

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

***IN VITRO* HODNOCENÍ FOTODYNAMICKÉ
AKTIVITY DERIVÁTŮ
TETRAPYRIDOPORPHYRAZINU PRO LÉČBU
SOLIDNÍCH NÁDORŮ**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Miloslav Macháček

Hradec Králové, 2016

Bc. Adéla Jedličková

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Mgr. Miloslavu Macháčkovi za odborné vedení mé práce, cenné rady a připomínky, věnovaný čas a trpělivost, díky nimž tato práce mohla vzniknout. Děkuji také členům vědecké skupiny doc. Zimčíka na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv za spolupráci. Na závěr bych ráda poděkovala celému kolektivu Katedry biochemických věd za vytvoření příjemného pracovního prostředí v laboratořích.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne

podpis.....

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Adéla Jedličková

Školitel: Mgr. Miloslav Macháček

Název diplomové práce: *In vitro* hodnocení fotodynamické aktivity derivátů tetrapyridoporphyrinu pro léčbu solidních nádorů

Mezi hlavní příčiny úmrtí v dnešní době bezesporu patří nádorová onemocnění, jejichž výskyt stále stoupá. Proto se výzkum v oblasti léčby významně zaměřuje na vývoj nových potenciálních protinádorových léčiv a terapeutických přístupů. Fotodynamická terapie (PDT) dnes patří mezi klinicky schválené terapeutické metody pro léčbu maligních i nemaligních onemocnění. Jejimi hlavními složkami jsou fotosenzitizér (PS), světlo a kyslík, které samy o sobě nejsou toxické, ale společnou interakcí vedou ke vzniku vysoce reaktivních molekul. Metoda je založena na absorpci světla o vhodné vlnové délce molekulou PS a následném přenosu energie fotonů na okolní molekuly, především na kyslík, za vzniku cytotoxických reaktivních forem kyslíku (ROS), kde hlavní roli hraje singletový kyslík. ROS následně poškozují okolní buněčné struktury, jejichž destrukce vede k nevratnému poškození buněčných funkcí a následné buněčné smrti, jejíž typ úzce souvisí s lokalizací PS uvnitř buňky. Výsledný efekt léčby je dán třemi propojenými mechanismy – přímým letálním cytotoxickým účinkem ROS, poškozením vaskularizace nádoru a indukci imunitní reakce v organismu.

Cílem této práce je hodnocení fotodynamické aktivity nově syntetizovaných PS na bázi tetrapyridoporphyrinu v *in vitro* podmínkách. Experimenty byly prováděny na buněčné linii HeLa, odvozené z lidských buněk karcinomu děložního čípku. Po 12 h inkubaci s PS byly buňky ozářeny červenou částí viditelného spektra pomocí Xe-výbojky ($\lambda > 570$ nm, 12.4 mW/cm², 11.2 J/cm²). Hodnocená byla i vlastní toxicita látek bez přítomnosti aktivujícího záření. Životaschopnost buněk byla stanovena na 96-jamkových mikrotitračních destičkách pomocí testu vychytávání neutrální

červeně. Zjišťován byl také časový průstup látek do buněk – množství PS bylo měřeno fluorescenčně v buněčném lyzátu.

Subcelulární lokalizace byla určena pomocí fluorescenční mikroskopie, kdy byly buněčné organely značeny specifickými fluorescenčními sondami MitoTracker Green FM a LysoTracker Blue DND-22. Morfologické změny indukované fotodynamickým působením PS byly zaznamenány pomocí fluorescenčního značení jader (Hoechst 33342, propidium jodid), buněčné membrány (Cell Mask Green Plasma membrane stain), mitochondrií (MitoTracker Red CMXRos) a F-aktinu (Alexa Fluor 488 konjugát phalloidinu) v kombinaci s fluorescenční a konfokální laserovou rastrovací mikroskopií. Typ buněčné smrti byl hodnocen pomocí průtokové cytometrie se značením buněk Annexinem V-FITC a propidium jodidem.

Kationické deriváty se ukázaly být účinnými fotosenzitizéry dosahující po aktivaci světlem až výjimečně vysokých toxicit ($EC_{50} 3,89 \pm 1,79$ nM) zatímco bez ozáření projevily velice nízké vlastní toxicity v řádu stovek μ M. Fotodynamický efekt indukoval změny v buněčné morfologii již během ozařování buněk a projevil se především ve tvorbě membránových blebů, změny tvaru mitochondrií a později také změnami na jádře (kondenzace chromatinu a fragmentace jádra) a reorganizací aktinového cytoskeletu. Výsledky průtokové cytometrie společně s indukovanými morfologickými změnami naznačují spíše nekrotickou smrt buněk. Deriváty, které nenesly žádný náboj, se neukázaly být za našich experimentálních podmínek účinné.

ABSTRACT

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradci Králové
Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Adéla Jedličková
Supervisor: Mgr. Miloslav Macháček
Title of diploma thesis: *In vitro* evaluation of photodynamic activity of tetrapyrroldiporphyrin derivatives for treatment of solid tumors

Nowadays, cancerous diseases belongs among the main causes of death, incidence continues to rise. Therefore research in the area of tumor treatment significantly focuses on the development of new potential anticancer drugs and therapeutical approaches. Photodynamic therapy (PDT) belongs to clinically approved therapeutic methods for the treatment of the malignant and nonmalignant diseases. PDT is composed of three main components – photosensitiser (PS), light and oxygen, all of them are non-toxic on their own. However, their interaction leads to a generation of highly reactive molecules. This method is based on absorption of light with appropriate wavelength by PS and subsequent energy transfer from photon to surrounding molecules, especially to oxygen. This transfer leads to a generation of cytotoxic reactive oxygen species (ROS) of which singlet oxygen plays a main role. ROS subsequently causes a damage of surrounding cell structures, which leads to irreversible damage of cell functions and subsequent cell death. Type of cell death is closely related to the localization of PS within the cell. Effect of the treatment is based on three mechanisms, which are interconnected – direct lethal cytotoxic effect of ROS, damage of cancer vasculature and induction of immune reaction in the organism.

Aim of this diploma thesis is the evaluation of photodynamic activity of newly synthesised PS from the group of tetrapyrroldiporphyrin derivatives *in vitro*. Experiments were performed on HeLa cell line, which is derived from human cervix cancer cells. Cells were irradiated with red part of the visible spectrum using a Xe lamp ($\lambda > 570$ nm, 12.4 mW/cm², 11.2 J/cm²) after 12 hour incubation with PS. Dark

toxicity of PSs (without the presence of activating light) was also performed. Evaluation of cell viability was carried out in 96-wells plates using neutral red uptake assay. Uptake profile of PS was also performed, amount of PS was measured in the cell lysate by fluorescence measurement.

Subcellular localization was detected by fluorescence microscopy. Cell organelles were labelled with specific fluorescent probes MitoTracker Green FM and LysoTracker Blue DND-22. Morphological changes of the cells induced by photodynamic effect of PS were studied by fluorescence labelling of cell nuclei (Hoechst 33342, propidium iodide), cell membrane (Cell Mask Green Plasma Membrane Stain), mitochondria (MitoTracker Red CMXRos) and F-actin (Alexa Fluor 488 conjugate of phalloidin) using fluorescence and confocal laser scanning microscopy. Type of cell death was evaluated by flow cytometry by staining cells with Annexin V-FITC and propidium iodide.

Cationic derivatives have shown to be effective PS with exceptionally high toxicity after activation ($EC_{50} = 3,89 \pm 1,79$ nM), while they have shown a very low inherent toxicity of hundreds of μ M without irradiation. Changes of cell morphology were already detected during the irradiation period. Photodynamic effect manifested in membrane blebbing, changes of mitochondria shape and later in nuclear changes (chromatin condensation and nucleus fragmentation) and reorganization of actin cytoskeleton. The results of flow cytometry together with induced morphological changes indicate rather necrotic cell death. Non-charged derivatives have not proven to be effective under our experimental conditions.

OBSAH

ABSTRAKT.....	4
ABSTRACT.....	6
OBSAH.....	8
1 ÚVOD.....	11
2 SEZNAM ZKRATEK.....	12
3 TEORETICKÁ ČÁST.....	15
3.1 NÁDORY, KARCINOGENEZE.....	15
3.1.1 Obecná charakteristika.....	15
3.1.2 Dělení nádorů dle biologických vlastností (chování).....	15
3.1.3 Nádorová onemocnění v ČR.....	16
3.2 FOTODYNAMICKÁ TERAPIE NÁDORŮ.....	16
3.2.1 Mechanismus PTD.....	17
3.3 OXIDAČNÍ STRES, REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU.....	18
3.3.1 Oxidační stres.....	18
3.3.2 Obecná charakteristika reaktivních forem kyslíku.....	19
3.3.3 Superoxidový anion radikál.....	20
3.3.4 Peroxid vodíku.....	20
3.3.5 Hydroxylový radikál.....	20
3.3.6 Singletový kyslík.....	21
3.3.7 Negativní důsledky působení ROS.....	21
3.3.8 Vztah ROS a nádorů.....	22
3.4 ZDROJ SVĚTLA.....	22
3.4.1 Optické okno tkáně.....	22
3.4.2 Volba světelného zdroje pro PDT.....	24
3.5 FOTOSENZITIZÉRY.....	24
3.5.1 Ideální fotosenzitizér.....	25

3.5.2	Struktura fotosenzitizérů	26
3.5.3	Dělení fotosenzitizérů do generací	27
3.5.4	První generace fotosenzitizérů	27
3.5.5	Druhá generace fotosenzitizérů	28
3.5.6	Třetí generace fotosenzitizérů	39
3.6	BIOLOGICKÉ ÚČINKY FOTODYNAMICKÉ TERAPIE	40
3.6.1	Přímý účinek PDT	41
3.6.2	Účinek na cévní zásobení nádoru	42
3.6.3	Imunitní odpověď	43
3.7	BUNĚČNÁ SMRT A FOTODYNAMICKÁ TERAPIE	44
3.7.1	Apoptóza	45
3.7.2	Nekróza	47
3.7.3	Autofagie	48
4	CÍLE PRÁCE	50
5	METODICKÁ ČÁST	51
5.1	MANIPULAČNÍ VYBAVENÍ PRO PRÁCI S BUNĚČNOU LINÍÍ... ..	51
5.2	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ PRO MANIPULACI A STERILNÍ PRÁCI S BUNĚČNOU LINÍÍ	52
5.3	POUŽITÉ REAGENCIE A CHEMIKÁLIE	52
5.4	BUNĚČNÁ LINIE HeLa	53
5.4.1	Příprava kultivačního média	54
5.4.2	Kultivace	54
5.4.3	Pasážování	54
5.4.4	Počítání buněk – stanovení počtu životaschopných buněk	55
5.5	ZKOUMANÉ FOTOSENZITIZÉRY	56
5.6	CYTOTOXICITNÍ EXPERIMENTY	58
5.6.1	Stanovení fototoxicity	58

5.6.2	Stanovení dark toxicity	59
5.7	STANOVENÍ ŽIVOTASCHOPNOSTI BUNĚK POMOCÍ TESTU VYCHYTÁVÁNÍ NEUTRÁLNÍ ČERVENĚ	59
5.8	ČASOVÝ PROFIL PROSTUPU LÁTEK DO BUNĚK	60
5.9	STANOVENÍ MNOŽSTVÍ BÍLKOVINY VE VZORKU	61
5.10	VYHODNOCENÍ DAT	61
5.11	FOTOGRAFICKÁ DOKUMENTACE	61
5.11.1	Subcelulární lokalizace	62
5.11.2	Morfologické změny – konfokální mikroskopie, živé buňky	62
5.11.3	Morfologické změny – konfokální mikroskopie, fixované buňky	63
5.12	PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE	63
6	VÝSLEDKY	65
6.1	CYTOTOXICITNÍ EXPERIMENTY	65
6.1.1	Tetrapyrídonporfyrázin ZIP252ZnEt ⁺	66
6.1.2	Tetrapyrídonporfyrázin ZIP300ZnMe ⁺	68
6.1.3	Porovnání cytotoxického působení kationických fotosenzitizérů	70
6.1.4	Ostatní fotosenzitizéry (tetrapyrídonporfyráziny ZIP252ZnHCl, ZIP 184Zn, ZIP184ZnHCl, ZIP249Zn)	70
6.2	ČASOVÝ PROFIL PROSTUPU LÁTEK DO BUNĚK	71
6.3	FOTOGRAFICKÁ DOKUMENTACE	72
6.3.1	Subcelulární lokalizace	72
6.3.2	Morfologické změny	75
6.4	PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE	80
7	DISKUZE	81
8	ZÁVĚRY	87
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	88

1 ÚVOD

Tato diplomová práce na téma „*In vitro* hodnocení fotodynamické aktivity derivátů tetrapyridoporphyrázinu pro léčbu solidních nádorů“ se zabývá fotodynamickou terapií (PDT), která představuje slibnou minimálně invazivní metodu pro léčbu určitých maligních i nemaligních onemocnění. Hlavními složkami PDT jsou molekuly fotosenzitizéru (PS), světlo a kyslík, jejichž interakcí dochází ke vzniku reaktivních cytotoxických molekul, které poškozují buněčné struktury, což vede k poškození funkcí nádorových buněk a k jejich smrti.

Ve své práci se zabývám jednotlivými složkami PDT, mechanismy a biologickými účinky této terapie a buněčnou smrtí, která může vlivem PDT nastat. Uvádím zde přehled jednotlivých PS, které byly schváleny pro použití v PDT nebo které prochází klinickým hodnocením. Tyto PS se dělí do tří generací. První generaci představuje porfimer sodný, který se stal prvním léčivem schváleným pro PDT nádorů, ale nepředstavuje PS s ideálními vlastnostmi. Proto byly postupně vyvíjeny další generace PS s vhodnějšími parametry.

Přestože je tato metoda známa již delší dobu, v posledních letech se zájem o tuto metodu (a hlavně její rozvoj) široce rozšířil. Stále více látek je dnes zkoumáno pro možnost stát se potenciálním PS pro PDT. Vzhledem k nízké invazivitě PDT a relativně nízkému výskytu nežádoucích komplikací má PDT potenciál získat významné místo vedle standardních metod léčby nádorů (radioterapie, chemoterapie, chirurgická léčba).

Cílem této práce je hodnocení fotodynamické aktivity nově syntetizovaných PS ze skupiny derivátů tetrapyridoporphyrázinu v *in vitro* podmínkách. Výsledky této práce mohou být v budoucnu použity jako podklad pro hlubší studium aktivity této skupiny látek, případně v *in vivo* experimentech.

2 SEZNAM ZKRATEK

AIF	apoptózu-indukující faktor (Apoptosis-inducing Factor)
ALA	kyselina 5-aminolevulová (Aminolevulinic Acid)
AlPcS4	hlinitý ftalocyanin tetrasulfonát (Aluminium phthalocyanine tetrasulfonate)
AMD	věkem podmíněná makulární degenerace (Age-Related Macular Degeneration)
Apaf-1	(Apoptotic Protease-Activating Factor 1)
ATMPn	acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(β -metoxyethyl)-porphycen
ATP	adenosintrifosfát
AzaPc	azaftalocyanin
BCA	bicinchoninic acid
BPD	benzoporfyrinový derivát
CDAMPs	molekulární znaky spojené s buněčnou smrtí (Cell Death Associated Molecular Patterns)
Cy	cyanin
DAMPs	molekulární znaky spojené s poškozením buněk (Damage-Associated Molecular Patterns)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol
dATP	deoxyadenosintrifosfát
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DMEM	kultivační médium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimetylsulfoxid
EC ₅₀	střední efektivní koncentrace
EDTA	etylendiaminotetraoctová kyselina (Ethylenediaminetetraacetic Acid)
FBS	fetální bovinní sérum
Φ_{Δ}	kvantový výtěžek singletového kyslíku
FITC	fluorescein isothiokyanát
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
HpD	derivát hematoporfyrinu (Hematoporphyrin Derivative)

HPPH	2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinyl pyrofeoforbid
LDL	lipoprotein o nízké hustotě (Low Density Lipoprotein)
MAC	membránu-atakující komplex (Membrane Attack Complex)
MQ-voda	ultračistá voda
mTHPC	metatetrahydroxyfenylchlorin
NPc	naftalocyanin
NR	neutrální červeně (Neutral Red)
NRU	testu vychytávání neutrální červeně (Neutral Red Uptake Assay)
$^1\text{O}_2$	singletový kyslík
$\cdot\text{O}_2^-$	superoxid anion radikál
$\cdot\text{OH}$	hydroxylový radikál
PBS	fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)
Pc	ftalocyanin (Phtalocyanine)
Pc4	křemičitý ftalocyanin (Silicon phtalocyanie 4)
PDT	fotodynamická terapie (PhotoDynamic Therapy)
PI	propidium jodid
PPIX	protoporfyrin IX
pRB	retinoblastomový protein (Retinoblastoma protein)
PS	fotosenzitizér (PhotoSensitizer)
P/S	penicilin/streptomycin
ROS	reaktivní formy kyslíku (Reactive Oxygen Species)
SCM	DMEM médium s obsahem séra a dalších látek (Serum Containing Medium)
SFM	DMEM médium neobsahující sérum a další látky (Serum Free Medium)
SnET2	ciničitý etiopurpurin (tin ethyl etiopurpurin)
SOD	superoxiddismutáza
T/E	trypsin/EDTA
TB	trypanová modř (Trypan Blue)
TC ₅₀	střední toxická koncentrace
TNF	tumor nekrotizující faktor (Tumor Necrosis Factor)
TPyPzs	tetrapyridoporphyrizin

TPyzPz	tetrapyrazinoporphyrazin
T75	sterilní kultivační lahve o ploše 75 cm ²
VTP	fotodynamická terapie zaměřená na cévy (Vascular Targeted Photodynamic Therapy)

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 NÁDORY, KARCINOGENEZE

3.1.1 Obecná charakteristika

Jako nádor označujeme novou, abnormální tkáň, vznikající z organismu vlastní tkáň, která v těle nevykazuje fyziologickou funkci a její růst se vymyká regulačním mechanismům organismu (Hofmanová 2013). Nádorová autonomie se projevuje ve smyslu morfologických, funkčních a biologických odlišností od ostatních zdravých částí organismu. Obecně mají nádorové buňky ve srovnání s nenádorovými vyšší schopnost dělení se a vykazují také vyšší odolnost a delší životnost (Stříteský 2001).

Na vzniku nádorů se podílí řada faktorů, z nichž mnohé ještě nejsou známé. K příčinám, které se mohou podílet na vzniku nádorů, patří chemické látky (např. polycyklické aromatické uhlovodíky, látky cigaretového kouře či aflatoxiny) fyzikální vlivy (zejména ionizující a UV záření), viry (viry Eppstein Baarové, papilomaviry), hormony (zvýšená hladina estrogenních hormonů), stravovací návyky (druh potravy, příprava a její konzumace) a dědičnost (Mačák et al. 2012).

Vznik a rozvoj nádorového onemocnění se nazývá karcinogeneze. Jedná se o vícestupňový proces, jenž se rozvíjí na podkladě genetických a epigenetických změn vzniklých u kmenových buněk a různých typů prekurzorových buněk. Základem procesu jsou zásahy na úrovni DNA – ty jsou zodpovědné za vznik nádorů (Hofmanová 2013).

3.1.2 Dělení nádorů dle biologických vlastností (chování)

Podle biologických vlastností nádoru můžeme nádory rozdělit na benigní, intermediární a maligní. Benigní nádory se projevují pomalým růstem, ohraničeností procesu, expanzivním růstem, kterým utlačují okolní tkáň, netvoří metastázy a lze je snadno chirurgicky odstranit. Maligní nádory rostou rychle, neohraničeně, invazivně a destruktivně vzhledem ke svému okolí. Chirurgické odstranění není snadné, nádory mohou recidivovat a tvořit metastázy. Rozhraní mezi benigními a maligními nádory

tvoří intermediární nádory s lepší prognózou než maligní, ale s možností recidivy a tvorbou metastáz (Mačák et al. 2012).

3.1.3 Nádorová onemocnění v ČR

V České republice patří nádorová onemocnění k druhé nejčastější příčině úmrtí. Výskyt nádorových onemocnění stále stoupá (Ministerstvo zdravotnictví České republiky 2014). Stoupající výskyt nádorů je spojován se stárnutím populace, výživovými problémy, zvyšující se spotřebou tabákových výrobků apod. Přesto, že výskyt nádorových onemocnění má stoupající charakter, úmrtnost na zhoubné novotvary se v současné době výrazně nemění, nebo spíše klesá v důsledku medicínského pokroku (Český statistický úřad).

3.2 FOTODYNAMICKÁ TERAPIE NÁDORŮ

Fotodynamická terapie (PDT) je vysoce selektivní, minimálně invazivní, klinicky schválená terapeutická metoda zaměřená na léčbu maligních i nemaligních onemocnění (Agostinis et al. 2011, Mroz et al. 2011).

PDT využívá 3 složky, fotosenzitizér (PS), světlo a molekulární kyslík, které samy o sobě nejsou toxické, společně ale iniciují fotochemické reakce, které vedou k tvorbě vysoce reaktivních a toxických látek, které způsobují buněčné poškození a vedou až k buněčné smrti (Agostinis et al. 2011).

Pro PDT je nezbytné, aby se PS preferenčně nacházel ve tkáni, která má být léčena. Prvním krokem terapie je podání PS systémově nebo lokálně bez jeho aktivace světlem. Následuje určitá inkubační doba, kdy se PS distribuuje a akumuluje v léčené tkáni. Po inkubaci dochází k aktivaci PS pomocí světla se specifickou vlnovou délkou. V přítomnosti kyslíku poté dochází k tvorbě cytotoxických látek (singletového kyslíku ($^1\text{O}_2$) a jiných reaktivních forem kyslíku (ROS)), které se podílí na poškození buněčných struktur, vedoucí ke zničení nádorové tkáně (Agostinis et al. 2011, Moreira et al. 2008, Yoon et al. 2013).

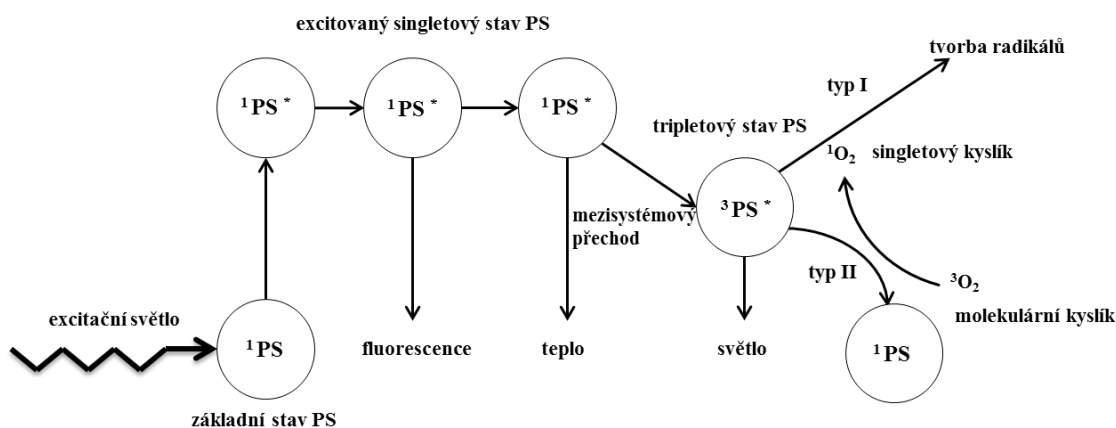
Protinádorový efekt PDT je výsledkem selektivního vychytávání PS proliferujícími buňkami nádoru, následného přímého cytotoxického efektu ROS na nádorové buňky (vedoucí k buněčné smrti – apoptóze či nekróze), poškození cévní mikrocirkulace nádoru (vedoucí k smrti buňky z nedostatku kyslíku a živin) a indukce místní zánětlivé reakce, která v některých případech vede k aktivaci systémové imunity. (Mroz et al. 2011, Robertson et al. 2009).

3.2.1 Mechanismus PDT

Hlavními aspekty mechanismu PDT jsou absorpce světla PS a následný přenos energie na další molekuly, především na molekulární kyslík (Robertson et al. 2009)

Jako většina molekul, i PS mají v základním singletovém stavu v orbitalu s nejnižší energií 2 elektrony s opačným spinem. Ozářením PS dochází k jeho excitaci a přechodu do svého prvního excitovaného singletového stavu (tedy beze změny spinu). Takto excitovaný PS je velmi nestabilní (nanosekundy) a ztrácí svou energii emisí fotonu (fluorescenčního záření), nebo konverzí na teplo. Excitovaný PS může také prodělat mezisystémový přechod na tripletový stav, kdy dochází k inverzi spinu jednoho z elektronů, která způsobí delší životnost excitovaného tripletového stavu PS (mikrosekundy). Tento proces je důležitý při PDT. Delší životnost excitovaného tripletového stavu PS zvyšuje šanci, že dojde ke kolizi s další molekulou, vedoucí k tvorbě reaktivních molekul (Agostinis et al. 2011, Benov 2015, Castano et al. 2004).

Excitovaný tripletový stav PS může projít dvěma typy reakcí, známých jako typ I a typ II. Mechanismus fotoreakce typu I je založen na přímé reakci PS s organickými molekulami a přenosu protonu nebo elektronu za tvorby volných radikálů a radikálových iontů. Tyto radikály mohou ihned reagovat s molekulami kyslíku a vytvářet ROS vedoucí k buněčné destrukci (Benov 2015, Robertson et al. 2009). Ve fotoreakci II. typu dochází k přímému přenosu energie na molekulární kyslík za tvorby $^1\text{O}_2$ (Robertson et al. 2009). Tyto reakce jsou graficky znázorněny na Obr. 1.



Obr. 1 Grafické znázornění fotochemických a fotofyzikálních reakcí PDT; PS – fotosenzitizér

Obě tyto reakce mohou probíhat simultánně. Poměr mezi nimi závisí na typu použitého PS, koncentraci substrátu a kyslíku (Robertson et al. 2009). Obecně je v PDT považován II. typ reakce za převažující a vytvářený $^1\text{O}_2$ tak působí jako hlavní cytotoxické agens PDT (Agostinis et al. 2011, Benov 2015). Za hypoxických podmínek nebo při vysokých koncentracích PS se však může více dominantní stát i fotoreakce I. typu (Macdonald a Dougherty 2001).

Protože životnost $^1\text{O}_2$ je velmi krátká (cca 10–320 ns), jeho difuze v buňkách je limitována pouze na 10–55 nm (Agostinis et al. 2011). To je velmi malý rozptyl, menší než průměrná velikost buněk či buněčných organel (Benov 2015). Z toho vyplývá, že pouze molekuly a buněčné struktury vyskytující se v bezprostřední blízkosti jeho vzniku (oblasti lokalizace PS) budou ovlivněny a následně zničeny (Castano et al. 2004).

3.3 OXIDAČNÍ STRES, REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU

3.3.1 Oxidační stres

Oxidační stres lze charakterizovat jako nerovnováhu mezi oxidačními a antioxidačními procesy v buňce ve prospěch oxidačních procesů, vedoucí k možnému poškození buněk. (Moreira et al. 2008). Jedná se o patologický stav, vznikající jako důsledek převažujících nežádoucích oxidačních procesů v buňce, vyvolaný volnými

radikály a dalšími reaktivními molekulami, nebo inhibicí přirozených ochranných antioxidačních mechanismů (Müllerová 2014).

