importantly, after irradiation at 980 nm, a high level of cell death was observed in cells loaded with RB-lysine-UCNP. Cell death after PDT treatment was also confirmed by propidium iodide and confocal microscopy. High drug loading capacity (160 RB/nanoparticle) UCNP, efficient FRET with UCNP for photosensitizer, high cell accumulation and PDT cell killing suggest that RB-lysine-UCNP is promising for NIR PDT and is therefore suitable for treating deep-lying tumors cancerous [82]. Aggregation of photosensitizers can significantly minimize their binding to liposomes. The first photosensitizer placed in the liposome was HpD. HeLa cell line have shown a much stronger photodynamic effect after therapy using liposomal constructs with HpD [83, 84]. Also, aminolevulinic acid (ALA) and its methyl ester (Metvix) caused much better photodynamic effects in animals vaccinated with cancer compared to those obtained in animals treated with PDT using free photosensitizers [85]. Due to the presence of a large number of receptors for low-density lipoproteins (LDL) on the surface of cancer cells, it is also beneficial to combine photosensitizers with LDL [86]. To increase the selectivity of cancer cell destruction with simultaneous protection of surrounding tissues, photosensitizers are also combined with monoclonal antibodies directed against specific tumor antigens. Aluminum phthalocyanine derivative (ALSPc) was placed in liposomes and additionally conjugated with 791 T/36 monoclonal antibodies. Studies conducted on the sarcoma line and the colorectal cancer line have shown better photodynamic effects after using a liposome derivative of photosensitizer conjugated with antibodies [87]. Abnormal glycolytic metabolism is one of the features of malignant tumors; therefore reversing metabolic transformation is a promising drug target in cancer treatment strategies [88,89]. We must pay attention to the importance of HER receptors in the pathogenesis of breast cancer. The HER receptor family includes the following receptors: HER1, HER2, HER3, HER4 [90]. Triple-negative breast cancer (TNBC) is the deadliest form of breast cancer because it is more aggressive, diagnosed at a later stage, and more likely to develop locally and systemically [91,92]. Ternary triple negative breast cancer (TNBC) tumors are heterogeneous, different phenotypically rapidly proliferating tumors. It is desirable and preferred to treat TNBC cells with different phenotypes with the most appropriate drugs. The research concerned a polymer nanoparticle containing 78 nm, chlorin e6, docetaxel and anti-Twist siRNA (CDTN) activated by light. Compared with chemotherapeutic agents, the use of CDTN improves tumor exposure of docetaxel and anti-Twist siRNA 2.5- and 2-fold, respectively. In combination with the laser irradiation used during maximal intra-tumor accumulation, CDTN significantly inhibits the growth of primary tumors and their lung metastases (both > 80 %) by killing peripheral cells. Dual modal nanomedicine lacking CT, GT or PDT showed adequate primary tumor growth, poor metastasis control, or both, respectively. This study reveals the specific spatial mechanism of CDTN in the treatment of metastatic TNBC and underlines the importance of combination therapy in the treatment of TNBC [93]. Dual-acting agents containing a cysteine protease inhibitor and Ru-based photosensitizer for PDT were designed, synthesized and validated in 2D cultures and 3D functional imaging tests of triple-negative human breast cancer (TNBC). These combination agents deliver and release Ru-based PDT agents to tumor cells and cause cancer cell death after irradiation with visible light, while inactivating katespin B (CTSB), a cysteine protease strongly associated with invasive and metastatic behavior. In total, five Ru-based complexes were synthesized. Photochemical studies have confirmed that complexes undergo

photoactivation of dissociation of ligands, or produce singlet oxygen. All inhibitors strongly and irreversibly inhibit CTSE. Compounds were evaluated on MDA-MB-231 TNBC and MCF-10A breast epithelial cells in 2D and 3D culture for effects on proteolysis and cell viability in dark and light conditions. Taken together, these data show that compounds strongly inhibit dye-quenched collagen (DQ) degradation and one compound causes effective cell death under light [94]. To improve non-invasive therapeutic efficacy in ER positive (ER + BC) breast cancer, Zhao R et al. developed a multifunctional microbubble FOXA1 loaded porphyrin to combine PDT and FOXA1 (KD) knockdown gene therapy with ultrasound-oriented destruction microbubbles (UTMD). In vivo, the CpMBs / siRNA fluorescence intensity at the tumor site peaked 6 h after injection and was retained for the next 24 h. During the observation period (21 days) no tumor recurrence was found in the PDT group in combination with FOXA1 KD. Compared to PDT or FOXA1 KD alone, the combination of these two methods was much more effective in inhibiting ER + breast cancer, showing a good synergistic effect. CpMBs / siRNA in combination with UTMD dramatically increased local accumulation of porphyrin and siRNA through the ultrasound-induced sonoporation effect under CEUS, demonstrating an excellent therapeutic effect for estrogen-dependent ER + breast cancer [95]. In one study, tamoxifen modified Ru (ii) polypyridyl complex (Ru-tmx) as an estrogen receptor (ER) targeted photosensitizer. Ru-tmx exhibits increased cellular uptake and efficacy of PDT towards breast cancer cells with high ER expression due to the specific targeting of tamoxifen on ER and eventually localizes in lysosomes. Moreover, Ru-tmx can be activated by two-photon excitation, generating  $^1O_2$  to damage lysosomes and leading to cell death [96]. Verteporfin for photosensitization (0.4 mg / kg) was administered intravenously and then exposed to increasing light doses (20, 30, 40, 50 J; 3 patients per dose) delivered by laser fiber placed interstitially under ultrasound control. MRI scans (magnetic resonance imaging) were performed before and 4 days after PDT. Histological examination of the resected tissue was performed. PDT was well tolerated with no adverse effects. PDT effects were detected by MRI in 7 patients and histology in 8 patients, increasing with the delivered dose of light, with a good correlation between the two modalities. Histologically, there were characteristic features of PDT necrosis, as opposed to spontaneous necrosis. Apoptosis was detected in adjacent normal tissue. The median follow-up of 50 months did not show any adverse effects or results not inferior to a comparable control population. This study confirms the potential role of PDT in the treatment of early breast cancer. It is currently the first PDT clinical trial for the treatment of primary breast cancer. Its main strength lies in the potential of PDT to target breast tumors that have shown no or minimal response to neoadjuvant treatment (NAT). The presence of residual disease after NAT indicates partial tumor resistance, in which minimally invasive local therapy plays a role, such as PDT. In some cases, PDT may also play the role of an alternative to NAT prior to surgery. Both offer the advantages of assessing tumor response in vivo using MRI, which may allow more effective use of conservative surgical procedures. PDT can also stimulate an anti-tumor immune response. As with conventional neoadjuvant therapies, we have shown that performing MRI scans shortly before PDT and again a few days later, immediately before surgery, is a potential tool for documenting the nature and extent of changes associated with PDT, compared to pathology as the gold standard [97].

### 3. PDT and breast cancer treatment, future

In breast cancer most of the PS that localize in mitochondria of certain kind of cancer cells, including breast cancer cells, show relatively high co-localization level in near nuclear areas such as endoplasmic reticulum, and are believed to be good candidates for PDD and PDT [98, 99]. Reduced mitochondrial oxygen consumption, decreased mitochondrial membrane potential and inhibited activity of complexes (I to IV) are all often seen after photodynamic therapy-mediated by

mitochondrial localizing photosensitizers, which have apoptosis-inducing capabilities [100–103]. Some lysosomal-localizing photosensitizers are hydrophilic and show excellent tumor destruction, they are usually associated with the induction of both apoptotic and necrotic responses following photodynamic therapy

PDT is currently under increased consideration along with other new treatments that include cancer vaccines, oncolytic virotherapy and immunotherapy. Hormone receptors remain the most currently used markers in clinical trials and the usage of breast cancer markers BRCA1 and BRCA2 is increasing as seen by numerous report studies. Most of the preclinical studies are performed with cell lines derived from breast cancers, and MCF-7, T-47D and MDA-MB-231 are among the most commonly used for PDT in vitro.

Experimental data from a diverse pool of research reports show photodynamic therapy to be a good treatment option for numerous cancers, offering reduced long-term mobility, very limited side-effects, better cancer-specificity over surgery, chemotherapy or radiotherapy.

For PDT, as with any new cancer therapy, it is important to identify specific indications for this treatment and evaluate its benefits and disadvantages compared to standard therapies. PDT is a procedure that requires a single injection of the drug, followed by a single exposure after a certain period of time. Very often this is done on an outpatient basis. For comparison, typical therapeutic radiotherapy regimens include daily irradiation for a total of 6–7 weeks (again on an outpatient basis). Chemotherapy schedules vary, but usually last for several months. Surgery, although a single procedure, requires general anesthesia and hospitalization for a period of one to several weeks. Cost-effectiveness comparisons were made in palliative treatment of head and neck cancer with PDT compared to extensive surgery or chemotherapy, and when PDT was used compared with endoscopic surveillance in patients with Barrett's esophagus and high-grade dysplasia. PDT proved to be both cost effective and provided a longer life span compared to other treatment options for these conditions [104].

PDT has the advantage that although there is a severe ulceration of the illuminated area immediately after the procedure, minimal fibrosis occurs in the healing process, which restores the function of organs and tissues with virtually no scars. PDT saves tissue architecture, providing the ability to regenerate normal tissue because it does not damage subepithelial collagen and elastin, and also retains extracellular support elements. The strengths of this treatment are its ability to destroy tumors without destroying the normal tissue structures surrounding the tumor, and this treatment can be repeated without accumulating toxicity. In addition, it has the advantage that it can be used to treat cancers that cannot be irradiated or that are not suitable for surgery. Over the past 30 years, PDT has been used to treat many types of cancer, and its effectiveness as a therapeutic and palliative method is well documented [105]. Another advantage of PDT is that the treatment can be repeated in the event of a relapse or a new primary tumor in the previously treated area. Such re-treatment is extremely difficult both during surgery and radiation therapy, without the risk of severe damage to normal tissue. Research is expected to optimize PDT as a treatment for breast cancer and to rationally select combination therapies that contain PDT as an ingredient.

The issue of troublesome, difficult to use laser equipment has already been resolved; service has become simpler, which helps the doctor in the treatment. Therefore, the main disadvantage of using PDT as first-line therapy is the fact that large randomized trials have not yet been performed. Treatment regimens still need to be optimized and standardized to achieve better therapeutic efficacy. Severe side effects have been reported when using incorrect PDT schedules. However, it is already clear that the right choice of drug type and dose, light wavelength, and drug spacing can improve the efficacy and safety of PDT. Moreover, careful attention to the physics and dosimetry of light will help minimize toxicity [105,106]. Research on the selective delivery of photosensitizers by conjugation with antibodies, using liposomes as carriers and delivery systems, or new photosensitizers with more specific tumor

location and faster removal from the body is also justified. It is also worth exploring the possibilities of combining PDT with other therapies. Studies in mice have already shown that the combination of PDT with doxorubicin, mitomycin C, immune system modulators and angiogenesis inhibitors resulted in a better PDT response. As our understanding of the best ways to combine these therapies is increasing, further improvement in clinical PDT should be expected [106–111].

#### Declaration of Competing Interest

The authors report no declarations of interest.

#### Acknowledgment

Dorota Bartusik-Aebischer acknowledges support from the National Science Centre NCN Poland (New drug delivery systems-MRI study, Grant OPUS-13 number 2017/25/B/ST4/02481).

#### References

- [1] B. Knap, D. Przystupski, J. Saczko, E. Kędzierska, K. Knap-Czop, J. Kotlińska, O. Michel, K. Kotowski, et al., J Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations, *Biomed. Pharmacother.* 106 (2018) 1098–1107.
- [2] Y. Gao, L. Zhang, Y. Liu, S. Sun, Z. Yin, L. Zhang, A. Li, G. Lu, A. Wu, L. Zeng, Ce6/Mn2+-chelated polydopamine@black-TiO2 nanopores for enhanced synergistic phototherapy and magnetic resonance imaging in 4T1 breast cancer, *Nanoscale* 12 (3) (2020) 1801–1810.
- [3] M. Triesscheijn, P. Baas, J.H.M. Schellens, F.A. Stewart, Photodynamic therapy in oncology, *Oncologist* 11 (2006) 1034–1044.
- [4] C. Feng, L. Chen, Y. Lu, Y. Liu, S. Liang, Y. Liu, Y. Li, C. Dong, Programmable Ce6 delivery via cyclopamine based tumor microenvironment modulating nanosystem for enhanced photodynamic therapy in breast cancer, *Front. Chem.* 7 (2019) 853.
- [5] A.W. Kurian, K. Fish, S.J. Shema, Ch.A. Clarke, Lifetime risks of specific breast cancer subtypes among women in four racial/ethnic groups, *Breast Cancer Res.* 12 (2010) 6–10.
- [6] T.M. Churilla, P.E. Donnelly, E.R. Leatherman, C.S. Adonizio, C.A. Peters, Total mastectomy or breast conservation therapy? How radiation oncologist accessibility determines treatment choice and quality: a SEER data-base analysis breast, *Breast J.* 21 (2015) 473–480.
- [7] M. Alexiades-Armenakas, Laser - mediated photodynamic therapy, *Clin. Dermatol.* 24 (2006) 16–25.
- [8] S.L. Marcus, W.R. McIntire, Photodynamic therapy systems and applications, *Expert Opin. Emerg. Drugs* 7 (2002) 319–331.
- [9] K. Plaetzer, B. Krammer, J. Berlinda, F. Bert, T. Kiesslich, Photo physics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects, *Lasers Med. Sci.* 24 (2009) 259–268.
- [10] B. Knap, D. Przystupski, J. Saczko, E. Kędzierska, K. Knap-Czop, J. Kotlińska, O. Michel, K. Kotowski, J Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations, *Biomed. Pharmacother.* 106 (2018) 1098–1107.
- [11] I. Roy, T.Y. Ohulchanskyy, H.E. Pudavar, Ceramic-based nanoparticles entrapping water insoluble photosensitizing anticancer drugs: a novel drug-carrier system for photodynamic therapy, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 7860–7865.
- [12] W. Liu, K. Zhang, L. Zhuang, J. Liu, W. Zeng, J. Shi, Z. Zhang, Aptamer/ photosensitizer hybridized mesoporous MnO2 based tumor cell activated ROS regulator for precise photodynamic therapy of breast cancer, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 184 (2019) 110536.
- [13] W. Xu, J. Qian, G. Hou, Y. Wang, J. Wang, T. Sun, L. Ji, A. Suo, Y. Yao, A dual-targeted hyaluronic acid-gold nanorod platform with triple-stimuli responsiveness for photodynamic/photothermal therapy of breast cancer, *Acta Biomater.* 83 (2019) 400–413.
- [14] T.M. Churilla, P.E. Donnelly, E.R. Leatherman, C.S. Adonizio, C.A. Peters, Total mastectomy or breast conservation therapy? How radiation oncologist accessibility determines treatment choice and quality: a SEER data-base analysis breast, *Breast J.* 21 (2015) 473–480.
- [15] M.R. Hamblin, P. Mroz, History of PDT: The First Hundred Years. *Advances in Photodynamic Therapy: Basic, Translational and Clinical*, Artech House, Boston-London, 2008, pp. 1–12.
- [16] M. Alexiades-Armenakas, Laser - mediated photodynamic therapy, *Clin. Dermatol.* 24 (2006) 16–25.
- [17] S.G. Bown, Photodynamic therapy for photochemists, *Philos. Trans. A Math. Phys. Eng. Sci.* 371 (2013), 20120371.
- [18] J. Hu, T. Wang, L. Zhou, S. Wei, A ROS responsive nanomedicine with enhanced photodynamic therapy via dual mechanisms: GSH depletion and biosynthesis inhibition, *J. Photochem. Photobiol. B* 5 (209) (2020), 111955.
- [19] H. Abrahamse, M.R. Hamblin, New photosensitizers for photodynamic therapy, *Biochem. J.* 473 (2016) 347–364.
- [20] A.P. Castano, T.N. Demidova, M.R. Hamblin, Mechanisms in photodynamic therapy: part two - cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death, *Photodiag. Photodyn. Ther.* 2 (2005) 1–23. M.R.
- [21] S. Rodriguez-Rodriguez, L. Guerrero-Torres, M.J. Diaz-Huizar, A. Pomerantz, M. Del Pilar Ortiz-Vilchis, R. Demichelis-Gómez, Cost-effectiveness of the regimen proposed by the International Consortium on Acute Promyelocytic Leukemia for the treatment of newly diagnosed patients with Acute Promyelocytic Leukemia, *Hematol. Transfus. Cell. Ther.* (2020). S2531-1379 30284-4.
- [22] D.F. Amantullah, J.S. Tamareisis, P. Chu, M.H. Bachmann, N.M. Hoang, D. Collyar, A.T. Mayer, R.B. West, W.J. Maloney, Ch.H. Contag, B.L. King, Local estrogen axis in the human bone microenvironment regulates estrogen receptor-positive breast cancer cells, *Breast Cancer Res.* 19 (2017) 121–126.
- [23] J. Bazak, W. Korytowski, W.A. Grotti, Bystander effects of nitric oxide in cellular models of anti-tumor photodynamic therapy, *Cancers (Basel)* 11 (2019) 1674.
- [24] A.F. Dos Santos, D.R.Q. de Almeida, L.F. Terra, R.A.M. Wailemann, V.M. Gomes, G.S. Arini, F.G. Ravagnani, M.S. Baptista, L. Labriola, Fluence rate determines PDT efficiency in breast cancer cells displaying different GSH levels, *Photochem. Photobiol.* 96 (3) (2020) 658–667.
- [25] S.L. Marcus, W.R. McIntire, Photodynamic therapy systems and applications, *Expert Opin. Emerg. Drugs* 7 (2002) 319–331.
- [26] L. Huang, H. Liu, Q. Chen, L. Yu, D. Bai, MPPa-PDT suppresses breast tumor migration/invasion by inhibiting Akt-NF- $\kappa$ B-dependent MMP-9 expression via ROS, *BMC Cancer* 19 (1) (2019) 1159.
- [27] G. Guney Eskile, A. Deveci Ozkan, E. Sozen Kucukkara, A.F. Kamanlı, B. Gunoğlu, M.Z. Yildiz, Optimization of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy protocol for breast cancer cells, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 31 (2020), 101854.
- [28] L. Liu, H.J. Xie, L.M. Mu, R. Liu, Z.B. Su, Y.N. Cui, Y. Xie, W.L. Lu, Functional chlorin gold nanorods enable to treat breast cancer by photothermal/ photodynamic therapy, *Int. J. Nanomedicine* 13 (2018) 8119–8135.
- [29] H. Montasefi, C.A. Kruger, H. Abrahamse, Review: organic nanoparticle based active targeting for photodynamic therapy treatment of breast cancer cells, *Oncotarget* 11 (22) (2020) 2120–2136.
- [30] E.C. Anigo, G.B. Plackal Adimuriyil, H. Abrahamse, The role of photodynamic therapy on multidrug resistant breast cancer, *Cancer Cell Int.* 19 (2019) 91.
- [31] B.P. George, H.A. Abrahamse, A review on novel breast cancer therapies: photodynamic therapy and plant derived agent induced cell death mechanisms, *Anticancer Agents Med. Chem.* 16 (7) (2016) 793–801.
- [32] T.G. Ahn, B.R. Lee, E.Y. Choi, D.W. Kim, S.J. Han, Photodynamic therapy for breast cancer in a BALB/c mouse model, *J. Gynecol. Oncol.* 23 (2) (2012) 115–119.
- [33] A. Dimofte, T.C. Zhu, S.M. Hahn, R.A. Lustig, In vivo light dosimetry for metaxefin lutetium-mediated PDT of recurrent breast cancer, *Lasers Surg. Med.* 31 (5) (2002) 305–312.
- [34] A.A. Nardelli, T. Stafinski, D. Menon, Effectiveness of photodynamic therapy for mammary and extra-mammary Paget's disease: a state of the science review, *BMC Dermatol.* 15 (11) (2011) 13.
- [35] R.E. Cuenca, R.R. Allison, C. Sibata, G.H. Dowji, Breast cancer with chest wall progression: treatment with photodynamic therapy, *Ann. Surg. Oncol.* 11 (3) (2004) 322–327.
- [36] S.A. Morrison, S.L. Hill, G.S. Rogers, R.A. Graham, Efficacy and safety of continuous low-irradiance photodynamic therapy in the treatment of chest wall progression of breast cancer, *J. Surg. Res.* 192 (2) (2014) 235–241.
- [37] P. Wyss, V. Schwarz, D. Dobler-Girdziunaite, R. Hornung, H. Walt, A. Degen, M. Fehr, Photodynamic therapy of locoregional breast cancer recurrences using a chlorin-type photosensitizer, *Int. J. Cancer* 93 (5) (2001) 720–724.
- [38] M.H. Teiten, L. Bezdetsnaya, J.L. Melin, C. Bou-Dil, M.E. Paudy, M. Dicato, F. Guillemin, Effect of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC)-mediated photodynamic therapy on sensitive and multidrug-resistant human breast cancer cells, *J. Photochem. Photobiol. B* 62 (September 3) (2001) 146–152.
- [39] R. Allison, T. Mang, G. Hewson, W. Snider, D. Dougherty, Photodynamic therapy for chest wall progression from breast carcinoma is an underutilized treatment modality, *Cancer* 91 (January 1) (2001) 1–8.
- [40] F. Cairnduff, M.R. Stringer, E.J. Hudson, D.V. Ash, S.B. Brown, Superficial photodynamic therapy with topical 5-aminolevulinic acid for superficial primary and secondary skin cancer, *Br. J. Cancer* 69 (March 3) (1994) 605–608.
- [41] B. Subramanian, P. Rajaputra, L. Nguyen, M. Li, C.J. Peer, J. Kendrick, W. D. Figg, S. Woo, Y. You, Local and systemic antitumor effects of photo-activatable paclitaxel prodrug on rat breast tumor models, *Photochem. Photobiol.* 96 (3) (2020) 668–679.
- [42] L. Li, J. Li, Y. Shi, P. Du, Z. Zhang, T. Liu, R. Zhang, Z. Liu, On-demand biodegradable boron nitride nanoparticles for treating triple negative breast cancer with boron neutron capture therapy, *ACS Nano* 13 (12) (2019) 13843–13852.
- [43] E.I. Shramova, G.M. Proshkina, S.M. Deyev, R.V. Petrov, Death mechanism of breast adenocarcinoma cells caused by BRET-induced cytotoxicity of miniSOG depends on the intracellular localization of the nanoLuc-miniSOG fusion protein, *Dokl. Biochem. Biophys.* 482 (1) (2018) 288–291.
- [44] M. Majerník, R. Jendželovský, M. Babičák, et al., Novel insights into the effect of hyperforin and photodynamic therapy with hypericin on chosen angiogenic factors in colorectal micro-tumors created on chorioallantoic membrane, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) e3004.
- [45] A. Karioti, S. Bilia, Hypericins as potential leads for new therapeutics, *Int. J. Mol. Sci.* 11 (2010) 562–594.
- [46] A.R. Green, D. Soria, J. Stephen, D.G. Powe, Ch.C. Nolan, I. Kunkler, J. Thomas, G.R. Kerr, W. Jack, D. Cameron, T. Piper, G.R. Ball, J.M. Garibaldi, E.A. Rakha, J.

