

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

**HODNOCENÍ FOTODYNAMICKÉ AKTIVITY
DERIVÁTŮ TETRAPYRIDOPORPHYRAZINU PRO
LÉČBU NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Miloslav Macháček, Ph.D.

Hradec Králové, 2017

Martina Půlkrábková

„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 řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne.....

podpis.....

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Mgr. Miloslavu Macháčkovi, Ph.D., za odborné vedení, přátelský přístup, cenné rady, trpělivost a čas, který mi věnoval při vypracování této práce. Mé poděkování patří i kolektivu Katedry biochemických věd za vytvoření příjemného pracovního prostředí v laboratořích a vědecké skupině doc. Zimčíka z Katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv za spolupráci.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Martina Půlkrábková

Školitel: Mgr. Miloslav Macháček, Ph.D.

Název diplomové práce:

Hodnocení fotodynamické aktivity derivátů tetrapyridoporphyrinu pro léčbu nádorových onemocnění.

Nádorová onemocnění jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí, především v průmyslově vyspělých zemích. Pro jejich efektivnější léčbu je žádoucí vyvíjet nové potenciální protinádorově účinné látky a terapeutické metody. Fotodynamická terapie (PDT) je klinicky schválená metoda pro léčbu nádorových i některých dalších onemocnění. Jejími hlavními přednostmi jsou neinvazivita a potenciální vysoká selektivita k cílovým buňkám, což ji odlišuje od současných konvenčních metod protinádorové léčby (chemoterapie, radioterapie).

Účinek PDT je založen na kombinaci tří účinných složek – molekulárního kyslíku, světla a fotosenzitizéru (PS). Tyto látky jsou samy o sobě netoxické, v kombinaci ovšem mohou vytvářet reaktivní formy kyslíku (ROS). ROS pak v cílových buňkách významně poškozují buněčné struktury, což může vyústit až ve smrt buňky. PS je látka schopná absorbovat světlo o vhodné vlnové délce a přijatou energii následně přenést na okolní molekuly, především právě na molekulární kyslík. Kromě přímého toxického účinku na nádorové buňky se na efektu PDT podílí také poškození cév zásobujících nádor a vyvolání imunitní odpovědi organismu.

V této práci je hodnocena aktivita nových potenciálních PS vycházejících z ftalocyaninů a azaftalocyaninů (P39-1Zn-Me, ZIP252Zn-Me, ZIP280Zn, ZIP288-OHZn). Studovány byly i dvě látky, které jsou určeny pro klinické použití při PDT (Photosens[®], methylenová modř). Hodnocení PS probíhalo *in vitro* na nádorové buněčné línii HeLa. Byla stanovena aktivita uvedených látek po expozici aktivujícím záření i jejich vlastní toxicita bez aktivace světlem a stanoven poměr TC₅₀/EC₅₀. Nejlepších výsledků dosahovaly kationické deriváty P39-1Zn-Me a ZIP252Zn-Me.

Vyznačovaly se relativně vysokou toxicitou po ozáření (až desítky nM) a nízkou toxicitou bez ozáření (stovky μM); u P39-1Zn-Me se vlastní toxicita neprojevila ani po dosažení limitu rozpustnosti v médiu.

U nových PS byla dále určována jejich subcelulární lokalizace po akumulaci v buňkách pomocí fluorescenční mikroskopie. Všechny látky se primárně lokalizovaly v lyzosomech. U nejúčinnějšího PS P39-1Zn-Me byly dokumentovány také morfologické změny, které v buňkách probíhaly po fotoaktivaci této látky. Toto hodnocení probíhalo za použití PS v koncentracích odpovídajících EC_{15} a EC_{85} ; jako kontrola byly použity buňky, které nebyly vystaveny působení PS. Tvorba ROS vedla u buněk s PS k rozsáhlému poškození buněčných membrán s tvorbou membránových blebů, dále bylo možné pozorovat změnu tvaru mitochondrií, zhuštění jaderného chromatinu a fragmentaci jádra a reorganizaci cytoskeletu. Pozorované morfologické změny jevíly známky nekrotické smrti buněk, u některých buněk ale byly pozorovány změny, které mohou naznačovat probíhající apoptózu.

U PS P39-1Zn-Me byl stanoven i časový průběh tvorby ROS pomocí metody využívající DCF. Hodnocen byl fluorescenční signál vznikající v buňkách v závislosti na množství produkovaných ROS před, během a po ozařování světlem. Z výsledků je zřejmé, že při ozáření buněk obsahujících PS dochází k masivní produkci ROS, zatímco před ozařováním a po jeho ukončení je jejich tvorba minimální.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Martina Půlkrábková

Supervisor: Mgr. Miloslav Macháček, Ph.D.

Title of diploma thesis:

Evaluation of photodynamic activity of tetrapyrroldiporphyrin derivatives for treatment of tumorous diseases.

Cancerous diseases are one of the most common causes of death, especially in industrialized countries. Their more effective treatment requires development of new potential anti-tumor agents and therapeutic methods. Photodynamic therapy (PDT) is a clinically approved method for the treatment of both tumorous and some other diseases. Its main advantages are non-invasiveness and potential for high selectivity to target cells, which distinguishes it from current conventional anticancer treatments (chemotherapy, radiotherapy).

The effect of PDT is based on a combination of three effective components - molecular oxygen, light and photosensitizer (PS). These substances are inherently non-toxic, but they can form reactive oxygen species (ROS) if combined. Then, ROS significantly damages cellular structures in target cells, which can result in cell death. PS is a substance capable of absorbing light of suitable wavelength and transferring the received energy to surrounding molecules, to molecular oxygen in particular. In addition to the direct toxic effect on tumour cells, damage to the tumour vasculature and induction of the immune response are also involved in the PDT effect.

In this diploma thesis, the photodynamic activities of new potential PSs from the group of azaphthalocyanines and phthalocyanines (P39-1Zn-Me, ZIP252Zn-Me, ZIP280Zn, ZIP288-OHZn) are evaluated. Two substances, meant for clinical practice in PDT (Photosens[®], methylene blue), were also studied. PSs evaluation was performed *in vitro* on the HeLa tumor cell line. The activity of these substances after exposure to the activating radiation (phototoxicity) as well as their own toxicity without activation by light (dark toxicity) was determined together with TC_{50}/EC_{50} ratio. Cationic derivatives

P39-1Zn-Me and ZIP252Zn-Me achieved the best results. They showed a relatively high toxicity after irradiation (up to 10^{-2} μ M range) and low toxicity without irradiation (10^2 μ M range); P39-1Zn-Me did not show toxicity even after reaching the solubility limit in the cell culture medium.

Subcellular localization of new PSs after accumulation in cells was determined by fluorescence microscopy. All of the substances were primarily localized to the lysosomes. In the case of the most potent PS P39-1Zn-Me, morphological changes occurred in cells after photoactivation of this substance were also documented. This evaluation was performed using PS in concentrations corresponding to their EC_{15} and EC_{85} ; cells which were not exposed to PS were used for control. The formation of ROS resulted in massive cell membrane damage with membrane blebbing, a change in the shape of the mitochondria, condensation of the nuclear chromatin and fragmentation of the nucleus, and reorganization of the cytoskeleton. Observed morphological changes indicated necrotic cell death, however some cells showed changes that could indicate apoptosis.

For PS P39-1Zn-Me, the time course of ROS creation was determined by DCF assay. Fluorescence signal generated in cells was evaluated, depending on the amount of ROS produced before, during and after light irradiation. From the results obtained, it is obvious that the ROS mass production occurs when cells containing PS are irradiated, whereas their production is minimal before and after the irradiation.

OBSAH

ABSTRAKT	3
ABSTRACT.....	5
Obsah	7
1. Úvod.....	11
2. Teoretická část	12
2.1. Nádorová onemocnění	12
2.1.1. Charakteristika	12
2.1.2. Vznik nádoru.....	12
2.1.3. Rozdělení nádorů	12
2.1.4. Výskyt nádorových onemocnění	13
2.2. Fotodynamická terapie	13
2.2.1. Molekulární mechanismus PDT	14
2.3. Reaktivní formy kyslíku, oxidační stres.....	16
2.3.1. Význam ROS v organismu	16
2.3.2. Oxidační stres	17
2.3.3. Singletový kyslík, $^1\text{O}_2$	18
2.3.4. Superoxidový anion radikál, $\cdot\text{O}_2^-$	18
2.3.5. Peroxid vodíku, H_2O_2	18
2.3.6. Hydroxylový radikál, $\cdot\text{OH}$	19
2.4. Světlo.....	19
2.4.1. Princip optického okna	19
2.5. Fotosenzitizéry	20
2.5.1. Struktura a vlastnosti PS	20
2.5.2. Ideální fotosenzitizér.....	22
2.5.3. První generace fotosenzitizérů.....	22

2.5.4.	Druhá generace fotosenzitizérů	23
2.5.4.1.	Porfyriny.....	24
2.5.4.2.	Chloriny.....	26
2.5.4.3.	Bakteriochloriny	28
2.5.4.4.	Feoforbidy	29
2.5.4.5.	Ftalocyaniny a naftalocyaniny.....	30
2.5.4.6.	Porfyceny.....	33
2.5.4.7.	Texafyriny	34
2.5.4.8.	Ostatní struktury	35
2.5.5.	Třetí generace fotosenzitizérů.....	36
2.6.	Účinky PDT na nádorové buňky.....	37
2.6.1.	Přímé poškození buněk.....	37
2.6.1.1.	Lyzosomy	38
2.6.1.2.	Mitochondrie	38
2.6.1.3.	Další cíle v buňce	39
2.6.2.	Poškození cévního zásobení nádoru	39
2.6.3.	Imunitní reakce na PDT	40
2.7.	Fotodynamická terapie a buněčná smrt.....	41
2.7.1.	Apoptóza.....	42
2.7.1.1.	Vnější cesta apoptózy	42
2.7.1.2.	Vnitřní cesta apoptózy.....	42
2.7.1.3.	Apoptóza při PDT.....	43
2.7.2.	Nekróza.....	44
2.7.3.	Autofagie	45
3.	Cíle práce	47
4.	Experimentální část.....	48
4.1.	Vybavení pro práci s buněčnou linií	48