Volným radikálem lze nazývat látky (molekuly, atomy či ionty), které mají ve svém elektronovém obalu jeden nebo více nepárových elektronů. Tyto látky jsou schopné samostatné existence. K jejich vzniku dochází přijetím nebo ztrátou elektronu z normální částice, dále také homolytickým štěpením vazby. Homolytické štěpení ale v biologických systémech není možné, jelikož vyžaduje příliš mnoho energie (Racek 2003). Volné radikály jsou nestabilní a vysoce reaktivní látky, které se snaží doplnit si chybějící elektron pro dosažení stabilní konfigurace (Müllerová 2014).

Tvorba volných radikálů v aerobních organismech je z větší části neřízený a nevyhnutelný proces díky jejich závislosti na oxidativních procesech nezbytných pro život. Pro adaptaci a přežití aerobních organismů v silném oxidativním prostředí byl velmi důležitý rozvoj silných antioxidačních mechanismů (Manda et al. 2009).

3.3.2 Obecná charakteristika reaktivních forem kyslíku

Pod pojmem ROS jsou řazeny především volné radikály, vznikající z molekuly kyslíku, které obsahují nepárový elektron, dále pak sloučeniny kyslíku, které sice radikály nejsou, ale mohou radikály poskytovat. K hlavním zástupcům ROS patří superoxid anion radikál ($\cdot\text{O}_2^-$), peroxid vodíku (H_2O_2), hydroxylový radikál ($\cdot\text{OH}$) a $^1\text{O}_2$ (Ledvina 2009).

ROS jsou tvořeny v enzymatických a neenzymatických reakcích (Manda et al. 2009). Potenciálně toxické ROS mohou v eukaryotických organismech vznikat v průběhu normálního energetického metabolismu (například oxidativní fosforylace nebo mitochondriální elektronový transport) nebo metabolismu xenobiotik (Moreira et al. 2008).

Obecně jsou ROS považovány za toxické látky způsobující poruchy v činnosti buněk, jejich následnou smrt či maligní transformaci (Manda et al. 2009). Volné radikály a další reaktivní molekuly mohou být zapojeny v procesech různých onemocnění, jako jsou například Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, karcinogeneze nebo AIDS. Také se uplatňují v nepatologických procesech, jako je například proces stárnutí (Moreira et al. 2008). Působení ROS však nemusí být jen

nežádoucí. Tyto molekuly se mohou účastnit také procesu nespecifické imunitní obrany vůči patogenům, signální transdukce nebo buněčného metabolismu.

Je velmi pozoruhodné, že jednoduché molekuly jako ROS jsou schopné regulace života a smrti (Manda et al. 2009).

3.3.3 Superoxidový anion radikál

K nejčastějším reaktivním formám kyslíku patří $\cdot\text{O}_2^-$, který vzniká jednoelektronovou redukcí molekuly kyslíku. Pomocí enzymu superoxiddismutázy (SOD) dochází v organismu k jeho odstraňování (dismutace) za vzniku H_2O_2 a kyslíku (Racek 2003, Müllerová 2014).

V biologických systémech nezpůsobuje samotný $\cdot\text{O}_2^-$ větší oxidativní poškození, je ale významný v produkci $\cdot\text{OH}$ (Castano et al. 2004). Sám se účastní například peroxidace lipidů (Manda et al. 2009).

3.3.4 Peroxid vodíku

Peroxid vodíku je vytvářen v organismu dismutací $\cdot\text{O}_2^-$. I když není volným radikálem, v přítomnosti dvoumocného železa (Fentonova reakce) vytváří vysoce toxický $\cdot\text{OH}$ (Ledvina 2009, Müllerová 2014). Také je nezbytný pro tvorbu kyseliny chlorné, katalyzovanou myeloperoxidázou (Manda et al. 2009). V biologických systémech H_2O_2 může snadno procházet buněčnými membránami a z buněk jej nelze odstranit. V organismu je H_2O_2 nezbytný například pro správnou funkci mnoha enzymů, je proto nezbytný pro správnou funkci celého organismu (Castano et al 2004).

3.3.5 Hydroxylový radikál

Nejnebezpečnější a nejreaktivnější formou ROS je $\cdot\text{OH}$, který vzniká ve Fentonově a Haber-Weissově reakci. Hydroxylový radikál představuje vysoce reaktivní molekulu, která atakuje většinu buněčných komponent (proteiny, sacharidy, lipidy i nukleové kyseliny). Jeho vysoká reaktivita způsobuje, že extrémně rychle zaniká napadením molekul prakticky v místě svého vzniku (Manda et al. 2009, Racek 2003).

3.3.6 Singletový kyslík

$^1\text{O}_2$ je excitovaná molekula kyslíku charakterizovaná spárovanými elektrony s opačnými spiny ve vnějším orbitalu. Jako nenabitá molekula je schopna difundovat v cytoplazmě a přes biologické membrány (Plaetzer et al. 2009). Vysoce reaktivní $^1\text{O}_2$ je schopen atakovat molekuly nukleových kyselin, lipidů či proteinů (Moreira et al. 2008). Při PDT působí $^1\text{O}_2$ jako hlavní cytotoxická ROS, jež je zodpovědná za většinu oxidativního poškození.

Jednou z hlavních charakteristik syntetizovaných PS je právě kvantový výtěžek $^1\text{O}_2$ (Φ_Δ), který můžeme definovat jako počet vytvořených molekul $^1\text{O}_2$ produkovaných molekulou PS po absorpci kvanta energie (Zimčík a Miletin 2009).

3.3.7 Negativní důsledky působení ROS

Negativní důsledky působení ROS v organismu se projevují především oxidačním poškozením lipidů, proteinů, DNA a dalších látek.

Poškození lipidů (lipoperoxidace) je způsobeno napadáním násobných vazeb nenasycených mastných kyselin fosfolipidové dvojvrstvy biologických membrán a vznikem reaktivních molekul. Tímto mechanismem dochází ke změně propustnosti membrán a vlivu na membránově vázané receptory a enzymy (Müllerová 2014).

U oxidačního poškození proteinů mohou reaktivní formy reagovat s postranními řetězci aminokyselin (zejména tryptofanu a methioninu). Oxidací či jinými změnami funkčních skupin dochází k agregaci, síťování bílkovin, fragmentaci a modifikaci funkčních skupin. Napadání thiolových skupin například v enzymech nebo hemoglobinu se projevuje poškozením jejich metabolických funkcí (tvorba disulfidických můstků). Důsledkem všech těchto změn dochází v buňce ke změnám transportu iontů, změně aktivity enzymů či proteolýze (Müllerová 2014, Ledvina 2009).

V DNA dochází k působením ROS ke štěpení cukerného kruhu, modifikaci bází či ke zlomům řetězce. Důsledkem jsou mutace, translační chyby či inhibice proteosyntézy (Müllerová 2014).

K poškození může docházet i v dalších makromolekulách, jako jsou například polysacharidy nebo glykosaminoglykany, stejně tak mohou být napadány i látky

nízkomolekulární např. katecholaminy, thioly či askorbát. Substrátem ROS může být také cholesterol (Ledvina 2009).

3.3.8 Vztah ROS a nádorů

V normálních buňkách je vyžadována ROS signalizace pro proliferaci buněk, vyplývající ze stimulace růstovými faktory. V nádorových buňkách dochází aktivací této cesty ke zvýšení ROS signalizace. Předpokládá se, že nádorové buňky mohou být více náchylné k oxidačnímu stresu způsobenému ROS, jelikož už pracují při zvýšené signalizaci zprostředkované ROS, která je nezbytná pro zvýšenou míru růstu nádorových buněk. Přídavkem látky, zvyšující tvorbu ROS nebo snižující schopnost jejich vylučování, se tak dostanou buňky nádoru přes kritický bod směřující k poškození lipidů, proteinů, DNA a dalších látek (Schumacker 2006).

3.4 ZDROJ SVĚTLA

Světlo je dalším klíčovým elementem PDT. Vhodný zdroj světla by měl být vybrán dle absorpčního spektra PS, typu onemocnění (umístění, velikost, přístup k ložisku, vlastnosti tkáně), ceny a velikosti vybraného zařízení. Klinická účinnost PDT je závislá na komplexní dosimetrii (celková dávka světla, čas vystavení světlu a typ přenosu světla). Zásadní pro úspěšnou terapii PDT je tedy výběr optimálního PS, zdroje světla a léčebných parametrů (Agostinis et al. 2011).

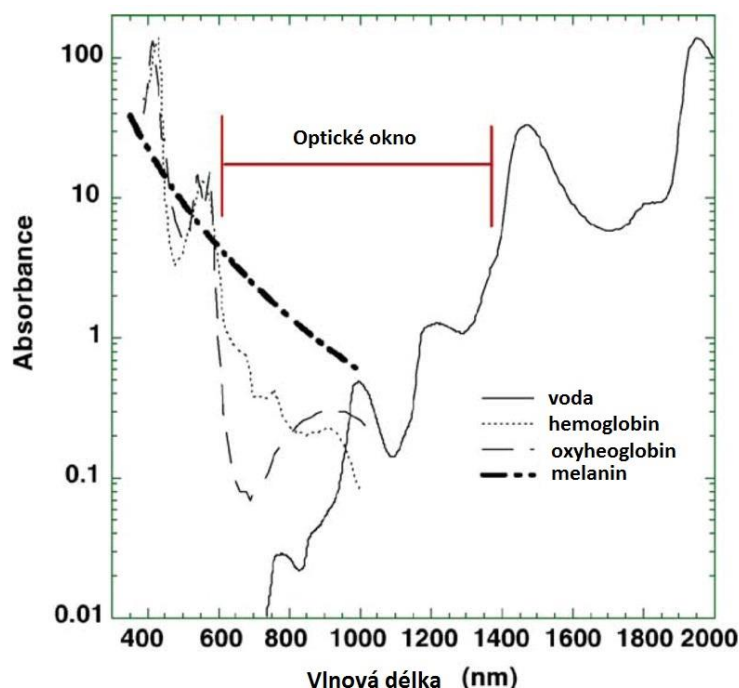
3.4.1 Optické okno tkáně

Účinnost a hloubku PDT ovlivňují optické vlastnosti tkání (Benov 2015). Po vstupu světla do tkáně dochází k jeho absorpci nebo rozptylu. Oba procesy závisí na typu tkáně a vlnové délce světla (Castano et al. 2004). Světlo s kratší vlnovou délkou (modré světlo) prochází tkáněmi méně efektivně než světlo červené, které má delší vlnovou délku (Agostinis et al. 2011). K rozptylu a absorpci světla ve tkáni dochází vlivem její nehomogenity (například obsah makromolekul, buněčných organel,

organizovaných buněčných struktur). Absorpci ovlivňují predominantně endogenní chromofory hemoglobin, myoglobin, melanin a cytochromy (Robertson et al. 2009).

Kombinací absorpce světla nižších vlnových délek (400–600 nm) důležitými endogenními chromofory, nižšího rozptylu světla při delších vlnových délkách a přítomností absorpce světla vodou při vlnových délkách nad 1300 nm vznikl koncept „optického okna“ ve tkáních, ve kterém je možné dosáhnout maximálního průchodu světla tkáněmi. (Benov 2015, Castano et al. 2004). Optickým oknem tkáně je tedy často nazývána oblast mezi 600–1200 nm (obr. 2). Nicméně pouze světlo o vlnové délce přibližně do 800 nm je schopno efektivně vytvářet $^1\text{O}_2$. Světlo o delší vlnové délce totiž neposkytuje dostatek energie ke spuštění fotodynamické reakce (Agostinis et al. 2011). Nejvíce využívaný rozsah vlnových délek pro PDT je přibližně 650–850 nm a lze jej také nazvat jako „fototerapeutické okno“ tkáně (Yoon et al. 2013).

Vzhledem k tomu, že se nádorové léze mohou vyskytovat povrchově, ale i hlouběji, vývoj PS se začal orientovat na jejich aktivaci světlem při vyšších vlnových délkách. To umožnilo zlepšit schopnost léčit pomocí PDT hlouběji uložené nádory díky vyšší penetraci světla o vyšší vlnové délce tkáněmi (Allison a Sibata 2010).



Obr. 2 Oblast optického okna tkáně s vyznačenými absorpčními spektry důležitých endogenních chromoforů (Castano et al. 2004)

3.4.2 Volba světelného zdroje pro PDT

Vhodný světelný zdroj by měl prokázat vhodné spektrální charakteristiky, které se shodují s maximální absorpční vlnovou délkou PS, která je schopna generovat dostatek ROS pro docílení cytotoxického efektu v nádorové tkáni (Robertson et al. 2009). Světelné zdroje by měly prokázat maximální efekt léčby s minimem poškození normální zdravé tkáně. Hlavními překážkami pro rozšíření využívání PDT jsou cena, komplexnost a dostupnost světelných zařízení (Yoon et al. 2013).

Jako zdroj světla pro PDT jsou využívány lasery nebo nekoherentní zdroje světla (LED aj.). Pomocí laserů je zajištěn výběr optimální vlnové délky pro maximální absorpci použitého PS, protože představuje monochromatický zdroj světla. Výběr vhodné vlnové délky zajišťuje vysokou produkci ROS (Moreira et al. 2008).

Lasery mohou být spojeny s optickými vlákny, která umožňují zavedení světla do nepřístupných oblastí, jako je trávicí trakt, močový měchýř nebo mozek (Agostinis et al. 2011). Nelaserové zdroje mohou být významnější například v dermatologii pro velký povrch, který jsou schopny ozářit, nižší cenu a velikost (Moreira et al. 2008).

3.5 FOTOSENZITIZÉRY

PS jsou sloučeninami schopnými absorbovat světlo o specifické vlnové délce a přeměnit jej na užitečnou energii, která u PDT zodpovídá za produkci cytotoxických ROS. Klíčovou charakteristikou každého PS je jeho schopnost akumulovat se v požadované tkáni, kde poté cytotoxická agens indukují požadovaný biologický efekt (Sharman et al. 1999).

PS jsou hlavní součástí PDT. Jejich fotofyzikální a farmakokinetické vlastnosti jsou určeny jejich strukturou. Rozdílnost v těchto vlastnostech vede k jejich různé účinnosti, selektivitě k nádorům, odlišným ozařovacím schémátům a nežádoucím účinkům (hl. fotosenzitivita) (Zimčík a Miletin 2009).

Přestože je známo, že interval mezi podáním PS a ozáření cílové tkáně je dlouhý (difuze PS z normálních tkání), tak se nyní předpokládá, že účinnost na nádory může být v některých případech lepší při zkrácení intervalu mezi podáním PS a ozáření, kdy je PS stále přítomný v cévách a způsobí vaskulární poškození (Agostinis et al. 2011). Tento typ PDT je znám jako fotodynamická terapie zaměřená na cévy (VTP).

Dnes je známo velké množství potenciálně využitelných PS pro PDT. Některé z nich je možné syntetizovat z dostupných přírodních materiálů, jako jsou hem, chlorofyl nebo bakteriochlorofyl. Ve srovnání s komplikovanou celkovou chemickou syntézou látek je syntéza PS z přírodních látek ekonomičtější a šetrnější pro životní prostředí (Castano et al. 2004).

3.5.1 Ideální fotosenzitizér

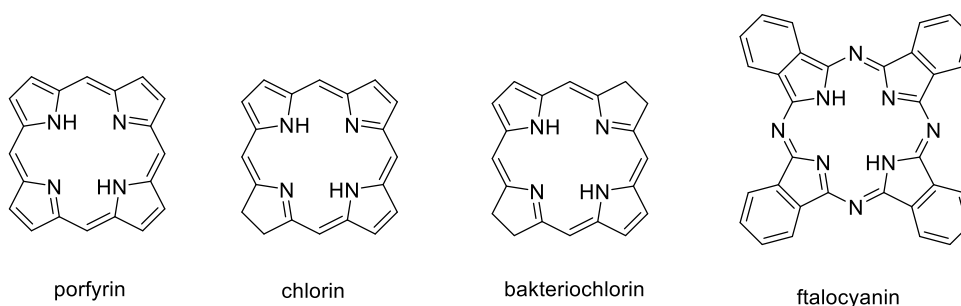
Pro hledání nových PS, vhodných pro PDT, byla všeobecně definována kritéria „ideálního PS“, jehož vlastností je snaha u nových PS dosáhnout.

Ideální PS by měla být chemicky čistá látka o známém složení, stabilní při pokojové teplotě, jejíž syntéza by měla být přímočará. Chemická čistota a znalost složení umožňuje analýzy pro kontrolu kvality PS. Ideálně by molekula PS měla být rozpustná ve vodě nebo směsi vodných rozpouštědel. Agregace PS v biologických systémech je nežádoucí, jelikož snižuje fotochemickou aktivitu PS. Ideální PS by měl vykazovat nízkou vlastní toxicitu a být cytotoxický pouze v přítomnosti světla o definované vlnové délce. Po podání by neměl způsobovat toxické účinky (alergické reakce, hypotenze aj.). Molekuly PS by měly být zadržovány preferenčně v požadované tkáni, z normálních tkání by měl být rychle vylučován. To vede ke zvýšení selektivity PS k nádorovým buňkám. Přebytek PS by měl být rychle vyloučen z těla, jelikož některé PS mají tendenci se hromadit v kůži a zapříčinit fotosenzitivitu, při níž jsou pacienti nuceni se vyhýbat přímému slunečnímu záření po dobu až několika týdnů. PS by měl mít vysokou fotochemickou aktivitu a být schopný efektivně vykazovat vysoký Φ_{Δ} či dalších ROS. Měl by ideálně silně absorbovat světlo o vyšších vlnových délkách (červená oblast spektra), ideálně v rozsahu 600–800 nm, kde je také rozptyl světla nejnižší a jeho průnik tkáněmi maximální. Důležitým parametrem je také cena, která by měla být nízká, a PS by měl být komerčně dostupný pro možnost rozsáhlejšího

využívání PDT (Agostinis et al. 2011, Castano et al. 2004, Yoon et al. 2013, Zimčík a Miletin 2009).

3.5.2 Struktura fotosenzitizérů

Většina PS používaných v terapii nádorů je odvozena od struktury tetrapyrrolového makrocyklu, který se nalézá u přirozeně se vyskytujících pigmentů, hemu, chlorofylu nebo bakteriochlorofylu (Castano et al. 2004). Hlavními strukturálními skupinami PS této skupiny jsou porfyriny a jejich analoga, chloriny, bakteriochloriny a ftalocyaniny (Obr. 3) (Benov 2015).



Obr. 3 Hlavní strukturální skupiny PS odvozených od tetrapyrrolového makrocyklu

Porfyriny představují plně konjugované tetrapyrroly lišící se v počtu a typu postranních skupin. Chloriny mají oproti porfyrinům ve svém pyrrolovém jádře redukovanou jednu dvojnou vazbu. Tato redukce umožňuje posun absorpčního maxima PS do oblasti 650–690 nm. Bakteriochloriny se vyznačují dvěma redukovánými dvojnými vazbami ve svých dvou pyrrolových jádrech. I tato redukce přispívá k výraznějšímu posunu maxima absorpce ještě dále do červené oblasti spektra. Další strukturální skupinou jsou ftalocyaniny, které mají maximální vlnovou délku absorpce větší než 650 nm (Castano et al. 2004). Jedná se o tetraazoporfyriny, nebo také porphyriziny se čtyřmi dalšími benzenovými jádry kondenzovanými k pyrrolovým podjednotkám (Moreira et al. 2008).

3.5.3 Dělení fotosenzitizérů do generací

Obecně lze dostupné fotosenzitizéry rozdělit do tří generací. Zástupcem první generace PS je derivát hematoporfyrinu (HpD, porfimer sodný), dostupný jako Photofrin[®]. Látky první generace mají bohužel několik nevýhod. Slabě absorbují světlo při nižších vlnových délkách (kolem 630 nm), jedná se o chemicky různé směsi látek, které jsou zadržovány kůží po několik měsíců, kdy způsobují dlouhodobou kožní fotosenzitivitu (Zimčik a Miletin 2009, Yoon et al. 2013).

Druhá generace PS zahrnuje látky, které byly vyvíjeny, aby překonaly nedostatky PS první generace (Allison a Sibata 2010). Druhá generace PS se vyznačuje absorpcí světla při vlnových délkách mezi 670–800 nm, tato vlnová délka světla prochází tkáněmi hlouběji (2–3 cm). Jejich silnější absorpce zajišťuje snížení množství PS, vyžadované pro terapeutický efekt. Již se nejedná o směsi látek, jako je tomu u první generace (Zimčik a Miletin 2009).

Třetí generace představuje PS předchozích generací, kovalentně spojených s různými molekulami (přenašeči), mající afinitu k nádorové tkáni nebo receptorům exprimovaných v těchto tkáních (Agostinis et al. 2011, Zimčik a Miletin 2009). Přenašeči mohou být například monoklonální protilátky, cholesterol, proteiny nebo liposomy, zajišťující zacílení na oblast nádorové tkáně (Yoon et al. 2013).

3.5.4 První generace fotosenzitizérů

- **Porfimer sodný**

Porfimer sodný, neboli derivát hematoporfyrinu (HpD), je prvním PS klinicky použitým pro nádorovou léčbu. Komerčně je známý pod názvem Photofrin[®] (Agostinis et al. 2011). HpD se skládá ze směsi porfyrinových monomerů, dimerů a oligomerů odvozených různými chemickými manipulacemi z hematoporfyrinu (Allison a Sibata 2010), látky izolované z hemoglobinu. (Moreira et al. 2008). Ve vodě rozpustný porfimer sodný je aplikován pacientům intravenózně v dávkách 2 mg/kg. Jeho biologický poločas se pohybuje v rozmezí 17–22 dní. Nejlepšího vychytávání PS nádorem je pak dosahováno za 45–50 hodin, kdy dochází k ozařování cílové oblasti (Zimčik a Miletin 2009).

Využití tohoto PS se zaměřuje na léčbu velkého množství solidních nádorů zahrnujících nádory plic, žaludku, jícnu, močového měchýře, mozku a děložního čípku (Agostinis et al. 2011, Moreira et al. 2008).

I přes to, že je HpD pravděpodobně světově nejpoužívanějším PS, vykazuje tento PS celou řadu nevýhod (Agostinis et al. 2011). Jedná se hlavně o dlouhotrvající fotosenzitivitu pacientů vyvolanou prodlouženou retencí PS v kůži, která trvá až 10 týdnů, a pacienti se po tuto dobu musí vyhýbat přímému slunečnímu záření (Ormond a Freeman 2013, Zimčík a Miletin 2009). Další nevýhodou je nízká absorpce světla při 630 nm, limitující efektivní penetraci tkáněmi (Ormond a Freeman 2013). Za nevýhodu lze také považovat chemickou nejednotnost, nejedná se totiž o chemicky definovanou entitu, nýbrž o směs látek s neurčitou strukturou a složením (Moreira et al. 2008).

Tyto nevýhody vedly k vývoji nových, chemicky dobře definovaných PS s vylepšenými farmakokinetickými a optickými vlastnostmi. Tyto látky zařazujeme do druhé generace PS (Moreira et al. 2008).

3.5.5 Druhá generace fotosenzitizérů

3.5.5.1 PORFYRINY

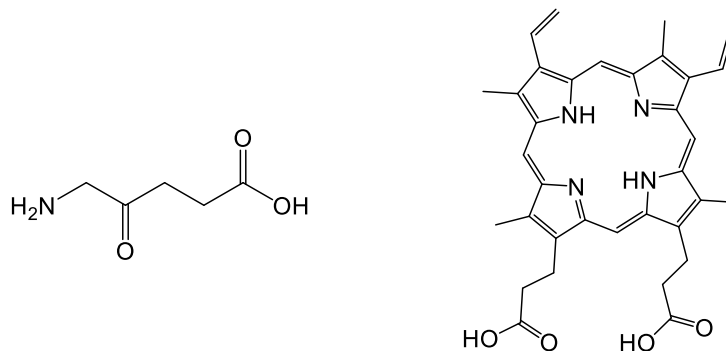
- **Kyselina 5-aminolevulová**

Kyselina 5-aminolevulová (ALA) figuruje v PDT jako proléčivo (Levulan[®]). Samotná molekula ALA je neaktivní – sama o sobě není PS, pouze je prekurzorem fotosenzitivního protoporfyrinu IX (PPIX) (Moreira et al. 2008).

S výjimkou zralých erytrocytů je v lidském těle většina typů buněk vybavena metabolickým aparátem pro syntézu hemu (Castano et al. 2004). Fyziologicky v organismu představuje ALA první krok syntézy porfyrinů, kdy dochází pomocí ALA syntetázy k její tvorbě z glycinu a sukcylní koenzymu A. Endogenně syntetizovaná molekula ALA je v několika reakcích přeměněna až na samotný hem. Za fyziologických podmínek nedochází k akumulaci meziproductů syntézy hemu v buňce, protože koncentrace hemu funguje jako zpětnovazebný mechanismus, inhibující syntézu endogenní ALA. Dalším limitujícím faktorem je limitovaná kapacita

enzymu ferochelatázy, přeměňující poslední meziprodukt PPIX na hem (Zimčík a Miletin 2009).

Enzymaticky pomocí několika reakcí se z proléčiva ALA stává aktivní PS – PPIX (Obr. 4). V případě dodání přebytku exogenní ALA se PPIX začíná kumulovat, což způsobí snížení produkce hemu (Allison a Sibata 2010) vlivem vyčerpání kapacity ferochelatázy (Zimčík a Miletin 2009). Tento krok je klíčový pro PDT, protože umožní kumulaci aktivního PS v tkáních. Navíc nádorová tkáň je schopna po podání exogenní ALA produkovat mnohem větší množství PPIX ve srovnání s normální tkání, a dochází tak k zásadnímu rozdílu v koncentracích PPIX v normální a nádorové tkáni (Allison a Sibata 2010).



Obr. 4 Proléčivo – kyselina 5-aminolevulová (vlevo) a aktivní fotosenzitizér – protoporfyrin IX (vpravo)

Exogenní ALA je možné aplikovat orálně, intravenózně nebo povrchově (Allison a Sibata 2010). Vykazuje nízkou toxicitu a je rychle vylučována z těla pomocí již existujícího mechanismu eliminace (Moreira et al. 2008).

ALA je oficiálně schválena pro použití v léčbě aktinické keratózy hlavy a obličeje (Zimčík a Miletin 2009). Je také využívána pro zobrazování a léčbu povrchových nádorů (Josefsen a Boyle 2012). Pro zobrazování nádorové tkáně může být využívána diagnosticky z důvodu produkce fluorescence PPIX, která může být vizualizovaná modrým světlem (Moreira et al. 2008).