- M.S. Bartlett, I.O. Ellis, Nottingham Prognostic Index Plus: validation of a clinical decision making tool in breast cancer in an independent series, *J. Pathol. Clin. Res.* 2 (1) (2016) 32–40.
- [47] Ontario Health (Quality), Gene expression profiling tests for early-stage invasive breast cancer: a health technology assessment. Ontario Health (Quality), Ont. Health Technol. Assess. Ser. 20 (10) (2020) 1–234. In this issue.
- [48] A.P. Castano, T.N. Demidova, M.R. Hamblin, Mechanisms in photodynamic therapy: part three – photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2 (2005) 91–106.
- [49] X. Feng, Y. Shi, L. Xie, K. Zhang, X. Wang, Q. Liu, P. Wang, Synthesis, characterization, and biological evaluation of a porphyrin-based photosensitizer and its isomer for effective photodynamic therapy against breast cancer, *J. Med. Chem.* 61 (2018) 7189–7201.
- [50] X. Zhao, M. Li, W. Sun, J. Fan, J. Du, X. Peng, An estrogen receptor targeted ruthenium complex as a two-photon photodynamic therapy agent for breast cancer cells, *Chem. Commun. (Camb.)* 54 (51) (2018) 7038–7041.
- [51] I. Roy, T.Y. Ohulchanskyy, H.E. Pudavar, et al., Ceramic-based nanoparticles entrapping water insoluble photosensitizing anticancer drugs: a novel drug-carrier system for photodynamic therapy, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 7860–7865.
- [52] L. Chudal, N.K. Pandey, J. Phan, O. Johnson, X. Li, W. Chen, Investigation of PPIX-Lipo-MnO<sub>2</sub> to enhance photodynamic therapy by improving tumor hypoxia, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 104 (2019), 109979.
- [53] B. Marydasan, R.R. Nair, P.S.S. Babu, D. Ramaiah, S.A. Nair, Picoyl porphyrin nanostructures as a functional drug entrant for photodynamic therapy in human breast cancers, *ACS Omega* 4 (7) (2019) 12808–12816.
- [54] L. Liu, H.-J. Xie, L.-M. M., R. Liu, Z.-B. Su, Y.-C. Cui, Y. Xie, W.-L. Lu, Functional chlorin gold nanorods enable to treat breast cancer by photothermal/photodynamic therapy, *Int. J. Nanomedicine* 13 (2018) 8119–8135.
- [55] P. Zhang, W. Steelant, W. Kumar, M. Scholfield, Versatile photosensitizers for photodynamic therapy at infrared excitation, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 4526–4527.
- [56] B. Chen, B.W. Pogue, T. Hasan, Liposomal delivery of photosensitizing agents, *Expert Opin. Drug Deliv.* 3 (2005) 477–487.
- [57] Y.J. Kim, H.I. Lee, J.K. Kim, C.H. Kim, Y.J. Kim, Peptide 18-4/chlorin e6-conjugated polyhedral oligomeric silsesquioxane nanoparticles for targeted photodynamic therapy of breast cancer, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 189 (2020), 110829.
- [58] Y. Yang, X. Yang, H. Li, C. Li, H. Ding, M. Zhang, Y. Guo, M. Sun, Near-infrared light triggered liposomes combining photodynamic and chemotherapy for synergistic breast tumor therapy, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 173 (2019) 564–570.
- [59] L. Chudal, N.K. Pandey, J. Phan, O. Johnson, X. Li, W. Chen, Investigation of PPIX-Lipo-MnO<sub>2</sub> to enhance photodynamic therapy by improving tumor hypoxia, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 104 (2019), 109979.
- [60] L. Chen, L. Zhou, C. Wang, Y. Han, Y. Lu, J. Liu, X. Hu, T. Yao, Y. Liu, S. Liang, S. Shi, C. Dong, Tumor-targeted drug and CpG delivery system for phototherapy and docetaxel-enhanced immunotherapy with polarization toward M1-Type macrophages on triple negative breast cancers, *Adv Mater* 31 (52) (2019), e1904997.
- [61] D. Bechet, P. Couleaud, C. Frochet, M.L. Viriot, F. Guillemi, M. Barberi-Heyob, Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents, *Trends Biotechnol.* 26 (11) (2008) 612–621.
- [62] I. Roy, T.Y. Ohulchanskyy, H.E. Pudavar, et al., Ceramic-based nanoparticles entrapping water insoluble photosensitizing anticancer drugs: a novel drug-carrier system for photodynamic therapy, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 7860–7865.
- [63] P. Juzenas, W. Chen, Y.P. Sun, et al., Quantum dots and nanoparticles for photodynamic and radiation therapies of cancer, *Adv Drug Deliver Rev* 60 (2008) 1600–1614.
- [64] W. Xu, J. Qian, G. Hou, Y. Wang, J. Wang, T. Sun, L. Ji, A. Suo, Y. Yao, A dual-targeted hyaluronic acid-gold nanorod platform with triple-stimuli responsiveness for photodynamic/photothermal therapy of breast cancer, *Acta Biomater.* 83 (2019) 400–413.
- [65] L. Li, J. Li, Y. Shi, P. Du, Z. Zhang, T. Liu, R. Zhang, Z. Liu, On-demand biodegradable boron nitride nanoparticles for treating triple negative breast cancer with boron neutron capture therapy, *ACS Nano* 13 (12) (2019) 13843–13852.
- [66] M. Triesscheijn, P. Baas, J.H.M. Schellens, F.A. Stewart, Photodynamic therapy in oncology, *Oncologist* 11 (2006) 1034–1044.
- [67] L. Zhang, Y. Gao, S. Sun, Z. Li, A. Wu, L. Zeng, PH-Responsive metal-organic framework encapsulated gold nanoclusters with modulated release to enhance photodynamic therapy/chemotherapy in breast cancer, *J. Mater. Chem. B* 8 (8) (2020) 1739–1747, 71.
- [68] I. Toubia, C. Nguyen, S. Diring, A.M.L. Ali, L. Larue, R. Aoun, C. Frochet, M. Gary-Bobo, M. Kobeissi, F. Odobel, Synthesis and anticancer activity of gold porphyrin linked to malonate diamine platinum complexes, *Inorg. Chem.* 58 (18) (2019) 12395–12406.
- [69] I. Mfonu-Tynga, N.N. Houreld, H. Abrahamse, Evaluation of cell damage induced by irradiated Zinc-Phthalocyanine-gold dendrimeric nanoparticles in a breast cancer cell line, *Biomed. J.* 41 (4) (2018) 254–264.
- [70] R.L. Kane, B.A. Virnig, T. Shanliyan, S.-Y. Wang, T.M. Tuttle, T.J. Wilt, The impact of surgery, radiation, and systemic treatment on outcomes in patients with ductal carcinoma in situ, *Int. J. Fertil. Womens Med.* 41 (2010) 130–133.
- [71] Y. Yang, X. Yang, H. Li, C. Li, H. Ding, M. Zhang, Y. Guo, M. Sun, Near-infrared light triggered liposomes combining photodynamic and chemotherapy for synergistic breast tumor therapy, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 173 (2019) 564–570.
- [72] S. Sun, Y. Xu, P. Fu, M. Chen, S. Sun, Zhao, R.J. Wang, X. Liang, S. Wang, Ultrasound-targeted photodynamic and gene dual therapy for effectively inhibiting triple negative breast cancer by cationic porphyrin lipid microbubbles loaded with HIF1 $\alpha$ -siRNA, *Nanoscale* 10 (42) (2018) 19945–19956.
- [73] W. Xu, J. Qian, G. Hou, Y. Wang, J. Wang, T. Sun, L. Ji, A. Suo, Y. Yao, PEGylated hydrazided gold nanorods for pH-triggered chemo/photodynamic/photothermal triple therapy of breast cancer, *Acta Biomater.* 82 (2018) 171–183.
- [74] D.R. Mokoena, B.P. George, B.H. Abrahamse, Enhancing breast cancer treatment using a combination of cannabidiol and gold nanoparticles for photodynamic therapy, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (19) (2019) 4771.
- [75] J. Bazak, W. Korytowski, W.A. Girotti, Bystander effects of nitric oxide in cellular models of anti-tumor photodynamic therapy, *Cancers (Basel)* 28 (11) (2019) 11.
- [76] Y. Yu, B. Wang, Ch. Guo, F. Zhao, D. Chen, Protoporphyrin IX-loaded laminarin nanoparticles for anticancer treatment, their cellular behavior, ROS detection, and animal studies, *Nanoscale Res. Lett.* 14 (1) (2019) 316.
- [77] I. Toubia, C. Nguyen, S. Diring, A.M.L. Ali, L. Larue, R. Aoun, C. Frochet, M. Gary-Bobo, M. Kobeissi, F. Odobel, Synthesis and anticancer activity of gold porphyrin linked to malonate diamine platinum complexes, *Inorg. Chem.* 58 (18) (2019) 12395–12406.
- [78] J. Bazak, W. Korytowski, W.A. Girotti, Bystander effects of nitric oxide in cellular models of anti-tumor photodynamic therapy, *Cancers (Basel)* 11 (11) (2019), 11 (11).
- [79] L. Chudal, N.K. Pandey, J. Phan, O. Johnson, X. Li, W. Chen, Investigation of PPIX-Lipo-MnO<sub>2</sub> to enhance photodynamic therapy by improving tumor hypoxia, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 104 (2019), 109979.
- [80] B. Marydasan, R.R. Nair, P.S.S. Babu, D. Ramaiah, S.A. Nair, Picoyl porphyrin nanostructures as a functional drug entrant for photodynamic therapy in human breast cancers, *ACS Omega* 4 (7) (2019) 12808–12816.
- [81] Z. Gao, F. Chen, Y. Li, Y. Zhang, K. Cheng, P. An, B. Sun, A small-sized and stable 2D metal-organic framework: a functional nanopatform for effective photodynamic therapy, *Dalton Trans.* 48 (45) (2019) 16861–16868.
- [82] M. Buchner, P.C. Garcia, V. Muhr, A. Kröninger, A.J. Baumner, T. Irsch, D. A. Russell, M.J. Marin, Photosensitizer functionalised luminescent upconverting nanoparticles for efficient photodynamic therapy of breast cancer cells, *Photochem. Photobiol. Sci.* 18 (1) (2019) 98–109.
- [83] N. Laroui, M. Coste, L. Lichon, Y. Bessin, M. Gary-Bobo, G. Pratiel, C. Bouduelle, N. Betache, S. Ulrich, Combination of photodynamic therapy and gene silencing achieved through the hierarchical self-assembly of porphyrin-siRNA complexes, *Int. J. Pharm.* 569 (2019), 118585.
- [84] O. Erdogan, M. Abbak, G.M. Demirbolat, F. Birtekocak, M. Aksel, S. Pasa, O. Cevik, Green synthesis of silver nanoparticles via *Cynara scolymus* leaf extracts: the characterization, anticancer potential with photodynamic therapy in MCF7 cells, *PLoS One* 14 (6) (2019), e0216496.
- [85] H. Liu, W. Jiang, Q. Wang, L. Hang, Y. Wang, Y. Wang, ROS-sensitive biomimetic nanocarriers modulate tumor hypoxia for synergistic photodynamic chemotherapy, *Biomater. Sci.* 7 (9) (2019) 3706–3716.
- [86] E.Ch. Anigo, B.P.A. George, H. Abrahamse, The role of photodynamic therapy on multidrug resistant breast cancer, *Cancer Cell Int.* 19 (2019) 91.
- [87] P. Palasuberniam, D. Kraus, M. Mansi, A. Brauni, R. Howley, K.A. Myers, B. Chen, Ferrochelatase deficiency abrogated the enhancement of aminolevulinic acid-mediated protoporphyrin IX by iron chelator deferoxamine, *Photochem. Photobiol.* 95 (4) (2019) 1052–1059.
- [88] L. Deng, D. Sheng, M. Liu, L. Yang, H. Ran, P. Li, X. Cai, Y. Sun, Z. Wang, A near-infrared laser and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activated bio-nanoreactor for enhanced photodynamic therapy of hypoxic tumors, *Biomater. Sci.* 8 (3) (2020) 858–870.
- [89] L. Chen, L. Zhou, C. Wang, Y. Han, Y. Lu, J. Liu, X. Hu, T. Yao, Y. Liu, S. Liang, S. Shi, C. Dong, Tumor-targeted drug and CpG delivery system for phototherapy and docetaxel-enhanced immunotherapy with polarization toward M1-Type macrophages on triple negative breast cancers, *Adv. Mater.* 52 (2019) e1904997.
- [90] B.A. Gasterson, R.D. Gelber, A. Goldhirsch, Y. Hachitanda, S. Oda, A prognostic importance of c-erbB2 expression in breast cancer, *J. Clin. Oncol.* 10 (1992) 1049–1056.
- [91] J. Zhang, S. Zhang, Y. Liu, M. Su, X. Ling, F. Liu, Y. Ge, M. Bai, Combined CB2 receptor agonist and photodynamic therapy synergistically inhibit tumor growth in triple negative breast cancer, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 24 (2018) 185–191.
- [92] I. Toubia, C. Nguyen, S. Diring, A.M.L. Ali, L. Larue, R. Aoun, C. Frochet, M. Gary-Bobo, M. Kobeissi, F. Odobel, Synthesis and anticancer activity of gold porphyrin linked to malonate diamine platinum complexes, *Inorg. Chem.* 58 (18) (2019) 12395–12406.
- [93] R. Zhao, X. Liang, B. Zhao, M. Chen, R. Liu, S. Sun, X. Yue, S. Wang, Ultrasound assisted gene and photodynamic synergistic therapy with multifunctional FOXA1-siRNA loaded porphyrin microbubbles for enhancing therapeutic efficacy for breast cancer, *Biomaterials* 173 (2018) 58–70.
- [94] Y.J. Kim, H.I. Lee, J.K. Kim, C.H. Kim, Y.J. Kim, Peptide 18-4/chlorin e6-conjugated polyhedral oligomeric silsesquioxane nanoparticles for targeted photodynamic therapy of breast cancer, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 189 (2020), 110829.
- [95] R. Zhao, X. Liang, B. Zhao, M. Chen, R. Liu, S. Sun, X. Yue, S. Wang, Ultrasound assisted gene and photodynamic synergistic therapy with multifunctional FOXA1-siRNA loaded porphyrin microbubbles for enhancing therapeutic efficacy for breast cancer, *Biomaterials* 173 (2018) 58–70.

- [96] H. Zhang, K. Liu, Z. Xue, H. Yin, H. Dong, W. Jin, X. Shi, H. Wang, H. Wang, High-voltage pulsed electric field plus photodynamic therapy kills breast cancer cells by triggering apoptosis, *Am. J. Transl. Res.* 10 (2) (2018) 334–351.
- [97] S.G. Bown, Photodynamic therapy for photochemists, *Philos. Trans. A Math. Phys. Eng. Sci.* 371 (2013), 20120371.
- [98] F. Hammerer, F. Poyer, L. Fournais, S. Chen, G. Garcia, M.P. Teulade-Fichou, P. Maillard, F. Mahuteau-Betzer, Mitochondria-targeted cationic porphyrin-triphenylamine hybrids for enhanced two-photon photodynamic therapy, *Bioorg. Med. Chem.* S0968-0896 (17) (2017) 31795–31799.
- [99] F.Z. Leandro, J. Martins, A.M. Fontes, A.C. Tedesco, Evaluation of theranostic nanocarriers for near-infrared imaging and photodynamic therapy on human prostate cancer cells, *Colloids Surf. Biointerfaces* 154 (2017) 341–349.
- [100] J. Wu, Q. Xiao, N. Zhang, C. Xue, A.W. Leung, H. Zhang, Q.J. Tang, C. Xu, Palmatine hydrochloride mediated photodynamic inactivation of breast cancer MCF-7 cells: effectiveness and mechanism of action, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 15 (2016) 133–138.
- [101] L.A. Quayle, M.G. Pereira, G. Scheper, T. Wiltshire, R.E. Peake, I. Hussain, C. A. Rea, T.E. Bates, Anti-angiogenic drugs: direct anti-cancer agents with mitochondrial mechanisms of action, *Oncotarget* 8 (51) (2017) 88670–88688.
- [102] R.R. Wakaskar, Passive and active targeting in tumor microenvironment, *Int. J. Drug Dev. Res.* 9 (2017) 37–41.
- [103] P.A. Sotiropoulou, M.S. Christodoulou, A. Silvani, C. Herold-Mende, D. Passarella, Chemical approaches to targeting drug resistance in cancer stem cells, *Drug Discov. Today* 19 (2014) 1547–1562.
- [104] X. Yu, G. Hu, Z. Zhang, F. Qiu, X. Shao, X. Wang, H. Zhan, Y. Chen, Y. Deng, J. Huang, Retrospective and comparative analysis of  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi breast specific gamma imaging versus mammography, ultrasound, and magnetic resonance imaging for the detection of breast cancer in Chinese women, *BMC Cancer* 16 (2016) 450.
- [105] M. Triesscheijn, P. Baas, J.H.M. Schellens, F.A. Stewart, Photodynamic therapy in oncology, *Oncologist* 11 (2006) 1034–1044.
- [106] M. Pilewski, M. Morrow, Margins in breast cancer: how much is enough? *Cancer* 124 (7) (2018) 1335–1341.
- [107] L. Chen, L. Zhou, C. Wang, Y. Han, Y. Lu, J. Liu, X. Hu, T. Yao, Y. Liu, S. Liang, S. Shi, C. Dong, Tumor-targeted drug and CpG delivery system for phototherapy and docetaxel-enhanced immunotherapy with polarization toward M1-type macrophages on triple negative breast cancers, *Adv. Mater.* 52 (2019), e1904997.
- [108] W. Liu, K. Zhang, L. Zhuang, J. Liu, W. Zeng, J. Sh, Z. Zhang, Aptamer/ photosensitizer hybridized mesoporous  $\text{MnO}_2$  based tumor cell activated ROS regulator for precise photodynamic therapy of breast cancer, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 184 (2019), 110536.
- [109] D.R. Mokoena, B.P. George, B.H. Abrahamse, Enhancing breast Cancer treatment using a combination of cannabidiol and gold nanoparticles for photodynamic therapy, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 4771.
- [110] Y. Yu, B. Wang, Ch. Guo, F. Zhao, D. Chen, Protoporphyrin IX-loaded laminarin nanoparticles for anticancer treatment, their cellular behavior, ROS detection, and animal studies, *Nanoscale Res. Lett.* 14 (1) (2019) 316.
- [111] O. Erdogan, M. Abbak, G.M. Demirbolal, F. Birtokocak, M. Aksel, S. Pasa, O. Cevik, Green synthesis of silver nanoparticles via *Cynara scolymus* leaf extracts: The characterization, anticancer potential with photodynamic therapy in MCF7 cells, *PLoS One* 14 (6) (2019) e0216496.

Terapia fotodynamiczna (PDT) jest rodzajem światłoterapii. Jej działanie polega na reakcji fotodynamicznej, która opiera się na kooperacji trzech czynników: światła, tlenu i fotouczulacza (PS). Fotouczulacz zostaje wprowadzony do tkanki guza i aktywowany światłem. Warunkiem zainicjowania reakcji fotodynamicznej jest korelacja pasma emisji światła z pasmem absorpcji PS. Po pochłonięciu fotonu (energii) światła, cząstka PS zostaje pobudzona ze stanu podstawowego  $S_0$  do stanu singletowego  $S_1$  a następnie do stanu trypletowego  $T_1$ . W zależności od stężenia tlenu zachodzą dwa mechanizmy. Foton energii (elektron) jest z  $T_1$  przeniesiony na molekule substratu (tkanki guza)- I mechanizm lub bezpośrednio na tlen – II mechanizm. Wspólnym mianownikiem obu reakcji jest powstanie reaktywnych form tlenu (ang. ROS) działających cytotoksycznie na tkankę guza. Tlen singletowy oraz wolne rodniki utleniają kwasy nukleinowe, cholesterol, fosfolipidy, aminokwasy. W związku z tym dochodzi do destrukcji błon komórkowych oraz organelli komórkowych takich jak jądro komórki, lizosomy, mitochondria czy aparat Golgiego. Reakcje te są zmianami pierwotnymi i mogą zachodzić *in vitro*. Fotouczulacz w zależności od miejsca położenia guza, może być zaaplikowany w postaci maści lub podany dożylnie. Zostaje on

wchłonięty przez komórki, ale tylko komórki chore (nowotworowe) zatrzymują go dłużej, ponieważ z komórek zdrowych jest on szybko usuwany. W badaniach *in vivo*, po podaniu fotouczulacza oprócz zmian opisanych wcześniej, zmienia się metabolizm wapnia i aktywność kinaz białkowych, a za ich pośrednictwem dochodzi do zmiany konfiguracji białek. Zmiany w mitochondriach aktywują apoptozę oraz uwolnienie kaspaz, cytochromu c i ceramidów. Wtórnie powstają zakrzepy w świetle naczyń krwionośnych, akumulacja leukocytów, zwężenie naczyń, co jest powodem niedokrwienia, niedotlenienia tkanki guza, a w konsekwencji martwicy. Przewagą PDT nad innymi formami terapii jest jej miejscowy zasięg działania oraz brak destrukcji komórek poza obszarem jej działania. W związku z tym może pełnić rolę terapii uzupełniającej w niszczeniu resztkowej tkanki guza po niedostatecznym leczeniu chirurgicznym, leczeniem radioterapią, czy chemioterapią. Jako metoda o miejscowym zasięgu ma przewagę nad wyżej wymienionymi, w których trudno jest uzyskać precyzyjne całkowite usunięcie nowotworu, bez naruszenia ważnych tkanek w sąsiedztwie. Nie mówiąc o chemioterapii, która jest ogólnoustrojowa. Obecnie PDT ma zastosowanie jako podstawowe leczenie małych, powierzchownie umiejscowionych guzów, albowiem zasięg terapeutyczny obejmuje tkanki na głębokość do 10mm. Nowoczesna technika światłowodowa pozwala na doprowadzenie światła do głębiej położonych guzów. Obiecujące wyniki badań nad zastosowaniem PDT w raku piersi dotyczą ognisk raka położonych powierzchownie. Ważnymi elementami dotyczącymi stosowania PDT w terapii klinicznej raka piersi jest odpowiednie ustandaryzowanie protokołów zawierających wybrany fotouczulacz: łatwy do syntezy oraz dopasowany do rodzaju komórki i jej środowiska fizykochemicznego, mający niską toksyczność i wysoką fototoksyczność, selektywnie gromadzący się w tkance guza, mający spektrum absorpcji fali świetlnej bliskiej podczerwieni o długości 650 nm-850nm przenikającej przez struktury położone przed guzem i różniącej się od spektrum absorpcji melaniny czy hemoglobiny, być dobrze rozpuszczalny w wodzie i łatwo usuwalny z organizmu.

Obecnie jest kilka zatwierdzonych fotouczulaczy dopuszczonych do terapii PDT. W przyszłości zapewne znaczącą rolę odegrają fotouczulacze nowej generacji np. typu PUNP (ang. Photon Upconverting Nanoparticles). Ich składowe to nanocząsteczka i związek światłoczuły. Ich rdzeń może przekształcać energię uzyskaną z fotonów – PUNP. Ich wyjątkowość polega na tym, że promieniowanie

wytwarzane przez rdzeń ma wyższą energię niż energia pochłaniana. Innym typem są transformujące nanocząstki funkcjonalizowane (ang. Upconverting nanoparticles, UCNP). UCNP przesuwają długość fali wzbudzenia do produkcji bliskiej podczerwieni (NIR). Umożliwia to głębszą penetrację tkanek. Ważne są odpowiednie źródła światła, których widmo emisji odpowiada widmu absorpcji fotouczulacza i odpowiednia wysokość dawki światła. Pojęcie teranostyki oznacza połączenie diagnostyki i terapii w celu celowanego leczenia. Obecnie wielką nadzieję wiąże się z nanomateriałami.. Cząsteczki te umożliwiają diagnozowanie procesów chorobowych, a jednocześnie pełnią rolę terapeutyczną. Połączenie nanomateriałów z fotouczulaczami i możliwość manipulowania wielkością uzyskanych cząstek, zwiększa skuteczność terapii, niweluje jej skutki uboczne. Przykładem zbudowanych nanoplatform będących przedmiotem badań są np. nanoplatfoma (Ce6-BSA-BC-NP) - zawierająca Chlorin e6, nanocząsteczkę albumin BSA oraz beta-karoten (BC) jako nośnik i środek cieniujący, (NP)-zwiększyła dystrybucję i cytotoksyczność oraz swoistość fotouczulacza, inna nanoplatfoma (PPIX-Lipo-MnO<sub>2</sub>)- zawierająca protoporfirynę IX(PPIX) umieszczoną w warstwie liposomowej i pokryta nanocząsteczkami MnO<sub>2</sub>, po reakcji z tkankowym H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wytwarzała tlen, działający synergistycznie z fotouczulaczem, co wzmacnia ogólną toksyczność nanokompozytu, nanoplatfoma-(FA-CuS/ DTX @ PEI-PpIX-CpG, oznaczona jako FA-CD @ PP-CpG) zawierającej cytostatyk przeciwnowotworowy Docetaxel (DTX) i fotouczulacz (PpIX)-po naświetlaniu odnotowano synergistyczne działanie docetaxelu i fotouczulacza. Układ ten działał również promująco na limfocyty cytotoksyczne T i może być wykorzystany w terapii anty PD-L1 w trójjemnym raku piersi (TNBC). Nanocząstka polimerowa zawierająca 78 nm, chlorynę e6, docetaxel i anty-Twist siRNA (CDTN) aktywowana światłem poprawia odpowiedź guza pierwotnego i przerzutów na docetaxel i siRNA anty-Twist 2,5 krotnie, w porównaniu z samym docetaxelem. Obecnie obserwacje przeprowadzono w oparciu o badania *in vivo* na liniach komórkowych 4T1 raka sutka myszy (w obrazach histopatologicznych występowały charakterystyczne cechy martwicy i apoptozy) oraz *in vitro* na liniach komórkowych ludzkiego raka piersi (MDA-MB-231, MCF-7 i BT-474). Po pierwszym badaniu klinicznym z zastosowaniem PDT w pierwotnym raku piersi, obserwacja pacjentów przez 50 miesięcy, nie wykazała żadnych działań niepożądanych. Tak jak w konwencjonalnej terapii przedoperacyjnej,

udowodniono, że wykonywanie MRI przed PDT i kilka dni później, jest potencjalnym narzędziem do dokumentowania charakteru i zakresu zmian związanych z PDT. Inne badania dotyczą selektywnego dostarczania fotouczulaczy poprzez sprzężanie ich z liposomami, lipoproteinami lub z przeciwciałami, lepszego oznakowania w celu poprawy widoczności guza, szybszego uwalniania z organizmu.

Rak piersi jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym u kobiet. Obecnie chemioterapia, radioterapia oraz chirurgia są głównymi i uzupełniającymi się metodami leczenia raka piersi. Każda z tych metod oprócz działania terapeutycznego niesie ze sobą powikłania miejscowe w postaci pozostawienia blizn, zwłóknień i ubytków mogących zaburzyć motorykę ciała lub w przypadku chemioterapii powodować uszkodzenie toksyczne tkanek ważnych życiowo organów. Obecnie poszukuje się drogą eksperymentów głównie *in vitro*, metod diagnostycznych i terapeutycznych nieinwazyjnych i działających selektywnie, miejscowo. Wprowadzenie przedoperacyjnej chemioterapii i hormonoterapii (NAT), w niektórych przypadkach przyczyniło się do zmniejszenia tkanki guza oraz redukcji zakresu zabiegu operacyjnego i wykonywania operacji oszczędzających piersi i tkankę limfatyczną pachy, dzięki wykonywaniu procedury węzła wartownika. Rutynowa diagnostyka obrazowa raka piersi opiera się na komplementarnych badaniach USG, mammografii i rezonansu magnetycznego. Metody te zawodzą w przypadku małych, wielogniskowych skupisk raka np. pozostałych po leczeniu chemioterapią, hormonoterapią lub radioterapią. W praktyce klinicznej pozostałą po leczeniu tkankę guza piersi usuwa się chirurgicznie i bada histopatologicznie w mikroskopie świetlnym. Na tej podstawie wiadomo, że odpowiedź na leczenie zależy od biologii raka, środowiska osobniczego tkanek pacjenta, dawki i rodzaju leku. Ewaluacja różnych zmian morfologicznych jakościowych i ilościowych obserwowanych w badaniach histopatologicznych oraz przełożenie tych obrazów na widoczne w rezonansie magnetycznym, jest obecnie priorytetowe. Postępem jest ocena obrazowania MRI ze wzmocnieniem ultra-małym, superparamagnetycznym tlenkiem żelaza (USPIO). Obiecującą metodą do miejscowego leczenia raka piersi jest metoda fotodynamiczna (FDT/FDD) lub fototermiczna (FTT). FDT jest już stosowana w terapii małych położonych powierzchownie nowotworów i zmian zapalnych, w tym w raku Pageta piersi lub wznowie raka w tkance powłok klatki piersiowej po

mastektomii. Uzdatnienie zastosowania FDT/FDD w guzach piersi położonych głęboko, to doprowadzenie źródła światła i optymalizacja głębokości jego wnikania, polepszenie utlenowania tkanki guza oraz synteza fotouczulaczy. Przyszłością jest konstrukcja nanoplatform, w których poszczególne składowe stanowią nanonośniki ( np. krzemu SiNP), chemioterapeutyk, substancje wiążące się z receptorami raka, fotouczulacz. Działanie synergistyczne lub wzajemnie promujące te składowe pozwala na optymalizację leczenia. Przykłady to koniugaty: antyestrogen-porfiryna, sacharyd-lek. W jednym z doświadczeń poprzez ocenę różnic mikro-RNA w liniach komórek raka piersi MDA-MB-231 leczonych chemioterapią i nie leczonych, zbadano rodzaj szlaków decydujących o lekooporności. Duże znaczenie ma opracowanie metod eksperymentalnych umożliwiających doświadczenia *in vitro* na modelach tkankowych trójwymiarowych (3D), naśladujących warunki fizjologiczne organizmu. Dobrze poznane obrazy histopatologiczne przed leczeniem i po chemioterapii lub po PDT/PTT, mogą być bazą do eksperymentów obrazowych *in vitro* oraz do budowy modeli tkankowych. W pracy przedstawiono bogaty przegląd literatury złożony ze 111 pozycji.

Article

# Histopathological Analysis of the Effect of Photodynamic Action on Post-Chemotherapy Excised Breast Cancer Tissue

Elżbieta Ostańska <sup>1</sup>, Edyta Barnaś <sup>2</sup>, Dorota Bartusik-Aebisher <sup>3</sup>, Klaudia Dynarowicz <sup>4</sup>,  
Magdalena Szpunar <sup>5</sup>, Joanna Skreń-Magierło <sup>2</sup> and David Aebisher <sup>6,\*</sup>

<sup>1</sup> Clinical Department of Pathology, Frederick Chopin Clinical Provincial Hospital No. 1, 35-055 Rzeszów, Poland; elaostanska@gmail.com

<sup>2</sup> Department of Midwifery, Medical College of the University of Rzeszów, University of Rzeszów, 35-959 Rzeszów, Poland; ebarnas@interia.eu (E.B.); joannaskret@wp.pl (J.S.-M.)