4.1.1.	Pracovní pomůcky pro manipulaci	48
4.1.2.	Pracovní přístroje	48
4.1.3.	Použité chemické látky a reagenty	49
4.2.	Práce s nádorovou buněčnou linií HeLa	50
4.2.1.	Příprava média pro kultivaci buněk	50
4.2.2.	Kultivace	50
4.2.3.	Pasážování	51
4.2.4.	Stanovení počtu životaschopných buněk	51
4.2.5.	Nasazování buněk	52
4.3.	Studované fotosenzitizéry	52
4.4.	Cytotoxické experimenty	54
4.4.1.	Hodnocení fototoxicity	55
4.4.2.	Hodnocení dark toxicity	55
4.4.3.	Vyhodnocení experimentů - stanovení životaschopnosti buněk	56
4.5.	Fotografická dokumentace	57
4.5.1.	Subcelulární lokalizace	57
4.5.2.	Morfologické změny na živých buňkách	58
4.5.3.	Morfologické změny na fixovaných buňkách	58
4.6.	Tvorba ROS	59
5.	Výsledky	60
5.1.	Cytotoxické experimenty	60
5.1.1.	Fotosenzitizér P39-1Zn-Me	61
5.1.1.1.	Fototoxicita	61
5.1.1.2.	Dark toxicita	61
5.1.2.	Fotosenzitizér ZIP252Zn-Me	62
5.1.2.1.	Fototoxicita	62
5.1.2.2.	Dark toxicita	63

5.1.3.	Fotosenzitizér ZIP280Zn	64
5.1.3.1.	Fototoxicita.....	64
5.1.3.2.	Dark toxicita	65
5.1.4.	Fotosenzitizér Photosens [®]	66
5.1.4.1.	Fototoxicita.....	66
5.1.4.2.	Dark toxicita	67
5.1.5.	Fotosenzitizér methylenová modř.....	68
5.1.5.1.	Fototoxicita.....	68
5.1.5.2.	Dark toxicita	69
5.1.6.	Fotosenzitizér ZIP288-OHZn	70
5.1.7.	Porovnání cytotoxicitních výsledků stanovovaných fotosenzitizérů.....	70
5.2.	Fotografická dokumentace	71
5.2.1.	Subcelulární lokalizace	71
5.2.2.	Morfologické změny	76
5.3.	Tvorba ROS	83
6.	Diskuze	84
7.	Závěry	88
	Seznam zkratk	89
	Seznam použité literatury	92

1. ÚVOD

V této své práci na téma „Hodnocení fotodynamické aktivity derivátů tetrapyridoporphyrinu pro léčbu nádorových onemocnění“ se zabývám fotodynamickou terapií (PDT) – moderní metodou léčby nádorových i některých dalších onemocnění. Pro účinek PDT jsou klíčové tři komponenty – kyslík, světlo a fotosenzitizér (PS), které společně dokážou vytvářet vysoce reaktivní formy kyslíku (ROS). Ty mohou uvnitř cílových buněk poškodit životně důležité struktury a způsobit buněčnou smrt.

V teoretické části práce se zaměřuji na obecnou charakteristiku PDT a jejich jednotlivých složek. Dále uvádím, jakými mechanismy a účinky může PDT na nádorové buňky působit. PDT může cílové buňky poškozovat přímým cytotoxickým účinkem, může narušit cévní zásobení nádoru nebo vyvolat reakci imunitního systému proti nádoru. Také se věnuji charakteristice způsobů buněčné smrti, kterým může buňka po podstoupení PDT podlehnout.

Jednou z hlavních složek PDT je PS. Dosud byly připraveny PS různých struktur s různou mírou účinku. Ve své práci uvádím příklady PS, které jsou požívány v klinické praxi nebo procházejí klinickým hodnocením. V současnosti je syntetizováno a zkoumáno velké množství látek s potenciálním využitím jako PS v PDT. Vzhledem k nesporným výhodám PDT (minimální invazivita, možnost selektivního cílení pouze na nádorové buňky) má tato metoda potenciál předčít konvenční způsoby terapie nádorových onemocnění (chemoterapie, radioterapie, chirurgické zákroky).

V této práci hodnotím fotodynamickou účinnost nově syntetizovaných PS odvozených od struktury ftalocyaninu a jejich dusíkatých izosterů, azaftalocyaninů, a také dvou PS určených pro klinické použití. Prokázání aktivity těchto nových látek může později vést k dalšímu, podrobnějšímu studiu jejich účinnosti.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ

2.1.1. Charakteristika

Termínem nádor (tumor, novotvar) označujeme neregulovaný růst tkáně, jejíž buňky se vymkly kontrolním mechanismům organismu. Nádorové buňky přestávají reagovat na faktory usměrňující buněčný cyklus a dochází k nevratným změnám tkáně (Mačák a Mačáková 2004).

2.1.2. Vznik nádoru

Vznik nádoru (karcinogeneze) je komplexní proces, na jehož počátku je poškození buněčné DNA (mutace). Pro rozvoj nádoru se musí vyskytnout mutace ve více genech kontrolujících růst buňky. Nejdůležitější z tohoto hlediska jsou protoonkogeny a tumor-supresorové geny. První zmíněné podporují buněčný růst, druhé jej inhibují. Při akumulaci poškození těchto genů dochází k nádorové transformaci buňky vedoucí k neregulované proliferaci, ztrátě diferenciaci a poruše apoptózy (Nečas 2009, Hofmanová 2013).

Rozvoj nádoru podněcuje značné množství faktorů, z nichž převládající jsou faktory vnějšího prostředí. Patří mezi ně chemické látky (látky z cigaretového kouře, aromatické uhlovodíky, aflatoxiny atd.), fyzikální faktory (RTG a UV záření) nebo některé viry (lidské papilomaviry, virus Epstein-Baarové) (Povýšil a Šteiner 2011). Z dalších faktorů lze uvést genetické vlivy či hormonální nerovnováhu - např. zvýšené hladiny estrogenů (Mačák a Mačáková 2004).

2.1.3. Rozdělení nádorů

Podle biologických vlastností dělíme nádory na benigní, maligní a intermediární. Benigní nádory rostou pomalu, jsou ohraničené, většinou snadno operovatelné a netvoří metastázy. Oproti tomu maligní nádory rostou rychle, invazivně (do okolní tkáně) a nejsou přesně ohraničené. Není snadné je vyoperovat a mohou metastazovat do jiných

orgánů. Přejchod mezi těmito dvěma typy tvoří nádory intermediární, které mají lepší prognózu než nádory maligní, ale mohou recidivovat a případně tvořit metastázy.

Dále se nádory dělí podle původu, tedy podle tkáně, ze které vycházejí, a to na mezenchymové, epitelové, neuroektodermové, smíšené a některé další (Povýšil a Šteiner 2011, Mačák a Mačáková 2004).

2.1.4. Výskyt nádorových onemocnění

Nádorová onemocnění jsou 2. nejčastější příčinou úmrtí v ČR. Ročně na ně umírá přes 27 tisíc osob. Celková incidence neustále roste a je způsobena především stárnutím obyvatelstva a současným životním stylem. Naopak mortalita mírně klesá, a to v důsledku zvyšující se kvality léčby a včasnějším zachytům onemocnění díky screeningovým programům (Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR 2014). Celosvětově pak na nádorová onemocnění zemře odhadem 8,8 milionu lidí ročně (údaje za rok 2015), což činí jedno z každých šesti úmrtí (World Health Organization 2017).

2.2. FOTODYNAMICKÁ TERAPIE

PDT je minimálně invazivní terapeutická metoda, klinicky schválená a používaná k léčbě nádorových i některých nemaligních onemocnění (Agostinis et al. 2011, Juarranz et al. 2008). Její princip je znám už více než sto let, ale teprve v poslední době začíná být využívána ve větší míře (Castano et al. 2004). V současné době se používá nejen v onkologii, ale i v dalších oborech jako je dermatologie, oční lékařství, imunologie či revmatologie (Wilson a Patterson 2008), uplatnění nachází též v kardiologii nebo léčbě rezistentních infekcí (Benov 2015).

Princip PDT tkví v použití tří základních složek: PS, viditelné světlo a molekulární kyslík ($^3\text{O}_2$). Tyto komponenty nejsou samy nijak toxické, ale při společném použití vyvolávají fotochemické reakce, při kterých vzniká singletový kyslík ($^1\text{O}_2$) a další ROS. Tyto poté poškozují ozářenou buňku obsahující PS a způsobují její zánik skrze buněčnou smrt (nejčastěji apoptózou či nekrózou) (Agostinis et al. 2011).

U PDT jsou klíčové dva kroky: podání PS systémově nebo lokálně a po určitém čase (minuty až dny) ozáření léčené tkáně viditelným světlem, zpravidla červeným spektrem o vlnové délce odpovídající absorpčnímu pásu PS. Selektivita metody je dána mírou schopnosti PS kumulovat se v cílových buňkách a také přesným ozářením léčené tkáně (Castano et al. 2004, Wilson a Patterson 2008).