Deriváty ALA jsou klinicky využívány pro léčbu a zobrazování bazálního buněčného karcinomu a dalších kožních lézí. ALA je používána i v dermatologii pro povrchovou léčbu psoriázy, Bowenovy choroby a akné. Estery ALA (Benvix[®],

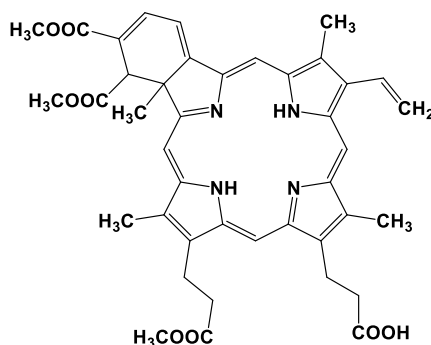
Metvix[®] a Hexvix[®] jsou využívány v léčbě gastrointestinálních nádorů a v diagnostice nádorů močového měchýře (Josefsen a Boyle 2012).

Malé molekuly ALA derivátů jsou schopny prostupovat kůží v místě nádoru selektivněji a způsobovat zde fluorescenci a zvýšení fotosenzitivity nádorů tvorbou PPIX. To z nich dělá ideální terapeutická činidla (Josefsen a Boyle 2012).

3.5.5.2 CHLORINY

- **Verteporfin**

Verteporfin (Obr. 5), neboli benzoporphyrinový derivát (BPD), je zástupcem PS skupiny chlorinů, odvozený od protoporphyrinu (Moreira et al. 2008). Jedná se o PS těžko rozpustný ve vodě, proto musí být podáván ve formě liposomů (Zimčík a Miletin 2009).



Obr. 5 Struktura verteporfinu

Tento PS se vyznačuje rychlým vychytáváním tkáněmi, rychlou eliminací a selektivitou vychytávání endoteliálními buňkami (Moreira et al. 2008). Má také kratší interval možné kožní fotosenzitivity po podání díky rychlejší farmakokinetice v plazmě a tkáních, která umožňuje rychlejší exkreci PS z těla (Josefsen a Boyle 2012). Biologický poločas BPD v plazmě se pohybuje okolo 5–6 hodin. Nádorová tkáň je obvykle ozařována 15 minut po podání PS. Délka možné fotosenzitivity není zpravidla delší než 48 hodin (Zimčík a Miletin 2009).

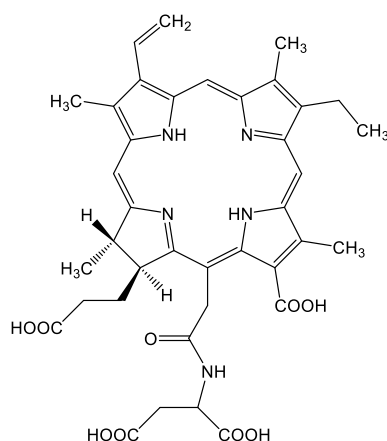
Úspěšnost BPD je připisována vyššímu absorpčnímu maximu (přibližně 690 nm). Ve srovnání s Photofrinem[®] a jeho vlnovou délkou absorpčního maxima,

vlnová délka absorpčního maxima BPD proniká tkáněmi o 50 % lépe (Josefsen a Boyle 2012).

Verteporfin způsobuje uzavírání cév, proto je optimální pro léčbu lézí způsobených novotvořenou vaskularizací (Zimčík a Miletin 2009). Klinicky byl BPD schválen pro léčbu věkem podmíněné makulární degenerace (AMD), která je příčinou těžké ztráty zraku až slepoty u starších osob, a prokázal účinnost také u kožních nemelanomových nádorů (Josefsen a Boyle 2012, Moreira et al. 2008).

- **Talaporfin**

Talaporfin, chemicky mono-L-aspartyl chlorin e6 (Obr. 6), představuje hydrofilní substanci ze skupiny chlorinů, odvozenou od molekuly chlorofylu (Moreira et al. 2008). Jedná se o semisyntetický derivát chlorinu e6, získaného reakcí chlorinu e6 s kyselinou asparagovou (Zimčík a Miletin 2009).



Obr. 6 Struktura talaporfinu

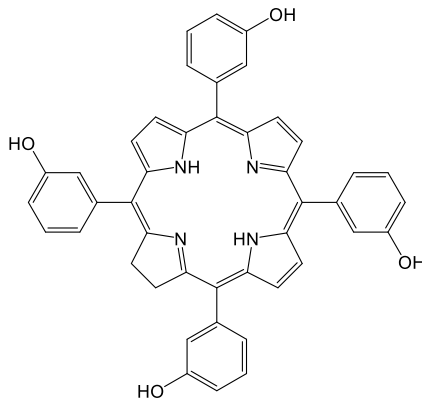
Vyazuje vynikající fotodynamické vlastnosti *in vitro* a *in vivo*. Chemicky čistý talaporfin vykazuje signifikantní absorpci světla při vlnové délce 664 nm. (Moreira et al. 2008). Pro maximální efekt léčby by k ozáření cílové tkáně mělo dojít 2–4 hodiny po intravenózní infuzi. Talaporfin je z těla vylučován žlučí, proto musí být věnována vyšší pozornost pacientům s chorobami jater (Allison a Sibata 2010). Stejně jako BPD talaporfin způsobuje po podání minimální kožní fotosenzitivitu (Ormond a Freeman 2013).

Tento hydrofilní PS je obvykle vázán v plazmě a předpokládá se, že má spíše vaskulární účinky (Allison a Sibata 2010). V buňkách se tento PS lokalizuje v lysozomech (Moreira et al. 2008).

Jedná se o potenciální PS pro PDT pro léčbu fibrosarkomu, nádorů jater, mozku, dutiny ústní. V Japonsku byl talaporfin schválen také pro léčbu nádorů plic (Ormond a Freeman 2013).

- **Temoporfin**

Dalším členem rodiny chlorinů je temoporfin (Obr. 7), chemicky metatetrahydroxyferylchlorin (mTHPC). Jedná se o komerčně dostupný a široce používaný PS pro PDT (Allison a Sibata 2010). Lze jej syntetizovat z metatetrahydroxyferylporfyrinu redukcí jednoho z pyrolových jader (Ormond a Freeman 2013). Rozpustnost mTHPC ve vodě není příliš dobrá, proto se podává jako směs s vodou, etanolem a polyetylglykolem (Zimčík a Miletin 2009). K selektivní akumulaci temoporfinu v nádorové tkáni a jeho eliminaci z normálních tkání dochází až za 4 dny po podání, k ozařování může tedy dojít až po této době (Allison a Sibata 2010).



Obr. 7 *Struktura temoporfinu*

K efektivní aktivaci PS dochází při vlnové délce 652 nm (Ormond a Freeman 2013). Temoporfin patří k neúčinnějším PS pro svůj neobyčejně vysoký Φ_{Δ} (Allison a Sibata 2010). Výhodou temoporfinu je také nízká dávka světla pro dosažení fotodynamického efektu (Josefsen a Boyle 2012).

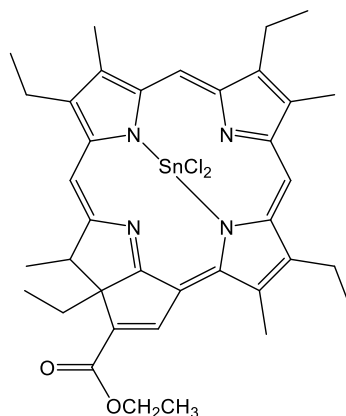
Pro léčbu jsou vyžadovány nízké dávky tohoto PS, což je jeho další velká výhoda. Jeho slabinou ale zůstává vysoká fotosenzitivita, projevující se u některých

pacientů, která může trvat až 6 týdnů. I přes krátký průběh léčby se může u pacientů objevit nepříjemná bolest (Allison a Sibata 2010, Ormond a Freeman 2013).

V Evropě byl tento PS schválen pro léčbu nádorů hlavy a krku (Moreira et al. 2008). V klinických studiích vykazuje také dobré výsledky při léčbě bazálního buněčného karcinomu (Zimčík a Miletin 2009).

- **Rostaporfin**

K chlorinovým PS patří také rostaporfin (cíničitý etiopurpurin, SnET2, PurlytinTM). Jedná se o syntetický purpurin (Obr. 8), který je degradačním produktem chlorofylu (Allison a Sibata 2010).



Obr. 8 Struktura rostaporfinu

Rostaporfin je aktivován světlem o vlnové délce 664 nm (Ormond a Freeman 2013). Posun absorpčního maxima k delším vlnovým délkám podporuje centrálně koordinovaný atom cínu (Allison a Sibata 2010).

Jedná se o hydrofobní PS, proto musí být podáván s emulgátorem (Zimčík a Miletin 2009). Současný přenašeč rostaporfinu je složením podobný vejcím, proto musí být zohledněna případná alergie pacientů na vejce, aby nedošlo k propuknutí alergické reakce. Cílem tohoto PS jsou buněčné membrány. Léčba je zahajována 24 hodin po aplikaci PS v dávce 1,2 mg/kg. Po podání se může u pacientů objevit bolest, dochází také k iniciaci fotosenzitivity, která trvá přibližně 14 dní po aplikaci PS (Allison a Sibata 2010).

Motexafin lutetium byl v USA schválen pro léčbu nádorů prsu a maligních melanomů (Josefsen a Boyle 2012). Jeví se taktéž slibně pro léčbu nádorů prostaty (Zimčik a Miletin 2009). Prochází klinickým hodnocením pro léčbu nádorů děložního hrdla. Jeho deriváty jsou taktéž klinicky hodnoceny, Optrin[®] pro léčbu AMD, a Antrin[®] pro fotoangioplastiku cév u aterosklerózy (Ormond a Freeman 2013).

3.5.5.4 FEOFORBIDY

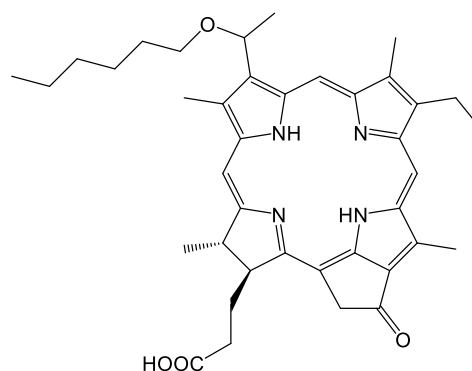
Skupina feoforbidů, syntetizovaná z chlorofylu, je charakteristická dvěma dalšími vodíky v jednom pyrolovém kruhu (Ormond a Freeman 2013).

- **2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinyl pyrofeoforbid (HPPH)**

Zástupcem skupiny feoforbidů je chlorinový derivát 2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinyl pyrofeoforbid (HPPH). Tato vysoce hydrofobní sloučenina je charakteristická pomalou farmakokinetikou a exkrecí z organismu (Allison a Sibata 2010). Aby byl HPPH rozpustný ve vodě, je vyžadován solubilizér nebo může být aplikován jako suspenze nanokrystalů (Zimčik a Miletin 2009).

PS je aktivován při absorpčních maximech 665 nm a 408 nm, čímž je umožněna léčba povrchových i hlouběji uložených lézí. Aplikovaná dávka PS se pohybuje mezi 2,5–6 mg/m². V plazmě může být detekován i několik měsíců po aplikaci PS. I přesto způsobuje jen minimální fotosenzitivitu (Allison a Sibata 2010, Zimčik a Miletin 2009).

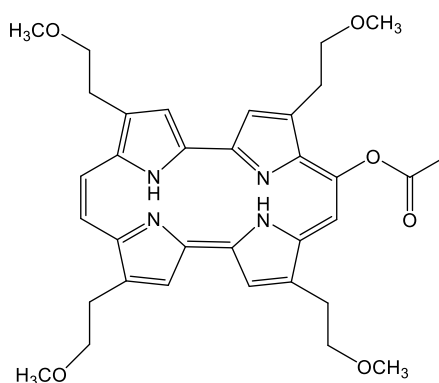
HPPH (Obr. 10) je klinicky zkoumán pro použití při léčbě nádorů jícnu, kůže, plic, dutiny ústní, hlavy a krku (Ormond a Freeman 2013).



Obr. 10 2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinyl pyrofeoforbid (HPPH)

3.5.5.5 PORPHYCENY

Konstitučními izomery porfyrinů jsou zcela syntetické porphyceny. Deriváty porphycenů vykazují vyšší absorpční maximum v červeném spektru (> 600 nm) než porfyriny. Díky rychlému vychytávání PS tkáněmi a rozmanitým cílovým buněčným organelám se porphyceny jeví jako vhodné kandidáty pro PDT. Acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(β -metoxyethyl)-porphycen (ATMPn) patří k nejvíce studovaným zástupcům porphycenů (Obr. 11) pro PDT (Zimčík a Miletin 2009). Vykazuje absorpční maximum při 640 nm. Tento PS byl hodnocen pro léčbu psoriázy a nemelanomových nádorů kůže (Josefsen a Boyle 2012).

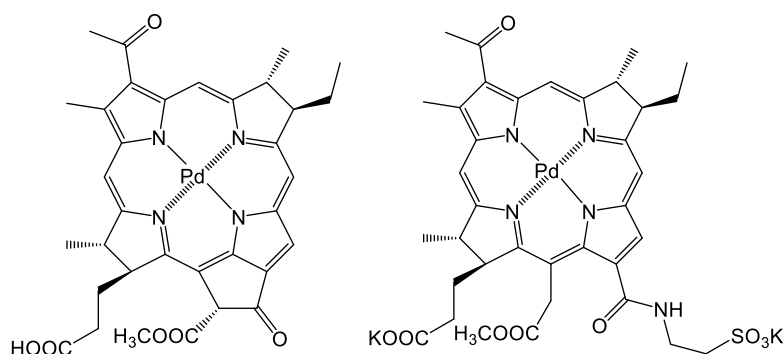


Obr. 11 Acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(β -metoxyethyl)-porphycen

3.5.5.6 BAKTERIOCHLORINY

Ke skupině bakteriochlorinů se řadí padoporfin (WST09, Tookad[®]) a padeliporfin (WST11, Stakel[®]). Jedná se o deriváty bakteriochlorofylu, bakteriálního ekvivalentu chlorofylu, obsahující centrální atom paladia (Obr. 12).

Hydrofobní padoporfin vyžaduje pro podání použití nosiče. Padeliporfin je hydrofilní sloučenina, jejíž podání je jednodušší (Allison a Sibata 2010). Absorpční maximum padoporfinu je 763 nm, padeliporfin absorbuje při 753–757 nm, je tak umožněn hlubší průnik světla tkáněmi (Kawczyk-Krupka et al. 2015). Ukázalo se, že obě tyto látky způsobují po ozáření rychlý uzávěr cévní cirkulace (Allison a Sibata 2010).



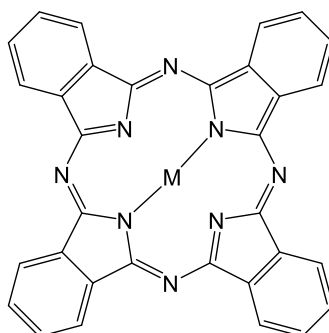
Obr. 12 Padoporfin (vlevo), padeliporfin (vpravo)

K exkreci bakteriochlorinů dochází velmi rychle, proto k ozáření dochází již krátce po jejich aplikaci. Fotosenzitivita se rozvíjí pouze do 3 hodin od aplikace PS (Allison a Sibata 2010).

Oba tyto senzitivizéry jsou klinicky hodnoceny pro léčbu nádorů prostaty (Ormond a Freeman 2013). Mohou mít potenciál i v léčbě choroidální neovaskularizace (Zimčík a Miletin 2009).

3.5.5.7 FTALOCYANINY

Skupina ftalocyaninů (Pc) představuje intenzivně modrozeleně zbarvené, aromatické makrocycly. Vytváří koordinační komplexy s širokou škálou kovů, nejvíce slibné se jeví komplexy s Al, Si a Zn (Obr. 13). Strukturně souvisí Pc s porfyriny. Jedná se o tetraazoporfyriny, které mají nahrazeny čtyři uhlíky v meso-pozicích atomem dusíku. V β -pozicích každé pyrolové podjednotky mají Pc kondenzován benzenový kruh, který zesiluje jejich absorpci při vyšších vlnových délkách (670–780 nm). Toto zesílení umožňuje efektivnější průnik světla nádory, proto Pc představují slibné zástupce PS druhé generace (Josefsen a Boyle 2012, Zimčík a Miletin 2009).



Obr. 13 Struktura ftalocyaninů ($M = \text{např. Al, Zn, Si}$)

Je obecně známo, že Pc mají tendenci vysoce agregovat a vytvářet dimerní a oligomerní formy v důsledku rozsáhlého systému π -vazeb. Agregace ovlivňuje vlastnosti Pc, zejména fotofyzikální, spektroskopické a elektrochemické. Výhodou těchto makrocyclických sloučenin je dlouhá životnost jejich tripletového excitovaného stavu, jejímž výsledkem je vysoce účinná produkce $^1\text{O}_2$ (Moreira et al. 2008).

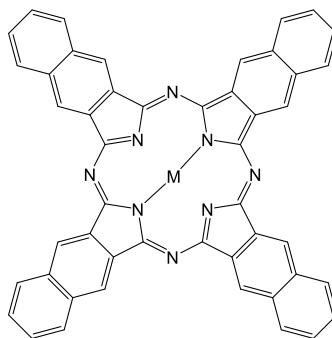
Životnost excitovaných stavů Pc může být ovlivněna jejich agregací, kdy dochází k nižší produkci singletového kyslíku a fluorescence. Agregace může být potlačena modifikací struktury Pc, například lze do periferní struktury makrocycly zavést objemnější a/nebo nabitě substituenty (Zimčik a Miletin 2009).

Protože se jedná o vysoce hydrofobní sloučeniny, bývají připravovány ve formě liposomů. Léčba je zpravidla zahájena hodinu po aplikaci PS. Z organismu jsou Pc obecně eliminovány během 24 hodin, což snižuje riziko kožní fotosenzitivity (Allison a Sibata 2010).

Zástupci skupiny Pc jsou hlinitý ftalocyanin tetrasulfonát (AlPcS4, Photosens[®]) a křemičitý ftalocyanin (Pc4). AlPcS4 vykazuje absorpční maximum při 676 nm. Sulfonací je zvýšena jeho rozpustnost ve vodě a snížena agregabilita. V Rusku je tento typ PS schválen a používán pro léčbu nádorů žaludku, kůže, dutiny ústní, jazyka, rtů a prsu. Tento typ Pc ale působí fotosenzitivitu s dobou trvání 4–6 týdnů (Zimčik a Miletin 2009). Pc4 absorbuje maximálně při 675 nm. Tento Pc dokončil I. fázi klinického hodnocení pro léčbu kožních nádorů, aktinické keratózy, Bowenovy nemoci a mycosis fungoides (Ormond a Freeman 2013). Také byl hodnocen pro sterilizaci krevních komponent (Josefsen a Boyle 2012).

3.5.5.8 NAFTALOCYANINY

Naftalocyaniny (NPc) představují Pc deriváty – rozšířené o další benzenové jednotky (Obr. 14). Ve srovnání s Pc absorbují NPc při delších vlnových délkách (740–780 nm), při nichž je dosaženo hlubšího průniku tkáněmi. Díky této absorpční oblasti jsou NPc slibnými PS pro PDT vysoce pigmentovaných melanomů, které vykazují problémy při přenosu světla (Josefsen a Boyle 2012).



Obr. 14 Struktura naftalocyaninů ($M =$ např. Al, Zn, Si)

Stabilita NPc je nižší než u Pc, protože se v přítomnosti světla a kyslíku snadno rozkládají (Josefsen a Boyle 2012). Dalšími nevýhodami jsou vyšší tendence k agregaci molekul a horší rozpustnost ve srovnání s Pc. Mohou mít horší schopnost průchodu biologickými membránami pro svoji relativně velkou molekulu (Zimčík a Miletin 2009).

3.5.6 Třetí generace fotosenzitizérů

U PS první a druhé generace, omezeně rozpustných ve vodných roztocích (zejména při fyziologickém pH), nastává problém s přímou intravenózní aplikací PS do krevního řečiště. Proto je zcela žádoucí pro zvýšení selektivity a specifity vyvíjet systémy přenašečů, které zajistí přenos PS do cílové tkáně a zvýší tím vychytávání samotného PS cílovou tkání (Josefsen a Boyle 2012).

Základním mechanismem této skupiny fotosenzitizérů je tedy jejich konjugace s různými přenašeči (Yoon et al. 2013). Velké množství biologicky aktivních molekul bylo konjugováno s PS. Jak bylo uvedeno na začátku kapitoly, těmito přenašeči mohou být monoklonální protilátky, cholesterol, proteiny, sacharidy, liposomy, které umožňují

zacílení na oblast nádorové tkáně díky afinitě k nádorům nebo specificky exprimovaným receptorům v těchto tkáních (Agostinis et al. 2011, Yoon et al. 2013). Přenašečovými systémy mohou být také nanočástice nebo polymery (Yoon et al. 2013). Nanočástice byly vyvinuty jako alternativní přenašečové systémy k liposomálnímu přenosu PS, který je spojován s několika nedostatky. Například pouze malá frakce PS může být efektivně inkorporována do liposomů. Také životnost liposomů je ve srovnání s nanočásticemi kratší (Josefsen a Boyle 2012).

Většina aktivních sloučenin se preferenčně váže například na lipoproteiny o nízké hustotě (LDL), jejichž receptory se ve zvýšené míře vyskytují právě v nádorových tkáních. Tím je umožněna zvýšená afinita k cílové nádorové tkáni (Agostinis et al. 2011). LDL částice jsou také vhodným kandidátem přenašečů, protože po ozáření jsou vysoce oxidovány. Vznikající reaktivní formy jsou cytotoxické pro endoteliální buňky, čímž je zvyšován fotodynamický efekt terapie (Josefsen a Boyle 2012).

Nekonjugované PS typicky dosahují poměru afinity k nádorové tkáni oproti té normální pouze 2:1 až 5:1. Pro PDT je zásadní tento poměr zlepšovat, protože je pak umožněno snížení dávky PS nezbytné pro léčebný efekt (Josefsen a Boyle 2012).

3.6 BIOLOGICKÉ ÚČINKY FOTODYNAMICKÉ TERAPIE

Bylo zjištěno, že biologický účinek PDT je reprezentován třemi hlavními vzájemně propojenými mechanismy, účastnícími se smršťování a destrukce nádorové tkáně. Jedná se o přímý letální účinek ROS (hlavně $^1\text{O}_2$) na nádorové buňky, poškození cévního zásobení nádorové tkáně, kde následně dochází ke snížení dodávky kyslíku a živin. Třetím mechanismem PDT je zprostředkovaná aktivace imunitního systému proti nádorovým buňkám. Kombinace všech těchto mechanismů je nezbytná pro optimální dlouhodobou terapii nádorů (Castano et al. 2005a).

3.6.1 Přímý účinek PDT

Vychytávání PS cílovými buňkami je rozhodujícím faktorem efektivní PDT (Castano et al. 2004). $^1\text{O}_2$ a jiné ROS mají krátkou životnost, čímž je omezena i jejich migrace v buňce, proto je subcelulární lokalizace PS klíčovým faktorem PDT. Ovlivňuje, které buňky budou po ozáření preferenčně usmrceny následkem poškození těchto buněčných struktur (Benov 2015, Zimčík a Miletin 2009). K hlavním strukturám, ve kterých se PS subcelulárně lokalizují, patří mitochondrie a lysozomy. Dále se PS mohou lokalizovat v plazmatických membránách, Golgiho aparátu, endoplazmatickém retikulu a jádře (Josefsen a Boyle 2012, Zimčík a Miletin 2009).

Většinou je ale velmi těžké, někdy až nemožné, definovat jedinou organelu zodpovědnou za smrt buňky, protože v průběhu inkubace nebo po ozáření může docházet ke změně lokalizace PS. Například k lokalizaci PS v cytoplazmatické membráně dochází pouze v prvních minutách inkubace, proto není častým cílem PS. Jednotlivé PS se mohou také lokalizovat i ve více organelách. Celkově tak dochází ke zvýšení počtu intracelulárních cílů PS. Difuze PS v cytoplazmě naznačuje, že PS nevykazuje preferenční lokalizaci (Zimčík a Miletin 2009).

Vychytávání PS a jeho subcelulární lokalizace je ovlivněna třemi hlavními parametry – nábojem, lipofilitou a prostorovou strukturou molekuly PS. Vliv na subcelulární lokalizaci má chemická povaha sloučeniny, proto ji může ovlivňovat také molekulová hmotnost, vazba na proteiny, koncentrace daného PS nebo délka inkubačního času (Castano et al. 2004).

Bylo zjištěno, že negativní náboj je nežádoucí pro transport přes membrány (Benov 2015). Obecně lze říct, že více hydrofobní PS se dvěma nebo méně negativními náboji prostupují membránami snadněji, proto dochází k vyššímu vychytávání buňkami. Ty PS, které mají více než dva negativní náboje a jsou méně hydrofobní, představují více polární molekuly, které membránami procházet nemohou, proto jsou vychytávány pomocí endocytózy a následně lokalizovány v lysozomech (Castano et al. 2004, Zimčík a Miletin 2009). PS s kationickým charakterem jsou naopak lokalizovány spíše v mitochondriích (Macdonald a Dougherty 2001, Castano et al. 2004). Délka postranního řetězce také ovlivňuje vychytávání PS nádorovými buňkami, kdy při zvyšování délky řetězce od 1 do 8 uhlíků se zvyšuje i vychytávání PS. Faktorem

ovlivňujícím hloubku průniku PS membránami a sílu hydrofobních a hydrofilních interakcí je také prostorová struktura molekuly PS (Benov 2015).

Přesto, že lysozomálně lokalizované PS vedou k buněčné smrti po ozáření, kdy dojde k porušení jejich membrány a trávení buňky pomocí hydrolytických enzymů z lysozomů, relativní účinnost takto lokalizovaných PS je nižší než u těch, které se lokalizují v mitochondriích a jiných organelách. Důvodem může být tendence k lokalizaci více agregujících PS v lysozomech či inaktivace hydrolytických enzymů cytosolickými inhibitory nebo PDT léčbou (Benov 2015, Castano et al. 2004).

Přesná subcelulární lokalizace PS je klíčovým faktorem i pro typ buněčné smrti indukovaný fotodynamickým zásahem (Josefsen a Boyle 2012). Obecně je přijímáno, že lokalizace PS v mitochondriích a jejich následné poškození pomocí PDT vede k apoptóze buněk, protože mitochondrie jsou nejdůležitějšími spouštěči apoptózy. Také dochází ke vzniku energetické nerovnováhy, protože je porušena funkce tvorby adenosin trifosfátu (ATP) v buňkách (Zimčik a Miletin 2009).

3.6.2 Účinek na cévní zásobení nádoru

Nádorová tkáň pro svůj růst vyžaduje adekvátní dodávku krve, která mu přináší kyslík a výživu. Poškozením vaskularizace nádorů lze efektivně ovlivnit další růst nádoru a přispět tak k léčbě (Zimčik a Miletin 2009). Kolaps cévního zásobení nádorů vede k hypoxii a nedostatku výživy. Jednotlivé PS mohou působit různými mechanismy. Například Photofrin® způsobuje konstriktci cév s jejich následným prosakováním, adhezi leukocytů a tvorbu trombu. Naopak ftalocyaniny způsobují primárně pouze prosakování cév (Castano et al. 2005a). Obecně lze říci, že pro časný efekt na cévy je charakteristická konstrikce cév. Dlouhodobý uzávěr cév je spíše charakterizován tvorbou trombu (Zimčik a Miletin 2009).