<sup>3</sup> Department of Biochemistry and General Chemistry, Medical College of the University of Rzeszów, University of Rzeszów, 35-959 Rzeszów, Poland; dbartusikaebisher@ur.edu.pl

<sup>4</sup> Center for Innovative Research in Medical and Natural Sciences, Medical College of the University of Rzeszów, University of Rzeszów, 35-310 Rzeszów, Poland; kdynarowicz@ur.edu.pl

<sup>5</sup> Students English Division Science Club, Medical College of the University of Rzeszów, 35-959 Rzeszów, Poland; szpunarmag@gmail.com

<sup>6</sup> Department of Photomedicine and Physical Chemistry, Medical College of the University of Rzeszów, University of Rzeszów, 35-959 Rzeszów, Poland

\* Correspondence: daebisher@ur.edu.pl



Citation: Ostańska, E.; Barnaś, E.; Bartusik-Aebisher, D.; Dynarowicz, K.; Szpunar, M.; Skreń-Magierło, J.; Aebisher, D. Histopathological Analysis of the Effect of Photodynamic Action on Post-Chemotherapy Excised Breast Cancer Tissue. *Medicina* 2022, 58, 700. <https://doi.org/10.3390/medicina58060700>

Academic Editors: Konstantinos Dimas and Andrea Sisti

Received: 18 April 2022

Accepted: 23 May 2022

Published: 25 May 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** *Background and objectives:* Breast cancer is the most commonly diagnosed cancer in women and its mortality is increasing. Therefore, research to improve treatment is of paramount importance. One method of treatment is photodynamic therapy. Photodynamic therapy selectively stimulates apoptosis in photosensitizer-treated neoplastic breast cells as a result of cytotoxic singlet oxygen generation via collisions between triplet excited state photosensitizer and triplet ground state oxygen upon tissue irradiation. The aim of this study was to evaluate the effects of photodynamic action on cancerous breast tissue samples as a model of photodynamic therapy. *Materials and Methods:* Breast cancer tissue samples were obtained from post-operative material and the patterns of histopathological changes in breast cancer tissue before and after photodynamic action on post-chemotherapy tissue were evaluated. Excised tissue samples were obtained from 48 female breast cancer patients who had previously undergone chemotherapy. Breast cancer tissues for this study were taken from macroscopically visible tumors larger than 10 mm. Histopathological analysis was performed to evaluate any morphological changes prior to and after photodynamic action on the post-chemotherapy tissue samples. Eighteen breast cancer tissue samples were analyzed before chemotherapy, fifteen after chemotherapy, and fifteen samples were analyzed after chemotherapy and application of photodynamic action. The photosensitizer Rose Bengal was applied to the samples subjected to photodynamic action. *Results:* Photodynamic action on post-chemotherapy neoplastic tissue showed histological changes under a light microscope. The results showed that morphological changes in breast cancer tissues after chemotherapy and photodynamic action were dependent on the concentration of Rose Bengal. In all cases, follow-up imaging showed tumor shrinkage of an average of 35% from baseline size. *Conclusions:* Histopathological examination revealed photosensitizer-concentration-dependent changes after photodynamic action in excised post-chemotherapy tissue. The effects of photodynamic action observed in this study suggest that the application of photodynamic therapy after chemotherapy can aid in breast cancer cell eradication.

**Keywords:** photodynamic therapy; histology; breast cancer; photosensitizer

## 1. Introduction

Breast cancer is the most commonly diagnosed cancer with approximately 2.3 million new cases diagnosed in 2020 [1]. The main treatments for breast cancer are surgery [2],

chemotherapy [3], radiation therapy [4], hormone therapy [5], and targeted therapy that uses drugs to target specific genes [6] and proteins [7] that are involved in the growth and survival of breast cancer cells. In recent years, photodynamic therapy (PDT) has been an interesting therapeutic approach in the treatment of cancer [8]. Currently, published studies show that PDT in combination with chemotherapy has become an available cancer treatment which uses functionalized organic nanoparticles (NPs) for effective PDT treatment of breast cancer [9]. One more possible solution to increase effectiveness for PDT in breast cancer could be the use of gold nanoparticles (AuNPs) in combination with cannabidiol (CBD), a Cannabis derivative from the *Cannabis sativa*; this has also been reported to be effective against breast cancer cell lines [10]. Both of the aforementioned examples have highlighted targeted drug delivery systems that improve the biodistribution of photosensitizers (PSs) in breast cancer tumors. The advantages that arise from a combination of PDT and chemotherapy are (1) high selectivity and (2) a decrease in breast cancer drug resistance. Due to metastases and recurrences, complete elimination of breast cancer is a significant challenge. Modern oncological research shows that cancer is not a simple local disease, but a local manifestation of a systemic disease. Current cancer treatments make it difficult to remove all the cancer cells from the body. Traditional strategies, including chemotherapy and radiotherapy, often lead to the development of cancer cell resistance to treatment [1,11]. Consequently, tumor relapse and metastasis are inevitable after treatment. Combining chemotherapy with photodynamic action offers the possibility of an effective treatment of cancer and an improvement in the living conditions of patients suffering from it. The main aim of this experiment was to histologically evaluate *ex vivo* breast cancer tumor tissue sections that were treated with several Rose Bengal concentrations and irradiated with visible light to incite photodynamic action. Histological analysis is the gold standard for tissue examination and this methodology is useful for diagnostics, and for monitoring the presence, distribution and accumulations of cellular degradation and accumulations of cellular degradation products arising from tissue treatment [12].

## 2. Materials and Methods

All studies were performed under the approval (No. 10/11/2018) of the Bioethics Committee at the University of Rzeszów. The study was conducted from March 2019 to December 2020. Patients were selected for the study with core needle biopsy and Vacuum-Assisted Biopsy clinical stage IIB and III (locally advanced and metastatic breast cancer) diagnosed breast cancer in whom, based on imaging tests and immunohistochemical examination of predictive factors (ER, PR, Ki67, HER2), cycles of neoadjuvant chemotherapy were implemented. These included 4 cycles of the AC regimen (ADM + CTX) (Adriamycin + Cyclophosphamide) administered every 3 weeks and 10–12 doses of Paclitaxel. In two HER2 (+) patients, 5 doses of Herceptin were administered. Approximately 6 months after the start of treatment, the patients underwent routine mastectomy surgery at the Department of General and Oncological Surgery, Provincial Hospital No. 1 in Rzeszów. Breast surgical tissues were delivered to the Department of Pathomorphology. All 48 female breast cancer tissue samples were divided into three groups. The first group of samples were breast cancer tissues prior to chemotherapy ( $n = 18$ ), the second group ( $n = 15$ ) were breast cancer tissues after chemotherapy that were subjected to a histopathological analysis, and the third breast cancer tissues group ( $n = 15$ ) were post-chemotherapy samples that were used for the application of photodynamic action with Rose Bengal (RB) prior to histopathological analysis. Rose Bengal concentrations were 0.02 g/mL (5 samples), 0.03 g/mL (5 samples), and 0.05 g/mL (5 samples). Breast cancer was excised from solid tumors larger than 10 mm in diameter and stored in a BioBank at  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  prior to use.

Post-operative breast cancer tissue samples were fixed for 24 h in 10% buffered formalin. Then, specimens were routinely taken for further histopathological examinations. Sections were left in 10% buffered formalin until the next day for further fixation. The next steps during histopathological procedures were (1) formalin decanting, (2) rinsing in running water (3) further fixation in 70% alcohol, (4) preparation in a Leica TP 1020 tissue

processor with ethyl alcohols, xylene and paraffin, (5) production of paraffin blocks using the AP280 sealer, (6) cutting tissue sections from blocks using Rotary microtome RM2245, (7) Hematoxylin–Eosin (H + E) routine staining using the Leica ST5020, and (8) securing sections on slides using the Leica SV5030 cap.

Hematoxylin+Eosin is the most common staining in which the cytoplasm of cells is shown in pink and the nucleus in blue. Routine histopathological diagnosis was performed with a Leica DM1000 LED light microscope. Fifteen breast tissue samples were selected for photodynamic action based on routine histopathological examinations.

Rose Bengal disodium salt (95%) was purchased from Sigma-Aldrich and used as received. Water used for preparation of Rose Bengal stock solution was purified with an AquaB Duo reverse osmosis water treatment system, Fresenius Medical Care, Singapore Pte. Ltd. Rose Bengal was applied at concentrations of 0.02 g/mL, 0.03 g/mL and 0.05 g/mL. Table 1 summarizes the concentration of Rose Bengal applied to the excised tissues.

**Table 1.** Rose Bengal concentrations applied to breast cancer tissue samples.

Rose Bengal Concentration Values
0.02 g/mL used for 5 samples after chemotherapy
0.03 g/mL used for 5 samples after chemotherapy
0.05 g/mL used for 5 samples after chemotherapy

Once received from the Pathomorphological Department, the breast cancer tissues were stored in 15 mL of deionized water in 15 mL polypropylene graduated conical test tubes fitted with a screw tight cap (Kartell Labware, Milano, Italy) at 5 °C. The dimensions of the breast cancer tissues were approximately 6 mm × 4 mm × 3 mm. A 10 mL syringe and an injection needle (0.8 mm) were used to deliver Rose Bengal solution to the breast cancer tissue. Photodynamic action was initiated by irradiation in 5 separate trials for each Rose Bengal concentration (0.02 g/mL, 0.03 g/mL, and 0.05 g/mL).

Before tissue illumination, each sample was covered with 0.1 mL RB. This amount of RB allowed for complete coverage of the examined tissues. Subsequently, the tissues were covered and kept from the light for 30 min at 18 °C to allow the Rose Bengal to penetrate into the tissue. For eliciting photodynamic action, a solid-state laser (LD Pumped All-Solid-State Green Laser, MGL-III-532 nm/300 mW) coupled to a fiber optic cable was used to deliver 532 nm light to the treated tissue samples for 15 min. The light cone covered the entire tumor and was distributed uniformly on the tissue surface. In addition, the distance of the light source from the tissue surface was selected so as not to cause excessive heating or drying of the tissue. The temperature on the surface of the tissue after 15 min of exposure did not exceed 30 °C. The radiant power of the 532 nm light was measured with a Newport power meter model 1918-C.

In the next step, irradiated tissue was then fixed in 10% buffered formalin, and subjected to histopathological preparation. Tissue sample images before treatment, after chemotherapy, after chemotherapy and photodynamic action were compared using light microscopy (Leica DM1000 LED).

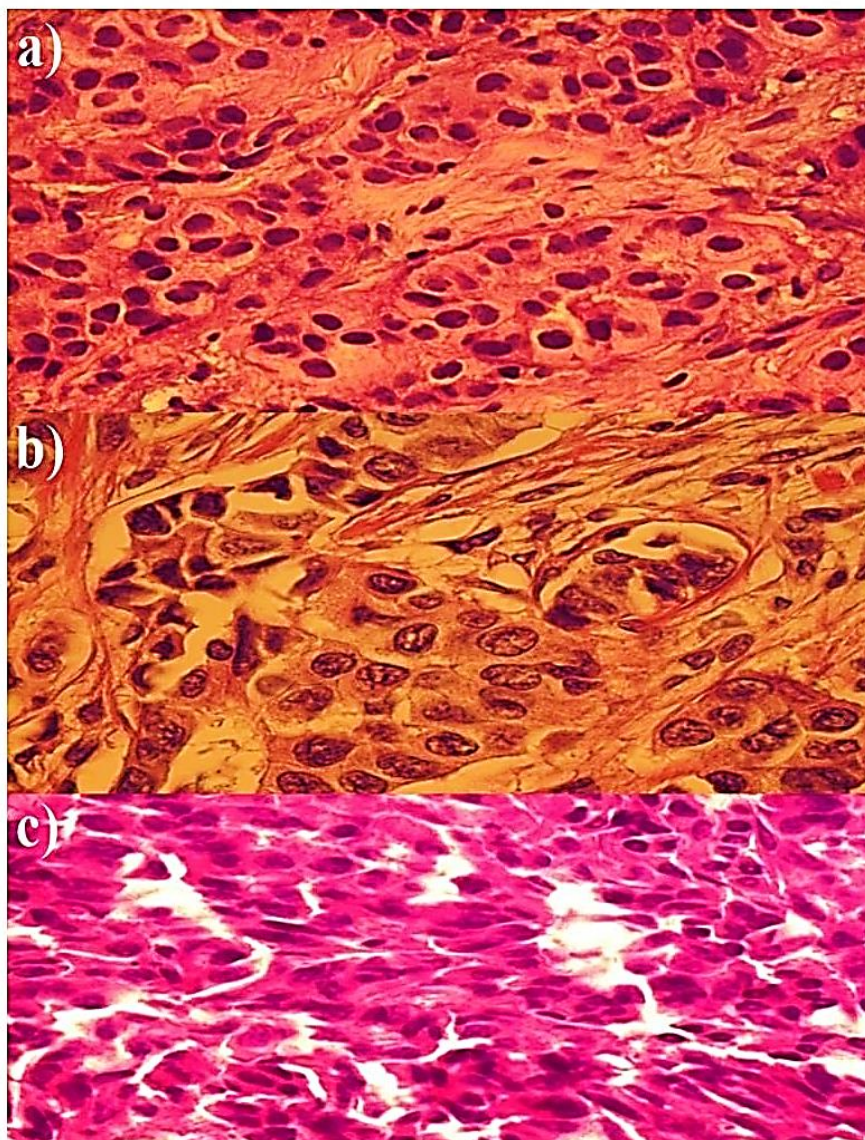
### 3. Results

We evaluated the differences in tissue by comparing microscopic images before chemotherapy, after chemotherapy and after chemotherapy and photodynamic action. The results showed that morphological changes of breast cancer tissues after chemotherapy and photodynamic action were dependent on the concentration of Rose Bengal.

As the concentration of Rose Bengal increased, chromatin condensation of cancer cells became more apparent and, at the same time cell, nuclei pyknosis (irreversible chromatin condensation in the nucleus of a cell undergoing necrosis or apoptosis) was enhanced. In histopathological studies of the 18 breast cancer tissue samples before chemotherapy, images showed loss of healthy architecture and increased number of tumor cells. In the

15 samples of breast cancer tissue after chemotherapy, a change in histological differentiation was seen.

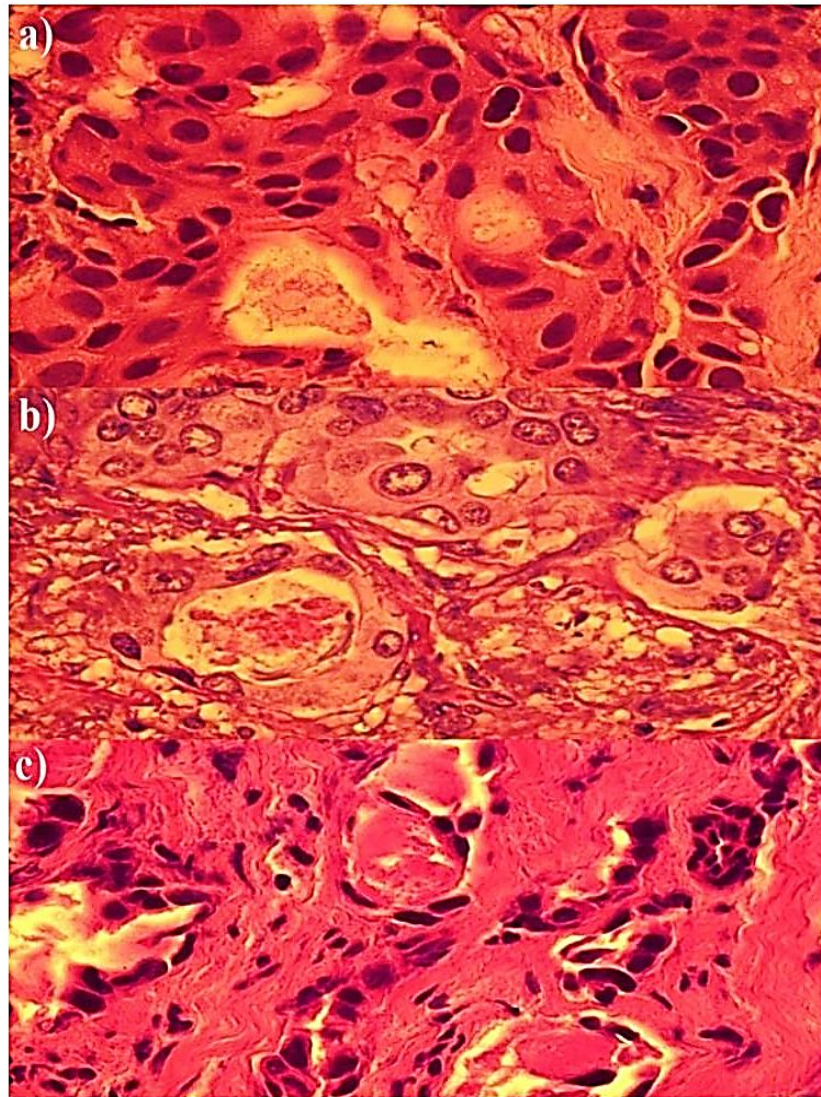
The histopathological changes after chemotherapy varied between patients. In 15 breast cancer samples after chemotherapy, changes involving the enlargement and contraction of the nucleus and neoplastic cells are visible. In all cases, follow-up imaging showed tumor shrinkage of an average of 35% from baseline size. Figure 1 shows representative histopathological images of breast cancer tissue: (a) before chemotherapy, (b) after chemotherapy, and (c) after chemotherapy and photodynamic action.



**Figure 1.** Image of histopathological material of cancer tissue (a) before chemotherapy and PDT, (b) after chemotherapy, (c) after chemotherapy and photodynamic action (Rose Bengal 0.02 g/mL).

Figure 1b (after chemotherapy) shows gland-shaped abnormalities. Additionally, edema and increased eosinophilic character of the cytoplasm were observed. Moreover, some cancer cells have aquatic lesions and nuclear pyknosis. In turn, Figure 1c (after chemotherapy and photodynamic action) shows more advanced destruction of cancer glands. Most of the cells were found to be ruptured. In addition, the cytoplasm became homogeneous and eosinophilic with increased pyknosis and deformation of the cell nuclei.

Figure 2 shows histopathological images of breast cancer tissue: (a) before chemotherapy, (b) after chemotherapy, and (c) after chemotherapy and photodynamic action (Rose Bengal 0.03 g/mL).

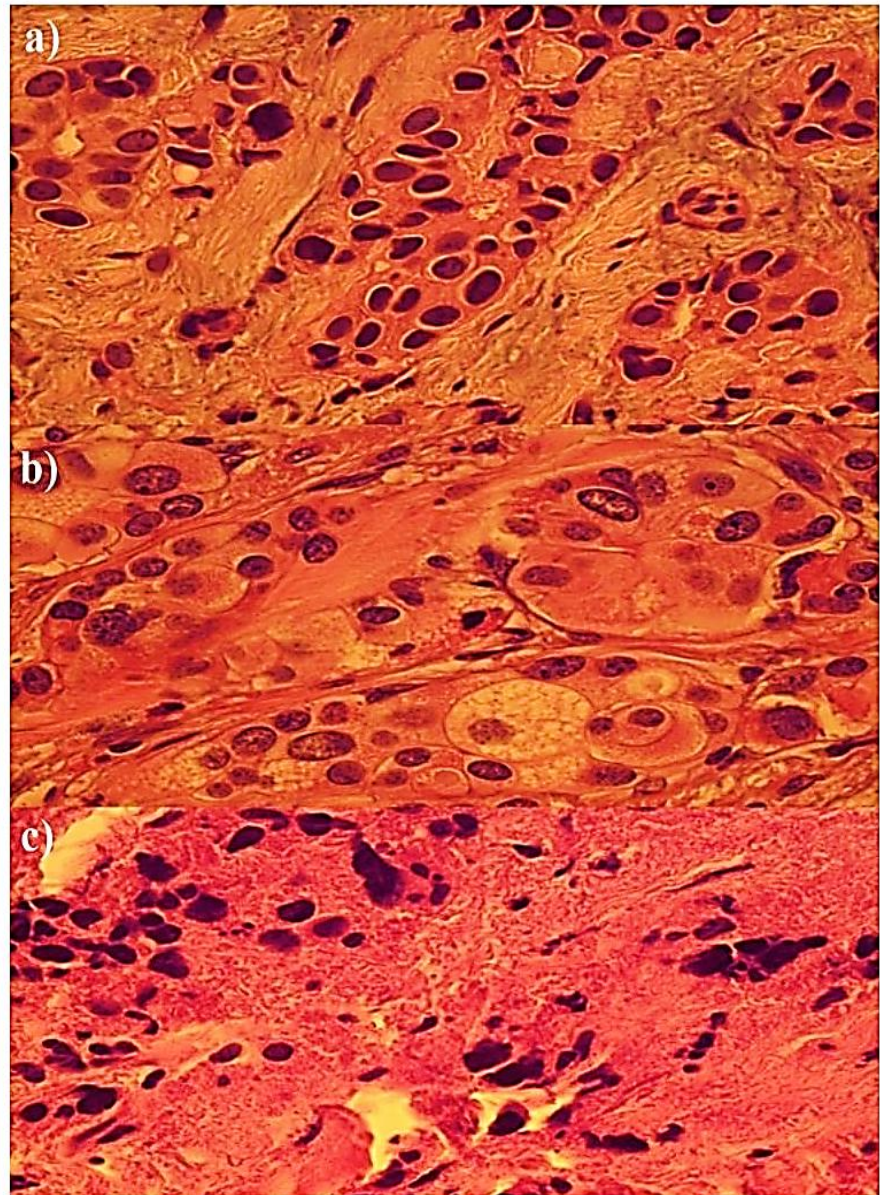


**Figure 2.** The representative image of histopathological material of cancer tissue (a) before chemotherapy, (b) after chemotherapy, and (c) after chemotherapy and photodynamic action (Rose Bengal 0.03 g/mL).

Figure 2b (after chemotherapy) presents slight changes in the form of cytoplasmic edema, with the formation of aquatic lesions. Cells merge, and the cell membrane is lost. There are slight changes in the nuclei. In turn, Figure 2c (after chemotherapy and photodynamic action) shows complete visible degradation of the cytoplasm, nuclei with bizarre blotchy shapes, and chromatin homogenization.

Figure 3b (after chemotherapy) shows current condensation of nuclear chromatin in a few cancer cells. In turn, Figure 3c (after chemotherapy and photodynamic action) presents visible homogenization of the cytoplasm with the disappearance of cytoplasmic membranes, and degradation of nuclear chromatin with the presence of a few changes similar to apoptosis. Figure 3b (after chemotherapy) shows advanced aquatic changes in the cytoplasm and nuclear pyknosis. In turn, Figure 3c (after chemotherapy and photodynamic

action) shows the disappearance of cytoplasmic membranes, further intensification of pyknosis, partially complete homogenization and chromatin breakdown.



**Figure 3.** Histopathological image of breast cancer tissue, (a) before chemotherapy, (b) after chemotherapy, (c) after chemotherapy and photodynamic action.

In this study, we used a Rose Bengal solution with concentrations of 0.02 g/mL, 0.03 g/mL, and 0.05 g/mL. We used each concentration five times in post-operative breast cancer tissue samples after chemotherapy and performed an *in vitro* photodynamic therapy modeling experiment. To describe the results of the histopathological examination, we chose an area in which 100 cells were visible. We counted all cells in the area (100 cells), and then, on the basis of their condition, we counted the fraction of cells that lost vitality and were agreed to be dead (Table 2). The described analytical method is a common procedure for the statistical analysis of histological preparations used in pathomorphology.

**Table 2.** The effectiveness of PDT.

% of dead cells	Rose Bengal Concentration		
	0.02 g/mL *	0.03 g/mL *	0.05 g/mL *
	32 ± 2%	46 ± 3%	93 ± 3%

\* experiment performed on five post-operative breast cancer tissues.

As the concentration increased, the number of dead cells increased. The application of 0.05 g/mL of Rose Bengal solution showed the highest number of killed cells (93 ± 3%) when compared to 0.03 g/mL and 0.02 g/mL. During all experiments, the 532 nm light covered the entire area of breast cancer tissue. The temperature on the surface of the tissue was room temperature, and the tissue did not dry out during the course of the experiment. The irradiation of samples for 15 min turned out to be sufficient for the detection of damage caused by photodynamic action *in vitro*. Lower concentrations of Rose Bengal at 0.02 g/mL and 0.03 g/mL resulted in 32 ± 2% and 46 ± 3% killing effect, respectively.

The optimization results are presented in Table 3, which shows that the best results were obtained when the breast tissue was placed 15 cm from the laser light source and exposed to radiation for 15 min. In this setup, the 532 nm light covered the top tissue surface.

**Table 3.** Results of optimization of the distance between the laser light source and the sample.

The Distance between the Laser Source and Tissue [cm]	Power the 532 nm Light Dose [ $\frac{J}{cm^2}$ ]
15	9 ± 2

#### 4. Discussion

The destruction of tumors by PDT is a phenomenon that has been known for about a century [13]. The effectiveness of PDT significantly depends on the PS dose, type, and cellular localization of the PS; the intensity, duration and wavelength of light; as well as the availability of oxygen at the target site [14]. In our experiment, potential cellular targets for PDT were studied. All cancer tissues after chemotherapy showed various degrees of cell changes, mainly consisting of the swelling of cancer cells, the formation of aquatic changes in the cytoplasm (Figures 1b, 2b and 3b), and changes in the cell nuclei showing chromatin homogenization. The same tissues after photodynamic action showed further changes in the degradation of the neoplastic tissue (a strength of the experiment). These changes showed a different degree of intensity, from small changes consisting of the condensation of nuclear chromatin, the formation of blotchy and bizarre (bizarre) forms, with assuming forms similar to the image of apoptosis in tissues *in vivo* and with a tendency of cytoplasm decay, to complete cell degradation, with the formation of amorphous homogeneous weaving. These changes showed varying degrees of intensity even within one cross-section of the tumor tissue. The intensity of the changes was not directly proportional to the concentration of the photosensitizer in all cases. The power and density of the 532 nm light delivered to the tissue were also important. Besides photodynamic cell killing, indirect effects were possible, due to the possibility of incorporating the Rose Bengal into the cellular membranes. The products of photodynamic action are reactive oxygen species (ROS) such as singlet oxygen that are capable of destroying cancer cells. Their activity directly causes the death of neoplastic cells through necrosis or apoptosis, destruction of tumor blood vessels, and stimulation of the immune system [15]. The main limitation of the study was the method of application of photosensitizers and their histopathological evaluation after the irradiation.

Before starting our research, a literature review was carried out to become acquainted with the experimental procedures of other research groups, which generates interest in tak-

ing up the topic of oncology therapy in laboratory. A number of studies have addressed the possible involvement of DNA damage in PDT phototoxicity combined with chemotherapy. The combination of chemotherapy with PDT enables precise drug delivery and continuous control of its release [16,17]. Additionally, light is the main factor in stimulating (inducing) the photodynamic response.

After administration of PS into patients, exposure to natural and artificial light must be limited due to the possibility of damaging the healthy cells [15,18,19]. One method of delivering light to deeper tissues in PDT therapy is with the use of up-conversion nanoparticles (UCNPs) that absorb near-infrared light and emit visible light.