Protinádorový efekt PDT se odvozuje od tří vzájemně propojených mechanismů: přímého poškození nádorových buněk, poškození cévního zásobení nádoru a vyvolání zánětlivé reakce organismu, která může vést k vytvoření systémové imunity (Agostinis et al. 2011, Benov 2015).

Pro úspěch PDT u daného onemocnění je klíčové určení vhodného typu a dávky PS, čas mezi podáním PS a expozicí záření, celková dávka ozáření a jeho intenzita, umístění nádoru a koncentrace kyslíku v léčeném místě. Nalezení optimálních podmínek PDT je poměrně složité (Agostinis et al. 2011). Hlavními výhodami PDT je nízká systémová toxicita (PS je aktivován světlem pouze v ozařované oblasti), selektivita a možnost využití PDT nezávisle na konvenčních terapeutických metodách (chemoterapie, radioterapie, chirurgický zákrok, imunoterapie). Chybí také vedlejší účinky chemoterapie či radioterapie i riziko potenciálně karcinogenního poškození DNA – klinicky používané PS se nelocalizují do buněčného jádra (Juarranz et al. 2008, Agostinis et al. 2011).

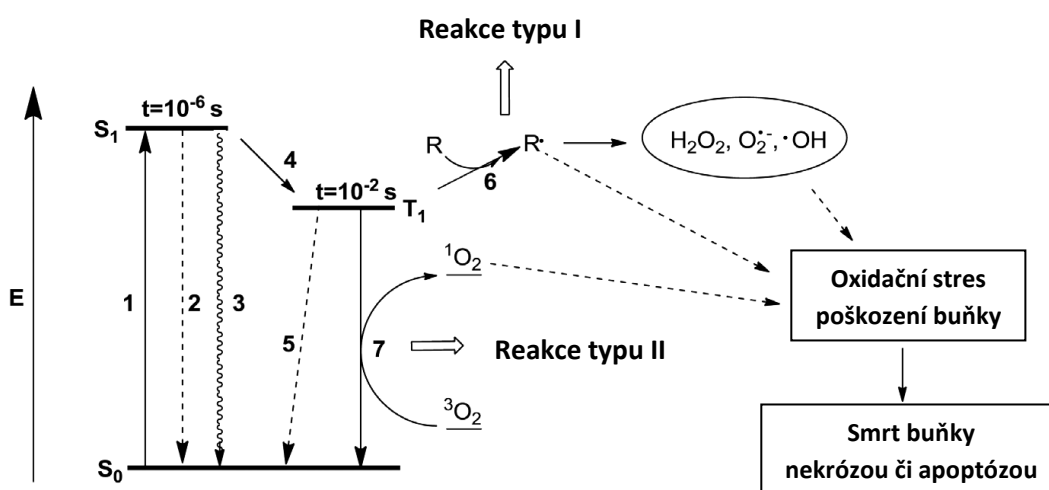
2.2.1. Molekulární mechanismus PDT

Při PDT jsou zásadní dva momenty: absorpce světla PS a následný přenos energie na další molekuly v buňce, nejčastěji na $^3\text{O}_2$ (Castano et al. 2004).

PS se v buňce nachází v základním singletovém stavu, ve kterém má dva elektrony s opačným spinem v molekulovém orbitalu s nízkou energií. Po absorpci světelné energie příslušné vlnové délky je jeden z elektronů excitován do orbitalu s vyšší energií, jeho spin ale zůstává neměnný. Tuto formu PS nazýváme excitovaný singletový stav a je velmi nestabilní (životnost řádově nanosekundy). Z tohoto excitovaného stavu může PS přejít do základního stavu emisí fluorescenčního záření či přeměnou na teplo. Může ale také dojít k tzv. mezisystémovému přechodu, kdy se změní spin excitovaného elektronu. Tato forma se označuje jako excitovaný tripletový

stav a je o něco stabilnější (řádově mikrosekundy). Oba elektrony jsou při ní v paralelním uspořádání. Následně dochází k přechodu do základního stavu buď emisí světla (fosforescence) nebo předáním energie jiné molekule (Robertson et al. 2009, Yoon et al. 2013, Yano et al. 2011).

Přechod PS z excitovaného tripletového stavu do základního probíhá dvěma základními typy reakcí, označovanými jako typ I a II. Při reakci typu I reaguje PS přímo s organickými molekulami, dochází k přenosu protonu či elektronu a vzniku radikálů, které mohou reakcí s kyslíkem vytvářet ROS poškozující buňku. Reakcí typu II dochází k přenosu energie z tripletového stavu PS na $^3\text{O}_2$ a vzniká vysoce reaktivní $^1\text{O}_2$. Oba typy reakcí mohou probíhat současně, jejich poměr závisí především na použitém PS a koncentraci substrátu a kyslíku v buňce (Macdonald a Dougherty 2001, Robertson et al. 2009). Předpokládá se ovšem, že fotoreakce typu II převažují (Agostinis et al. 2011). Všechny tyto děje jsou znázorněny na Obr. 1.



Obr. 1 Grafické znázornění fotofyzikálních a fotochemických reakcí při PDT: 1) absorpce, 2) fluorescence, 3) konverze na teplo, 4) mezisystémový přechod, 5) fosforescence, 6) tvorba volných radikálů reakcí typu I, 7) tvorba singletového kyslíku; S_0 – základní singletový stav, S_1 – excitovaný singletový stav, T_1 – excitovaný tripletový stav, R – biologický substrát, H_2O_2 , $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$ – reaktivní formy kyslíku, $^3\text{O}_2$ - molekulární kyslík, $^1\text{O}_2$ – singletový kyslík. Převzato z (Yoon et al. 2013).

Vzniklý $^1\text{O}_2$ je velmi reaktivní a okamžitě po svém vzniku atakuje okolní molekuly (životnost < 40 ns). Podobně tak působí některé další ROS, např. hydroxylový radikál ($\cdot\text{OH}$). Proto mohou být PDT ovlivněny a poškozeny pouze buněčné struktury ležící v bezprostřední blízkosti místa vzniku těchto molekul (akční rádius $^1\text{O}_2$ je cca 20 nm), nejčastěji to jsou tedy struktury obsahující PS (Robertson et al. 2009, Castano et al. 2004).

2.3. REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU, OXIDAČNÍ STRES

Jak bylo řečeno, kyslík, resp. ROS jsou zodpovědné za mechanismus účinku PDT a destrukci buněčných komponent. Jako ROS označujeme volné kyslíkové radikály (tedy sloučeniny vzniklé z molekulárního kyslíku a obsahující nepárový elektron) a dále některé neradikálové molekuly, ze kterých mohou volné radikály vznikat (Ledvina et al. 2009). Mezi nejdůležitější ROS řadíme superoxidový anion radikál ($\cdot\text{O}_2^-$), peroxid vodíku (H_2O_2), $\cdot\text{OH}$ a $^1\text{O}_2$.

2.3.1. Význam ROS v organismu

ROS jsou pro některé děje v organismu nezbytné. Účastní se metabolismu mnoha endogenních i exogenních látek. Přírodně jsou produkovány v buňkách v dýchacím řetězci při využívání kyslíku mitochondriemi - jsou mezistupněm v metabolizaci molekulárního kyslíku na vodu. Slouží jako signalizační molekuly v mnoha fyziologických funkcích, jako je např. udržování krevního tlaku. Důležitou roli hrají v imunitní reakci organismu – vznikají ve fagocytujících buňkách a napomáhají likvidaci cizorodých částic (Mandelker 2009, Ledvina et al. 2009).

Častěji ale mluvíme o negativním významu ROS. Při jejich nadměrné produkci dochází k řetězovým reakcím, které vedou k poškození různých makromolekul, především lipidů, bílkovin, nukleových kyselin či sacharidů (Nečas 2009, Turrens 2003).

V případě oxidačního poškození lipidů (tzv. lipoperoxidace) dochází k peroxidaci v místě násobné vazby nenasycených mastných kyselin. Nejvýznamnější je v tomto směru poškození fosfolipidové dvojvrstvy biologických membrán, které vede

ke změně jejich permeability (Ledvina et al. 2009, Nečas 2009). Mezi produkty peroxidace lipidů patří vysoce aktivní 4-hydroxy-2-nonenal, který se může kovalentně vázat s nukleofilními skupinami proteinů, nukleových kyselin a dalších lipidů. Tyto změny (probíhající především v mitochondriích) mají prokázanou souvislost se vznikem a progresí nádorových onemocnění (Zhong a Yin 2015).

K oxidačnímu poškození proteinů dochází díky jejich hojnému zastoupení v buňkách poměrně snadno. Dochází k jejich fragmentaci, zvýšení hydrofobicity, změně konformace či zesíťování a následné agregaci. Vznikají peroxidované proteiny, které mohou řetězovou reakcí oxidovat další molekuly. Významná je oxidace thiolových skupin cysteinu (a příp. methioninu), která vede ke změně či ztrátě funkce enzymů (Davies 2016).

Působení ROS na DNA může způsobit zlomy řetězců, modifikaci jednotlivých nukleotidových bazí či deoxyribózy a příčné propojení bazí. Tato poškození mohou vést ke změnám transkripce, indukci buněčné signalizace a poruše replikace, což může vyústit až v karcinogenezi (Valko et al. 2006).