Afinita k endoteliálním buňkám nádorů může být zajištěna pomocí přenašečových molekul, jako je albumin nebo LDL, protože pro tyto molekuly existuje v endotelu velké množství receptorů. Jedná se tak o doplňující faktor vychytávání PS nádorovou tkání (Huang et al. 2008).

Rozhodujícím parametrem pro optimalizaci účinku PDT na cévy je interval mezi aplikací PS a ozářením (Castano et al. 2005a). Nevyšší účinnosti je dosahováno

ozařováním a aktivací PS krátce po jeho aplikaci, kdy se PS vyskytuje v cévách a ještě nedochází k přechodu do nádorové tkáně (Zimčík a Miletin 2009). Tento přístup PDT je označován jako VTP. Je charakteristická ozařováním typicky 0–30 minut po aplikaci PS (Huang et al. 2008). PS používané pro VTP, nemají vysokou selektivitu k nádorové tkáni a jsou rychle eliminovány z těla. Mohou tak přinášet benefity působením primárně na vaskularizaci nádorů, zajišťující účinnou léčbu (Huang et al. 2008, Zimčík a Miletin 2009). Primárně může být VTP používána k léčbě novotvořené vaskularizace například u AMD. Zástupci bakteriochlorinů, padoporfin a padeliporfin, jsou klinicky hodnoceny v léčbě nádorů prostaty právě pro zaměření na cévní zásobení nádorů (Huang et al. 2008).

3.6.3 Imunitní odpověď

Imunitní odpověď vyvolaná PDT sice nepředstavuje primární cestu vedoucí ke smrti nádorových buněk, nepochybně ale přispívá v terapii z dlouhodobého hlediska kontroly nádorů (Zimčík a Miletin 2009). Za hlavní úkol akutní imunitní odpovědi vyvolanou PDT, kdy dochází k narušení homeostázy, je považováno odstranění poškozených buněk a podpora hojení s obnovou normálních funkcí tkáně (Agostinis et al. 2011).

Dnes jsou známy dva aspekty efektu PDT na imunitní odpověď vůči nádorům. Jedná se o protinádorovou aktivitu zánětlivých buněk vyvolanou PDT a vytvoření dlouhodobé protinádorové odpovědi imunitního systému. Fototoxická reakce PDT nemusí být smrtelná pro všechny nádorové buňky, tyto buňky pak představují imunitní stimul pro tvorbu zánětu (Castano et al. 2005a). Následkem PDT indukovaného oxidačního stresu dochází k vyvolání silné akutní zánětlivé reakce, která se projevuje otokem v oblasti, která je léčena (Agostinis et al. 2011). Aktivace akutní imunitní reakce zahrnuje produkci cytokinů, zánětlivých a chemotaktických molekul. Produkce těchto látek v nádorové tkáni po PDT iniciuje masivní, avšak regulovanou invazi neutrofilů, mastocytů, monocytů a makrofágů do léčené oblasti. Nejvíce znatelný je rychlý vzestup neutrofilů, které mají pravděpodobně velký vliv na destrukci nádorů v souvislosti s PDT (Castano et al. 2005a, Zimčík a Miletin 2009). Děje se tak skrze sekreci jejich lyzozomálních enzymů a ROS, které ničí endoteliální a nádorové buňky. Když neutrofilové odumírají, jejich buněčný obsah působí chemotakticky na další

molekuly (Macdonald a Dougherty 2001). V průběhu imunitní reakce dochází také ke změnám propustnosti cévního zásobení nádorů, kdy se cévy stávají propustnější pro prozánětlivé proteiny a proadhezivní pro buňky imunitního systému (Agostinis et al. 2011).

Všechny zmíněné buňky přirozené imunity mají za úkol neutralizovat zdroje DAMPs (molekulární znaky spojené s poškozením buněk) a CDAMPs (molekulární znaky spojené s buněčnou smrtí), které jsou generovány nádorovými buňkami, pomocí eliminace pozůstatků tkáně fagocytózou poškozených a mrtvých buněk. Fagocytující buňky následně migrují do lymfatických uzlin, kde se diferencují na antigen prezentující buňky. Prezentací antigenů v lymfatických uzlinách dochází ke zvýšení počtu klonů lymfocytů, které následně eliminují zbytkové nádorové buňky (Agostinis et al. 2011).

PDT aktivuje také komplement, který představuje další efektorový systém vrozené imunity. Aktivací komplementové kaskády a vytvořením membranolýtického komplexu (MAC) v buňkách cévního endotelu dochází k přispění kolapsu cévního zásobení nádoru (Nowis et al. 2005).

3.7 BUNĚČNÁ SMRT A FOTODYNAMICKÁ TERAPIE

Přesto, že PDT vyvolává mnoho signalizačních pochodů, jejím hlavním úkolem je primárně usmrcování nádorových buněk (Castano et al. 2005b). Obecně vyvolává tři základní typy buněčné smrti – apoptózu, nekrózu a s autofagií spojenou smrt buňky (Agostinis et al. 2011, Buytaert et al. 2007, Mroz et al. 2011). Všechny představují klíčové mechanismy podílející se na zajišťování normálního vývoje, tkáňové homeostázy a hlavně na odstraňování abnormálních a poškozených buněk v organismu (Buytaert et al. 2007)

Typ buněčné smrti po PDT může být ovlivňován různými faktory. Mezi nejdůležitější patří fyzikálně-chemické vlastnosti PS, jeho subcelulární lokalizace a lokální koncentrace, koncentrace kyslíku, vlnová délka a intenzita světla použitého pro ozařování (Benov 2015, Castano et al. 2005b). Metabolický stav buňky a fáze

buněčného cyklu lze popsat jako vnitřní faktory, které také mohou ovlivňovat citlivost buněk na PDT (Plaetzer et al. 2003).

Za hlavní typ buněčné smrti způsobovaný PDT je považována apoptóza (Agostinis et al. 2011). Obecně k apoptóze dochází u PS lokalizovaných v mitochondriích nebo endoplazmatickém retikulu. PS, které se lokalizují v spíše v plazmatických membránách nebo lysozomech, mohou opožďovat nebo blokovat apoptózu, čímž dochází k nekrotické smrti buňky. Proces autofagie, indukovaný PDT, může být cestou pokusu buňky o zajištění opravy a přežití poškozených klíčových organel. Pokud ale tato signalizace selže, dochází ke smrti buňky (Buytaert et al. 2007). Bylo zjištěno, že autofagii iniciují PS, lokalizující se v lysozomech, endoplazmatickém retikulu, mitochondriích a endozomech (Mroz et al. 2011).

3.7.1 Apoptóza

Apoptóza představuje komplexní vícekrokový systém programované buněčné smrti, kterou má každá buňka v organismu v sobě geneticky zakódovanou (Mroz et al. 2011). Jedná se bezpochyby o nejlépe prostudovaný typ buněčné smrti (Buytaert et al. 2007). Nežádoucí a potenciálně škodlivé buňky jsou pomocí apoptózy odstraňovány z organismu (Moreira et al. 2008).

Celý proces je regulován vnitřními a vnějšími faktory, kdy v jeho průběhu dochází k charakteristickým morfologickým, biochemickým a energetickým změnám v buňce (Plaetzer et al. 2003). Celý proces vyžaduje pro svůj průběh energii ve formě ATP (Buytaert et al. 2007). Představuje tak, ve srovnání s nekrózou, aktivní proces, který využívá ATP nebo jeho ekvivalentů k tvorbě apoptozomů, přenosu proapoptotických proteinů do jádra, kondenzaci chromatinu, tvorbě apoptotických tělísek a dalších morfologických změn.

Morfologicky je pro apoptózu charakteristická kondenzace chromatinu, štěpení chromozomální DNA na fragmenty, smršťování buňky, blebbing membrány (tvorba záhybů), degradace proteinů, tvorba apoptotických tělísek bez poškození membrány a expozice fosfatidylserinu na vnější stranu cytoplazmatické membrány (Buytaert et al. 2007, Moreira et al. 2008). Vytvořená apoptotická tělíška jsou rozpoznávána a následně pohlcována fagocytujícími buňkami (Plaetzer et al. 2003). Apoptóza tak obchází

rozvinutí zánětlivé reakce v organismu, jelikož je omezen únik intracelulárního obsahu z buňky do okolí. Ten je spojován s nekrotickou buněčnou smrtí (Moreira et al. 2008).

V procesu apoptózy hraje důležitou roli rodina Bcl-2 proteinů, jež má jak antiapoptotické (např. BclXL, Bcl-w), tak proapoptotické zástupce (např. Bax, Bid). Antiapoptotická skupina má za úkol apoptózu vyvolanou za některých cytotoxických podmínek inhibovat. V průběhu PDT ale dochází k jejich poškození a aktivaci proapoptotických proteinů (Mroz et al. 2011). Tomuto předpokladu nahrává studie (Kessel a Castelli 2001), která zjišťovala, zda rodina Bcl-2 proteinů je potenciálním cílem PDT. Byly použity PS, které se primárně lokalizují v mitochondriích. Bylo zjištěno selektivní poškození antiapoptotických proteinů Bcl-2, zatímco proapoptotická skupina proteinů zůstala nepoškozena.

Mnoho vnitřních a vnějších stimulů pro buněčnou smrt aktivuje rozdílné, ale často překrývající se signální kaskády, které zapříčiní zvýšenou propustnost mitochondriální membrány (Buytaert et al. 2007). Otevíráním pórů ve vnitřní a vnější mitochondriální membráně například vlivem působení ROS dochází k uvolňování proteinů z intramembranózního prostoru mitochondrie do cytoplazmy (Plaetzer et al. 2003). Fotodynamické poškození proteinů Bcl-2 je také signálem pro permeabilizaci mitochondriální membrány, uvolňování cytochromu c a dalších molekul, jako je apoptózu-indukující faktor (AIF) (Agostinis et al. 2011).

Hydrofilní PS, lokalizované v lysozomech a endoplazmatickém retikulu, mohou také během PDT indukovat proces apoptózy. Ruptura lysozomální membrány vede k následnému uvolňování kathepsinů z poškozených lysozomů, které v cytosolu mohou přímo aktivovat kaspázovou kaskádu nebo štěpit Bid protein, jenž přispívá k otevírání pórů mitochondriální membrány. Poškozením endoplazmatického retikula vlivem PDT dochází k masivnímu uvolňování vápenatých iontů do cytoplazmy, které způsobují otevírání mitochondriálních pórů (Agostinis et al. 2011, Plaetzer et al. 2003).

PDT indukuje uvolňování cytokinů z rodiny TNF. Bylo zjištěno, že tyto cytokiny stimulují produkci a translokaci lysozomálních proteáz do cytosolu, které mohou zajistit uvolňování cytochromu c, a tak aktivovat vnitřní cestu apoptózy (Moreira et al. 2008).

Proces apoptózy může být iniciován dvěma cestami. Prostřednictvím vnější cesty dochází k aktivaci receptorů smrti na povrchu buňky, vnitřní cesta apoptózy je spuštěna uvolněním cytochromu c mitochondriemi. Oba procesy vedou k aktivaci kaskády efektorových kaspáz (kaspáza 3, 6 a 7), štěpící buněčné substráty, jejichž štěpení vede k charakteristickým morfologickým a biochemickým změnám (Mroz et al. 2011).

3.7.1.1 VNITŘNÍ CESTA AKTIVACE APOPTOTICKÉ SMRTI

Esenciální roli hraje uvolňování cytochromu c z mitochondrie do cytosolu, zprostředkované proapoptotickou skupinou Bcl-2 proteinů (Mroz et al. 2011). Na cytochrom c se v cytosolu naváže protein Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor 1) a prokaspáza 9 a za přítomnosti energie ve formě ATP nebo dATP se vytvoří heptamerický komplex nazývaný apoptozom (Mroz et al. 2011, Plaetzer et al. 2003). Tento komplex má za úkol aktivovat kaskádu kaspáz, smrtících hydrolytických enzymů účastnících se apoptózy (Moreira et al. 2008). Aktivovaná kaspáza 9 štěpí efektorové kaspázy 3, 6 a 7 a následně dochází k biochemickým a morfologickým změnám buňky (Mroz et al. 2011). Tyto změny byly popsány v obecné podkapitole o apoptóze.

3.7.1.2 VNĚJŠÍ CESTA AKTIVACE APOPTOTICKÉ SMRTI

Vnější cesta apoptózy je zprostředkována navázáním ligandů z rodiny TNF (tumor nekrotizující faktor) na příslušné receptory na povrchu buňky, které se nazývají receptory smrti (Buytaert et al. 2007). Tyto receptory fungují jako transmembránové přenašeče signálu (Mroz et al. 2011). Po navázání ligandů (TNF α , FasL) dochází k tvorbě DISC komplexu, který přeměňuje prokaspázy 8 a 10 na jejich aktivní formy, které následně štěpí efektorové kaspázy 3 a 7, jež iniciují sled stejných buněčných změn jako u vnitřní cesty aktivace apoptózy (Buytaert et al. 2007).

3.7.2 Nekróza

Nekróza představuje prudkou formu buněčné smrti ovlivňující velké množství buněčných populací najednou (Mroz et al. 2011). Jedná se o pasivní a ve většině případů neprogramovaný proces, který probíhá po expozici buňky extrémním faktorům – fyzikálním (vysoká teplota či tlak, pH, osmolarita) nebo chemickým (toxické látky)

(Plaetzer et al. 2003). Vzniká na podkladě energetické nerovnováhy, vznikající z nedostatku energie ve formě ATP, která je neslučitelná s přežitím buňky (Buytaert et al. 2007).

Nekróza představuje nevratný proces, který je charakteristický otokem buněk a buněčných organel, který vede k jejich poškození. Dochází k ztrátě integrity buněčné membrány a následné lýze buněk. Intracelulární obsah se vylíje do okolí, kde se následně začne vyvíjet zánět. Dalšími charakteristickými rysy nekrózy jsou pyknotické jádro, hrubá struktura chromatinu a karyolýza (Moreira et al. 2008, Plaetzer et al. 2003).

Obecně se předpokládá, že vysoké koncentrace fotosenzitizéru nebo vysoká dávka světla (vysokodávková PDT) vedou k nekrotické buněčné smrti (Plaetzer et al. 2003). Tomuto předpokladu nahrává studie, která s použitím amfifilního PS – ATX-S10(Na) při vysokodávkové PDT na linii lidských melanomových buněk prokázala 99% cytotoxicitu a nekrotickou smrt většiny buněk, zatímco nižší dávky PDT způsobily apoptózu s cytotoxicitou nižší než 70 % (Nagata et al. 2003).

Vysokodávková PDT může indukovat masivní tvorbu ROS, které zapříčiní energetický kolaps buňky drastickým snížením koncentrace ATP a inhibicí metabolismu buňky (Buytaert et al. 2007). Dalším faktorem propagace nekrózy může být fotochemická inaktivace enzymů a dalších součástí apoptotické cesty buněčné smrti pomocí vysokých dávek PS nebo světla (Mroz et al. 2011).

3.7.3 Autofagie

Autofagie představuje buněčný katabolický proces, při kterém dochází k recyklaci komponent cytoplazmy (Buytaert et al. 2007). Autofagie tak pomáhá udržovat rovnováhu mezi syntézou, degradací a recyklací buněčných produktů (Mroz et al. 2011).

Jedná se o proces vlastního natrávení buňky a degradace buněčných organel, probíhající při absenci kaspázové signalizace nebo za podmínek, kdy je kaspázová signalizace inhibována (Buytaert et al. 2007). Iniciačním krokem je tvorba dvojmembránové struktury – autofagozomu, který obklopí cílovou strukturu v buňce a vytváří váček, který odděluje svůj obsah od zbytku cytoplazmy. Váček je posléze transportován do lysozomu, kde dochází k jeho fúzi za vzniku autofagolysozomu (Mroz

et al. 2011). Obsah váčku je degradován pomocí lysozomálních hydroláz (Buytaert et al. 2007). Kromě odstraňování nežádoucích proteinů, organel či mikroorganismů, autofagie také umožňuje, za podmínek stresu či hladovění, přesun živin v buňce z procesů, kde je lze postrádat, do procesů nezbytných pro život (Mroz et al. 2011).

Zatím není zcela objasněno, jak přesně je výsledek PDT ovlivněn autofagií. Stimulů pro iniciaci autofagie může být mnoho, včetně oxidačního stresu buňky (Agostinis et al. 2011). Autofagie může probíhat jako proces ochranný nebo indukující buněčnou smrt. Závisí to pravděpodobně na typu ROS a rozsahu oxidativního poškození (Mroz et al. 2011). K iniciaci autofagie může přispět poškození Bcl-2 proteinů účastnících se apoptózy, protože pro-autofagický protein Beclin 1 je na tyto proteiny vázán. Poškozením Bcl-2 proteinů tak dochází k jeho odštěpení a následně k autofagii (Reiners et al. 2010). Fotochemické poškození lysozomů zase může vést k nemožnosti dokončení autofagického procesu a ke smrti buňky (Agostinis et al. 2011).

4 CÍLE PRÁCE

- stanovení fototoxicity tetrapyridoporphyrinových PS (ZIP252ZnEt⁺, ZIP300ZnMe⁺, ZIP184Zn, ZIP252ZnHCl, ZIP184ZnHCl, ZIP249Zn) na nádorové buněčné linii HeLa
- zjištění vlastní toxicity studovaných látek bez přítomnosti světla (tzv. dark toxicita)
- stanovení časového profilu prostupu vybraných PS do buněk
- stanovení subcelulární lokalizace PS
- fotografická dokumentace morfologických změn HeLa buněk po aktivaci PS
- stanovení typu buněčné smrti po aktivaci studovaných látek pomocí průtokové cytometrie

5 METODICKÁ ČÁST

5.1 MANIPULAČNÍ VYBAVENÍ PRO PRÁCI S BUNĚČNOU LINIÍ

- sterilní plastové serologické pipety různého objemu (TPP, Švýcarsko)
- pipetovací nástavce SwiftPet+ (HTL, Polsko) a Biohit Midi Plus (Biohit, Finsko)
- sterilní Pasteurovy pipety (Brand, Německo)
- automatické pipety různého rozsahu (Eppendorf, Německo)
- 8-kanálová elektronická pipeta e-PET BioHit 50-1200 μ l (BioHit, Finsko)
- sterilní plastové špičky různých rozsahů (Eppendorf, Německo)
- plastové sterilní inkubační nádoby T75 (TPP, Švýcarsko)
- 96-jamkové mikrotitrační destičky s plochým dnem (TPP, Švýcarsko)
- sterilní mikroskopická sklíčka s kultivačním nástavcem vhodná pro konfokální mikroskopii (tloušťka sklíčka 170 μ m) Eppendorf Cell Imaging Slides (Eppendorf, Německo)
- sterilní mikroskopická sklíčka s kultivačním nástavcem (tloušťka sklíčka 1 mm) Lab-Tek™ II Chamber Slide™ System (Eppendorf, Německo)
- sterilní plastové Petriho misky o ploše dna 22,1 cm² (TPP, Švýcarsko)
- sterilní Petriho misky vhodné pro konfokální mikroskopii (tloušťka sklíčka 140 μ m) (WillCo Wells, Nizozemí)
- plastové sterilní centrifugační zkumavky o objemu 15 ml a 50 ml (TPP, Švýcarsko)
- sterilní mikrozukavky 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml a 5 ml (Eppendorf, Německo)
- sterilní laboratorní sklo (Thermo Fisher Scientific, Česká Republika)
- sterilní plastové vaničky
- podložní a krycí sklíčka (Thermo Fisher Scientific, Česká Republika)
- Bürkerova komůrka (Brand, Německo)
- sterilní škrabky na buňky (Sigma, Německo)

5.2 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ PRO MANIPULACI A STERILNÍ PRÁCI S BUNĚČNOU LINÍÍ

- buněčné inkubátory s termostatem a regulací koncentrace CO₂ Sanyo a Esco
- box s laminárním prouděním BioAir TopSafe 1.2 (EuroClone, Itálie)
- vodní lázně (Mettler, Německo)
- desková třepačka Heidolph Titramax 100 (Heidolph Instruments, Německo)
- centrifuga Hermle Z 300
- čtečka mikrotitračních destiček Tecan Infinite M200 (Tecan Group Ltd., Švýcarsko)
- 450 W Xenonová lampa Newport s 9 cm vodním a long-pass filtrem Newport OG570 (Newport Corporation, USA)
- invertovaný fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Japonsko)
- invertovaný fluorescenční mikroskop Nikon Ti E (Nikon, Japonsko)
- průtokový cytometr Accuri C6 (BD Bioscience, USA)
- luminiscenční spektrometr AMINCO Bowman Series 2

5.3 POUŽITÉ REAGENCIE A CHEMIKÁLIE

- fetální bovinní sérum (inaktivované teplem; FBS, 10%, Lonza, Belgie)
- kultivační médium DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; Lonza, Belgie)
- pufr HEPES (1M, Sigma, Německo)
- fosfátový pufr – tablety (PBS, Sigma, Německo nebo MP Biomedicals, USA)
- roztok penicilin/streptomycin (P/S, 100x koncentrovaný, Lonza, Belgie)
- roztok L-glutaminu (Lonza, Belgie)
- trypsin/EDTA (T/E, 10x koncentrovaný, Lonza, Belgie)
- roztok peroxidu vodíku (H₂O₂, 3%, Fluka, Sigma, Německo)
- trypanová modř (TB, 0,4%, Sigma, Německo)
- roztok neurální červeně (NR, 3,3 mg/ml, Sigma, Německo)
- fixační roztok pro NR (1% roztok CaCl₂ v 0,5% formaldehydu)
- lyzační roztok pro NR (1% roztok ledové kyseliny octové v 50% etanolu)

- dimetylsulfoxid (DMSO)
- fotosenzitizér ZIP252ZnEt (v SCM, vědecká skupina doc. Zimčíka, FaF UK)
- fotosenzitizér ZIP300ZnMe (v SCM, vědecká skupina doc. Zimčíka, FaF UK)
- fotosenzitizér ZIP184Zn (v SCM, vědecká skupina doc. Zimčíka, FaF UK)
- fotosenzitizér ZIP252ZnHCl (v DMSO, vědecká skupina doc. Zimčíka, FaF UK)
- fotosenzitizér ZIP184ZnHCl (v DMSO, vědecká skupina doc. Zimčíka, FaF UK)
- fotosenzitizér ZIP249Zn (v DMSO, vědecká skupina doc. Zimčíka, FaF UK)
- fluorescenční sonda MitoTracker Green FM
- fluorescenční sonda LysoTracker Blue DND-22
- fluorescenční sonda Hoechst 33342
- fluorescenční sonda CellMask Green Plasma membrane Stain
- fluorescenční sonda MitoTracker Red CMXRos
- Alexa Fluor 488 konjugát phalloidinu
- ADS pufr
- chlorid vápenatý
- Annexin-V-FITC (1%)
- fluorescenční sonda Propidium iodid (PI)
- dimetylformamid (DMF)
- reagenty pro měření bílkoviny (BCA+CuSO₄·5H₂O)

5.4 BUNĚČNÁ LINIE HeLa

Buněčná linie HeLa je odvozena z lidských buněk karcinomu děložního čípku. Jedná se o první kultivovanou lidskou buněčnou linii (linie pochází z roku 1951 z pacientky Henrietty Lackové – odtud název). V biomedicínském výzkumu je buněčná linie HeLa široce používána (Landry et al. 2013).

K jejím výhodám patří rychlý nárůst buněčné hmoty a snadná pasážovatelnost buněk. Za nevýhodu této linie je považována přítomnost HPV-18 provirů v genomu. S tím se pojí potenciální pracovní riziko. HeLa buňky mají normální hladinu

retinoblastomového proteinu (pRB), ale exprese proteinu p53 je nízká. Buněčnou linií HeLa jsme získali z Americké banky buněčných linií (ATCC, USA).

5.4.1 Příprava kultivačního média

Na přípravu kultivačního média obsahujícího sérum (SCM) pro HeLa buněčnou linií bylo použito médium DMEM. To bylo suplementováno fetálním bovinním sérem (10 obj. %), HEPES pufr (1 obj. %), penicilinem/streptomycinem (1 obj. %) a L-glutaminem (2 obj. %). K přípravě základního kultivačního média docházelo sterilně v prostoru laminárního boxu.

5.4.2 Kultivace

Buněčná linie HeLa byla kultivována na sterilních kultivačních lahvích o ploše 75 cm² (T75) v SCM při 37 °C, 5% CO₂ a konstantní humiditě v buněčném inkubátoru. Ke sterilní manipulaci s buněčnou linií docházelo v prostoru laminárního boxu.

5.4.3 Pasážování

Pasážování, neboli subkultivace, je proces cíleného udržování buněk v podmínkách *in vitro* pomocí opakovaného přenosu buněk do čerstvého kultivačního média.

Buňky byly pěstovány v kultivačních lahvích 3–4 dny. Během této doby bylo dosaženo jejich 80–90% konfluence (míra nárůstu na dně kultivační lahve). Aby nedocházelo k nežádoucím změnám vlastností, životaschopnosti a morfologie buněk, byla po již zmíněném intervalu jejich poměrná část přenesena do nové kultivační lahve s čerstvým médiem. Množství přenášených buněk bylo vždy zvoleno dle poměru z předchozí pasáže a aktuálního stavu konfluence, která byla zkontrolována mikroskopicky před samotným pasážováním buněk.

Proces pasážování byl zahájen odebráním starého média. Buňky byly následně dvakrát opláchnuty sterilním predehřátým PBS. Následně byl přidán 1 ml roztoku trypsinu a rozprostřen po celém povrchu lahve. Trypsinizace v uzavřené lahvi probíhala v inkubátoru při 37 °C po dobu maximálně 5 minut. Mikroskopicky bylo zkontrolováno, zda se všechny buňky oddělily ode dna a staly se suspenzními.

Následně byl trypsin inaktivován přidáním 9 ml SCM a buňky byly důkladně resuspendovány opakovaným nasáváním obsahu lahve do pipety a následným vypouštěním proti dnu lahve.

Do nové označené kultivační lahve bylo napipetováno 15 ml čerstvého předeřátého SCM (37 °C). Potřebná část buněčné suspenze ze staré lahve byla přenesena do takto připravené nové kultivační lahve. Suspenze byla promíchána a následně rovnoměrně rozprostřena na dně lahve. Buňky se uchovávaly do další pasáže při standardních podmínkách v inkubátoru. Zbytek buněčné suspenze byl využit při nasazování buněk na experimenty.

Ke všem uvedeným úkonům docházelo sterilně v prostoru laminárního boxu. Všechny roztoky byly před použitím vytemperovány v lázni na 37 °C.