Over the past few years, many research groups have demonstrated the effectiveness of UCNP-based PDT both *in vitro* and *in vivo* [20,21]. The use of UCNP is a leading topic of many research groups in Europe and in the world [20]. Figure 4 shows a simplified diagram of the operation of the PDT with UCNP.

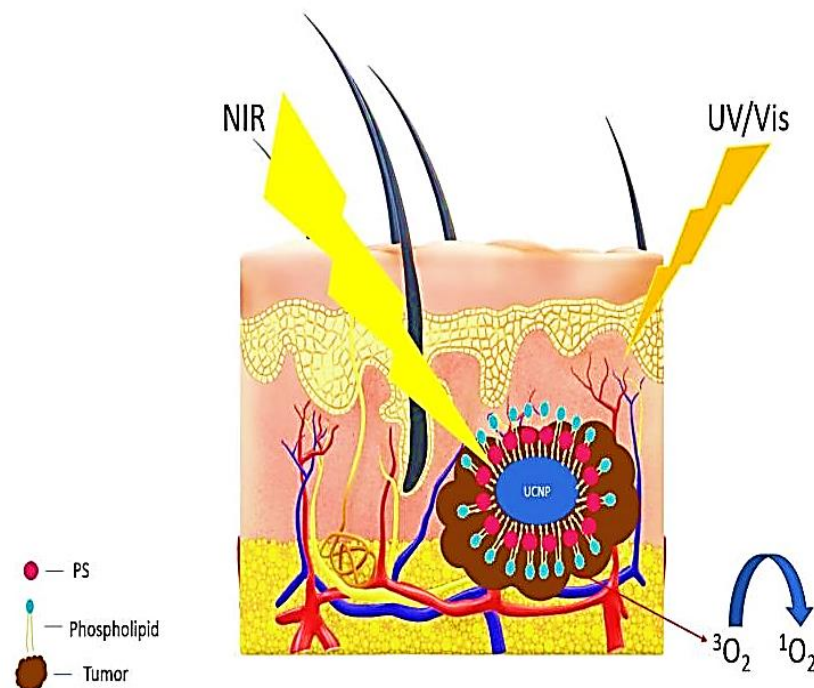


Figure 4. Photodynamic therapy (PDT) with UCNP using near-infrared (NIR) light.

#### PDT-Chemotherapy Nanoparticles

Chemotherapy has been at the forefront of cancer treatment for several decades, yet other less harsh methods have been sought. Photodynamic therapy offers the possibility of ‘defeating’ cancer by partially or completely destroying cancer cells [22–24]. Over the last twenty years, research and review studies have demonstrated the effectiveness of this method. However, in order to precisely and permanently cure the tumor, it is worth using an adjunct therapy such as PDT in combination with chemotherapy. The purpose of this is to achieve an effective ability to exert maximum antitumor capacity and inspire antitumor immunity to prevent tumor relapse and metastasis.

In a study by Jin et al., UCNP was prepared in a shell of micelles that generated ROS. The applied complex worked in conjunction with an anticancer chemotherapeutic agent, which is an example of a positive correlation between PDT and chemotherapy. Both PDT agents and chemotherapy can activate antitumor immunity by inducing immunogenic cell death. Experiments have shown that intravenous administration of multifunctional nanocarriers in combination with non-invasive NIR irradiation destroys orthotopic tumors and effectively inhibits metastasis to other tissues and organs. This study confirms the

effectiveness of chemo-photodynamic therapy in combination with antitumor immunity in the treatment of metastatic cancer [25].

According to Huang et al., the treatment of bone metastases, for example, is associated with certain limitations. Among them are the lack of selectivity of the applied therapies, severe toxicity and low efficiency. The synergy of chemotherapy with PDT may be of key importance to the achievements of existing methods [26]. Jiang et al., in order to improve the effectiveness of PDT, used PS and doxorubicin (DOX), which were coated with polyethylene glycol. The complex was found to have high drug loading capacity for both PS and the chemotherapeutic agent, allowing the combination of chemotherapeutic treatment of cancer with simultaneous deep penetration and accumulation of the drug in the internal tumor regions. The experiment confirmed the potential of the nanocomplex and its potential development directions [27]. Wang et al. constructed nanocomposites based on a magnetic nanoparticle to deliver chlorin (Ce6) and the therapeutic drug DOX. The complex resulted in tumor-targeted chemotherapy by controlled drug release and minimized side effects. The results of the experiment confirmed the highly effective antitumor properties of nanocomposites in the treatment of human tumor cells and tissues of the MCF-7 cell line. Combined chemical/photodynamic therapy significantly inhibited tumor growth *in vivo* [28]. Li et al. also created a nanocomplex with the photosensitizer 5-ALA and the drug DOX. Using the MCF-7 cell line, high cytotoxicity and morphological changes in cancer cells were observed. Reactive oxygen species resulting from irradiation enhanced the therapeutic effect. Uptake of the complex by cells increased apoptosis and damaged MCF-7 cells [29]. Panikar et al. presented a method of obtaining nanoliposomes targeting peptide-coupled ligands for chemo-photodynamic therapy of breast cancer. The nanocomplex contained the therapeutic drug DOX and methylene blue (MB). The energy transfer from UCNP to MB allows generation of reactive oxygen species upon activation with laser light. In the experiment, a significant decrease in cell viability was observed at the level of 95%. During chemotherapy alone and PDT alone, the levels were 77% and 84%, respectively. The obtained results confirmed the significant potential of the nanocomplex in the treatment of breast cancer [30].

Additionally, Huang et al., in their experiments, created a noncomplex comprising the Hsp90 inhibitor ganetespib (Ga) and PS such as zinc phthalocyanine (ZnPc) that accumulated in cancer cells. After exposure to laser light, the amount of ROS increased sharply. The applied Gan-ZnPc complex inhibited cell proliferation and indirectly led to apoptosis of neoplastic cells [31]. Wang et al., in their research, used a nanocomplex based on polysaccharides for delivery of the therapeutic agent DOX and 5-aminolevulinic acid (5-ALA). The platform exhibited a pH-sensitive drug release. Using a nanoplatform increased the cellular uptake of the drug and photosensitizer, which increased the effectiveness of the chemo-photodynamic therapy in MCF-7 breast cancer cells. The experiment confirmed that nanocomplexes may have enormous potential in the targeted therapy of breast cancer [32]. Hu et al., in their research, developed theranostic nanoparticles with the ability to attach DOX and PS. The aim of the research was to test the effectiveness of the therapy *in vivo* and *in vitro*. The applied complex with manganese oxide caused local hypoxia of the tumor, producing oxygen *in situ*. The use of the nanocomplex increased the effectiveness of pre-application PDT and enhanced the release of the drug DOX. The designed nanoparticles can be an alternative way to improve the effectiveness of both therapies, which will increase the popularity of their use [33]. Xu et al. used low molecular weight gels, an anticancer drug and PS. The results revealed that the injectable substances showed excellent antitumor efficacy due to the combination of the two treatments [34].

Liu et al. investigated the topic of theranostic nanoplatforms that combine PS and anticancer drugs. In this study, they used laponite nanoplatforms that store PS and DOX. The complex formed in a gradual and controlled manner and released the drug as a result of changes in pH and laser light intensity. Thanks to the contained substance, the complex could be used as an agent differentiating cancer cells from healthy cells (the complex was easily captured by cancer cells in an *in vivo* mouse tumor model). The experiment

demonstrated higher efficiency and a stronger therapeutic effect of the therapy using the complex as opposed to single therapy. Nanoplatfoms, used together with a drug and PS, are a promising methodology for highly effective chemo-phototherapy of neoplastic cells [35]. Pandya et al. developed biodegradable polymer nanoparticles containing cytotoxic drugs. Polymer nanoparticles also contained the PS tetraphenylchlorin in their structure. The research was carried out on the breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MDA-MB-468. Higher cytotoxicity was noted in a study in which cancer cells were treated with a nanocomplex and not with the drug itself. It is worth noting that the light-induced nanoparticles had a strong effect of PDT on cancer cells. In the final stage of the experiment, it was observed that the nanoplatfom can also be used as a contrast agent for cancer cells. However, this property needs to be analyzed in more detail [36]. Gaio et al. proposed a complex made of nanoparticles coated with hyaluronic acid, the drug docetaxel and PS, in order to destroy cancer cells using chemotherapy and photodynamic therapy. The mutual effects of both therapies were more effective than their single use. Only *in vitro* tests were carried out, which showed the potential of the nanocomplex in the destruction of cancer cells and the possibility of their future use under *in vivo* conditions [37]. Xu et al. developed a nanoplatfom based on PEGylated gold nanorods with drug release properties. The nanoplatfom was additionally equipped with DOX and a PS such as 5-ALA. The obtained complex showed excellent stability in physiological solutions. The degree of release of the contained substances depended on the pH. *In vitro* studies have shown that the nanocomplex can effectively penetrate human breast cancer cells and release the drug and PS into the cytoplasm. At the time of irradiation with near-infrared light, the production of ROS took place. A combination of chemotherapy, photodynamic therapy, and photothermal therapy may be more effective in killing breast cancer cells. The triple combination can completely inhibit tumor growth without excessive systemic toxicity. The conducted study provides hope for a complete and effective cure for cancer [38].

*In vivo* PDT causes destruction of neoplastic tissue and, to a lesser extent, the surrounding healthy tissue due to factors dependent on vascularization and oxygenation, and active processes in which the photosensitizer binds to carriers such as albumin and lipoproteins (LDL, HDL). Photodynamic therapy induces an inflammatory release of cytokines, e.g., TNF $\alpha$ . On the other hand, heat-shock proteins (Hsp) are also formed, which protect cancer cells, and macrophages may metabolize the photosensitizer. There is a question whether it is possible to modulate the tumor tissue locally in terms of its vascularization, oxygenation and inhibition of inflammatory processes just before the administration of the photosensitizer, so as to eliminate tumor protection mechanisms. The mutual correlation of PDT used after chemotherapy increases the effectiveness of cancer treatment, giving hope for a full cure for the disease.

This work shows that Rose Bengal located in a neoplastic tumor leads to the destruction of cancer tissue upon irradiation with 532 nm light. Activating Rose Bengal with laser light leads to the formation of  $^1\text{O}_2$ , which at the cellular and subcellular level damage the cytoplasmic membranes, mitochondria and lysosomes. It is one of the mechanisms that causes the destruction of tumor cells.

## 5. Conclusions

Current breast cancer treatment is multidisciplinary and standard chemotherapy may benefit from adjuvant treatments such as PDT. The application of photodynamic action on post-chemotherapeutic tissue *in vitro* shows additional cellular damage as determined by histological analysis. This work presents preclinical studies on an *in vitro* tissue model of Rose Bengal PDT, which has potential for clinical treatment of breast cancer. This study has demonstrated the importance of an analysis of histopathological characteristics during breast cancer treatment. The effects of *in vitro* photodynamic action applied in this study suggests that the application of PDT after chemotherapy can aid in breast cancer cell eradication.

**Author Contributions:** Conceptualization, E.O., E.B., D.B.-A. and D.A.; methodology, E.O., E.B., D.B.-A., J.S.-M. and D.A.; validation, E.O., D.A.; formal analysis, E.O., D.B.-A.; investigation, D.B.-A.; resources, E.O., D.B.-A., K.D., M.S.; writing-original draft preparation, E.O., E.B., D.B.-A.; writing-review and editing, E.O., D.B.-A., K.D., M.S., J.S.-M. and D.A.; visualization, E.O., E.B., D.B.-A.; supervision, D.B.-A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by Bioethics Committee of University of Rzeszów (protocol code 10/11/2018 and date of approval: 8 November 2018).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A.I. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *7*, 209–249. [CrossRef] [PubMed]
- Maughan, K.L.; Lutterbie, M.A.; Ham, P.S. Treatment of breast cancer. *Am. Fam. Physician* **2010**, *81*, 1339–1346. [PubMed]
- Wang, H.; Mao, X. Evaluation of the Efficacy of Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer. *Drug Des. Devel. Ther.* **2020**, *14*, 2423–2433. [CrossRef] [PubMed]
- Castaneda, S.A.; Strasser, J. Updates in the Treatment of Breast Cancer with Radiotherapy. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* **2017**, *26*, 371–382. [CrossRef] [PubMed]
- Drăgănescu, M.; Carmocan, C. Hormone Therapy in Breast Cancer. *Chirurgia* **2017**, *112*, 413–417. [CrossRef]
- Sporikova, Z.; Koudelakova, V.; Trojanec, R.; Hajduch, M. Genetic Markers in Triple-Negative Breast Cancer. *Clin. Breast Cancer* **2018**, *18*, e841–e850. [CrossRef]
- Roskoski, R., Jr. Small molecule inhibitors targeting the EGFR/ErbB family of protein-tyrosine kinases in human cancers. *Pharmacol. Res.* **2019**, *139*, 395–411. [CrossRef]
- Dias, C.J.; Helguero, L.; Faustino, M.A.F. Current Photoactive Molecules for Targeted Therapy of Triple-Negative Breast Cancer. *Molecules* **2021**, *26*, 7654. [CrossRef]
- Montaseri, H.; Kruger, C.A.; Abrahamse, H. Review: Organic nanoparticle based active targeting for photodynamic therapy treatment of breast cancer cells. *Oncotarget* **2020**, *11*, 2120–2136. [CrossRef]
- Mokoena, D.R.; George, B.P.; Abrahamse, H. Enhancing Breast Cancer Treatment Using a Combination of Cannabidiol and Gold Nanoparticles for Photodynamic Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4771. [CrossRef]
- Shi, X.; Yang, X.; Liu, M.; Wang, R.; Qiu, N.; Liu, Y.; Yang, H.; Ji, J.; Zha, G. Chondroitin sulfate-based nanoparticles for enhanced chemo-photodynamic therapy overcoming multidrug resistance and lung metastasis of breast cancer. *Carbohydr. Polym.* **2021**, *254*, 117459. [CrossRef] [PubMed]
- Narayan, R. (Ed.) *Monitoring and Evaluation of Biomaterials and Their Performance In Vivo*; Woodhead Publishing: Philadelphia, PA, USA; Elsevier Ltd.: Amsterdam, The Netherlands, 2017; pp. 209–213. ISBN 978-0-08-100603-0.
- Gunaydin, G.; Gedik, M.E.; Ayan, S. Photodynamic Therapy-Current Limitations and Novel Approaches. *Front. Chem.* **2021**, *9*, 691697. [CrossRef] [PubMed]
- Dolmans, D.E.J.G.J.; Fukumura, D.; Jain, R.K. Photodynamic Therapy for Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 380–387. [CrossRef] [PubMed]
- Wang, W.; Cheng, L.; Liu, Z. Upconversion Nanoparticles for Photodynamic Therapy and Other Cancer Therapeutics. *Theranostics* **2013**, *3*, 317–330. [CrossRef]
- Fu, J.J.; Li, C.W.; Liu, Y.; Chen, M.J.; Zhang, Q.; Yu, X.Y.; Wu, B.; Li, J.X.; Du, L.R.; Dang, Y.Y.; et al. The microneedles carrying cisplatin and IR820 to perform synergistic chemo-photodynamic therapy against breast cancer. *J. Nanobiotechnol.* **2020**, *18*, 146. [CrossRef]
- Lin, C.; Tong, F.; Liu, R.; Xie, R.; Lei, T.; Chen, Y.; Yang, Z.; Gao, H.; Yu, X. GSH-responsive SN38 dimer-loaded shape-transformable nanoparticles with iRGD for enhancing chemo-photodynamic therapy. *Acta Pharm. Sin. B* **2020**, *10*, 2348–2361. [CrossRef]
- Zhu, Y.; Yu, F.; Tan, Y.; Wen, L.; Li, Y.; Yuan, H.; Hu, F. Guiding Appropriate Timing of Laser Irradiation by Polymeric Micelles for Maximizing Chemo-Photodynamic Therapy. *Int. J. Nanomed.* **2020**, *15*, 6531–6543. [CrossRef]
- Mohapatra, A.; Uthaman, S.; Park, I.K. External and Internal Stimuli-Responsive Metallic Nanotherapeutics for Enhanced Anticancer Therapy. *Front. Mol. Biosci.* **2021**, *7*, 597634. [CrossRef]
- Grebenik, E.A.; Nadort, A.; Generalova, A.N.; Nechaev, A.V.; Sreenivasan, V.K.; Khaydukov, E.V.; Semchishen, V.A.; Popov, A.P.; Sokolov, V.I.; Akhmanov, A.S.; et al. Feasibility study of the optical imaging of a breast cancer lesion labeled with upconversion nanoparticle biocomplexes. *J. Biomed. Opt.* **2013**, *18*, 76004. [CrossRef]

21. Guryev, E.L.; Shilyagina, N.Y.; Kostyuk, A.B.; Sencha, L.M.; Balalaeva, I.V.; Vodeneev, V.A.; Kutova, O.M.; Lyubeshkin, A.V.; Yakubovskaya, R.I.; Pankratov, A.A.; et al. Preclinical Study of Biofunctional Polymer-Coated Upconversion Nanoparticles. *Toxicol. Sci.* **2019**, *70*, 123–132. [CrossRef]
22. Ma, Q.; Sun, X.; Wang, W.; Yang, D.; Yang, C.; Shen, Q.; Shao, J. Diketopyrrolopyrrole-derived organic small molecular dyes for tumor phototheranostics. *Chin. Chem. Lett.* **2022**, *33*, 1681–1692. [CrossRef]
23. Yu, Q.; Huang, X.; Zhang, T.; Wang, W.; Yang, D.; Shao, J.; Dong, X. Near-infrared Aza-BODIPY Dyes Through Molecular Surgery for Enhanced Photothermal and Photodynamic Antibacterial Therapy. *Chem. Res. Chin. Univ.* **2021**, *37*, 951–959. [CrossRef]
24. Chen, D.; Dai, H.; Wang, W.; Cai, Y.; Mou, X.; Zou, J.; Shao, J.; Mao, Z.; Zhong, L.; Dong, X.; et al. Proton-Driven Transformable 1O<sub>2</sub>-Nanotrapp for Dark and Hypoxia Tolerant Photod. *Adv. Sci.* **2022**, *14*, 2200128. [CrossRef]
25. Jin, F.; Qi, J.; Zhu, M.; Liu, D.; You, Y.; Shu, G.; Du, Y.; Wang, J.; Yu, H.; Sun, M.; et al. NIR-Triggered Sequentially Responsive Nanocarriers Amplified Cascade Synergistic Effect of Chemo-Photodynamic Therapy with Inspired Antitumor Immunity. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 32372–32387. [CrossRef] [PubMed]
26. Huang, Y.; Xiao, Z.; Guan, Z.; Shen, Y.; Jiang, Y.; Xu, X.; Huang, Z.; Zhao, C. A light-triggered self-reinforced nanoagent for targeted chemo-photodynamic therapy of breast cancer bone metastases via ER stress and mitochondria mediated apoptotic pathways. *J. Control Release* **2020**, *319*, 119–134. [CrossRef] [PubMed]
27. Jiang, D.; Gao, X.; Kang, T.; Feng, X.; Yao, J.; Yang, M.; Jing, Y.; Zhu, Q.; Feng, J.; Chen, J. Actively targeting D- $\alpha$ -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate-poly(lactic acid) nanoparticles as vesicles for chemo-photodynamic combination therapy of doxorubicin-resistant breast cancer. *Nanoscale* **2016**, *8*, 100–118. [CrossRef]
28. Wang, D.; Li, X.; Li, X.; Kang, A.; Sun, L.; Sun, M.; Yang, F.; Xu, C. Magnetic And pH Dual-Responsive Nanoparticles For Synergistic Drug-Resistant Breast Cancer Chemo/Photodynamic Therapy. *Int. J. Nanomed.* **2019**, *14*, 7665–7679. [CrossRef]
29. Li, X.; Viothini, K.; Ramesh, T.; Rajan, M.; Ramu, A. Combined photodynamic chemotherapy investigation of cancer cells using carbon quantum dot-based drug carrier system. *Drug Deliv.* **2020**, *27*, 791–804. [CrossRef]
30. Panikar, S.S.; Ramírez-García, G.; Vallejo-Cardona, A.A.; Banu, N.; Patrón-Soberano, O.A.; Cialla-May, D.; Camacho-Villegas, T.A.; de la Rosa, E. Novel anti-HER2 peptide-conjugated theranostic nanoliposomes combining NaYF<sub>4</sub>Yb,Er nanoparticles for NIR-activated bioimaging and chemo-photodynamic therapy against breast cancer. *Nanoscale* **2019**, *11*, 20598–20613. [CrossRef]
31. Huang, L.; Wei, G.; Sun, X.; Jiang, Y.; Huang, Z.; Huang, Y.; Shen, Y.; Xu, X.; Liao, Y.; Zhao, C. A tumor-targeted Ganetespib-zinc phthalocyanine conjugate for synergistic chemo-photodynamic therapy. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *151*, 294–303. [CrossRef]
32. Wang, Y.; Yang, M.; Qian, J.; Xu, W.; Wang, J.; Hou, G.; Ji, L.; Suo, A. Sequentially self-assembled polysaccharide-based nanocomplexes for combined chemotherapy and photodynamic therapy of breast cancer. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *203*, 203–213. [CrossRef] [PubMed]
33. Hu, D.; Chen, L.; Qu, Y.; Peng, J.; Chu, B.; Shi, K.; Hao, Y.; Zhong, L.; Wang, M.; Qian, Z. Oxygen-generating Hybrid Polymeric Nanoparticles with Encapsulated Doxorubicin and Chlorin e6 for Trimodal Imaging-Guided Combined Chemo-Photodynamic Therapy. *Theranostics* **2018**, *8*, 1558–1574. [CrossRef] [PubMed]
34. Xu, L.; Zhao, M.; Yang, Y.; Liang, Y.; Sun, C.; Gao, W.; Li, S.; He, B.; Pu, Y. A reactive oxygen species (ROS)-responsive low molecular weight gel co-loaded with doxorubicin and Zn(ii) phthalocyanine tetrasulfonic acid for combined chemophotodynamic therapy. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 9157–9164. [CrossRef] [PubMed]
35. Liu, R.; Xu, F.; Wang, L.; Liu, M.; Cao, X.; Shi, X.; Guo, R. Polydopamine-coated laponite nanoplateforms for photoacoustic imaging-guided chemo-phototherapy of breast cancer. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 394. [CrossRef] [PubMed]
36. Pandya, A.D.; Øverbye, A.; Sahariah, P.; Gaware, V.S.; Høgset, H.; Masson, M.; Høgset, A.; Mælandsmo, G.M.; Skotland, T.; Sandvig, K.; et al. Drug-loaded photosensitizer-chitosan nanoparticles for combinatorial chemo-and photodynamic-therapy of cancer. *Biomacromolecules* **2020**, *21*, 1489–1498. [CrossRef] [PubMed]
37. Gaio, E.; Conte, C.; Esposito, D.; Reddi, E.; Quaglia, F.; Moret, F. CD44 Targeting Mediated by Polymeric Nanoparticles and Combination of Chlorine TPCS 2a-PDT and Docetaxel-Chemotherapy for Efficient Killing of Breast Differentiated and Stem Cancer Cells In Vitro. *Cancers* **2020**, *12*, 278. [CrossRef] [PubMed]
38. Xu, W.; Qian, J.; Hou, G.; Wang, Y.; Wang, J.; Sun, T.; Ji, L.; Sou, A.; Yao, Y. PEGylated hydrazided gold nanorods for pH-triggered chemo/photodynamic/photothermal triple therapy of breast cancer. *Acta Biomater.* **2018**, *82*, 171–183. [CrossRef]

Pomimo ogromnego postępu jaki dokonał się w ostatnich latach w diagnostyce i terapii raka piersi, nadal jest to najczęściej występujący nowotwór złośliwy u kobiet. Obecnie standardowe metody leczenia raka piersi to: zabiegi chirurgiczne, radioterapia, hormonoterapia oraz terapie celowane. Lekooporność jest przyczyną braku całkowitej eliminacji raka, co w konsekwencji prowadzi do nawrotów i przerzutów. Terapia fotodynamiczna (PDT) jest od kilkadziesiąt lat stosowana jest w leczeniu niektórych nowotworów i stanów zapalnych. Badania

dowodzą, że połączenie chemioterapii i PDT, może stać się opcją terapeutyczną eliminującą całkowicie ognisko raka. Reakcja PDT zależy od dawki fotouczulacza (PS), lokalizacji PS w komórce, intensywności, czasu trwania i długość fali światła oraz obecności tlenu. W wyniku reakcji fotodynamicznej powstają reaktywne formy tlenu (ROS) na przykład tlen singletowy, powodujące niszczenie komórek nowotworu oraz unaczynienie guza. Przegląd literatury dotyczący eksperymentów z zastosowaniem PDT przez innych badaczy, upewnił nas, że obserwacja zmian komórkowych jest możliwa w warunkach laboratoryjnych. Problem dostarczenia światła do tkanek położonych głębiej niż skóra i błony śluzowe, wielu badaczy rozwiązało stosując nanocząsteczki konwersji w górę (UCNP), które pochłaniają światło bliskiej podczerwieni (NIR) i emitują światło widzialne (UV/Vis) działając na PS produkując zabójcze ROS. Eksperymenty Jin i ws., Huang i ws., Jiang i ws., udowodniły przydatność synergistycznego działania reakcji fotodynamicznej i chemioterapii. Skuteczność metod polegała na budowie nanoplatform, będących rodzajem nanoleków, zawierających PS, chemioterapeutyk w połączeniu z UCNP. Wang i ws., zastosowali nanokompozyty *in vitro* i *in vivo*, potwierdzając ich wysoką cytotoksyczność w stosunku do raka. Odnotowano 95% zabitych komórek raka. Zastosowanie tylko chemioterapii powodowało zabicie 77% komórek, tylko PDT- destrukcja 84% komórek nowotworu. Liu i wsp., oraz Xu in., zwrócili uwagę, że działanie nanoleków zależy od pH tkanki raka oraz od natężenia światła lasera. Badania *in vivo* udowodniły, że PS łączy się z nośnikami (albuminami, LDL, HDL). Dostarczenie nano kompozytów i ich działanie zależy od utlenowania i unaczynienia guza. Reakcja PDT wyzwała zapalenie z produkcją cytokin oraz białek szoku cieplnego (Hsp), które działają ochronnie na komórki raka oraz na makrofagi metabolizujące PS. Powstaje pytanie czy przed podaniem fotouczulacza możliwa jest modulacja reakcji zapalnej, unaczynienia i natlenowania w guzie, w celu powstrzymania reakcji obronnej nowotworu. Eksperyment przeprowadzony w ramach kooperacji Klinicznego Szpitala wojewódzkiego Nr. 1 w Rzeszowie oraz Uniwersytetu Rzeszowskiego, dotyczył histopatologicznej oceny tkanek raka pobranych z piersi 48 pacjentek po mastektomii. Chore w celu zmniejszenia wymiarów guza przebyły standardowe 4 cykle chemioterapii. Dwie chore dodatkowo przebyły leczenie celowane anty-HER2. Wszystkie pobrane z materiałów pooperacyjnych próbki przechowywano w stanie zamrożenia w temperaturze -78 stopni Celsjusza. Finalnie

spośród nich wybrano 15 próbek, które po rozmrożeniu, przez czas trwania doświadczenia przechowywano w próbkach stożkowych w temperaturze -5 stopni Celsjusza. Tkanki raka pokryto natlenowanym różem bengalskim w stężeniach 0,02 g/ml, 0,03g/ml 0,05 g/ml. Następnie naświetlano przez 15 minut światłem lasera o długości fali 532 nm. Odpowiednia odległość tkanki od źródła światła zapobiegła efektowi zniszczenia promieniami lasera tkanki. W efekcie, po naświetlaniu, jej temperatura nie przekroczyła 30 stopni Celsjusza. Naświetlone tkanki raka standardowo utrwalono w 10% buforowanej formalinie oraz przeprowadzono rutynowe przygotowanie techniczne tkanek, w celu uzyskania preparatów histopatologicznych do oceny w mikroskopie świetlnym. Porównanie obrazów 3 grup raka: przed chemioterapią, raka po chemioterapii oraz raka po chemioterapii i PDT, wykazało różnice w wyglądzie komórek raka pomiędzy trzema grupami. Miarą zmian były zmiany morfologiczne komórek oraz ilość komórek „zabitych” na 100 komórek raka. Największe zmiany dotyczyły tkanek pokrytych różem bengalskim o najwyższym stężeniu, przypominały obraz apoptozy w komórkach *in vivo*. Eksperyment przedkliniczny *in vitro*, udowodnił działanie PDT, w którym zastosowanie różu bengalskiego jako PS oraz naświetlanie światłem lasera o długości fali 532 nm, wywołało uszkodzenie błon cytoplazmatycznych skutkujące uszkodzeniem lizosomów i mitochondriów. Efekt potwierdziły obrazy histopatologiczne poddanych doświadczeniu tkanek raka. Wszystkie tkanki raka (S) po chemioterapii wykazywały różnego stopnia zmiany komórkowe głównie polegające na obrzęku komórek raka, tworzeniu się zmian wodniczkowych w cytoplazmie, zmian w jądrach komórkowych o obrazie homogenizacji chromatyny z tendencją do tworzenia form dziwacznych, kleksowatych. Te same tkanki po etapie PDT wykazywały dalej posunięte zmiany degradacyjne tkanki nowotworowej. Przy czym zmiany te wykazywały różny stopień nasilenia, od niewielkich zmian polegających na kondensacji chromatyny jądrowej oraz z tendencją do kurczenia się cytoplazmy, z przybieraniem form podobnych do obrazu apoptozy w tkankach *in vivo* aż do zupełnej degradacji komórek, z tworzeniem bezpostaciowego homogennego utkania. Zmiany te wykazywały różny stopień nasilenia nawet w obrębie jednego przekroju tkanki guza. Eksperyment dowodzi skuteczności PDT zastosowanej po chemioterapii, w finalnej eradykacji tkanki raka.