2.3.2. Oxidační stres

Oxidační stres je stav, kdy dochází k významné poruše rovnováhy mezi vznikem ROS a antioxidačními obrannými mechanismy buňky či organismu ve prospěch ROS. Hladina ROS stoupá např. při intoxikaci, hypoxii či zánětlivých procesech (Mandelker 2009).

Proti zvýšené hladině ROS působí enzymové i neenzymové antioxidační systémy. Příkladem jsou enzymy superoxidodismutasy (SOD) či glutathionperoxidasa (GPx), z neenzymových pak vitamin C a E, β -karoten nebo koenzym Q₁₀ (Ledvina et al. 2009). Snížená hladina těchto antioxidačních systémů taktéž přispívá k oxidačnímu stresu (Lushchak 2014).

Vystavení oxidačnímu stresu (krátkodobě, ale hlavně chronicky) vede prokazatelně ke vzniku řady onemocnění. Patří mezi ně např. diabetes mellitus, některá kardiovaskulární a neurodegenerativní onemocnění, plicní emfyzém a nádorová onemocnění. Oxidační stres sehrává také významnou roli při stárnutí organismu (Ledvina et al. 2009).

2.3.3. Singletový kyslík, $^1\text{O}_2$

Reaktivní molekula $^1\text{O}_2$ vzniká přijetím energie a excitací z molekulárního kyslíku. Ten obsahuje dva nepárové elektrony s paralelním spinem; je tedy biradikál, ale ne příliš reaktivní. Excitací dochází ke změně spinu jednoho z elektronů a vzniklý $^1\text{O}_2$ může velmi rychle reagovat s okolními molekulami (Turrens 2003). Při PDT je produkován fotoreakcí typu II a je považován za převažující cytotoxické činidlo. Míra produkce $^1\text{O}_2$ se vyjadřuje empiricky pro každý PS jako kvantový výtěžek $^1\text{O}_2$ (Φ_Δ) a udává počet molekul $^1\text{O}_2$ vyprodukovaných PS po absorpci energie jednoho fotonu (Macdonald a Dougherty 2001).

2.3.4. Superoxidový anion radikál, $\cdot\text{O}_2^-$

Jednoelektronovou redukcí $^3\text{O}_2$ vzniká $\cdot\text{O}_2^-$. Sám o sobě není příliš reaktivní, i když určité oxidační poškození způsobit může. Hlavně ale působí jako prekurzor dalších ROS (Castano et al. 2004). Superoxid spontánně podléhá dismutaci – reakci dvou molekul $\cdot\text{O}_2^-$ za vzniku H_2O_2 a $^3\text{O}_2$. V buňkách je tato reakce urychlována enzymem SOD (Nečas 2009). Kromě H_2O_2 může $\cdot\text{O}_2^-$ vytvářet i další ROS – reakcí s $\cdot\text{OH}$ vzniká $^1\text{O}_2$, s oxidem dusnatým ($\cdot\text{NO}$) může vytvářet další velmi reaktivní molekulu, peroxyinitrit (OONO^\cdot) (Castano et al. 2004).

2.3.5. Peroxid vodíku, H_2O_2

Peroxid vodíku představuje důležitou biologickou molekulu. Je produkován činností mnoha enzymů a je nezbytný při různých funkcích organismu, např. při vytváření hormonů štítné žlázy (Mandelker 2009). Je méně reaktivní než $\cdot\text{O}_2^-$, ze kterého vzniká, a z organismu je přirozeně odstraňován pomocí enzymů katalasy a GPx za vzniku vody a kyslíku. V přítomnosti iontů Fe^{2+} však může z H_2O_2 vznikat tzv. Fentonovou reakcí velmi reaktivní $\cdot\text{OH}$ (Nečas 2009). Ten může peroxid vodíku vytvářet také reakcí se superoxidem, potom mluvíme o Haber-Waissově reakci. V neutrofilech se pak reakcí $\cdot\text{OH}$ s chloridy katalyzovanou myeloperoxidasou tvoří silně oxidační chlornany (Ledvina et al. 2009).

2.3.6. Hydroxylový radikál, ·OH

·OH je jedním z nejsilnějších přírodních oxidantů (Turrens 2003). Vzniká výše zmíněnými reakcemi z H₂O₂ za přítomnosti redukováných kovů, nejčastěji Fe²⁺. Je vysoce reaktivní a podobně jako ¹O₂ má velmi krátkou životnost (řádově nanosekundy), takže působí oxidační poškození v blízkosti místa svého vzniku (Valko et al. 2006). Napadá a poškozuje většinu buněčných struktur (Mandelker 2009).

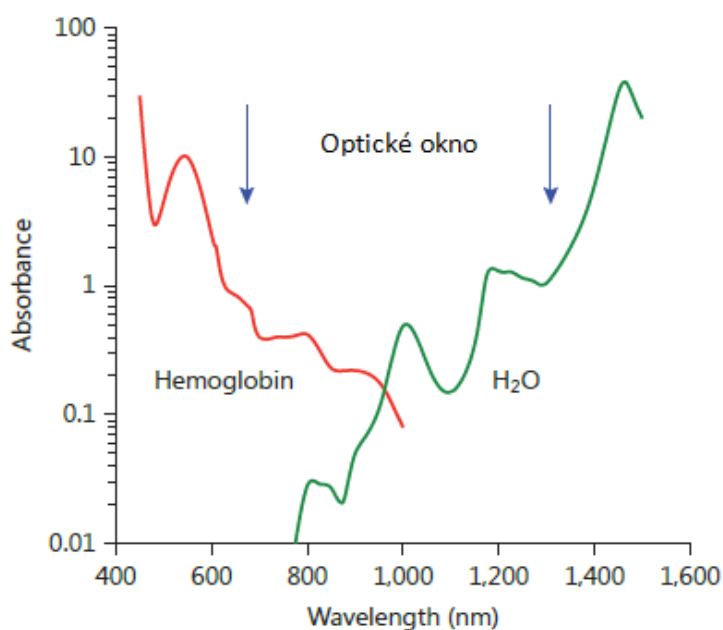
2.4. SVĚTLO

Světlo je jedna z hlavních komponent PDT. Parametry světelného zdroje volíme především podle absorpčního spektra PS a charakteru onemocnění (umístění a velikost léze, dosažitelnost a vlastnosti tkáně). Klinický efekt PDT pak závisí na optických vlastnostech tkáně a celkové dozimetrii – dávce světla, době vystavení světlu či jeho intenzitě. Pro úspěch PDT je tedy klíčová volba optimální kombinace PS, světelného zdroje a parametrů léčby (Agostinis et al. 2011, Benov 2015).

2.4.1. Princip optického okna

Volba vlnové délky světla závisí na typu PS a na optických vlastnostech tkáně. Ta bývá většinou značně nehomogenní díky přítomnosti různých makromolekul, buněčných organel a dalších struktur, což vede v různé míře k absorpci a rozptylu světla (Castano et al. 2004, Plaetzer et al. 2009). Bylo zjištěno, že hodnota vlnové délky by se měla pohybovat mezi 650-1300 nm, tedy v červené až blízké infračervené oblasti světelného spektra. Toto rozmezí se označuje jako „optické okno tkáně“ (Obr. 2). Při hodnotách $\lambda < 650$ nm dochází k absorpci a rozptylu světla díky endogenním chromoforům (hemoglobin, melanin, cytochromy), což omezuje průnik světla do tkáně; absorpce v těchto kratších vlnových délkách může také s větší pravděpodobností způsobit fotosenzitivitu kůže (Yoon et al. 2013, Castano et al. 2004). Se vzrůstající vlnovou délkou roste i schopnost světla prostoupit tkání, ovšem při $\lambda > 1300$ nm je už tento průnik omezován absorpcí světla molekulami vody (Castano et al. 2004). Prakticky je ovšem horní hranice $\lambda \sim 850$ nm, při vyšších hodnotách už totiž světlo nedosahuje dostatečné energie k excitaci PS a produkci ¹O₂ (Benov 2015). Z uvedených

parametrů je tedy jasné, že ideálně by měl PS absorbovat světlo při vlnové délce 650 - 850 nm. Toto rozmezí nazýváme „fototerapeutickým oknem“ (Yoon et al. 2013).



Obr. 2 Optické okno tkáně, ve kterém pozorujeme nejnižší absorpci a rozptyl světla. Znárodněna absorpce hemoglobinu a vody. Převezato z (Benov 2015).

2.5. FOTOLENIZIZÉRY

PS jsou látky schopné absorbovat světlo určité vlnové délky a jeho energii předat v buňce okolnímu kyslíku za vzniku ROS (Agostinis et al. 2011). Především ¹O₂ pak poškozují buněčné organely a vede k zániku buňky (Buytaert et al. 2007).

V současnosti známe velké množství PS potenciálně použitelných pro PDT a další stále vznikají. Některé mohou být získávány úpravou přírodních zdrojů, jako je hem či chlorofyl. Tato cesta je značně jednodušší a levnější než získávání PS úplnou chemickou syntézou (Yoon et al. 2013).

2.5.1. Struktura a vlastnosti PS

Většina užívaných PS má strukturu založenou na tetrapyrrolovém jádře podobnou porfyrinu, obsaženém např. v hemoglobinu (Agostinis et al. 2011). Tyto

sloučeniny obvykle vykazují silnou absorpci kolem 400 nm, označovanou jako Soretův pás. Pro PDT ovšem tento pás nemá příliš význam, jelikož při této vlnové délce dochází pouze k malému průniku světla do tkáně. Důležitější jsou slabší, tzv. Q-pásky, nacházející se v rozmezí 600 - 800 nm, tedy ve „fototerapeutickém okně“. Jednotlivé skupiny PS se pak liší absorpčními maximy těchto pásů (Castano et al. 2004, Macdonald a Dougherty 2001, Yano et al. 2011).