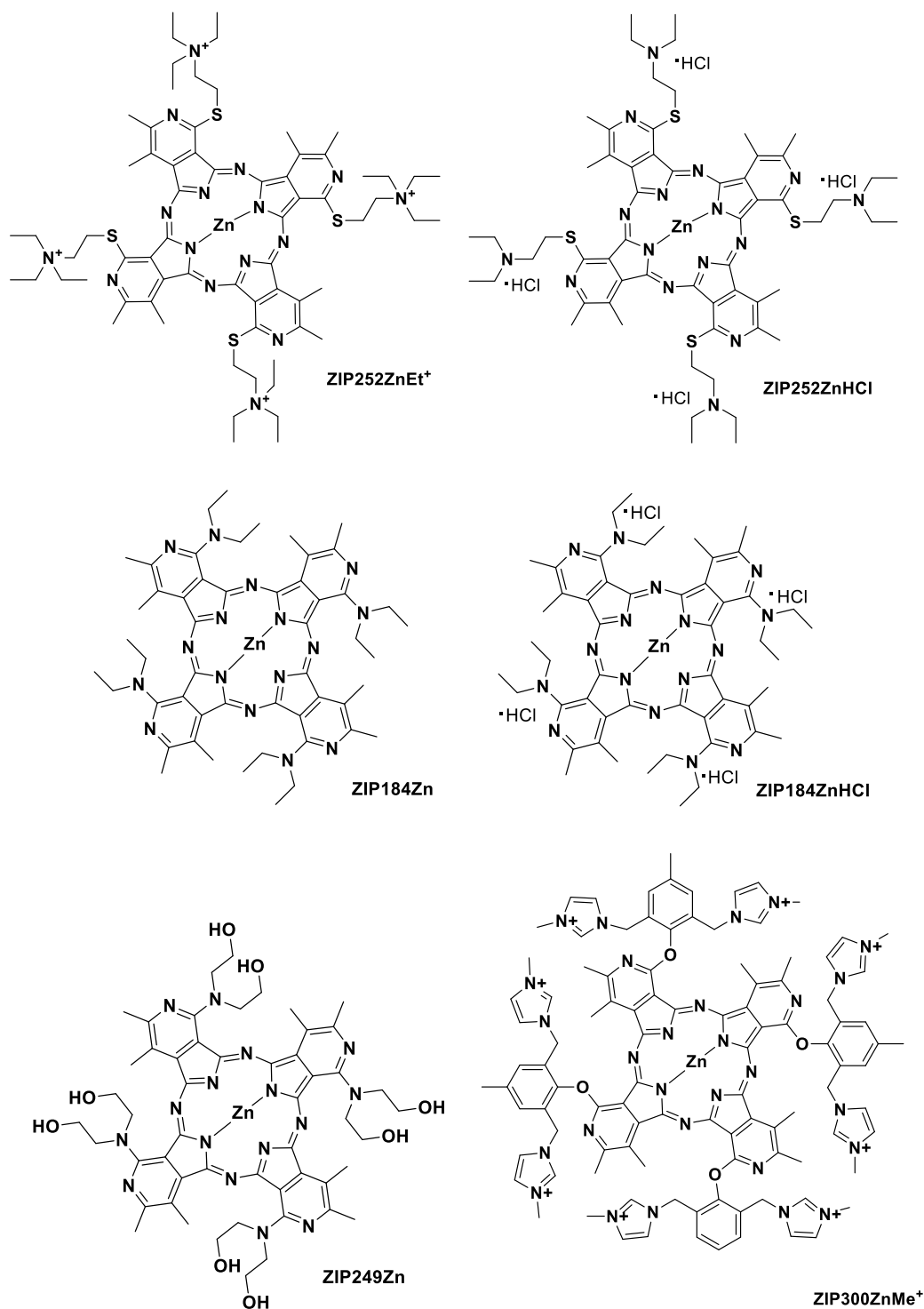
5.4.4 Počítání buněk – stanovení počtu životaschopných buněk

Počet živých buněk byl zjišťován mikroskopicky v Bürkerově komůrce po obarvení trypanovou modří. Jedná se o barvivo zvýrazňující buňky mrtvé (modré), jelikož živé buňky (bezbarvé sférické útvary na světle modrém pozadí) ji ze svého nitra aktivně transportují.

Do mikroskopické komůrky bylo napipetováno 100 µl 0,4% roztoku trypanové modří a poté byl přidán stejný objem řádně promíchané buněčné suspenze. Inkubace probíhala 5 minut při laboratorní teplotě. Obsah mikroskopické komůrky byl promíchán a na každou stranu Bürkerovy komůrky bylo nanášeno 10 µl obarvené suspenze. Výsledný počet živých buněk byl pak přepočítán na počet buněk v 1 ml suspenze.

5.5 ZKOUMANÉ FOTOSENZITIZÉRY

Pro veškeré experimenty byly použity fotosenzitizéry syntetizované vědeckou skupinou doc. Zimčíka na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické Fakulty v Hradci Králové.



Obr. 15 Struktura zkoumaných fotosenzitizérů

Zásobní roztoky zkoumaných fotosenzitizérů:

- fotosenzitizér ZIP184Zn (v DMSO) = 10 mM
- fotosenzitizér ZIP184ZnHCl (v DMSO) = 10 mM
- fotosenzitizér ZIP249Zn (v DMSO) = 10 mM
- fotosenzitizér ZIP252ZnHCl (v DMSO) = 10 mM
- fotosenzitizér ZIP252ZnEt⁺ (v SCM) = 500 μM
- fotosenzitizér ZIP300ZnMe⁺ (v SCM) = 1000 μM

Studované PS představují deriváty tetrapyridoporphyrinů (TPyPz), což jsou aza-analogy Pc (jejich dusíkaté izostery), které mají všechna benzenová jádra nahrazena pyridiny. Jedná se o první TPyPz připravené jako potenciální PS v PDT. Studované látky obsahují substituenty, obsahující různé spojující heteroatomy (O, N, S). Centrálním atomem těchto látek je zinek (Zn). Struktury všech studovaných látek jsou zobrazeny na Obr. 15. ZIP252ZnEt⁺ a ZIP300ZnMe⁺ představují jediné kationické, a tudíž hydrofilní, deriváty TPyPz. Charakteristika jednotlivých látek je uvedena v následující tabulce (Tab. 1).

Tab. 1 Základní charakteristika studovaných látek

fotosenzitizér	rozpuštěcí médium	spojující heteroatom (X)	absorpční maximum (λ_{\max}) [nm]	kvantový výtěžek singlet kyslíku (Φ_A)
ZIP252ZnEt ⁺	SCM	S	722 *	0.72 *
ZIP252ZnHCl	DMSO	S	n/a	n/a
ZIP184ZnHCl	DMSO	N	761 *	n/a
ZIP184Zn	SCM	N	772 *	0.41 *
ZIP249Zn	DMSO	N	767 *	n/a
ZIP300ZnMe ⁺	SCM	O	710 **	0.69 **

Poznámky: SCM – DMEM médium s obsahem séra a dalších suplementů; DMSO – dimetylsulfoxid; n/a – hodnoty nebyly experimentálně stanoveny; * Váchová et al. 2015, ** dosud nepublikované výsledky

5.6 CYTOTOXICITNÍ EXPERIMENTY

Suspenze buněk pro nasazování na experimenty v požadované koncentraci 75 000 buněk/ml byla připravena ve sterilní plastové vaničce smísením rozehřátého SCM s množstvím důkladně promíchané buněčné suspenze.

Vzniklá buněčná suspenze byla důkladně promíchána a následně pipetována elektronickou multikanálovou pipetou do 96-jamkové mikrotitrační destičky po 100 μ l na jamku. Mikrotitrační destička byla následně uložena na 24 hodin do inkubátoru.

Po 24 h byly k buňkám přidány studované látky. U buněk pozitivní kontroly bylo vyměněno médium za čerstvé; buňky negativní kontroly byly usmrceny letální dávkou H_2O_2 (200 μ M). Roztoky zkoumaných látek o finální koncentraci byly sterilně připravovány v mikrozkuřavkách ze zásobních roztoků naředěním předeřtým SCM. Manipulace se zásobními i pracovními roztoky probíhala ve tmě, aby se předešlo nežádoucí fotoaktivaci PS. Další postup se lišil dle požadovaného experimentu, zda byla vyhodnocována toxicita látek bez aktivace světlem (tzv. dark toxicita), nebo toxicita látky po aktivaci světlem (tzv. fototoxicita).

5.6.1 Stanovení fototoxicity

Ke stanovení fototoxicity zkoumaných látek byly zásobní roztoky naředěny na pracovní roztoky o požadované koncentraci:

- ZIP252ZnEt : 0,01–10 μ M
- ZIP300ZnMe: 0,001–1 μ M
- Ostatní: 0,1–50 μ M

K ředění roztoků bylo použito předeřtá SCM o teplotě 37 °C.

Staré médium bylo v jamkách opatrně nahrazeno roztokem o požadované koncentraci. Inkubace s látkou probíhala 12 hodin. Poté následovala sterilní výměna za čerstvé médium, neobsahující studované látky. Ozáření buněk probíhalo červenou částí viditelného spektra 450 W xenonové výbojky osazené vodním a long-pass filtrem ($\lambda > 570$ nm; 12,4 mW cm^{-2} ; 11,2 J cm^{-2}) po dobu 15 minut. Po ozáření byly buňky

uloženy na 24 hodin do inkubátoru a následně byla vyhodnocena jejich životaschopnost pomocí testu vychytávání neutrální červeně (NRU).

5.6.2 Stanovení dark toxicity

Pro hodnocení vlastní toxicity látek bez přítomnosti aktivujícího světla byly použity výrazně vyšší koncentrace zkoumaných látek. Ze zásobních roztoků látek byly naředěny požadované koncentrace (10 μM až 500 μM , resp. 1000 μM). Inkubace s látkami probíhala 24 hodin v inkubátoru bez přítomnosti aktivujícího světla. Po ukončení inkubace byla vyhodnocena životaschopnost buněk pomocí NRU.

5.7 STANOVENÍ ŽIVOTASCHOPNOSTI BUNĚK POMOCÍ TESTU VYCHYTÁVÁNÍ NEUTRÁLNÍ ČERVENĚ

Neutrální červeně (neutral red, NR) je slabě kationové supravítání barvivo, snadno difundující skrz buněčnou membránu. Životaschopné buňky barvivo aktivně vychytávají a koncentrují v lysozomech, kde se NR díky nízkému pH nabije, a není tak schopná prostupovat přes nepoškozené membrány. Z buněk s poškozenými membránami se toto barvivo snadno vymývá. Toto stanovení podává kvantitativní informaci o počtu životaschopných buněk v buněčné kultuře (Repetto et al. 2008).

Po ukončení inkubace s testovanými látkami byl připraven pracovní roztok NR (80 $\mu\text{g/ml}$) naředěním zásobního roztoku NR (3,3 g/l), který byl přidán k buňkám – výsledná koncentrace NR v jamkách tak činila 40 $\mu\text{g/ml}$. Buňky byly s NR inkubovány 3 hodiny při 37 °C a 5% CO_2 v inkubátoru.

Po ukončení inkubace s NR bylo odstraněno veškeré médium a k buňkám bylo přidáno 100 μl fixačního roztoku (1% roztok CaCl_2 v 0,5% formaldehydu). Fixace probíhala 15 minut při laboratorní teplotě. Po ukončení fixace byl fixační roztok odstraněn a buňky dvakrát omyty 100 μl PBS. Nakonec byly buňky lyzovány 200 μl lyzačního roztoku (1% roztok ledové kyseliny octové v 50% etanolu). Lyzace probíhala 30 minut na třepačce při laboratorní teplotě.

Experimenty byly vyhodnocovány spektrofotometricky pomocí multifunkční čtečky mikrotitračních destiček Tecan Infinite M200, kdy byla měřena absorbance při 540 nm. Životaschopnost buněk byla vyjádřena jako procenta pozitivní kontroly.

5.8 ČASOVÝ PROFIL PROSTUPU LÁTEK DO BUNĚK

V experimentech časového profilu vstupu látek do buněk byly HeLa buňky nasazeny v koncentraci 100 000 buněk na sterilní plastovou Petriho misku o průměru 6 cm ve finálním objemu 5 ml SCM.

Pro zjišťování časového profilu prostupu zkoumaných látek do buněk (tzv. uptake) byly k buňkám na Petriho miskách přidány zkoumané látky o výsledné koncentraci 10 μM v časových intervalech 12, 8, 6, 4, 2, 1, 0,5 a 0 hodin před vyhodnocováním experimentu. Po proběhlé inkubaci byly buňky dvakrát opláchnuty 5 ml předehřátého PBS. Další 5 ml předehřátého PBS bylo následně přidáno k buňkám a buňky byly důkladně seškrábány a přeneseny do 15 ml plastových zkumavek. Zbylé buňky byly opláchnuty 5 ml předehřátého PBS a přeneseny do stejné zkumavky. Vzorky byly centrifugovány 3 minuty při $70\times g$. Supernatant byl odstraněn a buňky byly lyzovány.

Lyzace probíhala přidáním 500 μl dimetylformamidu (DMF) ke vzorku obsahujícímu ZIP252ZnEt⁺ a 500 μl MQ-vody ke vzorku obsahujícímu ZIP300ZnMe⁺ a vymražením přes noc v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ráno byly vzorky rychle rozmrazeny v termobloku ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) a na 2 h opět zamrazeny v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. V rozmražených a okyselených vzorcích pak probíhalo fluorescenční stanovení koncentrace látek ve vzorcích. Fotosenzitizér ZIP252ZnEt⁺ byl okyselen trifluoroctovou kyselinou (10 μl 10% roztoku v DMF); fotosenzitizér ZIP300ZnMe⁺ byl okyselen kyselinou chlorovodíkovou (10 μl 10% roztoku v MQ-vodě).

5.9 STANOVENÍ MNOŽSTVÍ BÍLKOVINY VE VZORKU

Množství bílkoviny ve vzorku bylo stanoveno pomocí BCA (Bicinchoninic acid) metody. Koncentrační řada pro kalibrační křivku byla připravena rozpuštěním bovinního sérového albuminu v MQ-vodě v koncentracích 0, 50, 100, 200, 400, 600, 800 a 1000 $\mu\text{g/ml}$. K 10 μl vzorku byl přidán pracovní roztok BCA, který vznikl smícháním 4% $\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a zásobního roztoku BCA v poměru 1:50 *ad hoc*. Inkubace probíhala 30 min při 37 °C. Absorbance byla změřena při 562 nm na čtečce mikrotitračních destiček Tecan Infinite M 200.

5.10 VYHODNOCENÍ DAT

Získané cytotoxicitní výsledky měření byly zpracovány pomocí programu Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA). Tvorba grafů, výpočty EC_{50} a TC_{50} a statistická analýza byla provedená pomocí softwaru GraphPad Prism verze 6.04 (GraphPad Software, USA). Data byla statisticky analyzována jednofaktorovou analýzou rozptylu (one-way ANOVA) s Bonferroniho *post hoc* metodou vícenásobného porovnávání. Výsledky byly porovnány s kontrolou a průměry byly považovány za statisticky významné, jestliže $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ a $***p < 0.001$. Data v grafech jsou uvedena jako průměrné hodnoty se směrodatnou odchylkou. Všechny experimenty byly provedeny minimálně v pěti opakováních ($n \geq 5$).

5.11 FOTOGRAFICKÁ DOKUMENTACE

Pro fotografickou dokumentaci byly HeLa buňky nasazovány na sterilní plastové Petriho misky pro konfokální mikroskopii o průměru 3 cm v koncentraci 30 000 buněk/ml SCM ve finálním objemu 2 ml, popřípadě na sterilní mikroskopická sklíčka s kultivačním nástavcem (4 oddíly) v koncentraci 45 000 buněk/ml SCM ve finálním objemu 0,5 ml.

K pořizování fotografické dokumentace byl použit invertovaný fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse Ti E (Nikon, Japan) s chlazenou sCMOS kamerou Andor Zyla 5.5 (Andor Technology, Spojené Království) a LED fluorescenčním zdrojem (CoolLED pE-300^{white}, CoolLED Ltd., Spojené Království), případně laserovým rastrovacím konfokálním mikroskopickým systémem Nikon A1+.

5.11.1 Subcelulární lokalizace

Pro stanovování subcelulární lokalizace byly buňky nasazeny na Petriho misky vhodné pro konfokální mikroskopii. Po 24 hodinách byl k buňkám přidán vybraný fotosenzitizér o koncentraci 10 μM . Inkubace se studovanými látkami probíhala 12 h v inkubátoru. Následující den, po ukončení inkubace, byly buňky 15 min značeny fluorescenčními sondami 2 μM MitoTracker Green FM a 2 μM LysoTracker Blue DND-22. Poté byly dvakrát důkladně opláchnuty předehřátým ADS pufrům (116 mM NaCl, 5.3 mM KCl, 1.2 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.13 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 mM HEPES) obsahujícím vápník (1 mM CaCl_2). Mikrofotografie byly pořízeny s použitím fluorescenčních filtrů pro DAPI, FITC a Cy5 na fluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse Ti E.

5.11.2 Morfologické změny – konfokální mikroskopie, živé buňky

Nasazení buněk a látek probíhalo stejně jako v předchozí kapitole. Fotosenzitizér ZIP300ZnMe⁺ byl s buňkami inkubován v koncentraci odpovídající hodnotě EC_{85} (8,03 nM). Po 12 hodinách byly buňky opláchnuty a bylo přidáno 2 ml čistého SCM. Poté následovalo 15 minut ozařování. Po 24 h byly buňky fluorescenčně značeny 2 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33342, 0,5 \times koncentrovaným Cell Mask Green Plasma Membrane Stain a 0,5 μM MitoTracker Red CMXRos. Inkubace s fluorescenčními sondami probíhala 10 minut. Buňky byly dvakrát opláchnuty a po přidání předehřátého ADS pufru obsahujícího vápník byly ihned pořízeny mikrofotografie konfokálním laserovým rastrovacím mikroskopem Nikon A1+ s objektivem 40 \times . Vždy bylo nasnímáno 5 konfokálních řezů v celé tloušťce preparátu bez použití konfokálního zoomu.

5.11.3 Morfologické změny – konfokální mikroskopie, fixované buňky

Buňky byly nasazeny na sterilní mikroskopická skříčka s kultivačním nástavcem. Nasazení látek i ozařovací protokol byl stejný jako u předchozího postupu. Po 24 h byly buňky opláchnuty a 30 min inkubovány s 0,5 μ M MitoTracker Red CMXRos s SCM. Následně byla provedena fixace buněk předeřátým 4% paraformaldehydem v dPBS (pH = 7,3) po dobu 15 min. Buňky byly třikrát opláchnuty dPBS (5 min) a byl přidán permeabilizační pufr (0.5% Triton X-100 v dPBS). Po 15 min byly buňky opět třikrát opláchnuty dPBS a 60 min blokovány 3% BSA v dPBS. Po opláchnutí byly buňky 30 min barveny phalloidinem konjugovaným s Alexa Fluor 488 (5 U/ml), opláchnuty a 30 min barveny Hoechst 33342 (1 μ g/ml). Po opláchnutí dPBS byly preparáty 5 min zbavovány iontů v MQ-vodě a poté nechány zcela oschnout. Suché preparáty byly namontovány na podložní skříčko za použití ProLong AntiFade reagentie (ThermoFisher Scientific). Druhý den byly pořízeny mikrofotografie za použití laserového skenovacího konfokálního mikroskopu Nikonu A1+ s objektivem 40 \times . Vždy bylo nasnímáno 7 konfokálních řezů v celé tloušťce preparátu bez použití konfokálního zoomu.

5.12 PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

Buňky v procesu apoptózy vlivem ztráty integrity buněčné membrány vystavují na svůj vnější povrch membránový fosfolipid fosfatidylserin, na který se váže Annexin-V. Konjugace Annexinu-V s fluorochromy umožňuje detekovat buňky procházející buněčnou smrtí. Translokace fosfatidylserinu je spojena i s nekrotickou smrtí. K rozlišení těchto modalit slouží současné značení buněk propidium jodidem (PI), který skrze nepoškozené membrány živých buněk a buněk v časném stádium apoptózy neproniká, na rozdíl od pozdně apoptotických a nekrotických buněk, které jsou pro PI permeabilní. Buňky nepoškozené jsou pomocí průtokové cytometrie detekovány jako Annexin-V i PI negativní, časně apoptotické buňky jako Annexin-V pozitivní, ale pozdně apoptotické a nekrotické buňky jako Annexin-V a PI pozitivní (Hingorani et al. 2011).

HeLa buňky pro průtokovou cytometrii byly nasazeny na Petriho misky o průměru 6 cm v koncentraci 100 000 buněk/miska, finální objem suspenze činil 5 ml. Po 24 h bylo médium vyměněno za čerstvé obsahující ZIP300ZnMe⁺ o koncentracích odpovídající hodnotám EC₁₅ (2,18 nM) a EC₈₅. Inkubace s PS probíhala 12 h, poté byly buňky dvakrát opláchnuty předehřátým PBS a bylo přidáno čerstvé médium. Buňky byly ozařovány za standardních podmínek. Po uplynutí zvolené doby od ozáření (0, 15, 60, 120 a 360 min) byly buňky dvakrát opláchnuty PBS, trypsinovány, resuspendovány v předehřátém SCM a přemístěny do centrifugační zkumavky. Centrifugace probíhala 5 minut při 70× g. Supernatant byl slit, k buněčné peletě byl přidán 1 ml ADS pufru (pH 7,4) obsahujícího 2mM CaCl₂ a buňky byly důkladně resuspendovány. Buněčná suspenze přemístěna do 2 ml mikrozkušavek a 15 min inkubována s Annexin-V-FITC (1 obj. %) v inkubátoru a nepřítomnosti světla. 3 minuty před koncem inkubace byl přidán PI (7,5 μM). Abychom předešli falešné pozitivě PI, byly vzorky po inkubaci umístěny do ledové lázně. Měření probíhalo na průtokovém cytometru C6 Accuri.

6 VÝSLEDKY

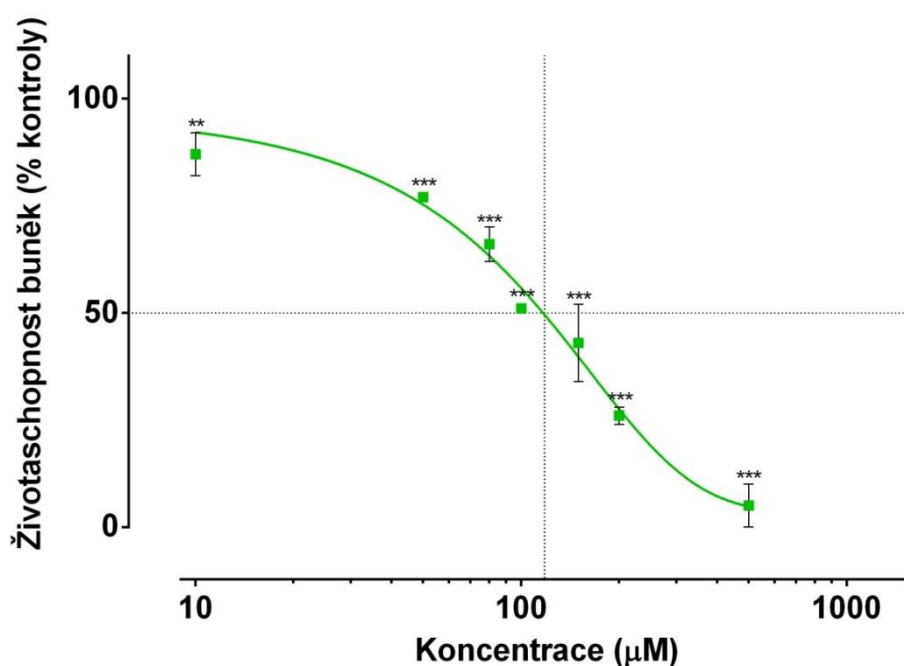
6.1 CYTOTOXICITNÍ EXPERIMENTY

Při hodnocení dat získaných experimenty byla u dark toxicity zjišťována střední toxická koncentrace TC_{50} (koncentrace studované látky, která způsobí i bez aktivace světla snížení životaschopnosti buněk na 50 % oproti kontrole). U fototoxicity byla zjišťována střední efektivní koncentrace EC_{50} (koncentrace studované látky, která způsobí po aktivaci světlem snížení životaschopnosti buněk na 50 % oproti kontrole). Následně byl vypočítán index TC_{50}/EC_{50} , představující poměr mezi toxicitou studované látky bez aktivace světlem a světlem indukovanou toxicitou. Čím je tento index vyšší, tím má studovaná látka lepší vlastnosti, jelikož jsou od sebe více vzdálené toxická a terapeutická (efektivní) koncentrace studované látky.