## 6. OPIS PUBLIKACJI NR 3 WRAZ ZE SKANEM PRACY

### PHARMACOLOGY

#### BREAST CANCER TISSUE TREATED USING PHOTODYNAMIC THERAPY

EDYTA BARNAŚ<sup>1</sup>, ELŻBIETA OSTAŃSKA<sup>2</sup>, DOROTA BARTUSIK-AEBISHER<sup>3</sup>,  
KLAUDIA DYNAROWICZ<sup>4</sup>, JOANNA SKRĘT-MAGIERŁO<sup>1</sup>, and DAVID AEBISHER<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Midwifery, Medical College of the University of Rzeszow, Rzeszow, Poland

<sup>2</sup>Clinical Department of Pathology, Frederick Chopin Clinical Provincial Hospital No 1,  
Rzeszow, Poland

<sup>3</sup>Department of Biochemistry and General Chemistry, Medical College of the University of Rzeszow,  
Rzeszow, Poland

<sup>4</sup>Department of Natural Sciences, University of Rzeszow, Rzeszow, Poland

<sup>5</sup>Department of Photomedicine and Physical Chemistry, Medical College of the University of Rzeszow,  
Rzeszow, Poland

**Abstract:** Breast cancer is the most common malignant neoplasm in women in the world, characterized by increasing morbidity and mortality. In clinics, breast cancer treatment is performed with surgical resection and adjuvant chemotherapy or radiotherapy. Surgery is quite invasive, takes a long time to recover, and carries a high risk of incomplete removal of the tumor tissue. Patients with other conditions, such as heart failure, could not tolerate surgery. Chemotherapy is one of the most commonly used treatments for cancer. Drug resistance (MDR) results in the unsatisfactory effectiveness of many chemotherapy drugs. Clinical trials use many potent chemotherapeutic drugs that have disadvantages such as lack of selectivity, poor bioavailability, and toxic effects on healthy cells. The combination of chemotherapy and photodynamic therapy (PDT) improved the therapeutic effects in multidrug-resistant cancer cells. Earlier studies have shown that phototherapy combined with chemotherapy can achieve an excellent anti-cancer effect at lower doses of drugs compared to those used conventionally. Nanomedicine-assisted chemo photodynamic therapy represents a promising therapeutic option for improved cancer therapy.

**Keywords:** breast cancer, drug resistance (MDR), chemotherapy, phototherapy, PDT, nanomedicine

In recent years, the main topic has been the prevention, diagnosis, and treatment of breast cancer. Breast cancer has been the main malignant tumor in women in Europe for many years. Despite the improvement of treatment and survival, mainly due to the use of mammography for screening, increasingly effective chemotherapy, and hormone therapy, the implementation of new technologies is still needed. This is to improve treatment outcomes at different stages of this disease (1-3). Over the last twenty years, chemotherapy has become a more effective option for patients in whom biopsy or radiotherapy has not brought satisfactory results (4). The effectiveness of chemotherapy is influenced, among others, by the type and physiology of the membrane protein transporters used (5). Recent reports have shown that the response rate to chemotherapy is a very important prognostic factor in predicting disease-free or relapse-free survival (6). A method

that also gives a chance to cure cancer is photodynamic therapy (PDT) which is usually used mainly in dermatology to treat skin cancer and precancerous lesions and for head, neck, and prostate cancers (7, 8). Studies have shown that the combination of PDT and chemotherapy, i.e. photodynamic chemotherapy, can increase the susceptibility of cancer cells to chemotherapeutic agents, thus providing a better synergistic anti-cancer effect (9). The basis of the operation of PDT is the use of a photosensitizer (PS) and a light source with a well-defined and appropriate wavelength. These two components make the so-called reactive oxygen species (ROS). The resulting reaction product initiates the apoptotic process leading to the death of cancer cells and the tumor. There are two known types of PDT reactions. In the type I reaction, electrons are transported to individual cell organelles where free radicals or radical ions are formed. The product of

\* Corresponding author: e-mail: daebisher@ur.edu.pl

the type II reaction is highly reactive singlet oxygen species ( $^1O_2$ ) (10-14).

Reactions I and II within a given tissue or organ occur at the same time. The interaction of both occurring reactions depends on the form and nature of the administered photosensitizer (PS). Cancer cell apoptosis is not the only effect of PDT. This therapy primarily engages the immune system to initiate inflammatory responses. The diagram of the PDT procedure is shown in Figure 1.

Based on the experience and analyzed publications, photodynamic therapy has become one of the last variants in severe and impossible to cure cases (15-16). Due to the minimal degree of invasiveness, photodynamic therapy has been included in the range of clinical methods as a procedure for the elimination of selected neoplastic cells with laser light and with the use of a photosensitizer (17-19).

In recent years, PDT has been increasingly used in the treatment of neoplastic and non-neoplastic lesions (20). The usefulness of PDT particularly applies to cancers that are refractory to conventional treatment, in the case of residual disease after chemotherapy treatment, or as an alternative to neoadjuvant therapy (21). Due to the rapid accumulation of PS in the tissues, the procedure is carried out in a relatively short time, which makes it more comfortable for the patient.

An important issue is the process of tissue healing after the application of PDT. Recent studies show that the use of PDT mainly violates the

glandular component of breast tissue. Due to the presence of a large amount of fibrous tissue in the breast, it is a sufficient substrate and building material for the healing of the cavity (22-23). The presence of metastases in addition to multidrug resistance is an important element in the treatment of breast cancer. In addition to metastases to the liver, brain, and bones, due to the high soreness and resistance to chemotherapy, metastases to the chest wall are a problem (24-25). PDT is hope for controlling metastasis. Currently, in the treatment of breast cancer, the main approach is breast-sparing treatment. Unlike radiation therapy, PDT does not leave fibrosis and scarring. PDT can be repeated because it does not destroy DNA, This creates a low probability of secondary cancers (26). Due to the photosensitizers used, which are associated with mitochondria, it is these cellular organelles that are destroyed after the influence of the appropriate wavelength of light. Damage to the tumor vessels is combined which leads to hypoxia. The result is necrosis and apoptosis of cancer cells (27-28). The advantage of PDT is the effect of the healing effect mainly in the range of the disease focus, with little damage to neighboring tissues. This is due to the focused beam of laser light and the short duration of free radicals (29-30). It is important to build technological platforms that, applied once, will have diagnostic and therapeutic properties. Currently, the most important thing is to produce a photosensitizing with the greatest possible selectivity and with the least possible side effects – nanotechnology in chemo-photodynamic therapy (31).

### Chemo-photodynamic therapy of breast cancer

In the treatment of breast cancer, chemo-photodynamics is a relatively new method, i.e. the correlation of two therapeutic methods: chemotherapy and PDT. The tool used is chemotherapeutic agents that are released at a specific site and at the right time (19).

Based on the literature review, it can be concluded that the combination of photodynamic therapy with chemotherapy is more effective in the treatment of neoplasms than the use of each of them separately. A variant of PDT is PTT (photothermal therapy). In PTT, the photosensitizer is "released" under the influence of electromagnetic radiation of a specific wavelength in the range of radio waves, infrared and visible light. The absorbed energy is transformed into internal energy (heat). The induced local temperature rise destroys neoplastic cells. Chemotherapy has a greater range of toxicity

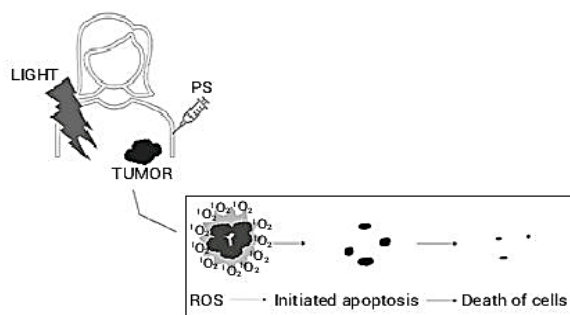


Figure 1. Procedure of Photodynamic therapy.

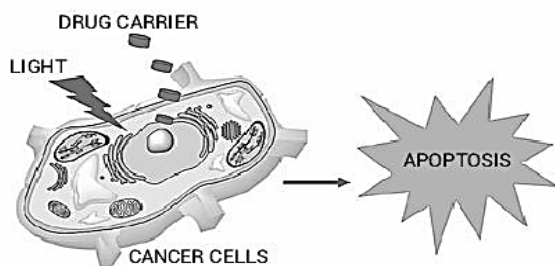


Figure 2. Chemo-photodynamic action.

due to the fact that PDT or PTT only works on diseased cells and tissues. PDT and PTT are innovative forms of cancer treatment that offer high confidence in the cure of cancer. The type of photosensitizer selected and used is mainly responsible for the effectiveness of chemotherapy in combination with PDT. The type of photosensitizer selected and used is mainly responsible for the effectiveness of chemotherapy combined with PDT.

#### **Chemo-photodynamic therapy of breast cancer- review**

The aim of the study was to review the latest literature in the field of breast cancer treatment with the PDT method in combination with chemotherapy (chemo-photodynamic therapy) with the use of a selected photosensitizer.

Fu et al., in their research, used the interaction of CDDP and IR820 which resulted in an increase in the production of reactive oxygen species; there was an activation of a protein (caspase-3) which led to cell death. The simultaneous action of CDDP and PS IR820 inhibited tumor development and growth through enhanced cell apoptosis and inhibition of cell division. The cytotoxicity of the procedure was relatively low, which was an additional advantage of the performed experiment (32).

Li et al. confirmed that the application of chemotherapy with PDT gives stronger and more lasting effects than the single application of one of the methods. In their research, they used the system of dots. During the experiment, Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), transmission electron microscopy (TEM), atomic force microscope (AFM), and fluorescence spectroscopy were used. In order to deliver the drug DOX, a nanocarrier system based on carbon quantum dots was used in conjunction with the 5-ALA photosensitizer. A drug preparation was introduced into the resulting 5-ALA-CQD-Glu- $\beta$ -CD complex. The study was performed *in vitro* using the MCF-7 breast cancer cell line. After drug application, cancer cells were irradiated with laser light with a wavelength of 635 nm, which significantly improved the therapeutic effect. The test results were analyzed using a fluorescence microscope. The experiment proved that the synthesis of two therapies (chemotherapy and PDT) is more efficient and effective, which leads to increased apoptosis of patients' cells. This is a significant finding confirming the theory of a favorable correlation between these two therapeutic techniques in cancer treatment (33).

In turn, Aru et al., in their experiment, tested the efficacy of silicon phthalocyanine (SiPc) in combination with a histone deacetylase inhibitor to form

a complex (HDACi). The aim of the research was to increase the anti-cancer therapy with the use of chemotherapy and PDT. The research material was two breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. A control sample which was a healthy HUVEC epithelial cell line was also analyzed. In preliminary studies, it was confirmed that the complex used greatly limited the development and multiplication of neoplastic cells. The main cause of this phenomenon was increased cell apoptosis and autophagy in cancer cell lines. Additionally, chemotherapy along with PDT limited the functioning of the mitochondrial membranes. Another effect was the destruction (total and partial) of DNA, which is an indirect factor causing program cell death (34).

Zhu et al. used a low molecular weight compound and other hydrophobic derivatives to obtain Ce6-CSPD polymeric micelles. The drug used was doxorubicin. In the experiment, it was observed that the produced and used nanoparticles had the ability to monitor the drug release process. The applied complex increased the effectiveness of chemo-phototherapy, minimizing the negative impact on healthy cells. In the study, it was possible to monitor the appropriate time of laser irradiation in order to maximize the effectiveness of anti-cancer therapy (35).

In turn, Jin et al., to increase the effectiveness of chemotherapy and PDT, used multifunctional nanocarriers administered intravenously using near-infrared light. The aim of the study was to inhibit the emerging metastases from the breast to the lungs, inducing (initiating) antitumor immunity (36).

Shi et al. also decided to use nanoparticles in their research, with the difference that they were based on chondroitin sulfate. The complex consisted of a photosensitizer, a drug or chemotherapeutic agent, and a chemosensitizer. The main goal was to minimize the emergence of lung metastases. They proved that the applied nanoparticles improved the anti-tumor efficacy against MCF-7 cells. The applied PDT enabled faster and more effective action of the drug by disrupting the physiological structure of the mitochondria. The experiment confirmed that the complex used may be an effective tool in the treatment of breast cancer (37).

Huang et al., targeted strategies to minimize bone metastasis. A classic drug (alendronic acid) was used to treat bone diseases. A proteasome inhibitor (actively involved in cell growth) and a photosensitizer were introduced into the complex. The research proved that the applied complex was highly effective in drug release and in inhibiting cell proliferation through the production of reactive oxygen

species as a result of irradiation. As a result of photodynamic chemotherapy, the tumor was significantly inhibited compared to the experiment without the applied complex. In addition, the toxicity of the applied therapy was also minimized. According to researchers, the complex has a chance to become an innovative form of breast cancer treatment (38).

Zhao et al., and Jiang et al., also took up the topic of treating cancer cells with chemotherapy and PDT. The topoisomerase inhibitor and the chlorin photosensitizer (E6) were accumulated in the non-carrier. In the study, there was an increase in the amount of ROS in the cells compared to a single administration of the photosensitizer. Thanks to the complex used, the chemo-photodynamic therapy was more effective and less toxic. After irradiation, increased cellular uptake and stronger cytotoxicity were observed in the cells of the breast cancer line. The applied complex increased the efficiency of tumor therapy, being a promising form of treatment for the future. The experiment only confirmed the effectiveness of the method in the drug delivery process (39-40).

Tan et al., created a high molecular weight complex of the hydrophobic lipid core-lipoprotein with a target peptide for efficient drug transport. The entire complex consisted of phospholipids, a peptide, the drug mertansine, and a photosensitizer. The created nanometer-sized complex efficiently accumulated in the tumor cells, causing significant inhibition of its physiology. The study confirmed that the applied nanocomplex may be an innovative and effective form of anticancer therapy (41).

Wang et al. in their research used a nanocomplex based on polysaccharides. Additionally, they introduced the therapeutic agent doxorubicin and the photosensitizer 5-aminolevulinic acid into the complex. The platform exhibited a pH-sensitive drug release physiology. The idea of using a nanoplatform increased the cellular uptake of the drug and photosensitizer, which increased the effectiveness of chemo-photodynamic therapy in breast cancer cells in the MCF-7 line. The experiment confirmed that nanocomplexes may have enormous potential in the targeted therapy of breast cancer (42).

Du et al. developed an intelligent drug delivery system based on apopheretin nanocages (AFt). The anticancer drug doxorubicin (DOX) and the photosensitizer - rose bengal (RB) were added to the complex. The AFt used cyclically released the drug under the influence of an increasing number of ROS. The time and place of its release were controlled by internal and external factors, avoiding incomplete drug release in response to a single stimulus. The

experiment confirmed that the rate of drug release significantly increased under the influence of irradiating cells with a laser. As a result, the drug could more effectively inhibit the development and growth of cancer cells. The results indicate that the created complex is a promising therapeutic agent in the fight against cancer in chemo-photodynamic therapy (43).

Huang et al. developed a new drug delivery complex called a conjugate that targets cancer cells. Zinc phthalocyanine (ZnPc), a photosensitizer, and the drug Ganatespib, as a protein inhibitor, were introduced into the complex. The multifunctional, nanometer-sized conjugate can selectively bind to cancer cells and then produce multiple intracellular reactive oxygen species (ROS) upon irradiation with laser light. The applied nanocomplex is more effective in destroying cancer cells compared to a single application of a drug or photosensitizer (44).

Hu et al., in their research, developed theranostic nanoparticles with the ability to attach the drug doxorubicin (DOX) and a photosensitizer. The aim of the research was to test the effectiveness of the therapy in vivo and in vitro. The applied complex with manganese oxide caused local hypoxia of the tumor, producing oxygen in situ. The use of the nanocomplex increased the effectiveness of pre-application PDT and enhanced the release of the drug DOX. The designed nanoparticles can be an alternative way to improve the effectiveness of both therapies, which will increase the popularity of their use (45).

Not only nanoparticles can increase the effectiveness of PDT and chemotherapy. Xu et al. set out to test the performance of a low molecular weight gel characterized by high drug loading capacity and sustained drug release while minimizing undesirable effects. The gel also contained an anti-cancer drug and a photosensitizer. The results confirmed that the injected form of the gel with the complex showed excellent anti-cancer efficacy thanks to the synergistic therapy (46).

In turn, Cao et al. created a system of biodegradable nanoparticles loaded with the drug docetaxel (DTX) and the photosensitizer TAPP. The system increased the efficiency of drug encapsulation as well as its uptake and accumulation in cancer cells. Compared to the method without the applied system, the one with the nanocomplex was more efficient and effective even nine times, which gives hope for its widespread use (47).

The review of the latest research made it possible to explore the subject of cancer cell treatment in more detail, which made it an extremely important introduction to the research study.

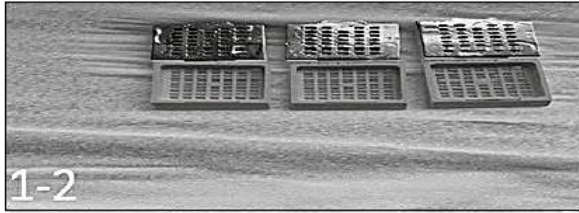


Figure 3a. Sample preparation steps: 1-2.

## MATERIALS AND METHODS

### Preparation of the histopathological material

All experiments were performed based on Approval of Bioethics Commission at the University of Rzeszów, Approval Code: Resolution No. 10/11/2018 titled Usefulness of diagnostic MRI relaxation times in the effectiveness of preoperative chemotherapy in women with breast cancer in comparison with the clinical radiological picture and histopathological examination of postoperative tissue material.

The material was collected from patients who had undergone routine surgeries. Neoadjuvant treatment was initiated in patients diagnosed with cancer based on initial imaging, histopathological and immunohistochemical tests. The surgical material for histopathological examination was fixed for 24 hours in a 10% buffered formalin solution = 4% formaldehyde solution (1). After fixation, tissue sections were collected from the breast into cassettes (2). The tissue material from the cassettes was rinsed, dehydrated, passed through intermediate fluids, and embedded in paraffin to obtain blocks - tissue processor (3). Sections were punched from the paraffin blocks on the microtome and placed on glass slides (4). Sections were dewaxed (5). Sections were routinely stained with hematoxylin and eosin (6). The final step was to cover the sections with a coverslip before this, the space between the glass and coverslip was filled with histofluid (7). All stages (in the form of photos) are shown in Figure 3.

### Stage I

Eighteen cases of invasive breast cancer after treatment were investigated neoadjuvant (pre-operative) chemotherapy. From the postoperative material, I collected a fragment of tumor tissue and healthy tissue. Both fragments were subjected first to an MRI examination with an assessment of the difference in relaxation times (T1 [ms]) of water between sick and healthy tissue. Then the tissue fragments were injected with oxygenated rose bengal at a concentration of 0.01 g/mL. They were then put

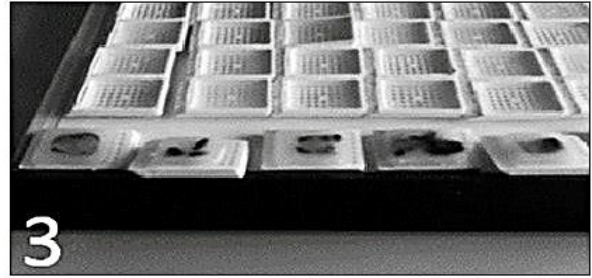


Figure 3b. Sample preparation step 3.



Figure 3c. Sample preparation step 4.

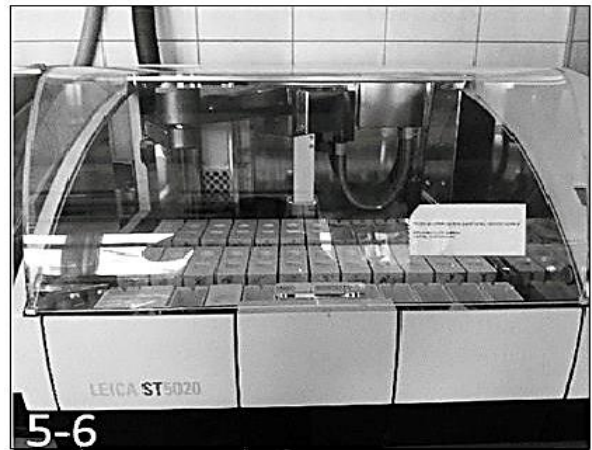


Figure 3d. Sample preparation steps: 5-6.



Figure 3e. Ready-made preparations.

Table 1. Measurement of T1 relaxation times of 6 tissues.

Sample number	T1 (ms) Sick. S	T1 (ms) Healthy. H	Difference
1.	971.47 ± 5	294.95 ± 32	676.52 ± 11
2.	891.68 ± 12	388.03 ± 12	503.65 ± 14
3.	830.18 ± 12	421.27 ± 411	408.91 ± 11
4.	599.13 ± 6	245.08 ± 10	354.05 ± 5
5.	705.99 ± 17	360.28 ± 8	345.71 ± 6
6.	538.2 ± 21	240.21 ± 7	298.06 ± 7

through 15 minutes with laser light with a wavelength of 532 nm. Sections after PDT were fixed in 10% buffered formalin, and then histopathological preparations were made using the routine method. In all cases in the RMI study, time differences were noted (T1 [ms]) between healthy and diseased tissue. Out of eighteen cases, we chose six with the highest T1 difference (Table 1).

### Stage II

24 patients with breast cancer after neoadjuvant chemotherapy were initially tested in histopathological and immunohistochemical studies. From the postoperative material, a fragment of the tumor (S) and healthy tissue (H) was prepared. Of these, patients whose cancer cell changes were small after chemotherapy but noticeable when examined under a light microscope, compared with the tissue before treatment was used in the experiment. The collected tumor (S) and healthy (H) tissue from each of the 6 patients was injected with an oxygenated solution of Rose Bengal in water (RB) with a concentration as in Table 2.

Table 2. The concentrations of the Rose Bengal solutions in water.

Sample number	Concentration value of RB for tissue
7	0.01 g/mL
8	0.01 g/mL
9	0.02 g/mL
10	0.03 g/mL
11	0.04 g/mL
12	0.05 g/mL

Figures 4a and 4b show the Bengal rose and the stage of irradiation of one of the preparations.

Each section of tumor (S) and healthy (H) tissue was exposed for 15 minutes to laser light with a wavelength of 532 nm. After PDT, each section was divided in half. Part of everyone a section (S and H) was examined by MRI. The remaining parts (S and H) were fixed in 10% buffered formalin, and then histopathological preparations were made using the routine method. A comparative analysis was performed for the material (S and H) from each of the six patients between tumor tissue (S) and healthy tissue (H) before chemotherapy, after chemotherapy, and tissue after chemotherapy and PDT.



Figure 4a. Bengal rose.

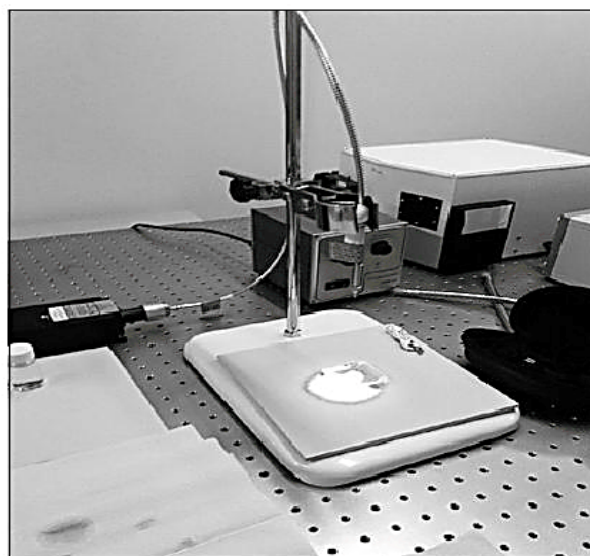


Figure 4b. The stage of irradiation of one of the preparations.

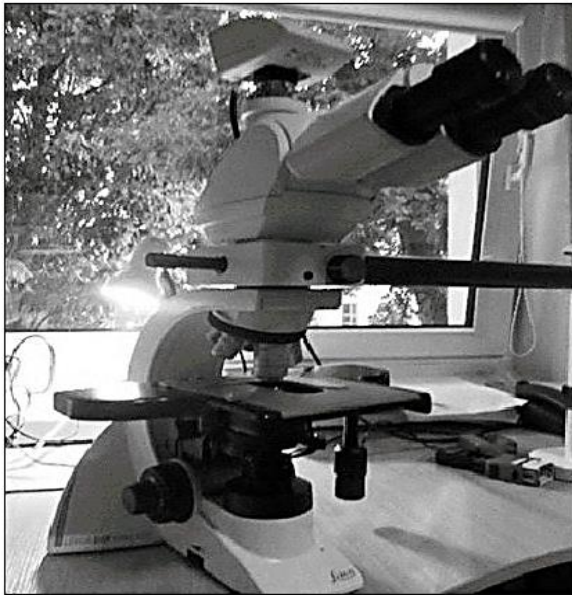


Figure 5. Microscope LEICA DM 1000 LED.