Pro PS je důležitá selektivita, tedy schopnost hromadit se v nádorové tkáni, nikoli ve zdravých buňkách, čímž se snižuje riziko poškození zdravé tkáně. Akumulace v nádorové tkáni je pravděpodobně způsobena vazbou na LDL receptory, které nádorové buňky produkují ve zvýšené míře. Afinitu PS k nádoru může podporovat také vysoká propustnost cév zásobujících nádor, nižší pH nádoru, nižší odtok lymfy či vysoký počet nádoru přidružených makrofágů (Ormond a Freeman 2013, Plaetzer et al. 2009, Yoon et al. 2013). Dále lze selektivitu k nádoru zvýšit navázáním PS na vhodný nosič, např. monoklonální protilátku rozpoznávající nádorový antigen, LDL, liposom a další (Agostinis et al. 2011, Dolmans et al. 2003).

Důležitou charakteristikou, která ovlivňuje vstup PS do nádorových buněk, je jeho náboj. Molekuly se záporným nábojem špatně prostupují membránami. Pokud má ovšem PS maximálně dva záporné náboje a je dostatečně lipofilní, difuze přes membránu je možná. V případě více záporných nábojů je PS přijat endocytózou a hromadí se především v lyzosomech. Naopak pozitivně nabitě PS vstupují do buněk snadno díky vazbě na záporně nabitě části proteinů v plazmatické a mitochondriální membráně nádorových buněk (Benov 2015). Náboj molekuly také určuje, v jakém buněčném kompartmentu se bude PS kumulovat (Ormond a Freeman 2013).

Vstup do nádorových buněk je také ovlivněn poměrem mezi hydrofilitou a lipofilitou molekuly. Pro difuzi PS membránami nádorových buněk je důležitá dostatečná míra lipofility. Nezbytná je ovšem i určitá míra rozpustnosti ve vodě, aby mohlo docházet k biodistribuci tělními tekutinami. Nejvýhodnější je tedy použití amfifilních PS (Benov 2015, Ormond a Freeman 2013), které jsou fotodynamicky aktivnější než symetricky hydrofobní či hydrofilní molekuly (Macdonald a Dougherty 2001). U velmi lipofilních molekul nerozpustných ve vodě je možné jejich podání v emulzi či uzavření do liposomu (Castano et al. 2004).

Za zmínku stojí i význam prostorové struktury a symetrie molekul PS. Změny v umístění substituentů do *ortho*, *meta* či *para* polohy mohou vést ke změnám cílových kompartmentů pro akumulaci PS a ovlivňují též hloubku proniknutí PS do buněčných membrán. Strukturální izomery téhož PS tak mohou vykazovat významné rozdíly v lokalizaci v buňce a výsledného efektu PDT (Benov 2015).

2.5.2. Ideální fotosenzitizér

Po zkušenostech s prvními klinicky použitými látkami bylo nutné stanovit, jaké vlastnosti by měl mít ideální PS. Tato představa se ovšem zatím nikdy zcela neshoduje s vlastnostmi reálně vytvořených látek (Allison et al. 2004). Požadavky na ideální PS jsou následující:

- jednoduchá syntéza z dostupných prekurzorů a získání čisté struktury o známém chemickém složení
- stabilita a rozpustnost ve vodném prostředí organismu
- selektivní akumulace v nádorové tkáni a vysoký Φ_{Δ}
- silná absorpce v červené až blízké infračervené oblasti spektra (600-800 nm) s vysokým molárním absorpčním koeficientem (ϵ)
- nízká toxicita bez ozáření (PS i jeho metabolitů)
- rychlé vyloučení z normální tkáně (snížení nežádoucích fototoxických účinků)
- cenová dostupnost

Další důležitou charakteristikou je interval mezi podáním PS a ozářením (DLI). Tento interval je obvykle dostatečně dlouhý (hodiny až dny), aby došlo k vyloučení PS z normální tkáně a dostatečné akumulaci ve tkáni nádorové. Nově se však ukazuje, že v některých případech je výhodnější DLI zkrátit (minuty až hodiny) – v této době je PS přítomen v cévách zásobujících nádor a dochází tak k jejich výraznému poškození (Ormond a Freeman 2013, Castano et al. 2004, Dolmans et al. 2003, Agostinis et al. 2011).

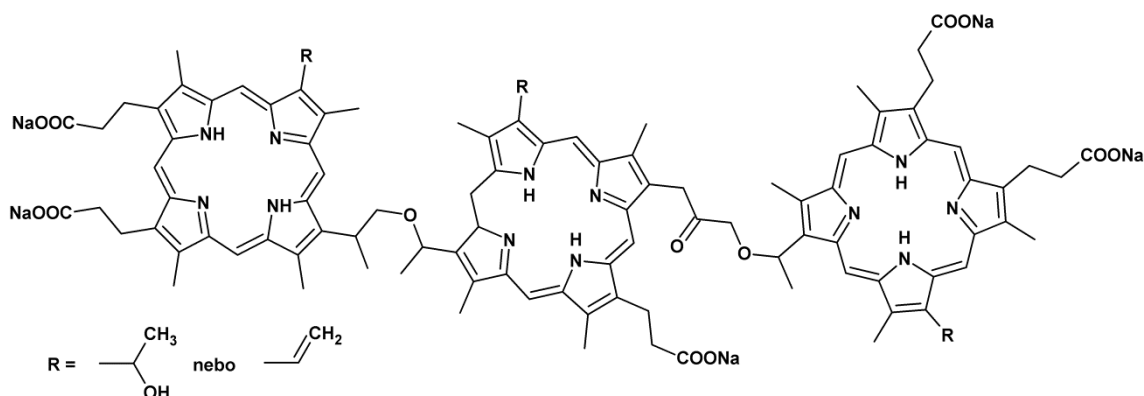
2.5.3. První generace fotosenzitizérů

Do první generace PS řadíme deriváty hematoporfyrinu (HpD), což je směs ve vodě rozpustných porfyrinů. Prvním a dosud klinicky používaným v mnoha zemích

světa je **porfimer sodný** (obchodní název Photofrin[®], Obr. 3), čištěná směs dimerů a oligomerů hematoporphyrinu. Porfyrinové jednotky jsou navzájem spojeny etherovou, esterovou či C-C vazbou (Agostinis et al. 2011, Yano et al. 2011).

Použití Photofrinu[®] pro PDT se ukázalo jako účinné a dodnes se využívá k léčbě mnoha typů nádorů (nádorů močového měchýře, jícnu, plic, krku, prsu či děložního čípku) (Ormond a Freeman 2013). Podává se intravenózně v dávce 2 – 5 mg/kg a po 24 - 48 hodinách dochází k ozáření (Yano et al. 2011). Jeho použití má ovšem i řadu nevýhod. Nejvyšší absorpci vykazuje při 630 nm s poměrně malým průnikem do tkáně a nízkým Φ_{Δ} . Problémem je i výrazná fotosenzitivita kůže, přetrvávající ještě několik týdnů po léčbě, nízká selektivita k nádoru a nejednotná struktura (Castano et al. 2004, Yano et al. 2011). Všechny tyto nevýhody vedly ke snahám vytvořit nové PS s optimálnějšími vlastnostmi.

Dalšími používanými HpD jsou Photogem[®] a Photosan-3[®]. První zmíněný je schválený pro klinické použití v Rusku a Brazílii, druhý v EU (Ormond a Freeman, 2013).



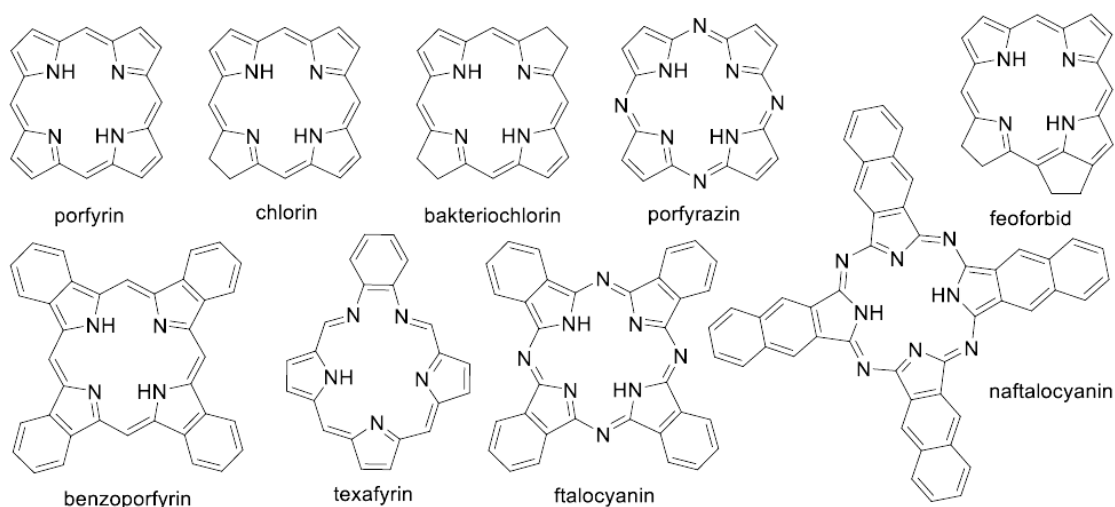
Obr. 3 Struktura Photofrinu[®], znázorněného jako trimer. Počet porfyrinových jednotek se pohybuje v rozmezí 2-8.