6.1.1 Tetrapyridoporphyrazin ZIP252ZnEt⁺

6.1.1.1 DARK TOXICITA

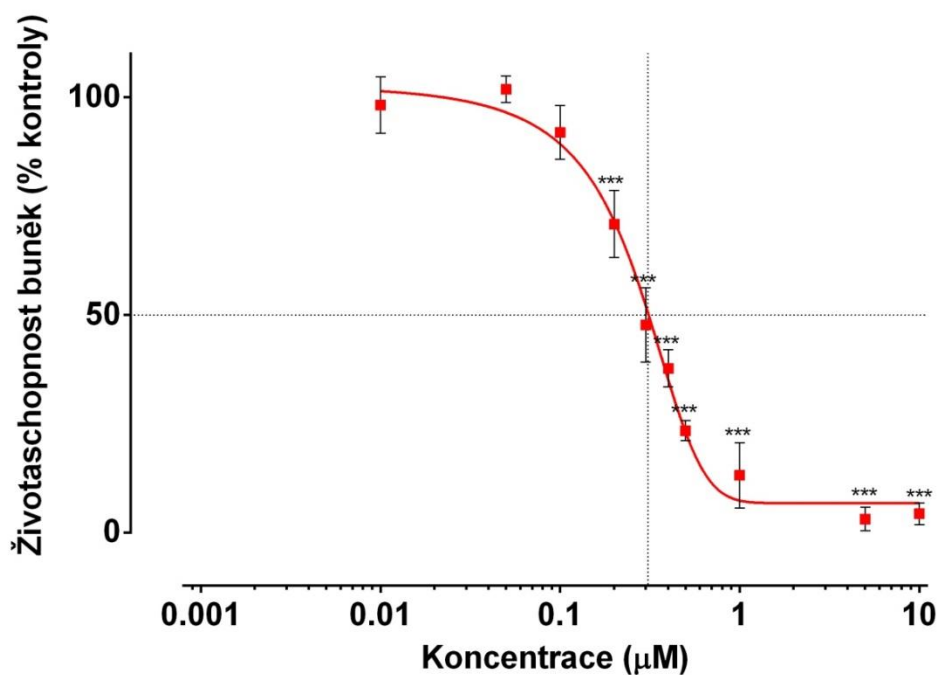
Vlastní toxicita (bez aktivace světlem) studované látky ZIP252ZnEt⁺ byla hodnocena v rozsahu koncentrací 10 μM až 1000 μM na buněčné linii HeLa. Zjištěná střední toxická koncentrace fotosenzitizéru odpovídá $\text{TC}_{50} = 105 \pm 9,5 \mu\text{M}$. Hodnoty jsou graficky znázorněny v následujícím grafu (Obr. 16)



Obr. 16 Grafické znázornění životaschopnosti HeLa buněk, vystavených stoupající koncentraci ZIP252ZnEt⁺ bez aktivujícího záření. Počet opakování $n=5$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ a *** $p<0.001$

6.1.1.2 FOTOTOXICITA

Účinnost dané látky po ozáření světlem byla hodnocena v rozsahu koncentrací 0,01–10 μM na HeLa buňkách. Zjištěná střední efektivní koncentrace fotosenzitizéru odpovídá $\text{EC}_{50} = 0,26 \pm 0,089 \mu\text{M}$. Experimentálně zjištěné hodnoty jsou graficky znázorněny v následujícím grafu (Obr. 17)

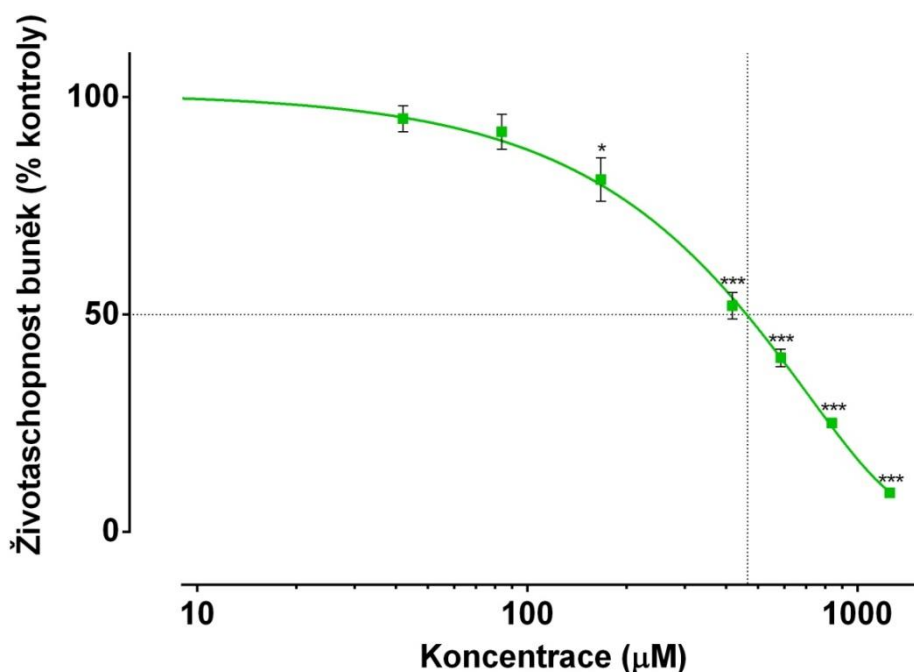


Obr. 17 Grafické znázornění životaschopnosti HeLa buněk, vystavených stoupající koncentraci ZIP252ZnEt⁺ v přítomnosti aktivujícího záření, hodnoceno 24 h po ozáření. Počet opakování n=7, *p<0.05, **p<0.01 a ***p<0.001

6.1.2 Tetrapyridoporphyrizin ZIP300ZnMe⁺

6.1.2.1 DARK TOXICITA

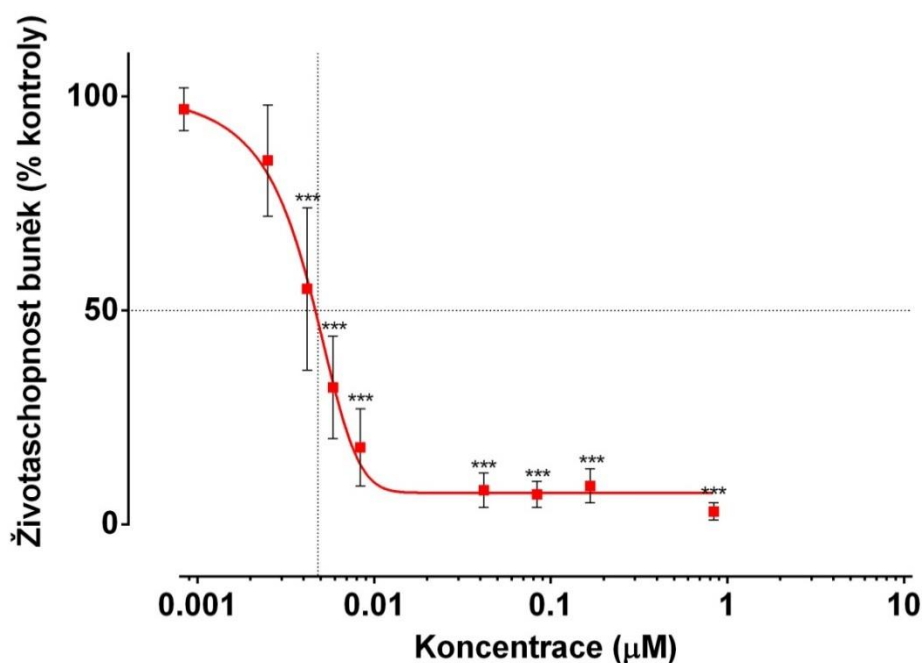
Vlastní toxicita (bez aktivace světlem) studované látky ZIP300ZnMe⁺ byla hodnocena v rozsahu koncentrací 10 μ M až 1000 μ M na buněčné linii HeLa. Zjištěná střední toxická koncentrace fotosenzitizéru odpovídá $TC_{50} = 435 \pm 33 \mu$ M. Tato látka tak vykazuje nižší toxicitu pro buňky bez aktivujícího záření než předchozí tetrapyridoporphyrizin ZIP252ZnEt⁺. Hodnoty jsou graficky znázorněny v následujícím grafu (Obr. 18).



Obr. 18 Grafické znázornění životaschopnosti HeLa buněk, vystavených stoupající koncentraci ZIP300ZnMe⁺ bez aktivujícího záření. Počet opakování $n=5$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ a *** $p<0.001$

6.1.2.2 FOTOTOXICITA

Účinnost dané látky po ozáření světlem byla hodnocena v rozsahu koncentrací 0,001–1 μM na HeLa buňkách. Zjištěná střední efektivní koncentrace fotosenzitizéru odpovídá $\text{EC}_{50} = 3,89 \pm 1,79 \text{ nM}$. Střední efektivní koncentrace tohoto fotosenzitizéru je mnohem nižší než u předchozího fotosenzitizéru ZIP252ZnEt^+ , z čehož vyplývá, že je pro dosažení cíleného efektu potřebná výrazně nižší koncentrace látky. Hodnoty zjištěné experimentem jsou graficky znázorněny v následujícím grafu (Obr. 19).



Obr. 19 Grafické znázornění životaschopnosti HeLa buněk, vystavených stoupající koncentraci ZIP300ZnMe^+ v přítomnosti aktivujícího záření, hodnoceno 24 h po ozáření. Počet opakování $n=9$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ a *** $p<0.001$

6.1.3 Porovnání cytotoxického působení kationických fotosenzitizérů

Z experimentálně získaných hodnot TC_{50} a EC_{50} byl vypočítán index TC_{50}/EC_{50} . Všechny získané hodnoty s vypočítaným TC_{50}/EC_{50} indexem jsou vypsány v následující tabulce (Tab. 2).

Tab. 2 Shrnutí získaných výsledků u sledovaných fotosenzitizérů

fotosenzitizér	TC_{50}	EC_{50}	TC_{50}/EC_{50}
ZIP252ZnEt ⁺	105 ± 9,5 μM	0,26 ± 0,089 μM	404
ZIP300ZnMe ⁺	435 ± 33 μM	3,89 ± 1,79 nM	111825

Oba studované kationické PS se jeví jako vhodné fotosenzitizéry pro PDT. Výrazně výhodnějším se zdá být tetrapyridoporphyrizin ZIP300ZnMe⁺ díky jeho dobré účinnosti po aktivaci světlem již v nízkých koncentracích (jednotky nM) a díky nízké vlastní toxicitě této látky (stovky μM). Vykazuje tak vysoký index TC_{50}/EC_{50} . Tetrapyridoporphyrizin ZIP252ZnEt⁺ dosáhl v experimentech také dobrých hodnot EC_{50} a TC_{50} , kvůli vyšší vlastní toxicitě a vyšší střední efektivní koncentraci látky dosahuje poměr TC_{50}/EC_{50} mnohem nižších hodnot.

6.1.4 Ostatní fotosenzitizéry (tetrapyridoporphyriziny ZIP252ZnHCl, ZIP184Zn, ZIP184ZnHCl, ZIP249Zn)

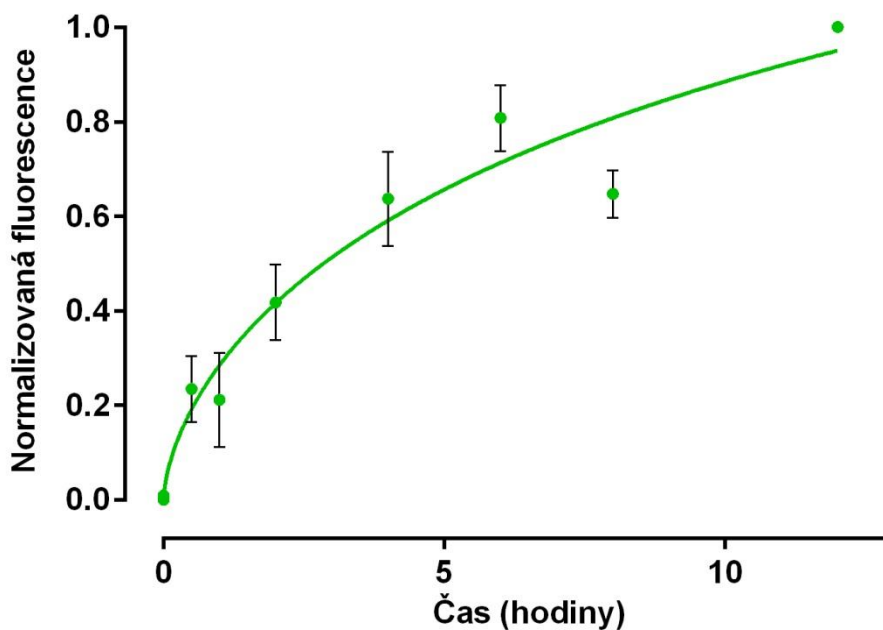
Ostatní použité PS (omezeně rozpustné ve vodných roztocích) nebyly aktivní ani po dosažení limitu rozpustnosti jednotlivých studovaných látek (Tab. 3). Nad koncentrací limitu rozpustnosti již studované látky agregovaly, tvořily krystaly a vypadávaly z roztoku. Proto s nimi nebyly prováděny další experimenty.

Tab. 3 Hodnoty limitů rozpustnosti neaktivních fotosenzitizérů

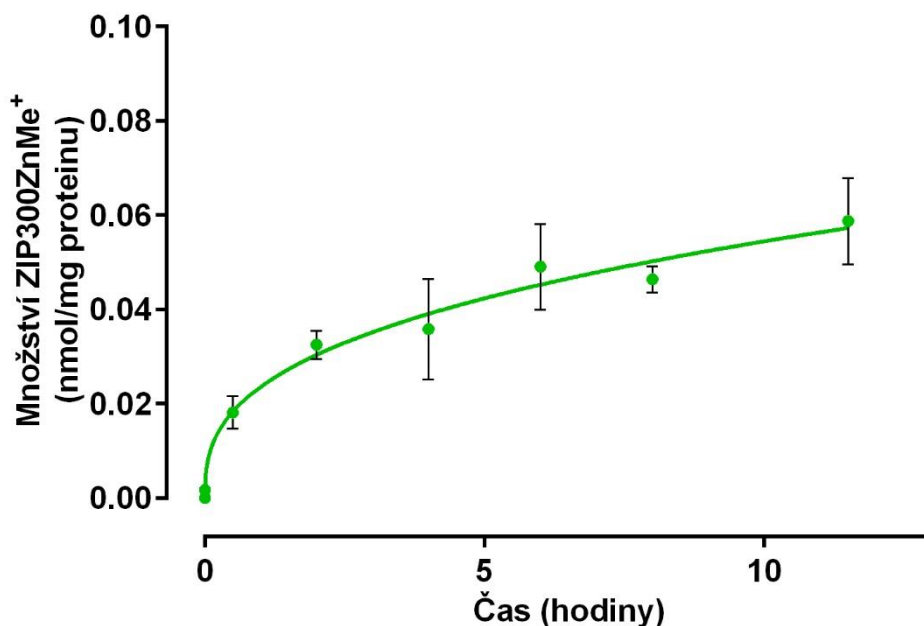
fotosenzitizér	limit rozpustnosti
ZIP 184Zn (v SCM)	cca 100 μM
ZIP252ZnHCl (v DMSO)	cca 50 μM
ZIP184ZnHCl (v DMSO)	cca 50 μM
ZIP249Zn (v DMSO)	cca 50 μM

6.2 ČASOVÝ PROFIL PROSTUPU LÁTEK DO BUNĚK

Experimentálně byl zjišťován časový profil prostupu („uptake“) PS (ZIP252ZnEt⁺ a ZIP300ZnMe⁺) v časových intervalech 0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 a 12 hodin. Získaná data jsou zobrazena v následujících grafech jako závislost množství látky (její fluorescence, resp. koncentrace vztažená na množství bílkoviny ve vzorku) na čase (Obr. 20, 21). Intenzita fluorescence přímo závisí na koncentraci PS, tzn. čím vyšší fluorescence je detekována, tím vyšší koncentrace PS se nachází v buňkách. Časový vstup obou PS do buněk byl v prvních hodinách velmi rychlý, s dosažením plateau fáze přibližně kolem 12 hodin. Finální koncentrace tetrapyridoporphyrinu ZIP300ZnMe⁺ činila 0,05 nmol/mg proteinu. U tetrapyridoporphyrinu ZIP252ZnEt⁺ stanovení množství látky ve vzorku neproběhlo.



Obr. 20 Grafické znázornění časového profilu prostupu ZIP252ZnEt⁺ do buněk (závislost normalizované fluorescence na čase)



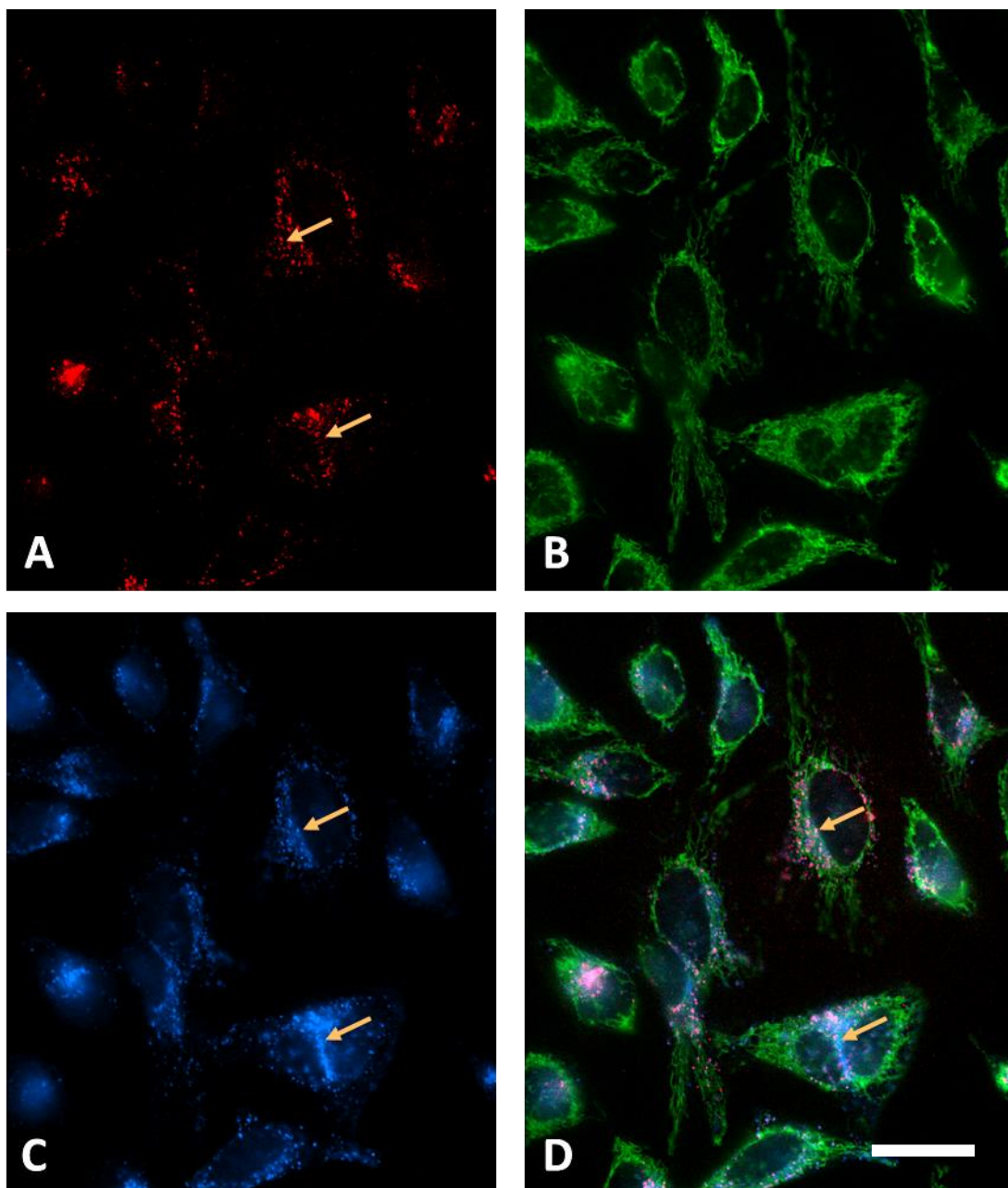
Obr. 21 Grafické znázornění časového profilu prostupu ZIP300ZnMe⁺ do buněk (závislost množství ZIP300ZnMe⁺ na čase).

6.3 FOTOGRAFICKÁ DOKUMENTACE

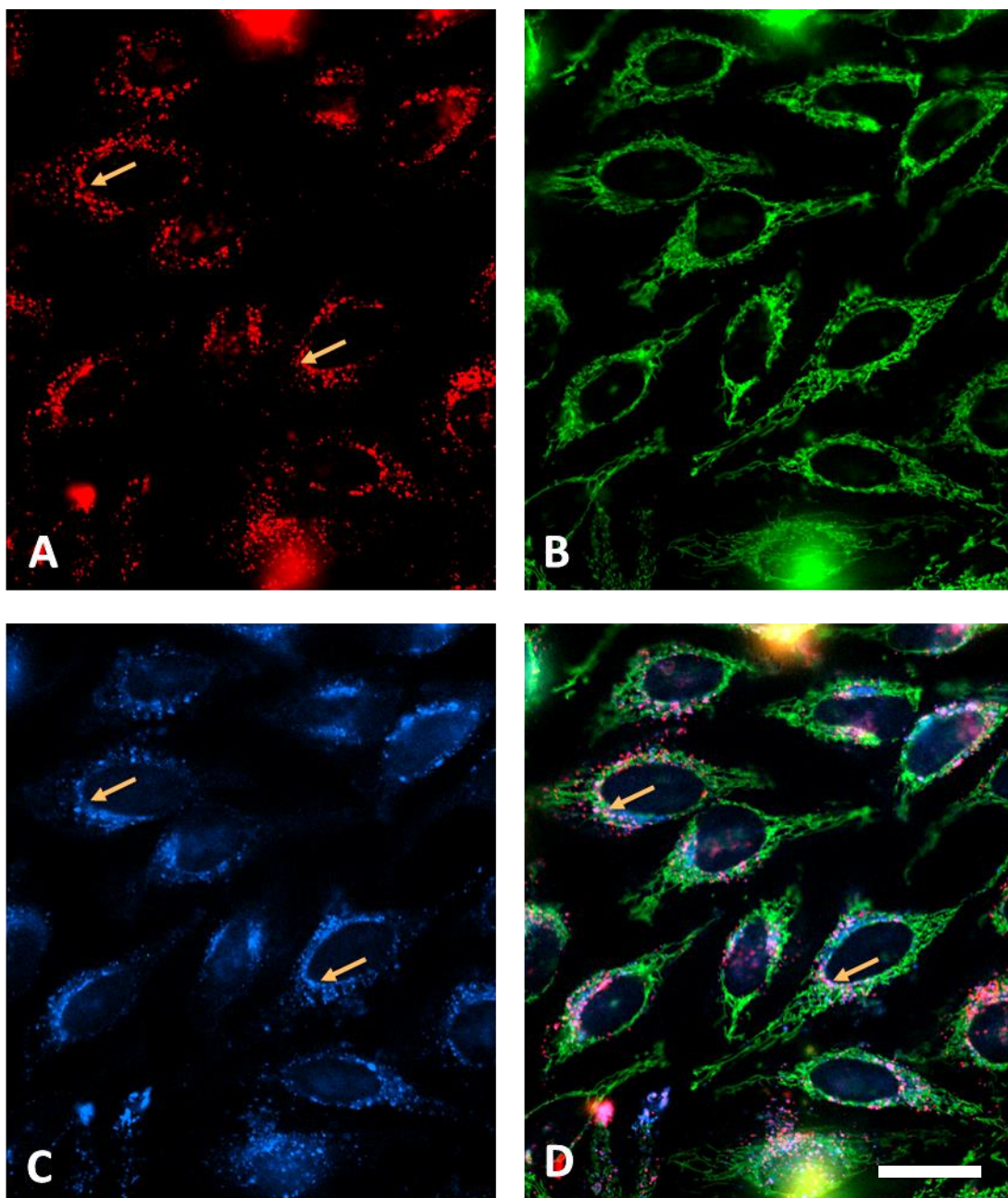
Pro fotografickou dokumentaci na buněčné linii HeLa byly použity pouze kationické deriváty ZIP252ZnEt⁺ a ZIP300ZnMe⁺, které prokázaly v cytotoxicitních experimentech *in vitro* slibnou účinnost. Jako kontrolní buňky jsou zde označovány buňky, ke kterým nebyl přidáván studovaný PS.

6.3.1 Subcelulární lokalizace

Pro hlubší nahlédnutí do mechanismu účinků kationických PS byla experimentálně určena lokalizace PS uvnitř buněk (tzv. subcelulární lokalizace) pomocí fluorescenční mikroskopie značením fluorescenčními sondami MitoTracker Green FM (mitochondrie) a LysoTracker Blue DND-22 (lysozomy). Mikrofotografie byly pořízeny na fluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse Ti E s použitím fluorescenčních filtrů pro DAPI, FITC a Cy5. Oba kationické PS se primárně lokalizovaly v endo-lysozomálním systému (červená fluorescence na obrázcích 22 a 23 nahoře; fluorescence samotného PS) se kryje se signálem lysozomů (modrá fluorescence). Endo-lysozomální systém a především lysozomy tak představují primární cíl ¹O₂.



Obr. 22 Subcelulární lokalizace ZIP252ZnEt⁺; červená (A) – fluorescence PS, modrá (C) – lysozomy, zelená (B) – mitochondrie, vpravo dole (D) – překryv fluorescenčních kanálů znázorňující lokalizaci PS v oblasti lysozomů. Měřítko odpovídá 50 μm.



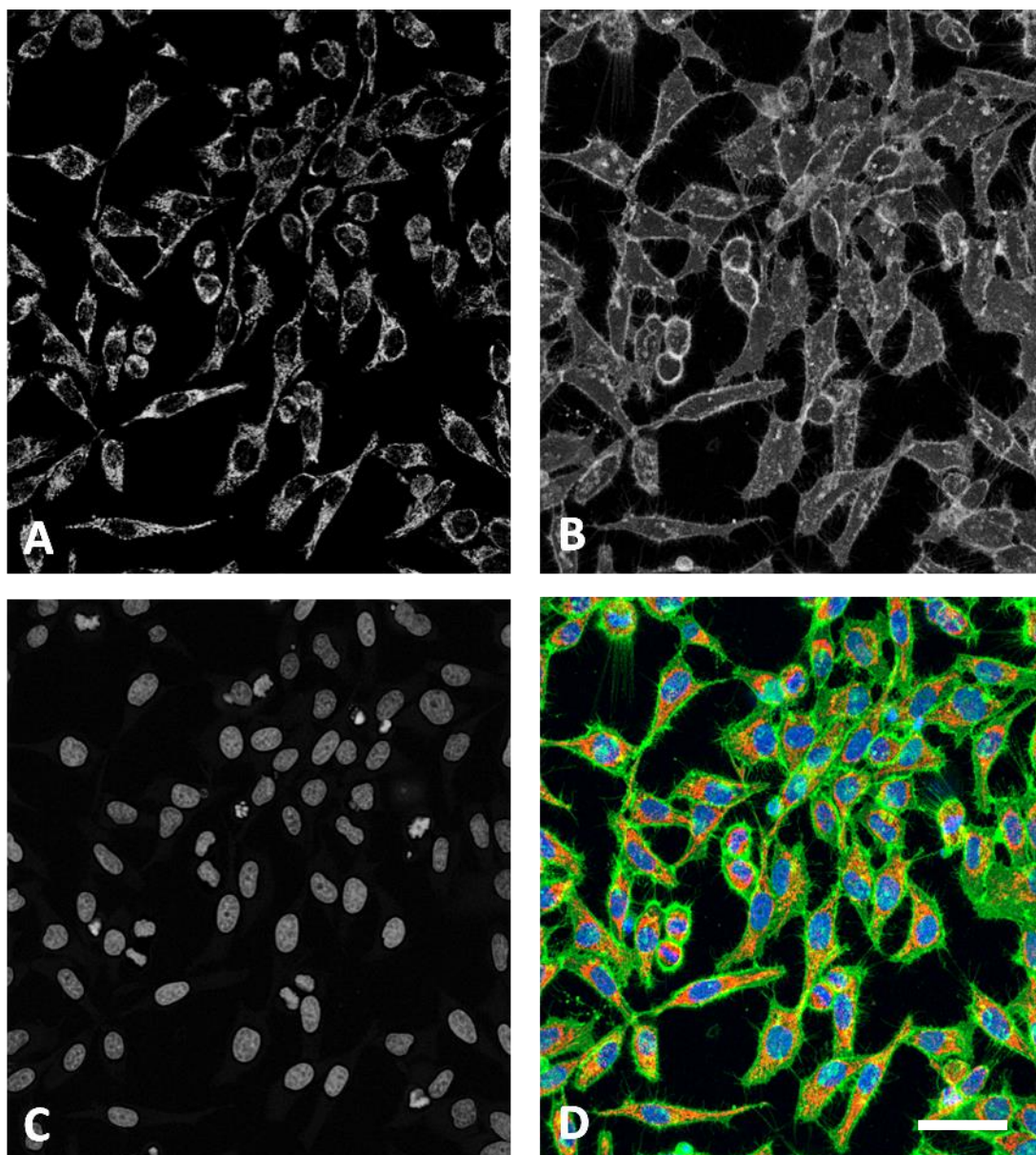
Obr. 23 Subcelulární lokalizace ZIP300ZnMe⁺; červená (A) – fluorescence PS, modrá (B) – lysozomy, zelená (C) – mitochondrie, vpravo dole (D) – překryv fluorescenčních kanálů znázorňující lokalizaci PS v oblasti lysozomů. Měřítko odpovídá 50 μm.