## RESULTS

The preparations after the applied diagnostic and therapeutic procedures were analyzed under the LEICA DM 1000 LED microscope. The microscope is shown in Figure 5.

### Stage I

In all cases, changes after PDT in both diseased (S) and healthy (H) tissues refer to changes in the cell nucleus consisting in condensation nuclear chromatin, homogenization with automatic nuclear atrophy, and nucleoli.

Figures 6a and 6b show the image of patient E6 of healthy tissue and sick after chemotherapy and PDT.

Figures 7a and 7b show the image of sample 10 of healthy tissue before and after chemotherapy and PDT.

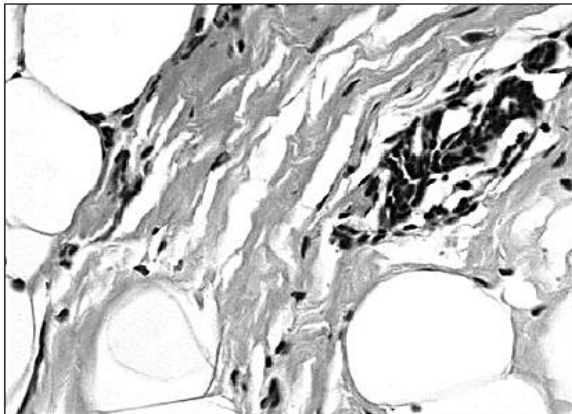


Figure 6a. The image of the healthy tissue of sample 4.

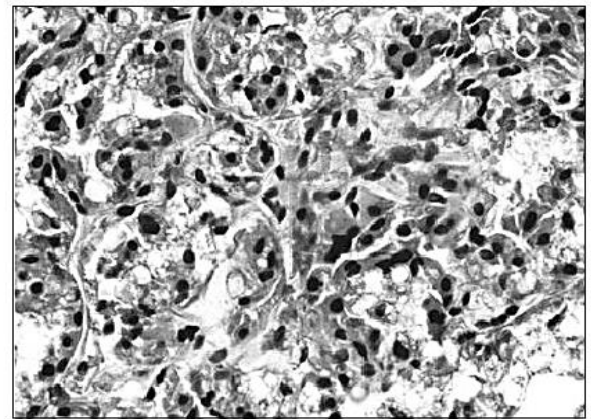


Figure 6b. The image of sick tissue after chemotherapy and PDT of sample 4.

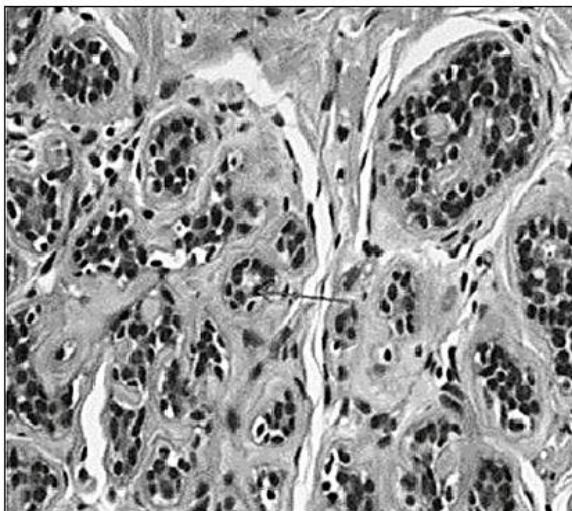


Figure 7a. The image of sample 10 of healthy tissue before chemotherapy and PDT.

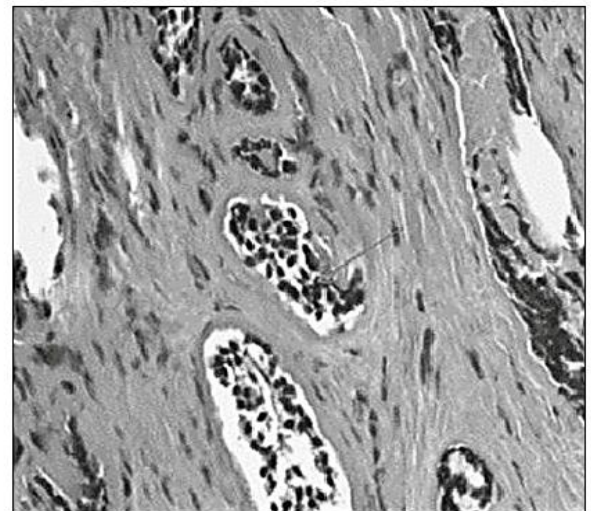


Figure 7b. The image of sample 10 of healthy tissue after chemotherapy and PDT.

Figures 8a - 8c show the image of sample 10 of sick tissue before and after chemotherapy and PDT.

## DISCUSSION

In stage I the picture of changes is up to apoptosis. The amount of cytoplasm also decreases while

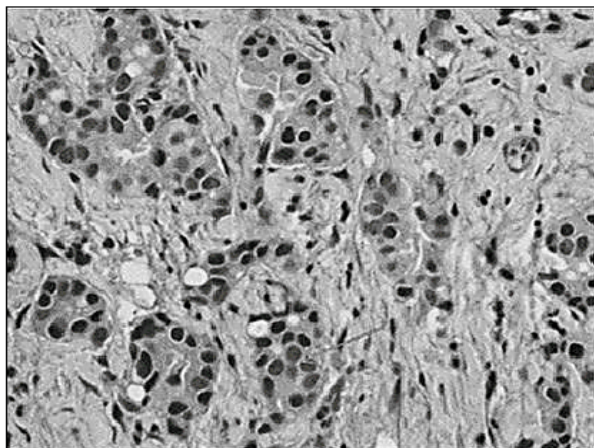


Figure 8a. The image of sample 10 of sick tissue before chemotherapy and PDT.

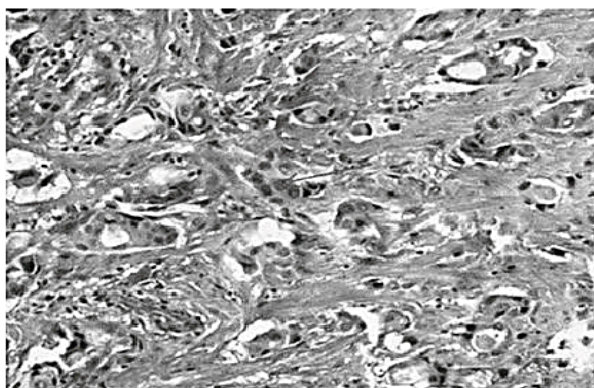


Figure 8b. The image of sample 10 of sick tissue after chemotherapy.

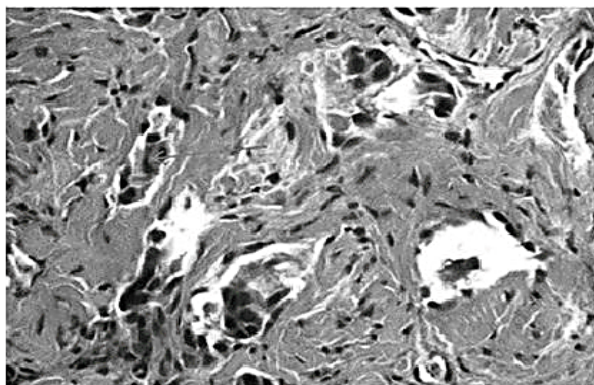


Figure 8c. The image of sample 10 of sick tissue after chemotherapy and PDT.

the change of the first chemical method is to enlarge the cells in favor of cytoplasm, vacuolization of the cytoplasm, allow eosinophilicity of the cytoplasm, bizarre nuclei, active mitotic disappears.

In stage II, the tissue tests (S and H) showed a picture of slight cell damage after chemotherapy in comparison with the material studied in stage I. The use of RB of the same concentration, i.e. 0.01 g/mL. revealed changes in cells (nuclear) similar to stage I. but only in some cells and they were less intense. With the increase in RB concentration, changes in nuclear chromatin condensation become more visible in terms of both the number of cells involved and the intensity of changes. At higher concentrations, there are also changes in the cytoplasm, consisting of its shrinkage, increase in eosinophilicity (at RB 0.04 g/mL), marked in some decay of the cytoplasm, intensification of the pyknosis of cell nuclei, up to the breakdown of cells (at an RB of 0.05 g/mL). Additionally, tissue (S and H) No. 12 was tested by irradiating it for 15 minutes 172 nm laser light but no RB was present. The type of change is similar to the presence of oxygenated RB, but the intensity is lower. It is not that significant pyknosis, cytoplasm lysis, and cell lysis as in the RB experiment.

## CONCLUSION

Neoadjuvant therapy (chemotherapy) has a promoting effect on PDT because the use of PDT with the same RB concentration in the tissue with large changes after chemotherapy resulted in more advanced cell changes than in tissue with minor changes after chemotherapy. The increase in RB concentration in PDT contributes to the intensification of degradation changes in cells cancer.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Banerjee S.M., El-Sheikh S., Malhotra A., Mosse C.A., Parker S., et al.: *J. Clin. Med.* 9, 9 pages (2020).
2. Alkarakooly Z., Al-Anbaky Q.A., Kannan K., Ali N.: *PLoS One* 13, 13 pages (2018).
3. Machado F.C., Adum de Matos R.P., Primo F.L., Tedesco A.C., Rahal P., Calmon M.F.: *Bioorg. Med. Chem.* 27, 1882 (2019).
4. Gottesman M.M., Fojo T., Bates S.E.: *Nat. Rev. Cancer* 2, 48 (2002).
5. Amawi H., Sim H.M., Tiwari A.K., Ambudkar S.V., Shukla S.: *Adv. Exp. Med. Biol.* 1141, 549 (2019).

6. De Mattos-Arruda L., Shen R., Reis-Filho J.S., Cortés J.: *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 13 566 (2016).
7. Tampa M., Sarbu M.I., Matei C., Mitran C.I., Mitran M.I., et al.: *Oncol. Lett.* 17, 4085 (2019).
8. Lou P.J., Jager H.R., Jones L., Theodossy T., Bown S.G., Hopper C.: *Br. J. Cancer* 91, 441 (2004).
9. Lin C., Tong F., Liu R., Xie R., Lei T., et al.: *Acta Pharm. Sin. B.* 10, 2348 (2020).
10. Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W., Jori G., Kessel D., et al.: *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 889 (1998).
11. Nowis D., Makowski M., Stokłosa T., Legat M., Issat T., Gołab J.: *Acta Biochim. Pol.* 52, 339 (2005).
12. Almeida R.D., Manadas B.J., Carvalho A.P., Duarte C.B.: *Biochim. Biophys. Acta* 1704, 59 (2004).
13. Obaid G., Broekgaarden M., Bulin A.L., Huang H.C., Kuriakose J., et al.: *Nanoscale* 8, 12471 (2016).
14. Zhu J., Tian S., Li K.T., Chen Q., Jiang Y., et al.: *Cancer Med.* 7, 1908 (2018).
15. Mallidi S., Anbil S., Bulin A.L., Obaid G., Ichikawa M., Hasan T.: *Theranostics* 6, 2458 (2016).
16. Garg T., Jain N.K., Rath G., Goyal A.K.: *Crit. Re. Ther. Drug Carrier Syst.* 32, 389 (2015).
17. Lamberti M.J., Vittar N.B.R., Rivarola V.A.: *World J. Clin. Oncol.* 5, 901 (2014).
18. Kessel D.: *Photochem. Photobiol.* 95, 119 (2019).
19. Pinto da Silva L., Magalhaes C.M., Nunez-Montenegro A., Ferreira P.J.O., Durate D., et al.: *Biomolecules* 9, pages (2019).
20. Sun M., Zhang Y., He Y., Xiong M., Huang H., et al.: *Colloids Surf. B Biointerfaces* 180, 313 (2019).
21. DeMichele A., Yee D., Esserman L.: *N. Engl. J. Med.* 377, 2287 (2017).
22. Barr H., Tralau C.J., Boulos P.B., MacRobert A.J., Tilly R., Bown S.G.: *Photochem. Photobiol.* 46, 795 (1987).
23. Khorsandi K., Hosseinzadeh R., Shahidi F.K.J.: *Cell Biochem.* 120, 4998 (2019).
24. Nielsen H.M., Overgaard M., Grau C., Jensen A.R., Overgaard J.J.: *Clin. Oncol.* 24, 2268 (2006).
25. Ragaz J., Olivotto I.A., Spinelli J.J., Phillips N., Jackson S.M., et al.: *J. Natl. Cancer Inst.* 97, 116 (2005).
26. Liu Y., Hou G., Zhang X., Liu J.J., Zhang S., Zhang J.: *J. Breast Cancer* 17, 161 (2014).
27. Korbelik M.: *J. Clin. Laser Med. Surg.* 14, 329 (1996).
28. Canti G., de Simone A., Korbelik M.: *Photochem. Photobiol. Sci.* 1, 79 (2002).
29. Zhao B., He Y.Y.: *Expert Rev. Anticancer Ther.* 10, 1797 (2010).
30. Fayter D., Corbett M., Heirs M.M., Fox D., Eastwood A.: *Health Technol. Assess.* 14, 1 (2010).
31. Shishkova N., Kuznetsova O., Berezov T.: *Cancer Biol. Med.* 9, 9 (2012).
32. Fu J.J., Li C.W., Liu Y., Chen M.Y., Zhang Q., et al.: *J. Nanobiotechnology* 18, 11 pages (2020).
33. Li X., Vinothini K., Ramesh T., Rajan M., Ramu A.: *Drug Deliv.* 27, 791 (2020).
34. Aru B., Günay A., Şenkuytu E., Yanıkkaya Demirel G., Gürek A.G., Atilla D.A.: *ACS Omega.* 5, 25854 (2020).
35. Zhu Y., Yu F., Tan Y., Wen L., Li Y., et al.: *Int. J. Nanomedicine* 15, 6531 (2020).
36. Jin F., Qi J., Zhu M., Liu D., You Y., et al.: *ACS Appl. Mater. Interfaces* 12, 32372 (2020).
37. Shi X., Yang X., Liu M., Wang R., Qiu N., et al.: *Carbohydr. Polym.* 254, 11 pages (2021).
38. Huang Y., Xiao Z., Guan Z., Shen Y., Jiang Y., et al.: *J. Control. Release* 319, 119 (2020).
39. Zhao Y., Zhao Y., Ma Q., Zhang H., Liu Y., et al.: *Colloids Surf. B Biointerfaces* 188, 8 pages (2020).
40. Jiang D., Gao X., Kang T., Feng X., Yao J., et al.: *Nanoscale* 8, 3100 (2016).
41. Tan T., Wang Y., Wang J., Wang Z., Wang H., et al.: *Acta Pharm. Sin. B* 10, 529 (2020).
42. Wang Y., Yang M., Qian J., Xu W., Wang J., et al.: *Carbohydr. Polym.* 203, 203 (2019).
43. Du B., Jia S., Wang Q., Ding X., Liu Y., Yao H., Zhou J., Self-Targeting A. *Biomacromolecules* 19, 1026 (2018).
44. Huang L., Wei G., Sun X., Jiang Y., Huang Z., et al.: *Eur. J. Med. Chem.* 151, 294 (2018).
45. Hu D., Chen L., Qu Y., Peng J., Chu B., et al.: *Theranostics* 8, 1558 (2018).
46. Xu L., Zhao M., Yang Y., Liang Y., Sun C., et al.: *Mater Chem. B.* 5, 9157 (2017).
47. Cao W., Zeng X., Liu G., Li Z., Zeng X., et al.: *Acta Biomater.* 26, 145 (2015).



Ze względu na różnorodne uboczne działania klasycznej terapii (chirurgia, chemioterapia, radioterapia), stosowanej w raku piersi, poszukuje się metod leczniczych powodujących jak najmniej skutków ubocznych. Terapią przyszłości, może stać się sprzężenie chemioterapii z fotodynamiką i nanotechnologią. Terapia PDT jest już z powodzeniem stosowana w leczeniu zapaleń i zmian nowotworowych i przednowotworowych położonych powierzchownie. Zalety tej opcji leczniczej to: szybki przebieg zabiegu, brak nasilonych zwłóknień i blizn, możliwość wielokrotnych powtórzeń z powodu braku uszkodzeń DNA, a więc działania prokancerogennego, działanie destrukcyjne ograniczone do chorych tkanek, bez efektu zmian uogólnionych. Schemat działania PDT polega na podaży fotouczulacza do chorej tkanki, a następnie naświetlaniu obszaru światłem o długości fali zgodnej z pasmem absorpcji fotouczulacza. Reakcja fotodynamiczna polega na zmianach w mitochondriach oraz destrukcji naczyń guza, w związku z produkcją toksycznych rodników tlenowych. W żywych komórkach (*in vivo*) lub *in vitro* w hodowlach komórkowych, obrazem tych zmian jest apoptoza lub martwica komórek nowotworu. Zmiany te można obserwować w mikroskopie fluorescencyjnym, lub po odpowiednim przygotowaniu technicznym, w mikroskopie świetlnym. Przegląd literatury naukowej dowodzi użyteczności nanoplatform (swoistych nanoleków) złożonych z nanonośników organicznych np. liposomów, miceli lub nieorganicznych jak tlenki metali, polimerów, z chemioterapeutykami oraz z fotouczulaczem. Przeprowadzone eksperymenty dowodzą użyteczności nanoleków w selektywnym dostarczeniu składników do tkanek nowotworowych położonych głębiej, kontroli uwalniania chemioterapeutyku oraz kontroli adekwatnego czasu działania. Rola PDT w tym wypadku ma działanie toksyczne synergistyczne i promujące w stosunku do chemioterapii. Doświadczenie przeprowadzone przez nasz zespół polegało na zbadaniu wpływu PDT na tkanki raka piersi po chemioterapii. Zaobserwowane zmiany dotyczyły obrazów w mikroskopie świetlnym tkanek zdrowych i raka przed chemioterapią, po chemioterapii i po chemioterapii i PDT. Jako fotouczulacza użyliśmy różu bengalskiego (RB). Zaobserwowaliśmy nasilenie zmian destrukcji komórek po chemioterapii poddanych PDT. Wraz ze wzrostem stężenia RB, rósł też poziom destrukcji tkanki raka.

W ciągu ostatnich dwudziestu lat chemioterapia stała się skuteczniejszą opcją dla pacjentów, u których biopsja lub radioterapia nie przyniosły zadowalających rezultatów. Na skuteczność chemioterapii wpływa m.in. rodzaj i fizjologia zastosowanych transporterów białek błonowych. Ostatnie doniesienia wykazały, że odsetek odpowiedzi na chemioterapię jest bardzo ważnym czynnikiem prognostycznym nawrotu choroby.

W codziennej diagnostyce, rozpoznanie raka ustalone jest na podstawie badania histopatologicznego fragmentów guza nowotworowego. Na podstawie oceny parametrów histopatologicznych, głównie oceny receptorów estrogenowych i progesteronowych, HER2 i antygenu Ki67, można wyróżnić podtypy biologiczne raka piersi. Są to rak Luminalny A, Luminalny B HER2-ujemny, Luminalny B-Her2 dodatni, Trójujemny. Podtypy biologiczne raka piersi stanowią podstawę do wdrożenia leczenia neoadiuwantowego chemioterapią. Niepełna skuteczność leczenia pierwotnego raka piersi jest przyczyną pozostawienia choroby resztkowej co prowadzi do nawrotów raka. Na tej podstawie CAP (College of American Pathologist) wprowadziło wzorce postępowania z materiałem operacyjnym po leczeniu wstępnym systemowym. System oceny według Pinder i RCB uwzględniają odpowiedź w obrębie raka pierwotnego inwazyjnego i przedinwazyjnego oraz w przerzutach do węzłów chłonnych. Ze względów praktycznych, w codziennej praktyce histopatologicznej zwykle stosowany jest system według Pinder. Ocena mikroskopowa materiału po leczeniu systemowym oprócz rutynowych elementów raportu patomorfologicznego powinna zawierać ocenę stopnia odpowiedzi na leczenie. Efektem leczenia neoadiuwantowego systemowego może być: całkowita odpowiedź patomorfologiczna, częściowa odpowiedź patomorfologiczna z pozostawieniem choroby resztkowej, brak odpowiedzi lub progresja choroby nowotworowej. Zmiany po leczeniu wstępnym w obrazie histopatologicznym mogą przedstawiać różnorodne zmiany degeneracyjne tkanek i komórek. Resztkowe komórki nowotworowe mogą mieć nietypowy wygląd. Czasem trzeba, w celu wykrycia resztkowych komórek raka w łożu guza, marginesach chirurgicznych i naczyniach limfatycznych stosować barwienia immunohistochemiczne. Konieczne jest często wnikliwe poszukiwanie resztkowego raka, co wymaga przebadanie wielu skrawków tkanki piersi. W ostatnich doniesieniach dowiedziono, że stopień odpowiedzi na leczenie neoadiuwantowe jest bardzo ważnym czynnikiem prognostycznym w zakresie:

przewidywania czasu przeżycia bez choroby (ang. DFS-disease-free survival) i całkowitego czasu przeżycia (ang. OS-overall survival). Zostało zbadanych osiemnaście przypadków inwazyjnego raka piersi po leczeniu przedoperacyjną chemioterapią. Z materiału pooperacyjnego pobrano fragment tkanki nowotworowej oraz tkankę zdrową. Oba fragmenty poddano najpierw badaniu MRI z oceną różnicy czasów relaksacji ( $T_1$  [ms]) wody między tkanką chorą a zdrową. Następnie do fragmentu tkanki wstrzyknięto natleniony róż bengalski (RB) o stężeniu 0,01 g/ml. Następnie poddano je działaniu światła laserowego o długości fali 532 nm przez 15 minut. Skrawki po PDT utrwalono w 10% buforowanej formalinie, a następnie wykonano preparaty histopatologiczne, stosując rutynową metodę. We wszystkich przypadkach w badaniu MRI odnotowano różnice czasowe ( $T_1$  [ms]) między tkanką zdrową a chorą. Spośród osiemnastu przypadków wybraliśmy sześć z największą różnicą  $T_1$ .

Tabela 1. Czasy relaksacji  $T_1$  tkanek nowotworowych piersi oraz tkanek zdrowych.

Numer próbki	$T_1$ (ms) Sick. S	$T_1$ (ms) Healthy. H	Różnice (ms) Difference
1.	971.47 ± 5	294.95 ± 32	676.52 ± 11
2.	891.68 ± 12	388.03 ± 12	503.65 ± 14
3.	830.18 ± 12	421.27 ± 411	408.91 ± 11
4.	599.13 ± 6	245.08 ± 10	354.05 ± 5
5.	705.99 ± 17	360.28 ± 8	345.71 ± 6
6.	538.2 ± 21	240.21 ± 7	298.06 ± 7

We wszystkich przypadkach zmiany po PDT zarówno w tkance chorej (S), jak i zdrowej (H) dotyczyły zmian w jądrze komórkowym polegających na kondensacji chromatyny jądrowej, homogenizacji z automatycznym zanikiem jąder i jąderkach.

Terapia neoadiuwantowa (chemioterapia) ma działanie promujące PDT, ponieważ zastosowanie PDT o tym samym stężeniu RB w tkance z dużymi zmianami po chemioterapii skutkowało bardziej zaawansowanymi zmianami komórkowymi niż w tkance z niewielkimi zmianami po chemioterapii. Wzrost stężenia RB w PDT przyczynia się do nasilenia zmian degradacyjnych w komórkach nowotworowych.

Obecne leczenie raka piersi jest interdyscyplinarne, a standardowa chemioterapia może przynieść korzyści z leczenia uzupełniającego, takiego jak PDT. Zastosowanie działania fotodynamicznego na tkankę po chemioterapeutyku *in vitro* wykazuje dodatkowe uszkodzenie komórek, co określono na podstawie analizy histologicznej.

Artykuł nr 3 przedstawia badania przedkliniczne na modelu tkankowym *in vitro* PDT z różem bengalskim, które mają potencjał do klinicznego leczenia raka piersi. Badanie to wykazało znaczenie analizy cech histopatologicznych podczas leczenia raka piersi. Efekty działania fotodynamicznego *in vitro* zastosowane w tym badaniu sugerują, że zastosowanie PDT po chemioterapii może wspomóc eradykację komórek raka piersi.

## 7. PODSUMOWANIE

*Może któregoś dnia nie będzie już konieczności wykonywania operacji chirurgicznych.*

*Byłaby to sytuacja idealna.*

*Oczywiście dziś jest to niemożliwe, nie wykluczam jednak, że w przyszłości takie rozwiązanie będzie w zasięgu naszych możliwości.*

*George Somlo (Konferencja w San Antonio w grudniu 2015 roku)*

Rak piersi jest najczęściej występującym u kobiet rakiem i stanowi też wiodącą przyczynę zgonów u kobiet. Charakteryzuje się wysokim odsetkiem nawrotów. Jest to spowodowane głównie niepełną skutecznością pierwotnego leczenia z pozostawieniem choroby resztkowej. Leczenie raka piersi jest leczeniem skojarzonym i obejmuje metody terapii miejscowej, tj. leczenie chirurgiczne i radioterapię oraz metody leczenia ogólnoustrojowego, jak chemioterapię i hormonoterapię czy leczenie celowane. Radioterapia i chemioterapia nie działają selektywnie, co wywołuje dużo skutków ubocznych. Stasowana chemioterapia aktywuje wtórną oporność komórek raka. Rozpoznanie raka możliwe jest dzięki badaniu patomorfologicznemu fragmentów guza. Aby uzyskać tkanki guza, konieczny jest rozległy zabieg operacyjny. Trudności sprawia diagnostyka niewielkich ognisk i postać wielogniskowa raka trudno odróżniająca się od tkanek prawidłowych. Skutki uboczne diagnostyki i terapii raka piersi mają ujemny wpływ na sprawność fizyczną i psychiczną pacjentów. Diagnoza, jaką jest choroba nowotworowa, zmusza pacjenta do zmierzenia się z trudnym wyzwaniem na wielu płaszczyznach w obszarze medycznym, ale również społecznym. Istnieje potrzeba, aby wdrożyć metody diagnostyczne i lecznicze jak najmniej inwazyjne. Metoda fotodynamiczna może stać się czułą, swoistą i miejscową formą terapii.

Zaproponowany eksperyment przeprowadzono *in vitro* na tkankach piersi po rutynowej chemioterapii. Wykorzystując rezonans magnetyczny analizowano, czy obecne są różnice w wartościach czasów relaksacji wody w tkankach zdrowych i nowotworowych, po chemioterapii oraz w tkankach zdrowych i nowotworowych po chemioterapii i terapii fotodynamicznej.