2.5.4. Druhá generace fotosenzitizérů

Většinu druhé generace PS tvoří látky strukturálně odvozené od porfyrinu. Z nejpoužívanějších sem řadíme porfyriny a jejich analoga (benzoporfyriny, chloriny, bakteriochloriny a feoforbidy), ftalocyaniny a jejich analoga a texafyriny (Obr. 4). Jedná se o makrocykly s 18 - 22 konjugovanými π -elektrony složené buď ze čtyř pyrrolových jader spojenými methinovými můstky, nebo v případě ftalocyaninů (PC) ze

čtyř isoindolových jednotek spojených atomy dusíku. Vlnové délky maxima absorpce (Q-pás) dosahují přibližně hodnot 630 nm (porfyriny), 670 nm (chloriny), 680 nm (PC), 690 nm (benzoporfyriny), 730 nm (bakteriochlorochiny) a 760 nm (texafyriny) (Yano et al. 2011).

Molekuly s tetrapyrrolovým jádrem nesou často ve svém středu koordinovaný atom kovu. Prvky jako Zn, Pd, In, Sn nebo Lu zachovávají vlastnosti jádra jako PS, zatímco kovy Fe nebo Cu použití při PDT neumožňují (Castano et al. 2004).



Obr. 4 Struktury hlavních skupin fotosenzitizérů odvozených od porfyrinu. Převzato z (Macháček 2016a).

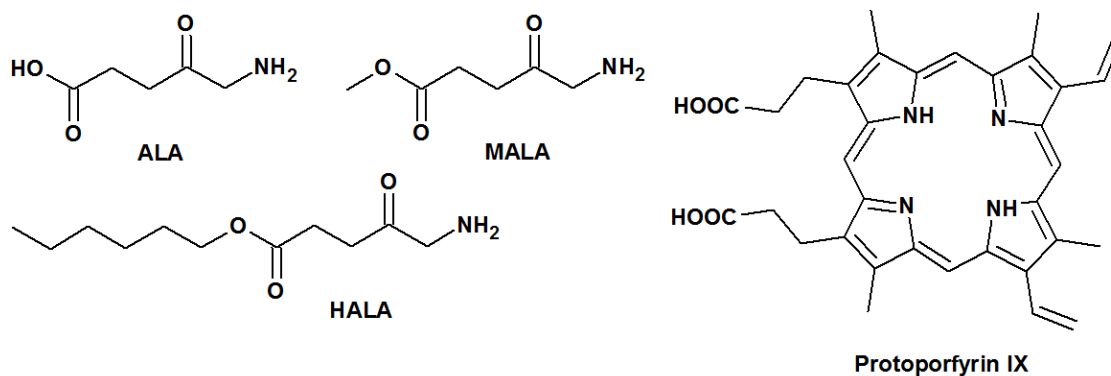
2.5.4.1. Porfyriny

- **5-aminolevulová kyselina (ALA) a její estery**

ALA (Obr. 5) je přirozeně se vyskytující aminokyselina, účastní se biosyntézy hemu, která probíhá ve všech buňkách s výjimkou zralých erytrocytů. Sledem několika chemických reakcí vzniká z ALA protoporfyrin IX (PpIX, Obr. 5), ze kterého se fyziologicky stává hem po zabudování železa pomocí enzymu ferrochelatasy. Kapacita tohoto enzymu je omezená a proto podáním exogenní ALA dochází v buňkách k hromadění fotodynamicky aktivního PpIX (Castano et al. 2004). ALA je tedy proléčivo, ze kterého v organismu vzniká účinný PS s přímým cytotoxickým účinkem. V neoplastické tkáni navíc dochází ke zvýšené tvorbě PpIX v porovnání s normální tkání, pravděpodobně díky odlišným hladinám enzymů této metabolické dráhy, nižší hladině železa a dalším faktorům (O'Connor et al. 2009).

Jako léčivo Levulan[®] se ALA používá topicky, intravenózně i orálně. Po topické aplikaci lze místo podání ozařovat do 18 hodin světlem v modré (410 nm), zelené (510 nm) i červené (635 nm) oblasti. Účinnější je světlo o kratších vlnových délkách, u červeného světla je nutná delší doba léčby kvůli nižší produkci ¹O₂. Po systémovém podání se může objevit celková fotosenzitivita, trvající asi 48 hodin; při topickém podání je omezena na místo aplikace. ALA se úspěšně používá u různých kožních lézí (jako např. aktinická keratóza, bazaliom či karcinom dlaždicových buněk), dále např. u nádoru hlavy, krku, močového měchýře, prostaty či Barretova jícnu, ale i v kosmetice k omlazení pleti (Allison a Sibata 2010, O'Connor et al. 2009). ALA slouží i jako fotodiagnostické a fotodetekční činidlo k zobrazení maligních i nemaligních onemocnění (Rodriguez et al. 2006).

Nevýhodou použití ALA je malý průnik světla do tkáně (asi 1 mm). Zvýšit jej lze navýšením lipofility ALA esterifikací. Využívá se methylester (MALA, Metvix[®], Obr. 5), hexylester (HALA, Hexvix[®], Obr. 5) či benzylester (Benzvix[®]). Posun vlnové délky světla do vyšších hodnot zdvojnásobuje hloubku prostupu do tkáně. V buňkách dochází k uvolnění ALA činností esteras (O'Connor et al. 2009). Estery ALA se používají v podobných indikacích jako ALA samotná a řada dalších indikací je v klinickém výzkumu (Ormond a Freeman 2013).

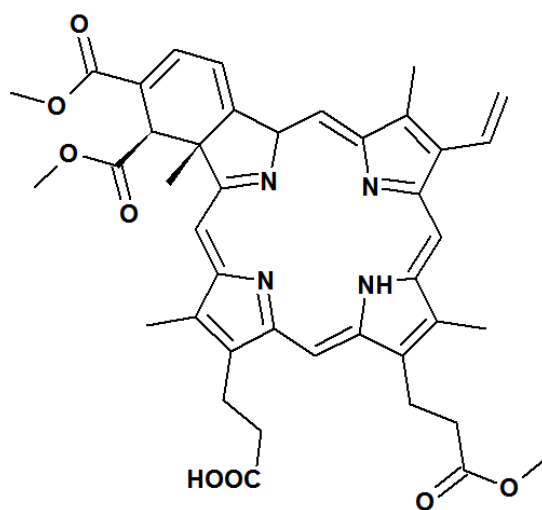


Obr. 5 Struktura 5-aminolevulové kyseliny (ALA), jejího methyl- a hexylesteru (MALA, HALA) a aktivního PS protoporphyrinu IX.

- **Verteporfin**

Verteporfin, obchodním názvem Visudyne[®] (Obr. 6), je derivát benzoporphyrinu, někdy též řazený mezi chloriny. Aktivuje se světlem o vlnové délce 690 nm, které má relativně velký průstup do tkáně. K ozáření dochází asi 30 minut po podání. Verteporfin je lipofilní molekula a podává se v dávce 0,3 mg/kg infuzí v liposomální formě (Yano et al. 2011). Díky rychlému vylučování z tkání vykazuje velmi nízkou kožní fotosenzitivitu (Ormond a Freeman, 2013).

Po podání se verteporfin přednostně hromadí v neovaskulární tkáni, především oka. Proto je schválen a používán pro léčbu věkově podmíněné makulární degenerace (AMD), což je závažné onemocnění oka způsobující slepotu. Je také schválen pro aplikaci v revmatologii k léčbě revmatoidní artritidy a probíhají klinické studie na jeho použití proti kožním malignitám. Uplatnit by se mohl i u dalších nádorových onemocnění spojených s výraznou tvorbou nových cév, jako jsou sarkomy či mozkový glioblastom (Yano et al. 2011, Allison a Sibata 2010).



Obr. 6 Struktura verteporfinu.

2.5.4.2. Chloriny

Chloriny se od porfyrinů liší redukovanou dvojnou vazbou v jednom pyrrolovém kruhu. Tato změna vede k posunu absorpčního pásu do vyšších hodnot (640 – 700 nm) (Ormond a Freeman 2013).

- **Temoporfin**

Temoporfin, chemicky *m*-(tetrahydroxyfenyl)chlorin (*m*-THPC), obchodním názvem Foscan[®] (Obr. 7), je derivát chlorinu s jednotným složením. Absorbuje při vlnové délce 652 nm a řadí se mezi velmi účinné PS druhé generace s vysokým Φ_{Δ} . Způsobuje přímou smrt nádorových buněk i poškození cév nádoru (O' Connor et al. 2009). Používá se k léčbě nádorů hlavy a krku a úspěšné bylo i testování účinku u nádorů prsu, prostaty, slinivky (Ormond a Freeman, 2013), jícnu, plic či kůže (Yano et al. 2011).

Velkou výhodou temoporfinu jsou nízké dávky PS (0,1 - 0,2 mg/kg), nízká intenzita světla i krátký čas ozařování (několik minut). Stinnou stránkou je dlouhý biologický poločas (45 - 65 hodin). Ke kumulaci v nádorové tkáni dochází asi za 4 dny, teprve poté může být zahájeno ozařování. Výrazná je také kožní fotosenzitivita, jež může ze začátku léčby vyvolat i tlumené světlo a která se vyskytuje od podání (*i.v.*) a trvá asi 2 - 4 týdny. Během léčby se může vyskytnout i výrazná bolest. Přesto je Foscan[®] účinný PS a u některých pacientů vykazuje významný klinický přínos (O' Connor et al. 2009, Allison a Sibata 2010).