6.3.2 Morfologické změny

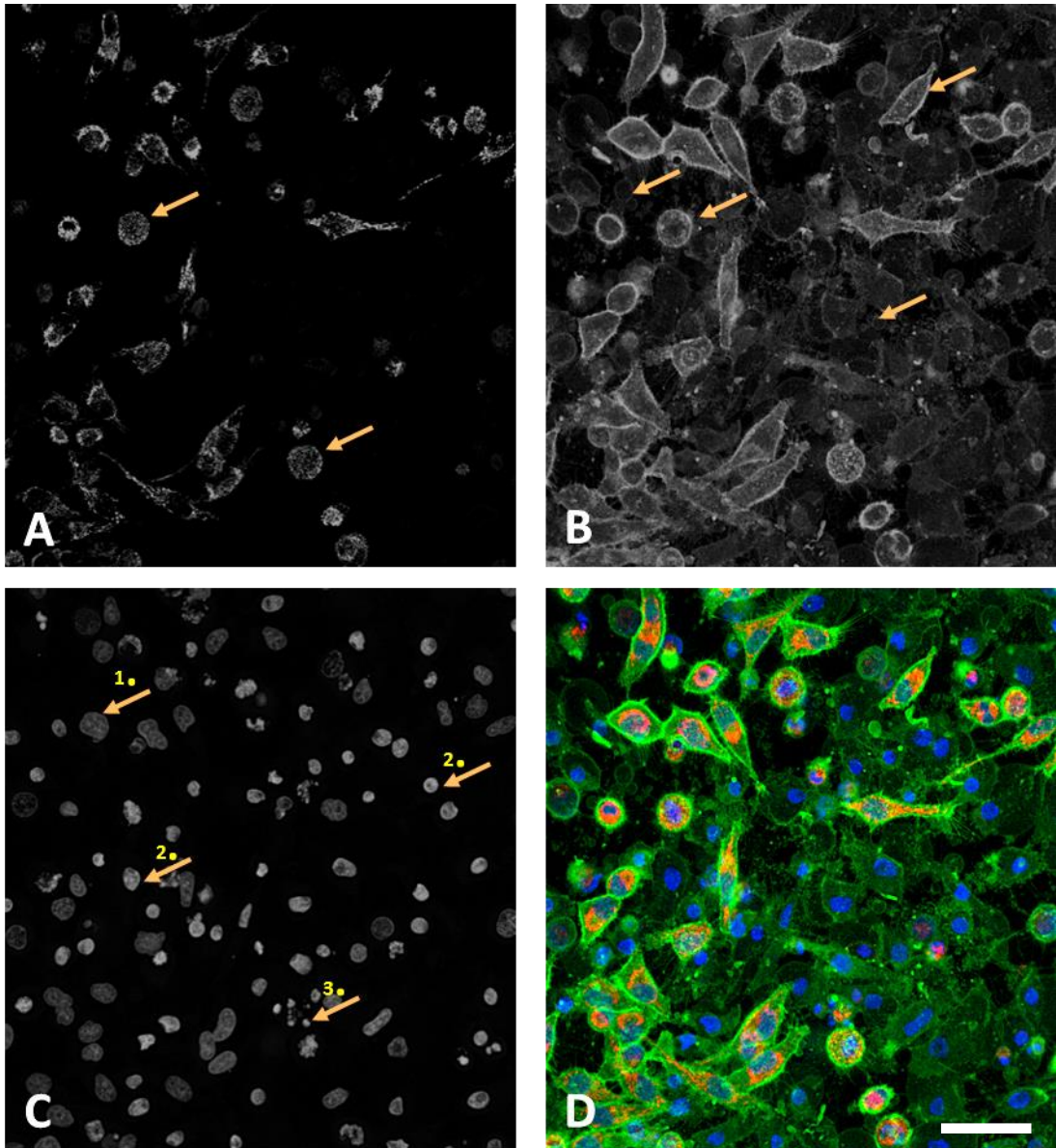
Morfologické změny indukované fotodynamickým působením fotosenzitizéru byly zaznamenány pomocí fluorescenčního značení jader (Hoechst 33342, propidium jodid), buněčné membrány (Cell Mask Green), mitochondrií (MitoTracker Red CMXRos) a aktinového cytoskeletu (Alexa Fluor 488 konjugát phalloidinu) v kombinaci s konfokální mikroskopií. Pro tyto experimenty byl použit jen tetrapyridoporphyrin ZIP300ZnMe⁺ pro jeho výrazně vyšší fotodynamickou účinnost.

Kontrolní buňky (bez cytotoxického působení PS) mají normální protáhlý tvar. Jejich mitochondrie jsou větvenité až vláknité. Buněčná jádra mají normální tvar a struktura chromatinu je nezměněná. Několik buněk prodělává buněčné dělení – jejich tvar je zakulacený a jádro prodělává charakteristické změny (signál fluorescenční sondy Hoechst je výrazně vyšší díky vysoce kompaktnímu uspořádání DNA). Cytoskelet buněk je beze změn, v buňkách je přítomna charakteristická vláknitá struktura aktinového cytoskeletu včetně stresových vláken (Obr. 24, Obr. 26).

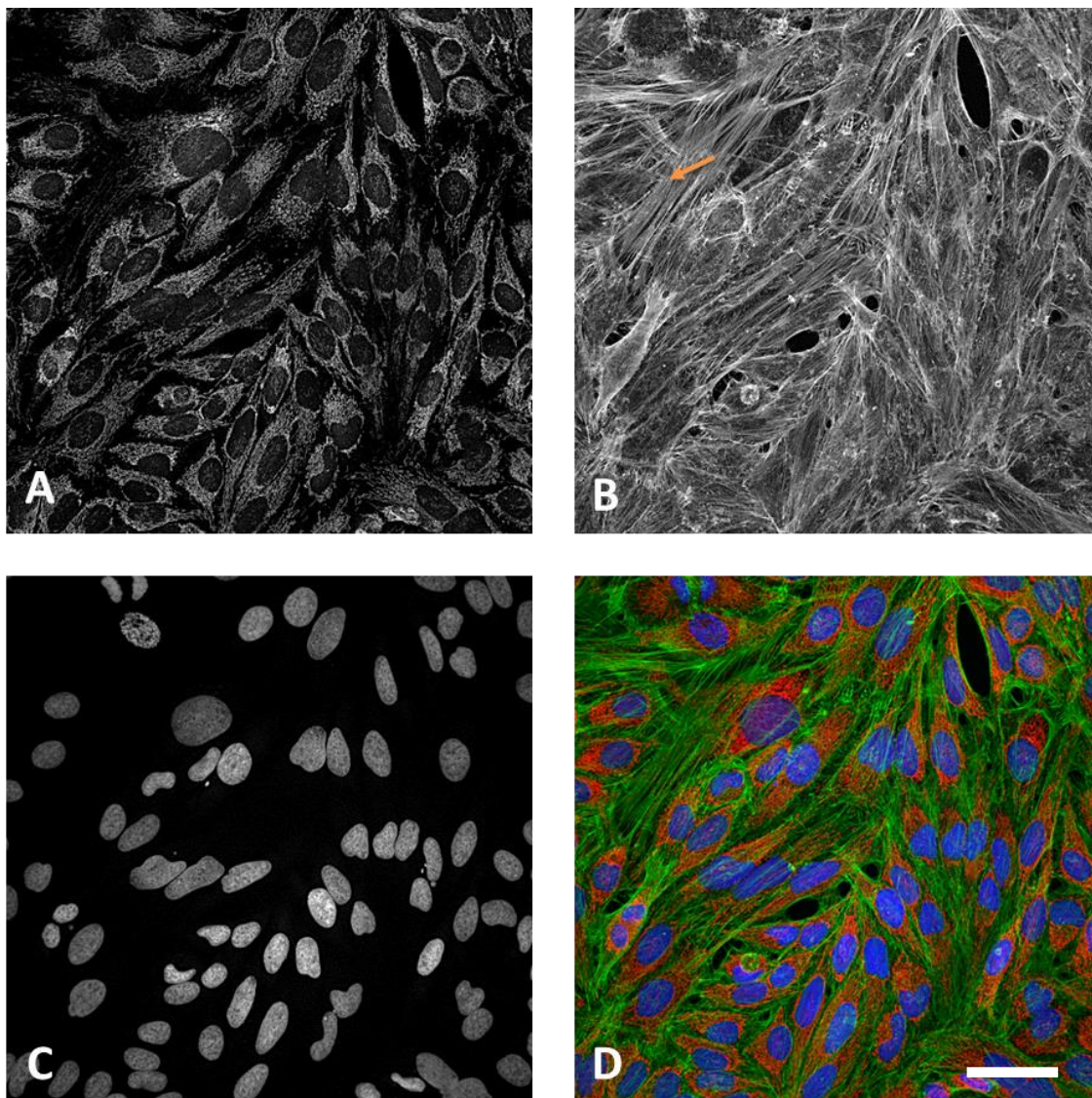
Fotodynamický efekt tetrapyridoporphyrinu ZIP300ZnMe⁺ (Obr. 25, Obr. 27) se projevil komplexními morfologickými změnami buněk. Kromě frakce morfologicky nezměněných buněk nalézáme velkou část buněk zakulacených a kontrahovaných. Většina jich pak vykazuje masivní poškození membrány a tvorbu membránových blebů v místě, kde se cytoplazmatická membrána oddělí od cytoskeletu, a hydrostatický tlak cytoplazmy vytvoří balónovité struktury. Zbytky membrán buněk, které prošly rychlou buněčnou smrtí (pravděpodobně nekrotického typu), produkují výrazně nižší signál. U mitochondrií došlo ke změně tvaru z větvenitého na sférický a jsou z velké části fragmentované. U usmrčených buněk došlo k úplnému vymizení signálu mitochondrií. Fotodynamický efekt se projevil také změnami na jádře (kondenzací chromatinu a fragmentací jádra) a reorganizací aktinového cytoskeletu buněk. U některých buněk došlo k jeho silnému rozrušení, chybí vláknitá struktura nebo v buňkách došlo k nahloučení vláken v oblasti buněčného kortexu.



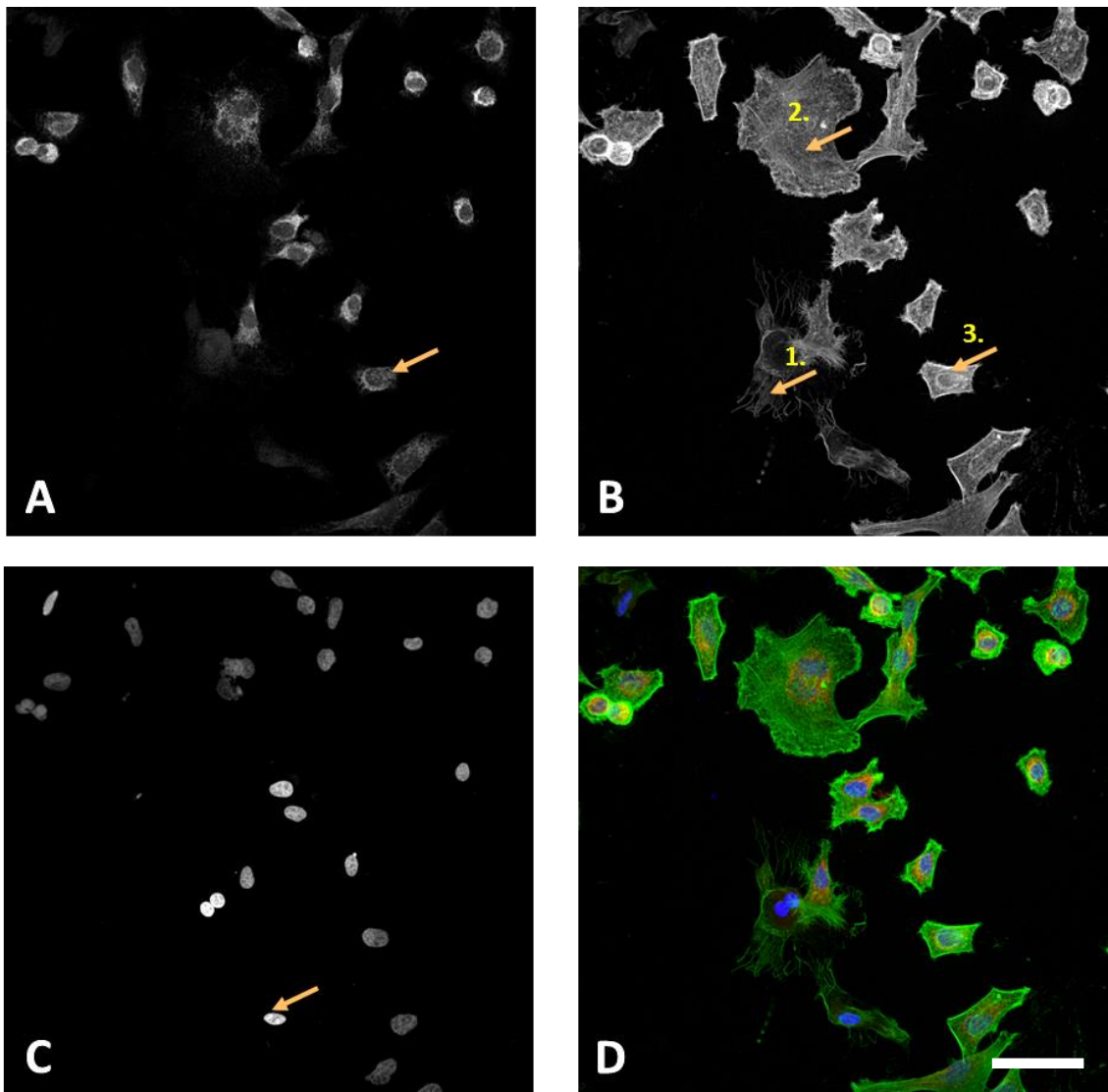
Obr. 24 Zobrazení kontrolních buněk HeLa (bez toxického působení PS). Buněčné struktury jsou beze změn. Na jednotlivých snímcích lze vidět jednotlivé buněčné struktury: A) mitochondrie – typický vřetenovitý až vláknitý tvar; B) cytoplazmatická membrána – většina buněk má normální tvar, membrány beze změn; C) buněčná jádra, s nezměněným uspořádáním jaderného chromatinu; D) snímek s překryvem všech fluorescenčních kanálů (Cy3, FITC, DAPI). Měřítko odpovídá 100 μm .



Obr. 25 Zobrazení morfologických změn na HeLa buňkách po aktivaci PS (ZIP300ZnMe⁺, EC₈₅ = 8,03 nM). Došlo ke změnám ve všech sledovaných buněčných strukturách - kontrakce až zakulacení buněk, tvorba membránových blebů (B) a změna tvaru mitochondrií (A). Na snímku (C) lze vidět jádra s typickou nealterovanou strukturou (1.), jádra s kondenzovaným chromatinem (2.) a fragmentaci jader (3.). Celkový snímek s překryvem fluorescenčních kanálů je zobrazen vpravo dole (D). Měřítka odpovídá 100 μm.



Obr. 26 Zobrazení kontrolních buněk HeLa (bez toxického působení PS, fixované buňky). Buněčné struktury jsou beze změn. Na jednotlivých snímcích lze vidět jednotlivé buněčné struktury: A) mitochondrie – typický větvenovitý až vláknitý tvar; B) aktinový cytoskelet – většina buněk – typická vláknitá struktura včetně stresových vláken; C) buněčná jádra, s nezměněným uspořádáním jaderného chromatinu; D) snímek s překryvem všech fluorescenčních kanálů (Cy3, FITC, DAPI). Měřítka odpovídá 100 μm .

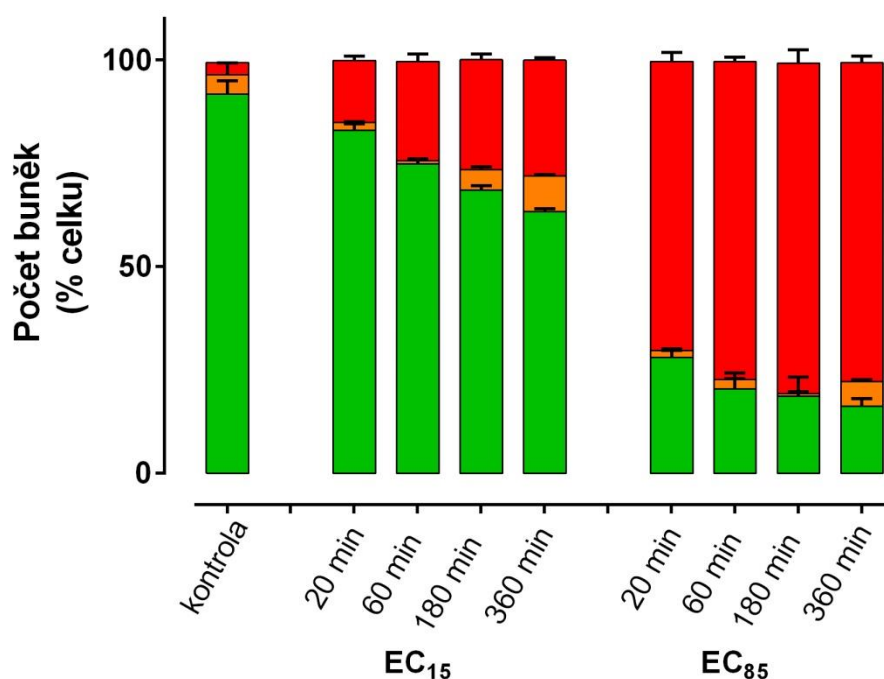


Obr. 27 Zobrazení morfologických změn na HeLa buňkách po aktivaci PS (ZIP300ZnMe⁺, EC₈₅ = 8,03 nM, fixované buňky). Došlo ke změnám ve všech sledovaných buněčných strukturách: A) změna tvaru mitochondrií; B) změna struktury aktinového cytoskeletu, u některých buněk cytoskelet silně rozrušen (1.), cytoskeletu chybí vláknitá struktura (2.), velká část buněk má vlákna nahloučená v kortexu (3.); C) lze vidět jádra s kondenzovaným chromatinem; D) celkový snímek s překryvem fluorescenčních kanálů (Cy3, FITC, DAPI). Měřítko odpovídá 100 μm.

6.4 PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

Hodnocení typu buněčné smrti navozené tetrapyridoporphyrizinovým PS ZIP300ZnMe⁺ bylo provedeno pomocí průtokové cytometrie s využitím Annexinu-V a PI. Pro experiment byly využity koncentrace PS odpovídající hodnotám jeho EC₁₅ a EC₈₅. Dosažené výsledky jsou graficky znázorněny na Obr. 28. Z výsledků je patrné, že při využití koncentrace EC₁₅ v celém sledovaném časovém intervalu až do 6 hodin od ozáření, je přítomna většina buněk neapoptotických, tj. negativních na Annexin-V a PI. Objevuje se zde i podíl buněk pozdně apoptotických až nekrotických.

Při zvýšení koncentrace PS na hodnotu EC₈₅, došlo už po 20 minutách po ozáření k velmi výraznému zvýšení podílu pozdně apoptotických až nekrotických buněk, které tvořily na rozdíl od EC₁₅ více než polovinu z celkového množství buněk. S narůstajícím intervalem od ozáření jejich podíl ještě vzrostl, což odpovídá výsledům z cytotoxicitních studií.



Obr. 28 Hodnocení typu buněčné smrti průtokovou cytometrií s použitím PS ZIP300ZnMe⁺ (použité koncentrace PS - EC₁₅ = 2,18 nM, EC₈₅ = 8,03 nM).

7 DISKUZE

Pro zvyšující se výskyt nádorových onemocnění v dnešní době je nutné vyvíjet nová potenciální protinádorová léčiva a terapeutické přístupy pro jejich léčbu. Podle údajů databáze GLOBOCAN se v roce 2012 ve světě odhalilo 14,1 milionů nových případů nádorových onemocnění a přibližně 8,2 milionů lidí na nádorové onemocnění zemřelo (International Agency for Research on Cancer 2012). Například v České republice patří nádorová onemocnění k druhé nejčastější příčině úmrtí (Ministerstvo zdravotnictví České republiky 2014).

Fotodynamická terapie zaměřená na léčbu maligních i nemaligních onemocnění je považována za minimálně invazivní, klinicky schválenou terapeutickou metodu (Agostinis et al. 2011, Mroz et al. 2011), která je v posledních letech významně studována a klinicky testována. Vzhledem k nízké invazivitě PDT a relativně nízkému výskytu nežádoucích komplikací má PDT potenciál i mezi standardními metodami léčby nádorů, jako jsou radioterapie, chemoterapie nebo chirurgická léčba.

Fotodynamická terapie nádorů využívá interakce tří netoxických složek – PS, světla a kyslíku, jejichž společná interakce vede k iniciaci fotochemických reakcí, které vedou k tvorbě vysoce reaktivních a toxických látek. PDT je založena na absorpci světla o vhodné vlnové délce molekulou PS a následném přenosu energie fotonů na okolní molekuly, především na kyslík, za vzniku cytotoxických ROS, kde hlavní roli hraje $^1\text{O}_2$ (Agostinis et al 2011). ROS poškozují okolní buněčné struktury, jejichž destrukce vede k nevratnému poškození buněčných funkcí a následné buněčné smrti (Buytaert et al. 2007).

Výsledný účinek fotodynamické terapie je vzájemným propojením tří hlavních mechanismů účastnících se destrukce nádorové tkáně. Jedná se o přímý letální účinek ROS (hlavně $^1\text{O}_2$) na nádorové buňky, poškození cévního zásobení nádorové tkáně, kde následně dochází ke snížení dodávky kyslíku a živin, a zprostředkovanou aktivaci imunitního systému proti nádorovým buňkám. (Castano et al. 2005a).

Efekt PDT se může pozitivně projevit také v kombinaci s jinou léčebnou metodou (například s chemoterapií). Jejich kombinací dochází nejenom k efektivnějšímu ničení nádorových buněk, ale především k redukci nežádoucích účinků chemoterapie, protože je pro dosažení cíleného účinku potřebná mnohem nižší dávka

léčiva pro chemoterapii (Moreira et al. 2008). Aditivní a synergický efekt kombinace léčby pomocí PDT a cisplatiny nebo gemcitabinu byl prokázán na plicní nádorové buněčné linii H1299, kde kombinací došlo k výraznému snížení viability buněk po kombinované terapii (Crescenzi et al. 2006).

Hlavními strukturními skupinami PS jsou porfyriny a jejich analoga, chloriny, bakteriochloriny a Pc (Benov 2015). Ftalocyaniny a jejich aza-analoga představují zajímavou strukturní skupinu organických barviv, které mají mnoho využití v různých oblastech výzkumu i v praxi (Macháček et al. 2016). Využití našly jako barviva, náplně tonerů v tiskárnách, optických materiálech (např. CD disky), průmyslových katalyzátorech nebo také jako fluorescenční sondy. Jednou z klíčových aplikací Pc je jejich použití v medicíně pro PDT nádorů. (Josefsen a Boyle 2012, Macháček et al. 2016). Skupina Pc představuje čistě syntetické makrocyclické látky, které mají vhodné fotofyzikální vlastnosti pro PDT. Mezi výhodné vlastnosti Pc patří silná absorpce záření nad 680 nm a vysoký Φ_{Δ} . Za nevýhodu těchto látek je považována jejich nízká rozpustnost ve vodě a tendence k agregaci, jež negativně ovlivňují fotodynamický efekt PS (Macháček et al. 2015).

V této práci byly experimentálně *in vitro* studovány látky ze skupiny derivátů tetrapyridoporphyrinů (TPyPz), jež jsou jedny z možných aza-analogů Pc s náhradou benzenových jader za pyridiny. Jejich syntéza, jako vhodných PS pro PDT, byla popsána teprve nedávno naší vědeckou skupinou (Váchová et al. 2015). Pro veškeré experimenty byly tyto látky syntetizovány vědeckou skupinou doc. Zimčíka na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické Fakulty v Hradci Králové. Fotosenzitizéry ZIP300ZnMe⁺ a ZIP252ZnEt⁺ představují ve vodě rozpustné kationické zástupce TPyPz, ostatní zkoumané PS mají velice omezenou rozpustnost ve vodných roztocích a vyžadují tedy použití nosičového systému nebo solubilizérů (v našem případě DMSO). Zkoumané látky obsahují substituenty s různými spojujícími heteroatomy (O, N, S). Centrálním kovovým atomem těchto látek je vždy zinek. Časový průběh kationických PS do buněk byl v prvních hodinách velmi rychlý, s dosažením plateau fáze přibližně kolem 12 hodin. Podobných výsledků bylo dosaženo i s nabitými, ve vodě rozpustnými Pc (Macháček et al. 2015, Makhseed et al. 2013) a tetrapyrazinoporphyrinů (TPyzPz), což je jiný typ azaftalocyaninů (Macháček et al. 2015, Macháček et al. 2016). Finální koncentrace TPyPz ZIP300ZnMe⁺ činila 0,05 nmol/mg proteinu.

V literatuře zatím není publikováno mnoho dalších výsledků *in vitro* experimentů hodnocení fotodynamické aktivity azaftalocyaninů. V roce 2010 byly publikovány první výsledky *in vitro* fotodynamické aktivity ve vodě rozpustných, zinečnatých azaftalocyaninů (AzaPc) ze skupiny TPyzPz a zinečnatých azanaftalocyaninů. Experimenty byly prováděny na Hep-2 buňkách, což je buněčná linie lidských černošských cervikálních nádorových buněk. Použité látky neprokázaly žádnou vlastní toxicitu bez aktivace zářením až do maximální použité koncentrace 200 μM . Fototoxicita byla hodnocena po 4 h inkubace se zkoumanými látkami. Kationický AzaPc dosáhl $\text{EC}_{50} = 0,104 \mu\text{M}$. Za hlavní subcelulární cíl této látky byly určeny lysozomy. To naznačuje pravděpodobné vychytávání tohoto nabitého AzaPc pomocí endocytózy (Zimčík et al. 2010).

Dalším zajímavým *in vitro* studovaným kandidátem ze skupiny Pc byl v nedávné době syntetizovaný, ve vodě rozpustný, zinečnatý Pc se šestnácti kladnými náboji na periférii (Makhseed et al. 2013). I ve vodném prostředí má tato látka vysoké Φ_{Δ} a absenci agregace i při vysokých koncentracích. Tento nabitý Pc prokázal velmi vysokou účinnost na nádorových HeLa buňkách *in vitro* ($\text{EC}_{50} = 36,7 \text{ nM}$) a nízkou vlastní toxicitu jak na nemaligní buněčné linii myších fibroblastů 3T3 ($\text{TC}_{50} = 395 \mu\text{M}$), tak na HeLa buňkách ($\text{TC}_{50} = 628 \mu\text{M}$). Dosáhl tak výjimečně dobré hodnoty poměru $\text{TC}_{50}/\text{EC}_{50}$ přesahující 10 000.