Wykorzystując metodę fotodynamiczną analizowano wpływ tlenu singletowego na tkanki raka piersi po chemioterapii. Obrazy histopatologiczne raka z rutynowych badań przed chemioterapią, porównano z obrazami po chemioterapii oraz z obrazami po chemioterapii i terapii fotodynamicznej. Miernikiem były zmiany w komórkach i tkankach. Część skrawków tkanek piersi po chemioterapii i fotodynamicznie dodatkowo zbadano wykorzystując rezonans magnetyczny. Eksperyment udowodnił, że w badaniu z wykorzystaniem rezonansu magnetycznego obecne są różnice w wartościach czasów relaksacji wody pomiędzy tkanką zdrową i tkanką nowotworową po chemioterapii. Ich ekwiwalentem są obserwowane zmiany histopatologiczne tkanek nowotworowych po chemioterapii i poddanych terapii fotodynamicznej, które są zależne od produkcji toksycznych rodników tlenowych.

## 8. WNIOSKI

Metoda fotodynamiczna zastosowana w tej pracy ma walory diagnostyczne polegające na: możliwości uwidocznienia bardzo małych skupisk raka, niewidocznych w konwencjonalnych badaniach obrazowych. Odnosi się to też do zaawansowanej choroby nowotworowej (przerzutów). Zjawisko polega na świeceniu tkanek, w których nastąpiła akumulacja fotouczulacza. Diagnostyka polegałaby na obserwacji takiej fluorescencji; braku konieczności ponownego chirurgicznego pobierania tkanek do oceny leczenia systemowego oraz możliwość wielokrotnego badania danego obszaru bez konieczności przerywania ciągłości tkanek.

Do terapeutycznych walorów zastosowanej terapii fotodynamicznej należy: miejscowa eradykacja tkanki nowotworowej z ominięciem leczenia systemowego i operacyjnego (odnosi się to szczególnie do wczesnych stadiów choroby, gdy nie ma przerzutów); niszczenie głównie tkanki raka, z zachowaniem większości rusztowania łącznotkankowego, co skutkuje mniejszymi zwłóknieniami i ograniczeniem bliznowacenia; możliwość dopasowania dawki promieniowania do wielkości tkanki raka; powtarzalność wyników.

Eksperymenty dowiodły skuteczności PDT zastosowanej po chemioterapii, w finalnej eradykacji tkanki raka. Badanie PDT pod kontrolą obrazową może być obiecującym, bezpiecznym i minimalnie inwazyjnym leczeniem pierwotnego raka piersi. Wiele aktualnych badań PDT koncentruje się na poszukiwaniu sposobów na zwiększenie selektywności PDT między guzami a ich organem pochodzenia. Są to fotouczulacze ze specyficznymi dla nowotworu przeciwciałami. Obiecujące jest zastosowanie nanonośników do fotouczulającego dostarczania leków. Ma to szczególne znaczenie w przypadku raka lekoopornego, w którym efekt fotodynamiczny może odgrywać rolę w omijaniu i hamowaniu dróg ucieczki chemioterapeutyków. Przydatność PDT polega na tym, że jest to badanie powtarzalne. Łatwiej jest powtórzyć PDT niż powtórzyć operację, chemioterapię lub radioterapię. Ma to znaczenie u pacjentów ze słabą lub niepełną odpowiedzią na chemioterapię przedoperacyjną lub w przypadkach, gdy chemioterapia i operacja nie są możliwe. Udowodniono, że niejednorodność zmian po

chemioterapii w tkankach nowotworu widoczna w obrazie histopatologicznym jest możliwa do oceny za pomocą MRI oraz, że zastosowanie metody fotodynamicznej (PDT) zmienia dodatkowo strukturę tkanek uprzednio zmienionych działaniem chemioterapii i zmiany te mogą być widoczne w obrazie mikroskopowym i MRI. W przyszłości wykorzystanie fotodynamiki i MRI może polepszyć bezinwazyjną diagnostykę raka piersi. Wykorzystanie fotodynamiki może być metodą główną lub uzupełniającą w terapii raka piersi.

## 9. DOROBEK NAUKOWY

**Łączna liczba IF: 12.533**

**Łączna liczba punktów MEiN: 820**

**Liczba publikacji z IF: 4**

**Liczba publikacji bez IF z punktami MEiN: 14**

**Liczba rozdziałów: 3**

### A. PRACE Z IF/Z PUNKTACJĄ MEiN

L.p.	Opis Bibliograficzny	IF	MEiN
1	<b>Ostańska E</b> , Barnaś E, Bartusik-Aebisher D, Dynarowicz K, Szpunar M, Skręt-Magierło J, Aebisher D. Histopathological Analysis of the Effect of Photodynamic Action on Post-Chemotherapy Excised Breast Cancer Tissue. <i>Medicina</i> . 2022; 58(6):700.	2.430	40
2	Barnaś E, <b>Ostańska E</b> , Bartusik-Aebisher D, Dynarowicz K, Skręt-Magierło JE, Aebisher D. Breast cancer tissue treated using photodynamic therapy. <i>Acta Poloniae Pharmaceutica</i> . 2022, 78(6) 835-843.	0.330	100
3	<b>Ostańska E</b> , Aebisher D, Bartusik-Aebisher D. Tytuł oryginału: The potential of photodynamic therapy in current breast cancer treatment methodologies Czasopismo: <i>Biomedicine and Pharmacotherapy</i> Szczegóły: 2021.137, id. art. 111302.	6.529	100
4	Opalińska A, Kwiatkowska D, Burdacki A, Markiewicz M M, Samotij D, Dudziński M, Niemiec-Dudek J, <b>Ostańska E</b> , Reich Adam Andrzej. Multifocal Pyoderma Gangrenosum with an Underlying Hemophagocytic	3.264	100

	Lymphohistiocytosis : Case Report and the Review of the Literature. Dermatology and Therapy 2021, 11(4), 1217-1237.		
<b>4</b>	<b>Łączna Liczba</b>	<b>12.533</b>	<b>340</b>

## B. PRACE BEZ IF/Z PUNKTACJĄ MEiN

<b>L.p.</b>	<b>Opis Bibliograficzny</b>	<b>IF</b>	<b>MEiN</b>
1	<b>Ostańska E</b> , Aebisher D, Bartusik-Aebisher D. Ocena skuteczności chemioterapii raka piersi z zastosowaniem czasów relaksacji rezonansu magnetycznego oraz metody fotodynamicznej, Postępy w badaniach nad nowotworami - przegląd wybranych zagadnień / redakcja Łukasz B. Pilarz, Kamil Maciąg Adres wydawniczy: Lublin : Wydawnictwo Naukowe TYGIEL Sp. z o. o., 2021, S. 127-135, Uwagi: Tyt. ang.: Assessment of the effectiveness of breast cancer chemotherapy with the use of magnetic resonance relaxation times and the photodynamic method, p-ISBN: 978-83-66489-66-0.	-	20
2	<b>Ostańska E</b> , Aebisher D, Bartusik-Aebisher D. Histopatologiczna ewaluacja tkanki raka piersi po chemioterapii, Wybrane choroby nowotworowe - diagnostyka i leczenie / redakcja Kinga Kalbarczyk, Monika Maciąg, Adres wydawniczy: Lublin : Wydawnictwo Naukowe TYGIEL Sp. z o. o., 2021, S. 177-186, Uwagi: Tyt. ang.: Histopathological evaluation of breast cancer	-	20

	tissue after chemotherapy, .p-ISBN: 978-83-66489-90-5		
3	<b>Ostańska E</b> , Aebisher D, Bartusik-Aebisher D. Interdyscyplinarne diagnozowanie raka piersi Tytuł całości: W: Wybrane choroby nowotworowe - diagnostyka i leczenie / redakcja Kinga Kalbarczyk, Monika Maciąg, Adres wydawniczy: Lublin : Wydawnictwo Naukowe TYGIEL Sp. z o. o., 2021, S. 210-219 , Uwagi: Tyt. ang.: Interdisciplinary diagnosis of breast cancer, p- ISBN: 978-83-66489-90-5.	-	20
4	<b>Ostańska E</b> , Aebisher D, Bartusik-Aebisher D. Diagnostyka raka piersi: zalety i ograniczenia, Wyroby Medyczne, 2021, 1, s. 16-21, Uwagi: Dodatek tematyczny nr 1 "Diagnostyka obrazowa", p-ISSN: 2543-8069.	-	5
5	Bober Z, Galiniak S M, Leksa N, Dynarowicz K, Aebisher D, <b>Ostańska E</b> , Czmił A, Bar P, Bartusik-Aebisher D, Tutka P. Cytisine parameters measured in the 1.5 Tesla magnetic field, European Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2020, 18, (1), s. 16-19, Uwagi: Poprzednie tytuły czasopisma: Przegląd Medyczny Uniwersytetu Rzeszowskiego i Narodowego Instytutu Leków w Warszawie: 2011-2015 (ISSN: 2082-369X) Medical Review: 2015-2016 (e-ISSN 2450-6761) ; Review Paper, p-ISSN: 2544-2406, e-ISSN: 2544-1361.	-	20
6	<b>Ostańska E</b> , Aebisher D, Kaznowska E B, Bartusik-Aebisher D. Primary breast angiosarcoma - a case report Czasopismo: European Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2020, 18 (4), s. 331-334,	-	20

	Uwagi: Poprzednie tytuły czasopisma: Przegląd Medyczny Uniwersytetu Rzeszowskiego i Narodowego Instytutu Leków w Warszawie: 2011-2015 (ISSN: 2082-369X) Medical Review: 2015-2016 (e-ISSN 2450-6761) ; Review Paper, p-ISSN: 2544-2406, e-ISSN: 2544-1361.		
7	<b>Ostańska E</b> , Aebisher D, Bartusik-Aebisher D. Solid pseudopapillary neoplasm of the pancreas : a case report, Medical Research Journal, 2020, 5 (1), s. 50-54, p-ISSN: 2451-2591, e-ISSN: 2451-4101.	-	100
8	<b>Ostańska E</b> , Aebisher D, Kaznowska E B, Bartusik-Aebisher D. Bladder Mullerianosis - a case report Czasopismo: European Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2019,17 (3), s. 277-280, Uwagi: Poprzednie tytuły czasopisma: Przegląd Medyczny Uniwersytetu Rzeszowskiego i Narodowego Instytutu Leków w Warszawie: 2011-2015 (ISSN: 2082-369X) Medical Review: 2015-2016 (e-ISSN 2450-6761) ; Review Paper, p-ISSN: 2544-2406, e-ISSN: 2544-1361.	-	20
9	Gustalik J, Bartusik-Aebisher D, <b>Ostańska E</b> , Przyczyna P, Osuchowski M, Aebisher D, Galiniak S M, Kaznowska E B. Epidemiology of breast cancer in Podkarpacie voivodship, European Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2019, 17 (3), s. 242-245, Uwagi: Poprzednie tytuły czasopisma: Przegląd Medyczny Uniwersytetu Rzeszowskiego i Narodowego Instytutu Leków w Warszawie: 2011-2015 (ISSN: 2082-369X) Medical Review: 2015-2016 (e-ISSN	-	20

	2450-6761) ; Review Paper, p-ISSN: 2544-2406, e-ISSN: 2544-1361.		
10	<p><b>Ostańska E</b>, Bartusik-Aebisher D, Aebisher D, Kaznowska E B. Neoadjuvant therapy in breast cancer - objectives and tasks, European Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2019, 17 (2), s. 153-156,</p> <p>Uwagi: Poprzednie tytuły czasopisma: Przegląd Medyczny Uniwersytetu Rzeszowskiego i Narodowego Instytutu Leków w Warszawie: 2011-2015 (ISSN: 2082-369X) Medical Review: 2015-2016 (e-ISSN 2450-6761) ; Review Paper, p-ISSN: 2544-2406, e-ISSN: 2544-1361.</p>	-	20
11	<p><b>Ostańska E</b>, Bartusik-Aebisher D, Gustalik J, Aebisher D, Galiniak S M, Kaznowska E B. The use of imaging tests to obtain optimal margins in breast surgery, European Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2019, 17, (3), s. 246-249,</p> <p>Uwagi: Poprzednie tytuły czasopisma: Przegląd Medyczny Uniwersytetu Rzeszowskiego i Narodowego Instytutu Leków w Warszawie: 2011-2015 (ISSN: 2082-369X) Medical Review: 2015-2016 (e-ISSN 2450-6761); Review Paper, p-ISSN: 2544-2406, e-ISSN: 2544-1361.</p>	-	20
12	<p><b>Ostańska E</b>, Aebisher D, Gustalik J, Leksa N, Bartusik-Aebisher D. Flow Cytometry : Acute Leukaemia, Introduction to Flow Cytometry / editor Jakub Werner</p> <p>Adres wydawniczy: New York : Nova Science Publishers, 2019, 25 s, Seria: Cell Biology Research Progress, Uwagi: eBook, p-ISBN: 978-1-53616-604-0.</p>	-	5

13	Gustalik J, Aebisher D, Leksa N, <b>Ostańska E</b> , Bartusik-Aebisher D. Flow Cytometry : Disorders of Plasma Cells, Introduction to Flow Cytometry / editor Jakub Werner Adres wydawniczy: New York : Nova Science Publishers, 2019, 18 s., Seria: Cell Biology Research Progress, Uwagi: eBook, p-ISBN: 978-1-53616-604-0.	-	5
14	Samotij D, Gawron E, Szczęch JM, <b>Ostańska E</b> , Reich AA. Acrodermatitis Continua of Hallopeau Evolving into Generalized Pustular Psoriasis Following COVID-19 : A Case Report of a Successful Treatment with Infliximab in Combination with Acitretin. <i>Biologics: Targets and Therapy</i> 2021,15, 07-113.		100
15	Ossolińska A, Morawiecka N, Żychowska M, Opalińska A, <b>Ostańska E</b> , Reich AA. Pathergy phenomenon leading to the diagnosis of pyoderma gangrenosum. <i>Forum Dermatologicum</i> 2021 7, 1, 12-16.		40
16	Leksa N, Aebisher D, Gustalik J, <b>Ostańska E</b> , Bartusik-Aebisher D. Flow Cytometry : Normal Blood and Bone Marrow Populations, Introduction to Flow Cytometry / editor Jakub Werner, Adres wydawniczy: New York : Nova Science Publishers, 2019, 20 s, Seria: Cell Biology Research Progress.	-	5
	Jaworecka K, Kijowski R, Ostańska E, Mazur-Chromiak P, Reich AA. Pierwotna amyloidozą skórna - opis przypadku. <i>Forum Dermatologicum</i> . 2020, 6(3), 126-129. 40.000.		40
<b>14</b>	<b>Łączna liczba</b>	-	<b>480</b>

## 10. STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Streszczenie rozprawy doktorskiej pt.  
**„Ocena skuteczności chemioterapii raka piersi z zastosowaniem czasów  
relaksacji rezonansu magnetycznego i metody fotodynamicznej”**

Lek. Elżbieta Ostańska

Promotor: dr hab. n. med. inż. Dorota Bartusik-Aebisher, Profesor UR

Leczenie raka piersi jest leczeniem skojarzonym i obejmuje metody terapii miejscowej, tj. leczenie chirurgiczne i radioterapię oraz metody leczenia ogólnoustrojowego, jak chemioterapię i hormonoterapię czy leczenie celowane. Aby stosowana forma leczenia była efektywna i skuteczna na całym etapie leczenia należy ją nieustannie monitorować. W niniejszej pracy, w celu oceny skuteczności chemioterapii raka piersi wykorzystano kliniczny rezonans magnetyczny oraz metodę fotodynamiczną.

Eksperyment polegał na pobraniu w czasie zabiegu operacyjnego próbek tkankowych raka piersi, które były badane przy użyciu rezonansu magnetycznego (MRI) na aparacie 1.5 Tesla (GE OPTIMA) oraz metodą fotodynamiczną. Uzyskane pomiary fizykochemiczne tkanek zostały porównane z obrazami histopatologicznymi materiału pooperacyjnego. Tkanki nowotworowe poddano również terapii fotodynamicznej wykorzystując róż bengalski w celu redukcji komórek nowotworowych raka piersi analizując skuteczność PDT w badaniu *in vitro*.

Przeprowadzone badania potwierdziły, iż tkanka zdrowa oraz tkanka nowotworowa po chemioterapii w oparciu o różnicę zawartości wody posiadają różne czasy relaksacji w badaniu MRI. Dodatkowo zaaplikowana terapia PDT na tkanki nowotworowe wywołała uszkodzenie błon cytoplazmatycznych skutkując uszkodzeniem lizosomów i mitochondriów. Tkanki leczone chemioterapią oraz PDT wykazywały dalej posunięte zmiany degradacyjne tkanki nowotworowej.

Badania potwierdziły, iż za pomocą klinicznego rezonansu magnetycznego analizując czasy relaksacji możliwe jest zróżnicowanie tkanek leczonych i nieleczonych. Dodatkowo potwierdzono skuteczność terapii PDT tkanek nowotworowych w warunkach *in vitro*.

## 11. STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ W JĘZYKU ANGIELSKIM

Summary of doctoral dissertation on:

### **„Evaluation of the effectiveness of chemotherapy of breast cancer with the application of magnetic resonance relaxation times and the photodynamic method”**

Treatment of breast cancer is a combination therapy and includes topical treatments, such as surgery and radiotherapy, and systemic treatments such as chemotherapy and hormone therapy, and targeted treatments. In order for the applied form of treatment to be effective and efficient throughout the treatment phase, it must be constantly monitored. In this study, clinical magnetic resonance imaging and the photodynamic method were used to assess the effectiveness of chemotherapy in breast cancer.

The experiment consisted in collecting breast cancer tissue samples during surgery, which were examined with the use of magnetic resonance imaging (MRI) using a 1.5 Tesla apparatus (GE OPTIMA) and the photodynamic method. The obtained physicochemical tissue measurements were compared with the histopathological images of the postoperative material. Tumor tissues were also subjected to photodynamic therapy using rose bengal to reduce neoplastic cells of breast cancer by analyzing the effectiveness of PDT in an in vitro study.

The conducted research confirmed that healthy tissue and neoplastic tissue after chemotherapy, based on the difference in water content, have different relaxation times in the MRI examination. Additionally, the PDT therapy applied to neoplastic tissues caused damage to the cytoplasmic membranes, resulting in damage to lysosomes and mitochondria. Tissues treated with chemotherapy and PDT stage showed further changes in the degradation of the neoplastic tissue.

The study confirmed that using clinical magnetic resonance imaging, it is possible to differentiate between treated and untreated tissues by analyzing relaxation times. Additionally, the effectiveness of PDT in neoplastic tissues was confirmed in vitro.

## 12. ZGODA BIOETYCZNA



KOMISJA BIOETYCZNA UNIwersYTETU RZESZOWSKIEGO  
UNIwersYTET RZESZOWSKI  
ul. Warszawska 26 A, 35-205 Rzeszów  
tel. (017) 872 19 25

**UCHWAŁA Nr 10/11/2018**

**Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Rzeszowskim**

**08/11/2018**

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Rzeszowskim, działając na podstawie art. 29 ust. 3 pkt 2 ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz. U. z dnia 26 marca 1997 roku, Nr 28, poz.152), zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 roku (Dz. U. Nr 47 poz. 480 z 1999 roku) w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania Komisji Bioetycznych, po zapoznaniu się z wnioskiem obejmującym również zgłoszenie badania oraz po wysłuchaniu dodatkowych informacji złożonych przez wnioskodawcę, w wyniku przeprowadzonej dyskusji i głosowania,

**postanawia**

projekt badawczy: „Przydatność diagnostycznych czasów relaksacji MRI w ocenie skuteczności chemioterapii przedoperacyjnej u kobiet z rakiem piersi w zestawieniu z obrazem klinicznym, radiologicznym i badaniem histopatologicznym tkankowego materiału pooperacyjnego”

**zaopiniować pozytywnie.**

**Uwagi:** Uchwała jest ważna na okres objęty planem badań.

Do wiadomości:

Wnioskodawca

Lek. Elżbieta Ostańska, dr n. med. Ewa Kaznowska, dr hab. n. med. inż. ~~Dawid Bartusik~~  
Aebisher, Prof. UR

*Lidia Czyż*  
Zastępca Przewodniczącego  
Komisji Bioetycznej UR  
dr n. o zdr. Lidia Czyż

## 13. OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW

Rzeszów, dnia 6 czerwca 2022 r.

Imię i nazwisko: **lek. Elżbieta Ostańska**

Jednostka: **Kliniczny Zakład Patomorfologii  
Kliniczny Szpital Wojewódzki Nr 1 im. Fryderyka Chopina w Rzeszowie**

Promotor: **dr hab. n. med. inż. Dorota Bartusik-Aebisher, prof. UR**

### OŚWIADCZENIE

W związku z przygotowywaniem przeze mnie rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów, na co zezwala **Ustawa o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki** z dnia 14 marca 2003, art. 13.1 (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.) oraz zatwierdzone przez Radę Wydziału Medycznego na posiedzeniu w dniu 8 stycznia 2015 **Zasady prowadzenia przewodów doktorskich opartych na „cyklu prac”**, oświadczam niniejszym, że wkład mojej pracy naukowej, a tym samym pracy pozostałych współautorów w opublikowaniu poniższego artykułu, który zamierzam przedstawić jako własną pracę doktorską jest następujący:

1. **Ostańska Elżbieta**, Aebisher David, Bartusik-Aebisher Dorota. *The potential of photodynamic therapy in current breast cancer treatment methodologies*. Biomedicine and Pharmacotherapy. 2021;137, id. art. 111302.

- koncepcja: 70%
- metodyka: 70%
- analiza i zestawienie wyników: 70%
- dyskusja: 70%
- prace nad manuskrytem: 70%
- analiza bibliograficzna: 70%
- proces publikacji: 70%

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez **Panią Elżbietę Ostańską** udział w przygotowaniu powyższej publikacji naukowej, która stanowić będzie część jej pracy doktorskiej:

1.   
.....

2.   
.....

Imię i nazwisko: **lek. Elżbieta Ostańska**

Jednostka: **Kliniczny Zakład Patomorfologii  
Kliniczny Szpital Wojewódzki Nr 1 im. Fryderyka Chopina w Rzeszowie**

Promotor: **dr hab. n. med. inż. Dorota Bartusik-Aebisher, prof. UR**

### OŚWIADCZENIE

W związku z przygotowywaniem przeze mnie rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów, na co zezwala **Ustawa o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki** z dnia 14 marca 2003, art. 13.1 (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.) oraz zatwierdzone przez Radę Wydziału Medycznego na posiedzeniu w dniu 8 stycznia 2015 **Zasady prowadzenia przewodów doktorskich opartych na „cyklu prac”**, oświadczam niniejszym, że wkład mojej pracy naukowej, a tym samym pracy pozostałych współautorów w opublikowaniu poniższego artykułu, który zamierzam przedstawić jako własną pracę doktorską jest następujący:

1. **Ostańska Elżbieta, Barnaś Edyta, Bartusik-Aebisher Dorota, Dynarowicz Klaudia, Szpunar Magdalena, Skręt-Magiero Joanna, Aebisher David. *Histopathological Analysis of the Effect of Photodynamic Action on Post-Chemotherapy Excised Breast Cancer Tissue*. *Medicina*. 2022; 58(6): 700.**

- koncepcja badań: 70%
- metodyka: 70%
- praca laboratoryjna: 70%
- analiza i zestawienie wyników: 70%
- interpretacja wyników i dyskusja: 70%
- prace nad manuskrytem: 70%
- analiza bibliograficzna: 70%
- proces publikacji: 70%

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez **Panią Elżbietę Ostańską** udział w przygotowaniu powyższej publikacji naukowej, która stanowić będzie część jej pracy doktorskiej:

1. .....
2. .....
3. .....
4. .....
5. .....
6. .....

Rzeszów, dnia 6 czerwca 2022 r.

Imię i nazwisko: **lek. Elżbieta Ostańska**

Jednostka: **Kliniczny Zakład Patomorfologii  
Kliniczny Szpital Wojewódzki Nr 1 im. Fryderyka Chopina w Rzeszowie**

Promotor: **dr hab. n. med. inż. Dorota Bartusik-Aebisher, prof. UR**

### OŚWIADCZENIE

W związku z przygotowywaniem przeze mnie rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów, na co zezwala **Ustawa o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki** z dnia 14 marca 2003, art. 13.1 (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.) oraz zatwierdzone przez Radę Wydziału Medycznego na posiedzeniu w dniu 8 stycznia 2015 **Zasady prowadzenia przewodów doktorskich opartych na „cyklu prac”**, oświadczam niniejszym, że wkład mojej pracy naukowej, a tym samym pracy pozostałych współautorów w opublikowaniu poniższego artykułu, który zamierzam przedstawić jako własną pracę doktorską jest następujący:

1. Barnaś Edyta, **Ostańska Elżbieta**, Bartusik-Aebisher Dorota, Dynarowicz Klaudia, Skręt-Magierło Joanna, Aebisher David. *Breast cancer tissue treated using photodynamic therapy*. Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research. 2022; 78(6): 835-843.

- koncepcja badań: 70%
- metodyka: 70%
- praca laboratoryjna: 70%
- analiza i zestawienie wyników: 70%
- interpretacja wyników i dyskusja: 70%
- prace nad manuskrytem: 70%
- analiza bibliograficzna: 70%
- proces publikacji: 70%

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Panią **Elżbietę Ostańską** udział w przygotowaniu powyższej publikacji naukowej, która stanowić będzie część jej pracy doktorskiej:

1. *David Aebisher*
2. *Dorota M. Aebisher*
3. *Klaudia Dynarowicz*
4. *Joanna Skręt-Magierło*
5. *Edyta Barnaś*

## 14. CERTYFIKATY



# CERTYFIKAT

Pani **Elżbieta Ostańska**

w dniu 21.05.2019 w Rzeszowie

uczestniczył (a) w **KONFERENCJI MŁODYCH NAUKOWCÓW**

nt.

## **ANALIZA ZAGADNIENIA, ANALIZA WYNIKÓW - WYSTĄPIENIE MŁODEGO NAUKOWCA Edycja I**

Temat referatu:

Ocena skuteczności chemioterapii raka piersi z zastosowaniem czasów relaksacji rezonansu magnetycznego oraz metody fotodynamicznej

\*\*\*

Uczestnik konferencji wygłaszając referat miał możliwość:

- analizy zagadnienia naukowego oraz pokazania własnych pomysłów i koncepcji,
- opisanie problemu badawczego i wskazania możliwych rozwiązań,

Zaprezentowano również indywidualne osiągnięcia naukowe.  
Wskazano możliwości wykorzystania wyników badań w praktyce.

Zadaniem Uczestnika było przygotowanie profesjonalnej i przejrzystej prezentacji multimedialnej, będącej narzędziem wykorzystanym w trakcie wystąpienia publicznego.

Uczestnik miał również za zadanie podzielić się własną pasją, dobrze sypnąć przed publicznością oraz sprawić, aby słuchacze nie tylko nabyli wiedzę i ją zrozumieli, ale także aby byli tą wiedzą zainspirowani.

**POTWIERDZAMY  
CZYNNY UDZIAŁ**  
w KONFERENCJI MŁODYCH NAUKOWCÓW  
[www.creativetime.pl](http://www.creativetime.pl)

**CREATIVE TIME**  
Współpraca  
Dr inż. Małgorzata Kozłowska

# CERTYFIKAT

Pani **Elżbieta Ostańska**

w dniu 21.05.2019 w Rzeszowie

uczestniczył(a) w **KONFERENCJI MŁODYCH NAUKOWCÓW**

nt.