- **Talaporfin**

Pro talaporfin (Obr. 7) se používá několik názvů – N-aspartylchlorin e6 (NPe6), LS11, Laserphyrin[®], LitxTM a další (Allison a Sibata 2010). Je to ve vodě rozpustný PS, díky čemuž se rychle akumuluje v nádorové tkáni - během asi čtyř hodin. Poté se ozařuje světlem o vlnové délce 664 nm a působí poškození nádorových buněk i zásobujících cév. Podává se injekčně v dávkách 0,5 - 3,5 mg/kg. V kůži se kumuluje málo a z těla se vylučuje do 7 dnů, proto nezpůsobuje výraznou fotosenzitivitu (Yano et al. 2011). V Japonsku byl schválen k léčbě rakoviny plic a má potenciál k léčbě dalších malignit (Ormond a Freeman 2013).

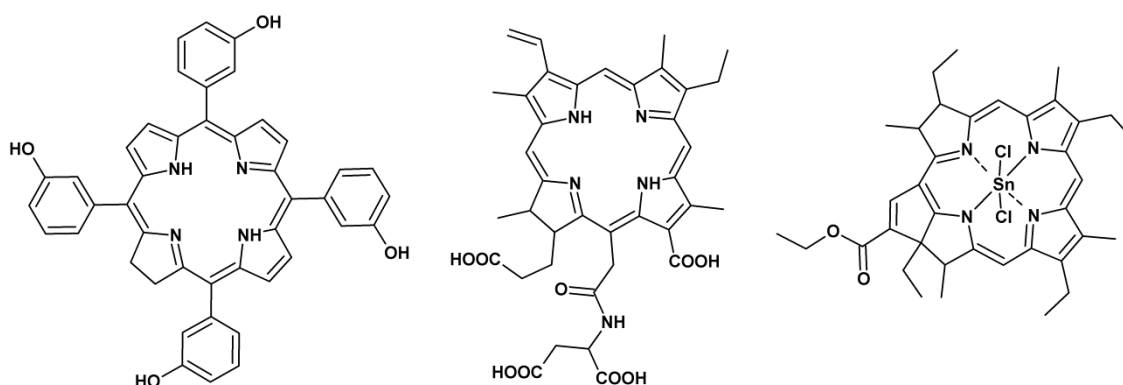
- **Rostaporfin**

Rostaporfin, také ethyletiopurpurin cínčitý (SnET2) nebo Purlytin[®] (Obr. 7), je syntetický purpurin strukturně odvozený od chlorofylu. Je aktivován světlem o vlnové délce 664 nm, posun do vyšších hodnot (oproti Photofrinu[®]) je způsoben atomem cínu v centru molekuly (O' Connor et al. 2009). Ten způsobuje i vyšší Φ_{Δ} , asi dvacetinásobný než vykazuje Photofrin[®]. Rostaporfin se používá v dávce 1,2 mg/kg a k ozáření dochází

za 24 hodin po injekčním podání (Yano et al. 2011). Nevýhodou v jeho aplikaci je riziko kožní fotosenzitivity (asi 14 dní) a toxicity ve tmě. Probíhají studie na jeho použití u metastazujícího adenokarcinomu prsu, bazaliomu a Kaposiho sarkomu u lidí s AIDS a dále např. u AMD (Ormond a Freeman 2013, O'Connor et al. 2009).

- **Ce6-PVP**

Tento PS, registrovaný pod názvem Photolon[®] (nebo také Fotolon[®]) je komplexní sloučeninou tvořenou trisodnou solí chlorinu e6 a nízkomolekulárním polyvinylpyrrolidonem. Ce6-PVP má silné absorpční maximum kolem 660 nm. Podává se infuzí v dávce 1,0 - 2,5 mg/kg, k ozáření dochází po 3 - 4 hodinách. Fotosenzitivita může přetrvávat 4 dny po PDT. V současnosti je schválen v Bělorusku a Rusku pro diagnostiku a léčbu nádorů kůže a dutých orgánů (Shliakhtsin et al. 2009, Istomin et al. 2010).



Obr. 7 Struktury některých významných chlorinů – zleva temoporfin, talaporfin, rostoporfin.

2.5.4.3. Bakteriochloriny

Bakteriochloriny jsou sloučeniny strukturně odvozené od porfyriu redukcí dvojných vazeb ve dvou pyrrolových cyklech. Tato redukce posouvá jejich absorpční Q-pás oproti porfyriu a chlorinů dále do červené oblasti – bakteriochloriny a strukturně podobné bakteriofeoforbidy mají absorpční maximum větší než 710 nm, v některých případech blíží se 800 nm (Macdonald a Dougherty 2001, Ormond a Freeman 2013).

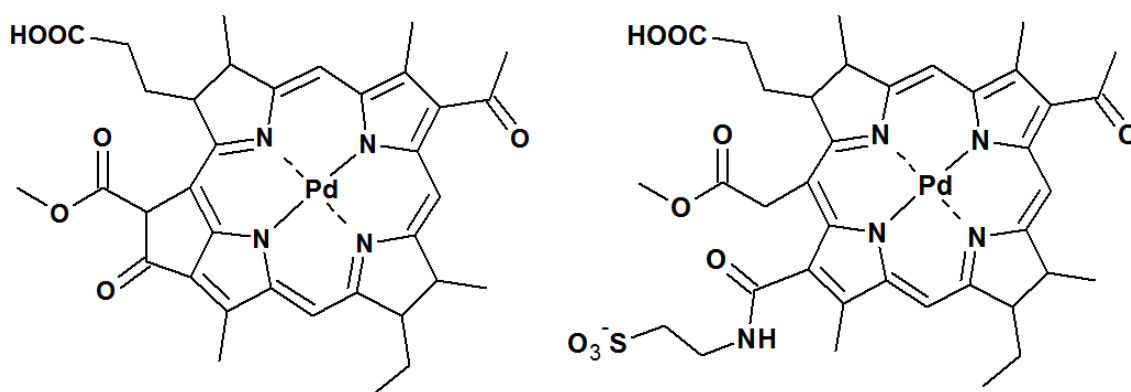
- **Padoporfin**

Padoporfin (WST09, Tookad[®], Obr. 8) je bakteriofeoforbid odvozený od bakteriochlorofylu, obsahující ve svém středu atom palladia. Vykazuje maximum absorpce při vlnové délce 763 nm a prostup tkání do hloubky asi 4 mm (O'Connor et al. 2009). Padoporfin je hydrofobní a ke svému podání vyžaduje navázání na nosič. Velmi rychle je vylučován z organismu, k ozáření proto dochází již za 30 min po podání (v dávkách 2 - 4 mg/kg). Další výhodou rychlé exkrece je i nevýznamná fotosenzitivita vyskytující se do 3 hodin po ozáření.

Padoporfin poškozuje především cévní zásobení nádoru (Allison a Sibata 2010). Probíhá klinické hodnocení na jeho využití k léčbě rakoviny prostaty, ve kterém se jeví velmi slibně. Díky příznivým vlastnostem (dobrý prostup do tkáně, nízká kožní fotosenzitivita) se padoporfin ukazuje jako výhodný PS pro klinické použití (Ormond a Freeman 2013, O'Connor et al. 2009).

- **Padeliporfin**

Padeliporfin (WST11, Stakel[®], Tookad[®] Soluble, Obr. 8) je hydrofilní bakteriochlorin. Jeho struktura, vlastnosti i aplikace jsou velmi podobné padoporfinu, maximum absorpce vykazuje při 753 nm. Jeho použití je též zaměřeno proti rakovině prostaty (Ormond a Freeman 2013, Azzouzi et al. 2015).



Obr. 8 Struktury bakteriochlorinů – zleva padoporfin a padeliporfin.

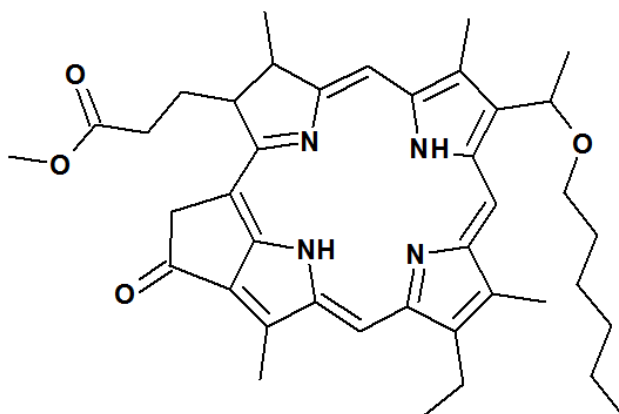
2.5.4.4. Feoforbidy

Feoforbidy strukturně vychází z chlorinů, v jednom pyrrolovém jádru porfyriu dochází k redukci dvojné vazby.

- **HPPH**

HPPH neboli 2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinyl pyrofeoforbid (Photochlor[®], Obr. 9) je lipofilní PS ze skupiny feoforbidů. V čisté formě se dá připravit z extraktu ze sinic rodu *Spirulina*. V těle není HPPH metabolizován a relativně pomalu se vylučuje. Po injekčním podání může být aktivován světlem o vlnové délce 665 nm nebo 408 nm s různým průnikem do tkáně. Umožňuje proto léčbu povrchových i hlouběji uložených lézí. Aplikuje se v dávce 0,15 mg/kg a k ozáření dochází za 24 - 48 hodin. Fotosenzitivita se vyskytla pouze při použití vysokých dávek PS a světla (Yano et al. 2011, Allison a Sibata 2010).