V roce 2009 byla publikována studie (Ke et al. 2009), která porovnávala fotodynamické vlastnosti periferně a neperiferně substituovaných zinečnatých Pc. Jedná se o látky substituované čtyřmi skupinami karboxylových derivátů v α - nebo β -pozicích makrocyclu. Vlastní toxicita použitých látek bez přítomnosti aktivujícího záření se neprojevila při použití porovnávaných Pc v koncentracích do 8 μM . Fototoxicita po ozáření ($\lambda > 610 \text{ nm}$, 60 J cm^{-2}) byla u těchto Pc studována na buněčné linii MGC803, která představuje lidské nádorové buňky žaludku. Tetra- α -substituované zinečnaté Pc se ukázaly být více fototoxické vůči MGC803 buňkám a méně agregující než jejich tetra- β -substituované protějšky. Nejvíce fotoaktivní se z testovaných Pc ukázal zinečnatý neperiferně substituovaný 4-karboxylfenoxyftalocyanin. Dosáhl vysoké hodnoty fototoxicity po ozáření ($\text{EC}_{50} = 3,05 \mu\text{M}$), která prokazuje výhodné vlastnosti tohoto PS pro PDT. Studované neperiferně substituované látky také prokázaly mírně vyšší kvantový výtěžek singletového kyslíku a vyšší fotostabilitu, naproti tomu nebyl významný rozdíl ve vychytávání obou skupin látek buňkami.

Další látkou z řad Pc, jejíž fotodynamické vlastnosti *in vitro* byly experimentálně hodnoceny, je například amfifilní zinečnatý tetrakarboxyoktafluoroftalocyanin. Jeho fotodynamická aktivita byla studována na buněčné linii HeLa. Zároveň byla látka srovnávána s hydrofobním zinečnatým hexadekafluoroftalocyaninem a hydrofilním zinečnatým nefluorovaným oktakarboxyftalocyaninem. Pro *in vitro* fotocytotoxicitní experimenty byly buňky s těmito látkami inkubovány po dobu 2 h a následně ozařovány ($\lambda > 500$ nm, 31 J cm^{-2}). I tento potenciální PS dosáhl vysoké fototoxicity, $EC_{50} \sim 0,5 \text{ }\mu\text{M}$. K akumulaci tohoto PS docházelo primárně v hydrofobní lipidové membráně buněk. Tato látka se vyskytovala v buňkách ve své fotoaktivní monomerní formě a neagregovala v nich (Oda et al. 2000).

Fotodynamická aktivita jednotlivých PS studovaných v této práci byla hodnocena po aktivaci světlem ($\lambda > 570$ nm; $12,4 \text{ mW cm}^{-2}$; $11,2 \text{ J cm}^{-2}$) na buněčné nádorové linii HeLa. Nejlépe se ze zkoumaných PS projevil kationický PS ZIP300ZnMe⁺, který prokázal neobyčejně vysokou toxicitu po ozáření $EC_{50} = 3,89 \pm 1,79 \text{ nM}$, která udává, že pro dosažení cíleného smrtícího efektu na nádorové buňky je potřeba extrémně malého množství v řádu jednotek nM. Podobný výsledek fototoxicity v řádech desítek nM byl dosažen i u kationického Pc nesoucího stejnou periferně substituovanou skupinu jako ZIP300ZnEt⁺ (Makhseed et al. 2013). ZIP252ZnEt⁺ dosáhl hodnoty $EC_{50} = 0,26 \pm 0,089 \text{ }\mu\text{M}$, což je v porovnání s již publikovanými Pc a AzaPc stále velice dobrá aktivita srovnatelná s kationickými Pc nesoucími stejnou periferní skupinu (Macháček et al. 2015). Ostatní zkoumané látky bohužel neprokázaly fotodynamickou aktivitu po ozáření až do limitu jejich rozpustnosti v SCM. Výjimečně vysoká EC_{50} je o to zajímavější, že podobně účinný Pc (Makhseed et al. 2013) měl v plateau fázi uptake experimentů na HeLa buněčné linii koncentraci $0,55 \text{ nmol/mg proteinu}$ (Macháček et al. 2016), což je přibližně desetinásobně vyšší koncentrace než u ZIP300ZnMe⁺.

Vlastní toxicita kationických látek bez aktivace světlem byla hodnocena na buněčné linii HeLa. Vlastní toxicita ZIP252ZnEt⁺ byla $TC_{50} = 105 \pm 9,5 \text{ }\mu\text{M}$ a vlastní toxicita ZIP300ZnMe⁺ byla $TC_{50} = 435 \pm 33 \text{ }\mu\text{M}$. Oba kationičtí, ve vodě rozpustní zástupci tak vykazují nízkou vlastní toxicitu (TC_{50}) v řádech stovek μM , což je pro potenciál látky pro PDT a jeho další studium PS důležité. Mnoho látek pro PDT, jež jsou ve vodě málo rozpustné, nemůže dosáhnout nízké vlastní toxicity vlivem

přídavků solubilizérů či organických rozpouštědel, která toxicitu systému pomocná látka-PS může výrazně negativně ovlivnit. Podobné výsledky výrazně nízké vlastní toxicity Pc a AzaPc na buněčné linii HeLa publikovala naše skupina již dříve (Makhseed et al. 2013, Macháček et al. 2015). Periferně substituovaný kationický Pc se dokonce ukázal být jedním z nejméně toxických PS, kdy publikovaných, hodnota TC_{50} přesahuje hodnotu 1500 μ M.

Oba zástupci kationických TPyPz studovaných v této práci dosáhly velice dobrého poměru TC_{50}/EC_{50} . ZIP252ZnEt⁺ dosáhl poměru 404 a ZIP300ZnMe⁺ pak až výjimečně vysokých 111 825. Tyto výsledky naznačují, že se jedná o nadějně kandidáty pro PDT a rozhodně si zaslouží další hlubší *in vitro* a do budoucna i *in vivo* hodnocení.

Jak ukazuje literatura, po proběhlé PDT poškozené buňky procházejí všemi typy buněčné smrti: apoptózou, nekrózou a buněčnou smrtí spojenou s autofagií (Agostinis et al. 2011, Buytaert et al. 2007, Mroz et al. 2011). Hlavními typy jsou ale apoptóza a nekróza. Apoptóza představuje proces programované buněčné smrti závislý na ATP, morfologicky charakterizovaný kondenzací chromatinu, štěpením chromozomální DNA na fragmenty, smršťováním buňky, blebbingem membrány, degradací proteinů, tvorbou apoptotických tělísek bez poškození membrány a expozicí fosfatidylserinu na vnější stranu cytoplazmatické membrány (Buytaert et al. 2007, Moreira et al. 2008). Nekróza představuje proces buněčné smrti, který je charakteristický otokem buněk a buněčných organel, který vede k jejich poškození, ztrátou integrity buněčné membrány a její následnou rupturou, která umožní vylití intracelulárního obsahu okolí, kde se následně začne vyvíjet záněť (Moreira et al. 2008).

Subcelulárním cílem obou zkoumaných kationických TPyPz byly určeny lysosomy, podobně jako u dalších látek publikovaných naší skupinou, což je v rozporu s obecně přijímaným názorem, že kationické PS jsou lokalizovány především v mitochondriích (Macdonald a Dougherty 2001). Tato lokalizace má vliv i na typ buněčné smrti po aktivaci světlem a vede k rychlému usmrcení buněk se znaky nekrózy (Macháček et al. 2015).

U kationického zástupce ZIP300ZnMe⁺, který prokázal v cytotoxicitních experimentech slibnější vlastnosti, byly studovány morfologické změny navozené aktivací tohoto PS a procesy doprovázející buněčnou smrt. Fotodynamický efekt tetrapyridoporphyrinu ZIP300ZnMe⁺ se projevil, dle vysoké fototoxicity,

očekávanými komplexními morfologickými změnami mitochondrií, jader, cytoplazmatické membrány i aktinového cytoskeletu. Obdobné změny aktinového cytoskeletu při PDT byly pozorovány i v dřívějších studiích s jinými PS (Uzdensky et al. 2005, Juarranz et al. 2001). Průtokovou cytometrií s využitím kombinace značení Annexinem-V(FITC) a propidium jodidem lze rozlišit normální, apoptotické a pozdně apoptotické či nekrotické buňky. Vlivem ztráty integrity buněčné membrány v procesu apoptózy vystavují na svůj vnější povrch membránový fosfolipid fosfatidylserin, na který se váže Annexin-V. Tato vazba je ale umožněna i u buněk nekrotických. Současným značením buněk propidium jodidem (PI) lze tyto modalitty rozlišit. PI skrze nepoškozené membrány živých buněk a buněk v časném stádium apoptózy neproniká, na rozdíl od pozdně apoptotických a nekrotických buněk, které jsou pro PI permeabilní (Hingorani et al. 2011). Výsledky spolu s morfologickými změnami poukazují na převládající nekrózu v procesu buněčné smrti navozené účinkem ZIP300ZnMe⁺. Převažující nekróza je pravděpodobně způsobena rupturou lysozomů po aktivaci PS a vylitím jejich obsahu do buňky (účinek např. proteáz) včetně pokračujícího účinku PS v cytoplazmě buněk.

Deriváty ze skupiny derivátů tetrapyrído-porphyrinů prokázaly v *in vitro* experimentech, zkoumajících fotodynamickou aktivitu na buněčné nádorové linii HeLa, velmi výhodné vlastnosti, proto by měla být této skupině v budoucnu věnována větší pozornost. Část výsledků této práce byla již publikována (Váchová et al. 2015) a výsledky s TPYPz ZIP300ZnMe⁺ jsou součástí další připravované publikace.

8 ZÁVĚRY

- Studované kationické deriváty ZIP300ZnMe⁺ a ZIP252ZnEt⁺ prokázaly slibnou fotodynamickou účinnost v přítomnosti aktivujícího záření na buněčné nádorové linii HeLa (EC₅₀ = 3,89 nM resp. 260 nM). Ostatní deriváty nebyly aktivní ani po dosažení limitu rozpustnosti jednotlivých látek.
- Vlastní toxicita kationických derivátů (nesoucích trvalý náboj) bez aktivujícího záření byla velmi nízká – TC₅₀ = 105 μM pro ZIP252ZnMe⁺ a pro ZIP300ZnMe⁺ byla hodnota TC₅₀ = 435 μM.
- Časový prostup kationických derivátů byl velmi rychlý. Plateau fáze bylo dosaženo během 12 hodin.
- Hlavním subcelulárním cílem studovaných PS byly lysozomy.

Pomocí fotografické dokumentace s použitím ZIP300ZnMe⁺ byly detekovány výrazné morfologické změny na buňkách. Fotodynamický účinek se projevil změnou tvaru buněk, tvorbou membránových blebů, změnou tvaru mitochondrií a později také změnami na jádře a reorganizací aktinového cytoskeletu.

- Převládajícím typem buněčné smrti detekovanou průtokovou cytometrií se ukázala nekróza, což je v souladu s morfologickými změnami pozorovanými pomocí konfokální mikroskopie.
- Fotosenzitizér ZIP300ZnMe⁺ ukázal velmi slibné vlastnosti pro PDT, proto je vhodný pro další studium.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

AGOSTINIS, P., K. BERG, K. A. CENGEL, T. H. FOSTER, A. W. GIROTTI, S. O. GOLLNICK, S. M. HAHN, M. R. HAMBLIN, A. JUZENIENE, D. KESSEL, M. KORBELIK, J. MOAN, P. MROZ, D. NOWIS, J. PIETTE, B. C. WILSON a J. GOLAB. *Photodynamic therapy of cancer: an update. CA: a cancer journal for clinicians* [online]. 2011, roč. 61, č. 4, s. 250–81 [cit. 2016-02-08]. ISSN 1542-4863. Dostupné z: doi:10.3322/caac.20114

ALLISON, R. R. a C. H. SIBATA. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* [online]. 2010, roč. 7, č. 2, s. 61–75 [cit. 2016-02-15] ISSN 1873-1597. Dostupné z: doi:10.1016/j.pdpdt.2010.02.001

BENOV, L. Photodynamic therapy: current status and future directions. *Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre* [online]. 2015, roč. 24, č. Suppl. 1, s. 14–28 [cit. 2016-02-10]. ISSN 1423-0151. Dostupné z: doi:10.1159/000362416

BUYTAERT, E., M. DEWAELE a P. AGOSTINIS. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochimica et biophysica acta* [online]. 2007, roč. 1776, č. 1, s. 86–107 [cit. 2016-03-09]. ISSN 0006-3002. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbcan.2007.07.001

CASTANO, A. P., T. N. DEMIDOVA a M. R. HAMBLIN. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* [online]. 2004, roč. 1, č. 4, s. 279–93 [cit. 2016-02-08]. ISSN 1572-1000. Dostupné z: doi:10.1016/S1572-1000(05)00007-4

CASTANO, A. P., T. N. DEMIDOVA a M. R. HAMBLIN. Mechanisms in photodynamic therapy: Part three-Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* [online]. 2005a, roč. 2, č. 2, s. 91–106 [cit. 2016-03-08]. ISSN 1572-1000. Dostupné z: doi:10.1016/S1572-1000(05)00060-8

CASTANO, A. P., T. N. DEMIDOVA a M. R. HAMBLIN. Mechanisms in photodynamic therapy: part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* [online]. 2005b, roč. 2, č. 1, s. 1–23 [cit. 2016-03-09]. ISSN 1572-1000. Dostupné z: doi:10.1016/S1572-1000(05)00030-X

CRESCENZI, E., A. CHIAVIELLO, G. CANTI, E. REDDI, B. M. VENEZIANI a G. PALUMBO. Low doses of cisplatin or gemcitabine plus Photofrin/photodynamic therapy:

Disjointed cell cycle phase-related activity accounts for synergistic outcome in metastatic non-small cell lung cancer cells (H1299). *Molecular Cancer Therapeutics* [online]. 2006, roč. 5, č. 3, s. 776-785 [cit. 2016-04-13]. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0425. ISSN 1535-7163. Dostupné z: <http://mct.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1535-7163.MCT-05-0425>

ČESKÝ STATISTICKÝ ÚŘAD. Úmrtí na novotvary [online]. Poslední revize 2014-12-20 [cit. 2016-02-01]. Dostupné z: https://www.czso.cz/csu/czso/13-7222-03--umrti_na_novotvary

HINGORANI, R., J. DENG, J. ELIA, C. MCINTYRE a D. MITTAR. Detection of Apoptosis Using the BD Annexin V FITC Assay on the BD FACSVers[™] System. *BD Biosciences* [online]. 2011 [cit. 2016-04-12]. Dostupné z: https://www.bdbiosciences.com/documents/BD_FACSVerse_Apoptosis_Detection_AppNote.pdf

HOFMANOVÁ, J. Nádorové onemocnění, úvod a základní pojmy. *Genotoxicita a karcinogeneze* [online]. 2013 [cit. 2016-02-01]. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/web/pages/01_nador.html

HUANG, Z., H. XU, A. D. MEYERS, A. I. MUSANI, L. WANG, R. TAGG, A. B. BARQAWI a Y. K. CHEN. Photodynamic therapy for treatment of solid tumors--potential and technical challenges. *Technology in cancer research & treatment* [online]. 2008, roč. 7, č. 4, s. 309–20 [cit. 2016-03-08]. ISSN 1533-0346. Dostupné z: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2593637&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

JOSEFSEN, L. B. a R. W. BOYLE. Unique diagnostic and therapeutic roles of porphyrins and phthalocyanines in photodynamic therapy, imaging and theranostics. *Theranostics* [online]. 2012, roč. 2, č. 9, s. 916–66 [cit. 2016-02-21]. ISSN 1838-7640. Dostupné z: [doi:10.7150/thno.4571](https://doi.org/10.7150/thno.4571)

JUARRANZ, A., J. ESPADA, J. CARLOS STOCKERT, A. VILLANUEVA, S. POLO, V. DOMÍNGUEZ a M. CAÑETE. Photodamage Induced by Zinc(II)-phthalocyanine to Microtubules, Actin, α -Actinin and Keratin of HeLa Cells ¶. *Photochemistry and Photobiology* [online]. 2001, roč. 73, č. 3, s. 283-289 [cit. 2016-05-03]. ISSN 00318655. Dostupné z: [doi: 10.1562/0031-8655\(2001\)0730283PIBZIP2.0.CO2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2001)0730283PIBZIP2.0.CO2).

KAWCZYK-KRUPKA, A., K. WAWRZYNIEC, S. K. MUSIOL, M. POTEMPA, A. M. BUGAJ a A. SIEROŃ. Treatment of localized prostate cancer using WST-09 and WST-11 mediated vascular targeted photodynamic therapy-A review. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* [online]. 2015, roč. 12, č. 4, s. 567–74 [cit. 2016-02-25]. ISSN 1873-1597. Dostupné z:

doi:10.1016/j.pdpdt.2015.10.001

KE, M.-R., J.-D. HUANG a S.-M. WENG. Comparison between non-peripherally and peripherally tetra-substituted zinc (II) phthalocyanines as photosensitizers: Synthesis, spectroscopic, photochemical and photobiological properties. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* [online]. 2009, roč. 201 č. 1, s. 23-31 [cit. 2016-05-01]. ISSN 10106030. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jphotochem.2008.09.011.

KESSEL, D. a M. CASTELLI. Evidence that bcl-2 is the target of three photosensitizers that induce a rapid apoptotic response. *Photochemistry and photobiology* [online]. 2001, roč. 74, č. 2, s. 318–22 [cit. 2016-03-10]. ISSN 0031-8655. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11547571>

LANDRY, J. J. M., P. T. PYL, T. RAUSCH, T. ZICHNER, M. M. TEKKEDIL, A. M. STÜTZ, A. JAUCH, R. S. AIYAR, G. PAU, N. DELHOMME, J. GAGNEUR, J. O. KORBEL, W. HUBER a L. M. STEINMETZ. The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. *G3 (Bethesda, Md.)* [online]. 2013, roč. 3, č. 8, s. 1213–24 [cit. 2016-01-10]. ISSN 2160-1836. Dostupné z: doi:10.1534/g3.113.005777

LEDVINA, M., A. STOKLASOVÁ a J. CERMAN. *Biochemie pro studující medicíny*. Vyd. 2. Praha: Karolinum, 2009, 2 sv. ISBN 978-80-246-1414-4.

MACDONALD, I. J. a T. J. DOUGHERTY. Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines (JPP)* [online]. 2001, roč. 5, č. 2, s. 105–129 [cit. 2016-02-15]. ISSN 1088-4246. Dostupné z: doi:10.1002/jpp.328

MAČÁK, J., J. MAČÁKOVÁ a J. DVOŘÁČKOVÁ. *Patologie*. 2., dopl. vyd. Praha: Grada, 2012, 347 s., [20] s. barev. obr. příl. ISBN 978-80-247-3530-6.

MACHÁČEK, M., A. CIDLINA, V. NOVAKOVA, J. SVEC, E. RUDOLF, M. MILETIN, R. KUČERA, T. SIMUNEK a P. ZIMCIK. Far-red-absorbing cationic phthalocyanine photosensitizers: synthesis and evaluation of the photodynamic anticancer activity and the mode of cell death induction. *Journal of medicinal chemistry* [online]. 2015, roč. 58, č. 4, s. 1736–49 [cit. 2016-04-13]. ISSN 1520-4804. Dostupné z: doi:10.1021/jm5014852

MACHÁČEK, M., J. KOLLÁR, M. MILETIN, R. KUČERA, P. KUBÁT, T. SIMUNEK, V. NOVAKOVA a P. ZIMCIK. Anionic hexadeca-carboxylate tetrapyrazinoporphyrazine: synthesis and in vitro photodynamic studies of a water-soluble, non-aggregating photosensitizer. *RSC Adv* [online]. 2016, roč. 6, č. 12, s. 10064-10077 [cit. 2016-05-05]. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi: 10.1039/C5RA25881B

MAKHSEED, S., M. MACHACEK, W. ALFADLY, A. TUHL, M. VINODH, T. SIMUNEK, V. NOVAKOVA, P. KUBAT, E. RUDOLF a P. ZIMCIK. Water-soluble non-aggregating zinc phthalocyanine and in vitro studies for photodynamic therapy. *Chemical communications (Cambridge, England)* [online]. 2013, B.m.: The Royal Society of Chemistry, roč. 49, č. 95, s. 11149–51 [cit. 2016-04-13]. ISSN 1364-548X. Dostupné z: doi:10.1039/c3cc44609c

MANDA, G., M. T. NECHIFOR a T. M. NEAGU. Reactive Oxygen Species, Cancer and Anti-Cancer Therapies. *Current Chemical Biology* [online]. 2009, roč. 3, č. 1, s. 342–366 [cit. 2016-02-15]. ISSN 18723136. Dostupné z: doi:10.2174/187231309787158271

MINISTERTSVO ZDRAVOTNICTVÍ ČESKÉ REPUBLIKY. Zpráva o zdraví obyvatel České republiky [online]. Praha, 2014 [cit. 2016-02-01]. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/czsp/aktuality/Cesi_ziji_dele_ale_trapi_je_civilizacni_nemoci/Zprava_o_zdravi_obyvatel_CR_.pdf

MOREIRA, L. M., F. VIEIRA DOS SANTOS, J. P. LYON, M. MAFTOUM-COSTA, C. PACHECO-SOARES a N. SOARES DA SILVA. Photodynamic Therapy: Porphyrins and Phthalocyanines as Photosensitizers. *Australian Journal of Chemistry* [online]. 2008, roč. 61, č. 10, s. 741-754 [cit. 2016-01-15]. ISSN 0004-9425. Dostupné z: doi:10.1071/CH08145

MROZ, P., A. YAROSLAVSKY, G. B. KHARKWAL a M. R. HAMBLIN. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers* [online]. 2011, roč. 3, č. 2, s. 2516–39 [cit. 2016-01-15]. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers3022516

MÜLLEROVÁ, D. *Hygiena, preventivní lékařství a veřejné zdravotnictví*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2014, 254 s. ISBN 978-80-246-2510-2.

NAGATA, S., A. OBANA, Y. GOHTO a S. NAKAJIMA. Necrotic and apoptotic cell death of human malignant melanoma cells following photodynamic therapy using an amphiphilic photosensitizer, ATX-S10(Na). *Lasers in surgery and medicine* [online]. 2003, roč. 33, č. 1, s. 64–70. [cit. 2016-03-09]. ISSN 0196-8092. Dostupné z: doi:10.1002/lsm.10190

NOWIS, D., T. STOKŁOSA, M. LEGAT, T. ISSAT, M. JAKÓBISIAK a J. GOŁĄB. The influence of photodynamic therapy on the immune response. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* [online]. 2005, roč. 2, č. 4, s. 283–98 [cit. 2016-03-08]. ISSN 1572-1000. Dostupné z: doi:10.1016/S1572-1000(05)00098-0

ODA, K., S.-I. OGURA a I. OKURA. Preparation of a water-soluble fluorinated zinc phthalocyanine and its effect for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [online]. 2000, roč. 59, č. 1-3, s. 20-25 [cit. 2016-05-01]. ISSN 10111344. Dostupné z: doi: 10.1016/S1011-1344(00)00129-9.

ORMOND, A. a H. FREEMAN. Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. *Materials* [online]. 2013, B.m.: Multidisciplinary Digital Publishing Institute, roč. 6, č. 3, s. 817–840 [cit. 2016-02-21]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma6030817

PLAETZER, K., T. KIESSLICH, T. VERWANGER a B. KRAMMER. The Modes of Cell Death Induced by PDT: An Overview. *Medical Laser Application* [online]. 2003, roč. 18, č. 1, s. 7–19 [cit. 2016-03-09]. ISSN 16151615. Dostupné z: doi:10.1078/1615-1615-00082

PLAETZER, K., B. KRAMMER, J. BERLANDA, F. BERR a T. KIESSLICH. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers in medical science* [online]. 2009, roč. 24, č. 2, s. 259–68 [cit. 2016-02-20]. ISSN 0268-8921. Dostupné z: doi:10.1007/s10103-008-0539-1

RACEK, J. *Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění*. 1. vyd. Praha: Galén, 2003, 89 s. Repetitorium, sv. 6. ISBN 80-7262-231-5.

REINERS, J. J. Jr., P. AGOSTINIS, K. BERG, N. L. OLEINICK a D. KESSEL. Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy. *Autophagy*. [online]. 2010, roč. 6, č. 1, s. 7–18. [cit. 2016-03-09]. ISSN 1554-8635. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19855190>

REPETTO, G., A. DEL PESO a J. L. ZURITA. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature protocols* [online]. 2008, roč. 3, č. 7, s. 1125–31 [cit. 2016-01-10]. ISSN 1750-2799. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2008.75

ROBERTSON, C. A., D. H. EVANS a H. ABRAHAMSE. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* [online]. 2009, roč. 96, č. 1, s. 1–8 [cit. 2016-02-20]. ISSN 1873-2682. Dostupné z: doi:10.1016/j.jphotobiol.2009.04.001

SHARMAN, W. M., C. M. ALLEN a J. E. VAN LIER. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discovery Today* [online]. 1999, roč. 4, č. 11, s. 507–517 [cit. 2016-02-15]. ISSN 13596446. Dostupné z: doi:10.1016/S1359-6446(99)01412-9

SCHUMACKER, P. T. Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. *Cancer cell* [online]. 2006, roč. 10, č. 3, s. 175–6 [cit. 2016-02-10]. ISSN 1535-6108. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccr.2006.08.015

STRŽÍTESKÝ, Jan. *Patologie: [učebnice pro zdravotnické školy a bakalářské studium]*. Vyd. 1. Olomouc: Epava, 2001, 338 s. ISBN 978-80-86297-06-4.

UZDENSKY, A., E. KOLPAKOVA, A. JUZENIENE, P. JUZENAS a J. MOAN. The effect of sub-lethal ALA-PDT on the cytoskeleton and adhesion of cultured human cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. 2005, roč. 1722, č. 1, s. 43-50 [cit. 2016-05-03]. ISSN 03044165. Dostupné z: doi: 10.1016/j.bbagen.2004.11.011.

VACHOVA, L., M. MACHACEK, R. KUČERA, J. DEMUTH, P. CERMAK, K. KOPECKY, M. MILETIN, A. JEDLICKOVA, T. SIMUNEK, V. NOVAKOVA a P. ZIMCIK. Heteroatom-substituted tetra(3,4-pyrido)porphyrazines: a stride toward near-infrared-absorbing macrocycles. *Organic & biomolecular chemistry* [online]. 2015, B.m.: The Royal Society of Chemistry, roč. 13, č. 20, s. 5608–12 [cit. 2016-04-13]. ISSN 1477-0539. Dostupné z: doi:10.1039/c5ob00651a

YOON, I., J. Z. LI a Y. K. SHIM. Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. *Clinical endoscopy* [online]. 2013, roč. 46, č. 1, s. 7–23 [cit. 2016-02-10]. ISSN 2234-2400. Dostupné z: doi:10.5946/ce.2013.46.1.7

ZIMČÍK, P. a M. MILETIN. Photodynamic therapy. In: Lang, A. R. (ed.). *Dyes and pigments: new research*. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2009, s. 1-62. ISBN 1606920278.

ZIMČÍK, P., M. MILETIN, H. RADILOVA, V. NOVAKOVA, K. KOPECKY, J. SVEC a E. RUDOLF. Synthesis, properties and in vitro photodynamic activity of water-soluble azaphthalocyanines and azanaphthalocyanines. *Photochemistry and photobiology* [online]. 2010, roč. 86, č. 1, s. 168–75 [cit. 2016-04-13]. ISSN 1751-1097. Dostupné z: doi:10.1111/j.1751-1097.2009.00647.x