**ANALIZA ZAGADNIENIA, ANALIZA WYNIKÓW  
- WYSTĄPIENIE MŁODEGO NAUKOWCA**  
Edycja 1

Temat posteru:

Ocena skuteczności chemioterapii raka piersi z zastosowaniem czasów relaksacji rezonansu magnetycznego oraz metody fotodynamicznej

\*\*\*

Uczestnik konferencji przedstawiając poster miał możliwość:  
- analizy zagadnienia naukowego oraz pokazania własnych pomysłów i koncepcji,  
- opisanie problemu badawczego i wskazanie możliwych rozwiązań.

Zaprezentowano również indywidualne osiągnięcia naukowe.  
Wskazano możliwości wykorzystania wyników badań w praktyce.

Prezentowany poster był czytelny, komunikatywny i estetyczny oraz przyciągał uwagę innych Uczestników.

**POTWIERDZAMY  
CZYNNY UDZIAŁ**

W KONFERENCJI MŁODYCH NAUKOWCÓW  
[www.creativetime.pl](http://www.creativetime.pl)

CREATIVE TIME

Współcele

Dr inż. Marcin Kuczero

CREATIVE TIME

**XIII** MDR międzynarodowe  
dni  
rehabilitacji  
potrzeby i standardy współczesnej rehabilitacji

# certifikat

numer wpisu do rejestru OIL w Rzeszowie 64-000058-001-0037

Pan/Pani lek. med. Elżbieta Ostańska

czynnie uczestniczył/a

**w XIII MIĘDZYNARODOWYCH DNIACH REHABILITACJI  
POTRZEBY I STANDARDY WSPÓŁCZESNEJ REHABILITACJI**

Rzeszów, 11-12 lutego 2021r

Przewodnicząca Komitetu Organizacyjnego

*Teresa Pap*  
Prof. nadzw. UR o hab. n. o zot. Teresa Pap

Przewodniczący Komitetu Naukowego

*Andrzej Kwolek*  
Prof. dr hab./n. med. Andrzej Kwolek

Za udokumentowane uczestnictwo w sesji naukowej lekarka otrzymuje 10,7 punktów edukacyjnych  
- PC 0005 uwielosparwadrenia Ministra Zdrowia z 9 października 2004r. w sprawie sposobu  
docełniania obowięzów doskonalenia zawodowego lekarzy i lekarzy derystów.



Uniwersytet Rzeszowski





VM Media sp. z o.o. VM Group sp. k.

# CERTIFICATE



## Elżbieta Ostańska

name and surname

participated in **VIRTUAL MEETING**

### Oncoplastic and Reconstructive Breast Surgery Poland-Rome-Dubai

Is there a breast surgeon on this flight?

**March 27, 2021**

This document entitles to obtain 1 educational point\*

dr n. med. Łukasz Stolarczyk

Medical Information Director  
VM Media sp. z o.o. VM Group sp. k.

prof. dr hab. n. med. Agnieszka Kolacińska-Wow

President of the Scientific Committee

\*Pursuant to Regulation of the Minister of Health of 6 October 2004 concerning the manner in which medical and dental professionals shall fulfil their obligation to complete continuing professional education (Journal of Laws of 2004, No 231, Item 2326), based on the registration, with the District Chamber of Medical and Dental Professionals, of entities providing continuing professional education to medical and dental professionals in the Conference.



VM Media sp. z o.o. VM Group sp.k.

# CERTYFIKAT



## Elżbieta Ostańska

imię i nazwisko

**3711736**

nr prawa wykonywania zawodu

uczestniczył(a)

w *Virtual Meeting*

### RAK PIERSI 2021

#### Aktualne wytyczne postępowania diagnostyczno-terapeutycznego PTOK

31 marca 2021 roku

Niniejszy dokument stanowi podstawę do uzyskania 2 punktów edukacyjnych\*

dr n. med. Łukasz Stolarczyk

Dyrektor ds. informacji medycznej  
VM Media sp. z o.o. VM Group sp.k.

prof. dr hab. n. med. Maciej Krzakowski

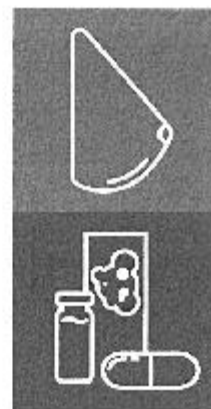
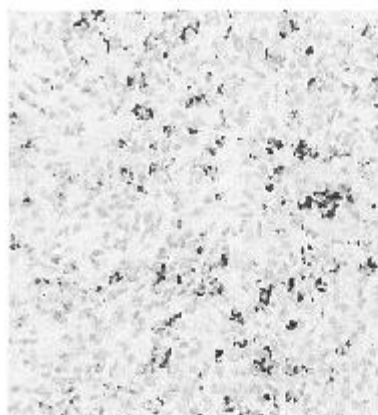
Przewodnik ręki Komitetu Naukowego

prof. dr hab. n. med. Piotr Wysocki

Przewodniczący Komitetu Naukowego

\*Na podstawie Rozporządzenia Ministra Zdrowia z 6 października 2004 r. w sprawie sposobu dopełnienia obowiązku doskonalenia zawodowego lekarzy i lekarzy dentyistów (Dz.U. z 2004 r. nr 231, poz. 2326), wglądu do rejestru i Krajowej Izby Lekarskiej podmiotów prowadzących doskonalenie zawodowe lekarzy i lekarzy dentyistów oraz udokumentowanej liczby godzin uczestnictwa w konferencji.





Pan/Pani

# Elżbieta Ostańska

uczestniczył(a) w webinarium

zorganizowanym w dniach 28-29 kwietnia 2021 roku

**Rak piersi – interdyscyplinarne wyzwania diagnostyczne i terapeutyczne**

dr hab. med. Łukasz Szylberg, prof. UMS

dr n. med. Wojciech Olszewski

Uczestnicy szkolenia otrzymają 4 punkty edukacyjne zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 6 października 2004 r. w sprawie sposobów dopełniania obowiązku doskonalenia zawodowego lekarzy i lekarzy dentyści.

Główny organizator



Roche Diagnostics Polska Sp. z  
o.o. ul. Bobrowiecka 8  
00-728 Warszawa

Organizator techniczny



Alfakonferencje S.C.  
ul. Wiosenna 15  
60-185 Skórzawa

numer wpisu do rejestru podmiotów prowadzących kształcenie  
Okręgowej Rady Lekarskiej w Poznaniu: 68-000078-001-0002

# CERTYFIKAT

UCZESTNICTWA W KONFERENCJI

## AKADEMIA RAKA PIERSI

NOWOŚCI • WYZWANIA • KONTROWERSJE

27 MARCA 2021 R.



*Elżbieta Ostańska*

*Atkinowska*

Prof. nadzw. dr hab. n. med. Anna Atkinowska  
Dzielnik Naukowy Konkret

WZROSTY



Polskie Towarzystwo  
Onkologiczne

OPRACOWANIE



PZWL



PWN

INSTYTUT

*Aleksandra Maciąg*

Aleksandra Maciąg  
Centrum Badań i Edukacji Medycznych

Wzrosty, Opracowanie, PZWL, PWN, Instytut, Centrum Badań i Edukacji Medycznych, Polskie Towarzystwo Onkologiczne, 2021 r. Wszelkie prawa zastrzeżone. Wydrukowano w całości na papierze ekologicznym. Materiał wydrukowany w całości na papierze ekologicznym. Wydrukowano w całości na papierze ekologicznym.

# CERTYFIKAT

Pani  
Elżbieta Ostańska

uczestniczyła  
w II Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej  
Wyzwania i problemy nauk biomedycznych  
21.01.2021 r.

Fundacja na rzecz promocji  
nauki i rozwoju TYGIEL  
Prezesa Zarządu  
*Kamil Maciąg*  
Kamil Maciąg



## II OGÓLNOPOLSKA KONFERENCJA NAUKOWA WYZWANIA I PROBLEMY NAUK BIOMEDYCZNYCH

Pani Elżbieta Ostańska

w dniu 21.01.2021 r. uczestniczyła

w II Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej  
Wyzwania i problemy nauk biomedycznych

i przedstawiła pracę w formie wystąpienia ustnego

pt. *Histopatologiczna ewaluacja tkanki raka piersi po chemioterapii*

Jednocześnie potwierdza się, że w konferencji uczestniczyli przedstawiciele  
co najmniej 5 jednostek naukowych (ośrodków akademickich).

Fundacja na rzecz promocji  
nauki i rozwoju TYGIEL  
Prezes Zarządu  
*Kamil Maciąg*  
Kamil Maciąg



ZASWIADCZENIE

XIII INTERDYSCYPLINARNA  
KONFERENCJA NAUKOWA **TYGIEL 2021**  
„Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju”

Pani Elżbieta Ostańska

w dniu 25-28.03.2021 r. uczestniczyła

w XIII Interdyscyplinarnej Konferencji Naukowej TYGIEL 2021  
„Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju”

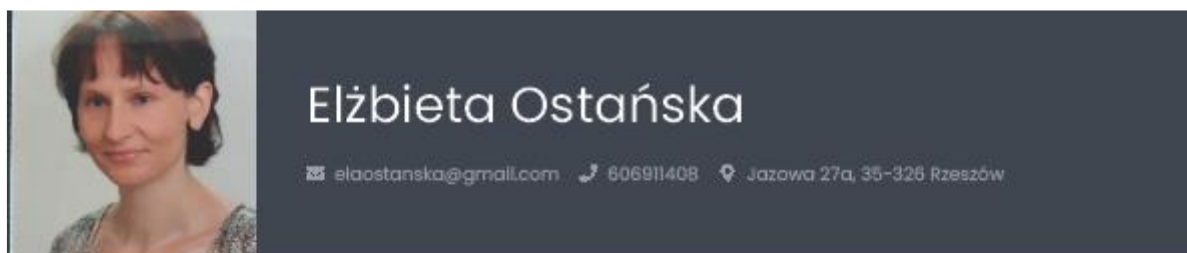
i przedstawiła pracę w formie wystąpienia ustnego

pt. *Interdyscyplinarne diagnozowanie raka piersi*

Jednocześnie potwierdza się, że w konferencji uczestniczyli przedstawiciele  
co najmniej 3 jednostek naukowych (ośrodków akademickich).

Podpis na rzecz prezydium  
Prof. dr hab. n. med. Elżbieta Ostańska  
Prezes Zarządu  
*Elżbieta Ostańska*  
Kamila Młociąg

## 15. CURRICULUM VITAE



### Wykształcenie

<b>lekarz</b> Akademia Medyczna w Lublinie, Lublin	paź 1986 - sie 1992
<b>Specjalizacja I-stopnia z patomorfologii</b> Rzeszów	1995
<b>Specjalizacja II-stopnia z patomorfologii</b> Warszawa	2006

### Doświadczenie zawodowe

<b>starszy asystent w Klinicznym Zakładzie Patomorfologii</b> Kliniczny Szpital Wojewódzki Nr 1 im. Frederyka Chopina w Rzeszowie, Rzeszów Od 23 lat czynnie wykonywany zawód lekarza Od 4 lat zastępca Kierownika Klinicznego Zakładu Patomorfologii KSZW Nr1 w Rzeszowie	2006 - obecnie
<b>lekarz stażysta</b> Szpital Powiatowy w Świdniku, Świdnik k/Lublina	1992 - 1993
<b>lekarz-dyżurant w Oddziale Chorób Wewnętrznych</b> Centrum Opieki Medycznej, Jarosław	1993 - 1996
<b>lekarz w Pogotowiu Ratunkowym</b> Centrum Opieki Medycznej, Jarosław Praca w zespole karetki reanimacyjnej i w ambulatorium	1996 - 2007

### Kursy

Multidisciplinary approach to diagnostics and treatment of breast cancer - Gliwice	cze 2009
Clinical Oncology Update Onkologia 2012- Kraków	maj 2013
Postępy w diagnostyce chorób gruczołu piersiowego - Warszawa	cze 2014
Cervical Cytopathology in BD SurePath LBC Cervical Specimens - Warszawa	lut 2014

### Dane osobowe

Data urodzenia	1 kwietnia 1966
Miejsce urodzenia	Lublin
Prawo jazdy	Kategoria B od 1992-12-31
Płeć	kobieta
Obywatelstwo	polskie
Stan cywilny	wolny

### Umiejętności

obsługa komputera	<div style="width: 80%;"></div>
prawo jazdy	<div style="width: 95%;"></div>
pracy pod presją czasu	<div style="width: 90%;"></div>
odporność na stres	<div style="width: 85%;"></div>
szybka adaptacja do nowych warunków	<div style="width: 75%;"></div>

### Języki

angielski	<div style="width: 80%;"></div>
francuski	<div style="width: 20%;"></div>

Metoda cell-block w praktyce patomorfologa - Rzeszów	gru 2014
USG gruczołów piersiowych - kurs Medycyny Praktycznej - Kraków	mar 2015
CINtec PLUS cytology Refresher Interpretation Training - Warszawa	lut 2017
Breast Pathology Masterclass Nottingham (England)/Bologna(Italy)	cze 2017
Biomarkery w diagnostyce raka piersi ze szczególnym uwzględnieniem HER2 IHC, HER2 Dual ISH oraz PDL1	lis 2021

## Osiągnięcia

Dyplom - Wyróżnienie za zaprezentowany poster podczas Konferencji Młodych Naukowców- Rzeszów 2019-05-21

## Dorobek naukowy(konferencje)

Analiza zagadnienia, analiza wyników - wystąpienie młodego naukowca Edycja I 1-wystawienie posteru " Ocena skuteczności chemioterapii raka piersi z zastosowaniem czasów relaksacji rezonansu magnetycznego oraz metody fotodynamicznej" 2-prezentacja " Ocena skuteczności chemioterapii raka piersi z zastosowaniem czasów relaksacji rezonansu magnetycznego oraz metody fotodynamicznej"	maj 2019
Radiologia wspólna sprawa 2019 - sympozjum naukowo-szkoleniowe	paź 2019
Konferencja PTPAT prezentacja "Raport patomorfologiczny w raku piersi"	gru 2019
Radiologia wspólna sprawa 2020- sympozjum naukowo-szkoleniowe udział czynny	paź 2020
Choroby nowotworowe wyzwaniem dla nauk medycznych XXI wieku- Ogólnopolska Konferencja Naukowa TYGIEL 2020 1- Wystąpienie "Ocena skuteczności chemioterapii raka piersi z zastosowaniem czasów relaksacji rezonansu magnetycznego oraz metody fotodynamicznej" 2-Wystawienie posteru	gru 2020
Wyzwania i problemy nauk biomedycznych -TYGIEL- ogólnopolska konferencja naukowa	sty 2021

## Hobby i zainteresowania

- podróże
- muzyka poważna i rozrywkowa
- taniec z elementami ćwiczeń (zumba, strong zumba)
- aranżacja wnętrz
- szczególne zainteresowanie zawodowe: patologia gruczołu piersiowego

## Działalność w wymiarze społecznym. Zaangażowanie w działalność Fundacji:

- Fundacja Pomocy Dzieciom -Serduszko
- Fundacja Serca dla Maluszka
- Fundacja "AKOGO?" Ewy Błaszczyk
- Fundacja Spektrum Liberi
- Współpraca z Firmą Happy Kids
- Fundacja Rozwoju Kardiologii im. prof. Z. Religi

1-wystąpienie posterowe "Histopatologiczna ewaluacja tkanki piersi po chemioterapii"	
2-prezentacja "Histopatologiczna ewaluacja tkanki piersi po chemioterapii"	
XIII Międzynarodowe Dni Rehabilitacji. Potrzeby i standardy współczesnej rehabilitacji -konferencja międzynarodowa	lut 2021
Wystąpienie posterowe "Rehabilitacja w raku piersi z punktu widzenia lekarza patomorfologa"	
Oncoplastic and Reconstructive Breast Surgery - konferencja międzynarodowa Poland-Rome-Dubai	mar 2021
Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju-XIII interdyscyplinarna Konferencja TYGIEL 2021	mar 2021
Prezentacja "Interdyscyplinarne diagnozowanie raka piersi"	
Rak piersi -Aktualne wytyczne postępowania diagnostyczno-terapeutycznego PTOK marzec 2021	mar 2021
Rak piersi-interdyscyplinarne wyzwanie diagnostyczne i terapeutyczne - webinarium	kwi 2021
Selected Issues of Electrical Engineering and Electronics WZEE 2021 Konferencja międzynarodowa	wrz 2021
Wystawienie posteru"The use of MRI to breast cancer diagnostics"	

## Staż

Katedra Patomorfologii (Zakład Patomorfologii Klinicznej i Doświadczalnej) Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie Nottingham UK	sty 1996 - sty 2005
Brest Unit Department of Histopathology stażysta City Hospital Nottingham UK, Nottingham UK	maj 2017 - cze 2017

## Dorobek naukowy-publikacje

AU: Ostańska Elżbieta, Aebisher David, Kaznowska Ewa Beata, Bartusik-Aebisher Dorota. TO: Bladder Mullerianosis - a case report CZ: European Journal of Clinical and Experimental Medicine SZ: 2019 : vol. 17, nr 3, s. 277-280, bibliogr., streszcz. ang. CF: artykuł w czasopiśmie

polskim JP: ENG Pkt. MEIN: 20.000

AU: Ostańska Elżbieta, Aebisher David, Gustalik Joanna, Lekska Natalia, Bartusik-Aebisher Dorota. TO: Flow Cytometry : Acute Leukaemia TC: W: Introduction to Flow Cytometry / editor Jakub Werner AW: New York : Nova Science Publishers, 2019 SZ: 25 s. : bibliogr., streszcz. ang. CF: rozdział w języku obcym CP: Rozdział w książce JP: ENG Pkt. MEIN: 5.000

AU: Ostańska Elżbieta, Bartusik-Aebisher Dorota, Aebisher David, Kaznowska Ewa Beata. TO: Neoadjuvant therapy in breast cancer - objectives and tasks CZ: European Journal of Clinical and Experimental Medicine SZ: 2019 : vol. 17, nr 2, s. 153-156, bibliogr., streszcz. ang. CF: artykuł w czasopiśmie polskim JP: ENG Pkt. MEIN: 20.000

AU: Ostańska Elżbieta, Bartusik-Aebisher Dorota, Gustalik Joanna, Aebisher David, Galiniak Sabina Monika, Kaznowska Ewa Beata. TO: The use of imaging tests to obtain optimal margins in breast surgery CZ: European Journal of Clinical and Experimental Medicine SZ: 2019 : vol. 17, nr 3, s. 246-249, bibliogr., streszcz. ang. CF: artykuł w czasopiśmie polskim JP: ENG Pkt. MEIN: 20.000

AU: Ostańska Elżbieta, Aebisher David, Kaznowska Ewa Beata, Bartusik-Aebisher Dorota. TO: Primary breast angiosarcoma - a case report CZ: European Journal of Clinical and Experimental Medicine SZ: 2020 : vol. 18, nr 4, s. 331-334, bibliogr., streszcz. ang. CF: artykuł w czasopiśmie polskim JP: ENG Pkt. MEIN: 20.000

AU: Ostańska Elżbieta, Aebisher David, Bartusik-Aebisher Dorota. TO: Solid pseudopapillary neoplasm of the pancreas : a case report CZ: Medical Research Journal SZ: 2020 : Vol. 5, nr 1, s. 50-54, bibliogr., streszcz. ang. CF: artykuł w czasopiśmie polskim JP: ENG Pkt. MEIN: 100.000

AU: Ostańska Elżbieta, Aebisher David, Bartusik-Aebisher Dorota. TO: Diagnostyka raka piersi: zalety i ograniczenia CZ: Wyroby Medyczne SZ: 2021, nr 1, s. 16-21 CF: artykuł w czasopiśmie polskim JP: POL Pkt. MEIN: 5.000

AU: Ostańska Elżbieta, Aebisher David, Bartusik-Aebisher Dorota. TO: The potential of photodynamic therapy in current breast cancer treatment methodologies CZ: Biomedicine and Pharmacotherapy SZ: 2021 : Vol. 137, id. art. 111302, bibliogr., streszcz. ang. CF: artykuł w czasopiśmie zagranicznym JP: ENG IF: 6.529 Pkt. MEIN: 100.000

AU: Ostańska Elżbieta, Aebisher David, Bartusik-Aebisher Dorota. TO: Histopatologiczna ewaluacja tkanki raka piersi po chemioterapii TC: W: Wybrane choroby nowotworowe - diagnostyka i leczenie / redakcja Kinga Kalbarczyk, Monika Maciąg AW: Lublin : Wydawnictwo Naukowe TYGIEL Sp. z o. o., 2021 SZ: S. 177-186 : bibliogr., streszcz. pol., ang. CF: rozdział w języku polskim CP: Rozdział w książce JP: POL Pkt. MEIN: 20.000

AU: Ostańska Elżbieta, Aebisher David, Bartusik-Aebisher Dorota. TO: Interdyscyplinarne diagnozowanie raka piersi TC: W: Wybrane choroby nowotworowe - diagnostyka i leczenie / redakcja Kinga Kalbarczyk, Monika Maciąg AW: Lublin : Wydawnictwo Naukowe TYGIEL Sp. z o. o., 2021 SZ: S. 210-219 : bibliogr., streszcz. pol., ang. CF: rozdział w języku polskim CP: Rozdział w książce JP: POL Pkt. MEIN: 20.000

AU: Ostańska Elżbieta, Aebisher David, Bartusik-Aebisher Dorota. TO: Ocena skuteczności chemioterapii raka piersi z zastosowaniem czasów relaksacji rezonansu magnetycznego oraz metody fotodynamicznej TC: W: Postępy w badaniach nad nowotworami - przegląd wybranych zagadnień / redakcja Łukasz B. Pilarz, Kamil Maciąg AW: Lublin : Wydawnictwo Naukowe TYGIEL Sp. z o. o., 2021 SZ: S. 127-135 : bibliogr., streszcz. pol., ang. CF: rozdział w języku polskim CP: Rozdział w książce JP: POL Pkt. MEIN: 20.000

AU: Opalińska Aleksandra, Sawińska Edyta, Samotij Dominik, Ostańska Elżbieta, Gustalik Joanna, Reich Adam Andrzej. TO: Biopsja wycinająca zmiany barwnikowej macierzy paznokcia CZ: Forum Dermatologicum SZ: 2018 : T. 4, nr 2, s. 84-86, bibliogr., streszcz. ang. CF: artykuł w czasopiśmie polskim JP: POL Pkt. MEIN: 5.000

AU: Gustalik Joanna, Bartusik-Aebisher Dorota, Ostańska Elżbieta, Przyczyna Piotr, Osuchowski Michał, Aebisher David, Galiniak Sabina Monika, Kaznowska Ewa Beata. TO: Epidemiology of breast cancer in Podkarpacie voivodship CZ: European Journal of Clinical and Experimental Medicine SZ: 2019 : vol. 17, nr 3, s. 242-245, bibliogr., streszcz. ang. CF: artykuł w czasopiśmie polskim JP: ENG Pkt. MEIN: 20.000

AU: Gustalik Joanna, Aebisher David, Leksa Natalia, Ostańska Elżbieta, Bartusik-Aebisher Dorota. TO: Flow Cytometry : Disorders of Plasma Cells TC: W: Introduction to Flow Cytometry / editor Jakub Werner AW: New York : Nova Science Publishers, 2019 SZ: 18 s. : bibliogr., streszcz. ang. CF: rozdział w języku obcym CP: Rozdział w książce JP: ENG Pkt. MEIN: 5.000

AU: Leksa Natalia, Aebisher David, Gustalik Joanna, Ostańska Elżbieta, Bartusik-Aebisher Dorota. TO: Flow Cytometry : Normal Blood and Bone Marrow Populations TC: W: Introduction to Flow Cytometry / editor Jakub Werner AW: New York : Nova Science Publishers, 2019 SZ: 20 s. : bibliogr., streszcz. ang. CF: rozdział w języku obcym CP: Rozdział w książce JP: ENG Pkt. MEIN: 5.000

AU: Żuk Gabriela, Jaworecka Kamila, Samotij Dominik, Ostańska Elżbieta, Reich Adam Andrzej. TO: Rheumatoid neutrophilic dermatitis CZ: Reumatologia SZ: 2019 : Vol. 57, nr 6, s. 350-353, bibliogr., streszcz. ang. CF: artykuł w czasopiśmie polskim JP: ENG Pkt. MEIN: 70.000

AU: Bober Zuzanna, Galiniak Sabina Monika, Leksa Natalia, Dynarowicz Klaudia, Aebisher David, Ostańska Elżbieta, Czmił Anna, Bar Piotr, Bartusik-Aebisher Dorota, Tutka Piotr. TO: Cytisine parameters measured in the 1.5 Tesla magnetic field CZ: European Journal of Clinical and Experimental Medicine SZ: 2020 : vol. 18, nr 1, s. 16-19, bibliogr., streszcz. ang. CF: artykuł w czasopiśmie polskim JP: ENG Pkt. MEIN: 20.000

AU: Jaworecka Kamila, Kijowski Robert, Ostańska Elżbieta, Mazur-Chromiak Piotr, Reich Adam Andrzej. TO: Pierwotna amyloidoza skórna - opis przypadku CZ:

Forum Dermatologicum SZ: 2020 : T. 6, nr 3, s. 126-129, bibliogr., streszcz. pol., ang. CF: artykuł w czasopiśmie polskim JP: POL Pkt. MEiN: 40.000

AU: Opalińska Aleksandra, Kwiatkowska Dominika, Burdacki Adrian, Markiewicz Mirosław Marian, Samotij Dominik, Dudziński Marek, Niemiec-Dudek Jadwiga, Ostańska Elżbieta, Reich Adam Andrzej. TO: Multifocal Pyoderma Gangrenosum with an Underlying Hemophagocytic Lymphohistiocytosis : Case Report and the Review of the Literature CZ: Dermatology and Therapy SZ: 2021 : Vol. 11, iss. 4, p. 1217-1237, bibliogr., streszcz. ang. CF: artykuł w czasopiśmie zagranicznym JP: ENG IF: 3.264 Pkt. MEiN: 100.000

U: Ossolińska Agata, Morawiecka Natalia, Żychowska Magdalena, Opalińska Aleksandra, Ostańska Elżbieta, Reich Adam Andrzej. TO: Pathergy phenomenon leading to the diagnosis of pyoderma gangrenosum CZ: Forum Dermatologicum SZ: 2021 : T. 7, nr 1, s. 12-16, bibliogr., streszcz. pol., ang. CF: artykuł w czasopiśmie polskim JP: ENG Pkt. MEiN: 40.000

AU: Samotij Dominik, Gawron Ewelina, Szczęch Justyna Maria, Ostańska Elżbieta, Reich Adam Andrzej. TO: Acrodermatitis Continua of Hallopeau Evolving into Generalized Pustular Psoriasis Following COVID-19 : A Case Report of a Successful Treatment with Infliximab in Combination with Acitretin CZ: Biologics: Targets and Therapy SZ: 2021 : vol. 15, p. 107-113, bibliogr., streszcz. ang. CF: artykuł w czasopiśmie zagranicznym JP: ENG Pkt. MEiN: 100.000

---

## Działalność dydaktyczna

Zajęcia dydaktyczne w roku akademickim 2019/2020 (65 godzin ćwiczeń oraz wykładów wydziału Położnictwa URZ