HPPH vykázal při klinických studiích dobré výsledky u pacientů s rakovinou jícnu, při léčbě Barrettova jícnu (prekanceróza), kožních lézí a karcinomu plic (Allison a Sibata 2010). Dále se zkoumá jeho účinnost při léčbě rakoviny dutiny ústní, krku a hlavy (Ormond a Freeman 2013). Deriváty HPPH nacházejí využití v různých diagnostických a zobrazovacích metodách (Yano et al. 2011).



Obr. 9 Struktura 2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinyl pyrofeoforbidu (HPPH).

2.5.4.5. Ftalocyaniny a naftalocyaniny

Ftalocyaniny (PC; tetrabenzoporfyriziny) a příbuzné naftalocyaniny (NC) jsou barviva využívaná mimo jiné jako účinné PS. Strukturně vycházejí z porfyrinů (viz Obr. 4) a obvykle obsahují centrální atom kovu, nejčastěji Zn, Si nebo Al (Allison a Sibata 2010). Tyto diamagnetické kovy zvyšují Φ_{Δ} prodloužením životnosti tripletového stavu PS. Díky přikondenzovaným benzenovým či naftalenovým cyklům dochází k posunu absorpce PC a NC dále do červené oblasti spektra oproti porfyrinům. Silnou absorpci vykazují PC v rozmezí 670 - 770 nm, NC při 740 - 780 nm (O'Connor et al. 2009, Josefsen a Boyle 2012).

Struktura PC a NC, hlavně přítomnost čtyř fenylových (resp. naftylových) skupin, způsobuje často jejich špatnou rozpustnost ve vodě. Druhou výraznou nevýhodou je tendence PC a NC tvořit agregáty díky planárnímu uspořádání a větší velikosti molekul. Agregace pak vede ke snížení až ztrátě aktivity těchto PS. Tyto nedostatky lze omezit úpravou struktury či vhodným zvoleným transportním systémem.

Jako nejvýhodnější se jeví úprava molekul PC a NC přidáním sulfonových skupin, které zvyšují jejich rozpustnost ve vodě. Nejúčinnější PS se ukazují PC ve formě nesymetricky substituovaných sulfonových kyselin s atomem Zn či Al ve svém středu. Při vpravování sulfonových skupin ovšem vznikají směsi izomerů a molekul PS s různým stupněm sulfonace (Jiang et al. 2014, Castano et al. 2004). Další možností, jak zvýšit dostupnost a účinnost PC a NC, je jejich uzavření do liposomů (Allison a Sibata 2010).

- **Sulfonovaný hlinitý ftalocyanin**

Tento PS, označovaný AlPcS, se používá pod názvem Photosens[®] (Obr. 10). Je to ve vodě rozpustná směs PC s různou mírou sulfonace ($n \sim 3$), resp. jejich sodných solí. Maximální absorpce dosahuje při 675 nm (Jiang et al 2014). AlPcS se aplikuje v malých dávkách (0,5 - 0,8 mg/kg) a ozařuje se po 24 - 72 hodinách (Yano et al. 2011).

Klinicky se Photosens[®] používá v Rusku k léčbě různých typů a stadií rakoviny, např. žaludku, kůže, rtů, dutiny ústní, prsu a dalších a některých nemaligních onemocnění. Problémem při použití Photosensu[®] je ovšem jeho výrazná fotosenzitivita, vyskytující se několik týdnů po léčbě. Nevýhodou je rovněž jeho nejednotné složení (Jiang et al. 2014, Ormond a Freeman 2013).

- **Zinečnatý disulfo-diftalimidomethylftalocyanin**

Tento PC ($ZnPcS_2P_2$, Obr. 10), obchodním názvem Photocyanine[®], je amfifilní PS vyvinutý v Číně. Podobně jako Photosens[®] je zástupcem sulfonovaných PC. Je to směs čtyř velmi podobných izomerů, ve kterých jsou dvě sulfonové skupiny umístěné vedle sebe, totéž platí pro dvě skupiny ftalimidomethylové. Ve směsi se ovšem mohou vyskytnout i další izomery s přílehlé i protilehle umístěnými funkčními skupinami. $ZnPcS_2P_2$ vykazuje Q-pás s maximem absorpce při 670 nm.

ZnPcS₂P₂ vykazuje výhodné vlastnosti druhé generace PS, např. nízkou kožní fotosenzitivitu, vysoký Φ_{Δ} a amfifilní strukturu, která zvyšuje selektivitu PS k nádorovým buňkám. V klinických studiích se zkoumá jeho efekt u léčby leukémie (Jiang et al. 2014, Huang et al. 2007).

- **Křemičitý ftalocyanin 4**

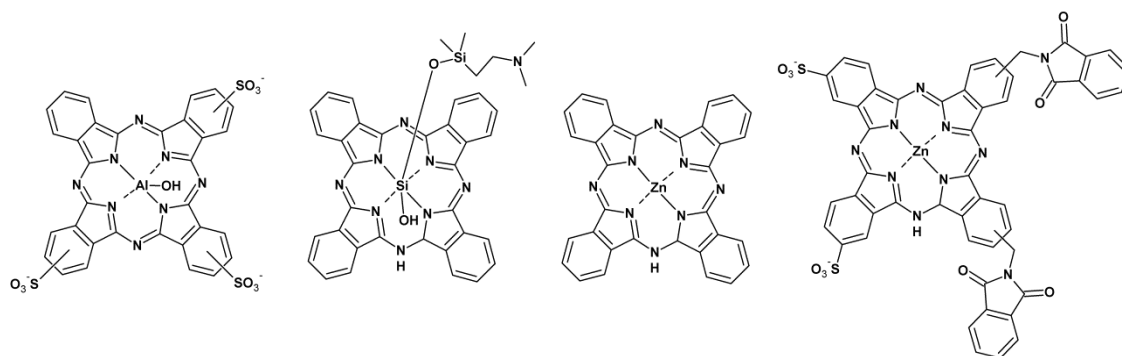
Křemičitý ftalocyanin 4 (Pc4, Obr. 10) je PS absorbující stejně jako Photosens[®] při 675 nm. Ve svém středu nese dále substituovaný atom křemíku. Sloučenina není sulfonovaná a vyskytuje se v čisté formě, nikoli jako směs izomerů (Jiang et al. 2014, Ormond a Freeman 2013).

Klinické hodnocení ukazuje jeho přínos pro léčbu kožních maligních i nemaligních onemocnění. Ve studiích vykazuje také minimální toxicitu při topickém i intravenózním podání (Ormond a Freeman 2013, Allison a Sibata 2010).

- **Zinečnatý ftalocyanin**

Zinečnatý ftalocyanin (ZnPc, také označovaný CGP55847, Obr. 10) je nesubstituovaný PC s atomem Zn ve svém středu. Kvůli vysoké lipofilitě je upraven do formy liposomů. Absorbuje v podobné vlnové délce jako výše uvedené PC (Jiang et al. 2014).

Klinické studie zkoumaly jeho vliv na spinocelulární karcinomy hlavy a krku (Sekkat et al. 2012), byly ovšem přerušeny (Jiang et al. 2014).



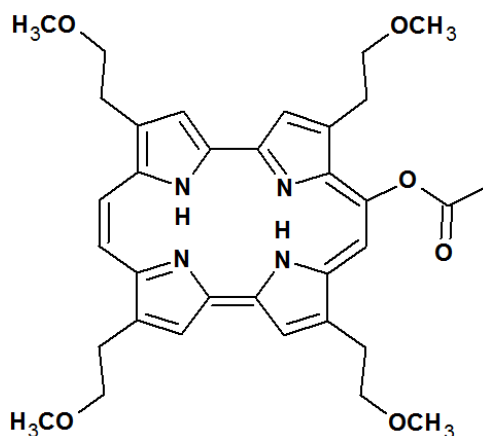
Obr. 10 Struktura některých ftalocyaninů – zleva AlPcS (Photosens[®]), Pc4, ZnPc a ZnPcS₂P₂ (Photocyanine[®]).

2.5.4.6. Porfyceny

Porfyceny jsou syntetické látky odvozené od porfyrinů, přesněji jejich strukturní izomery. Oproti porfyrinům mají jiné uspořádání pyrrolových jader a spojovacích můstků mezi nimi a jejich molekula je méně symetrická (Stockert et al. 2007). Charakteristické jsou pro ně absorpční pásy při vlnové délce nad 600 nm, účinná produkce ROS a nádorová selektivita. Velkou výhodou porfycenů je možnost modifikovat strukturu (hlavně postranní řetězce) a tím zlepšit jejich vlastnosti a účinnost. Dále se vyznačují rychlou biodistribucí, řádově v hodinách u hydrofobních derivátů a v minutách u sloučenin hydrofilních. Díky tomu nezpůsobují významnou fotosenzitivitu (O'Connor et al. 2009). Porfyceny způsobují přímé poškození nádorových buněk i poškození jejich cévního zásobení, také v závislosti na hydrofilně-lipofilním charakteru molekuly. Mohou být aplikovány systémově i topicky (Stockert et al. 2007).

Jedním ze studovaných zástupců této skupiny je **9-acetoxy-2,7,12,17-tetra(β -methoxyethyl)porfycen** (ATMPn, Obr. 11). Studuje se jeho využití v dermatologii k léčbě lupénky či některých kožních malignit.

Bylo připraveno mnoho dalších porfycenových derivátů, bohužel řada z nich není dosud prostudovaná. Díky svým vlastnostem se však porfyceny jeví slibně pro použití při PDT (Stockert et al. 2007, Josefsen a Boyle 2012).



Obr. 11 Struktura 9-acetoxy-2,7,12,17-tetra(β -methoxyethyl)porfycenu.

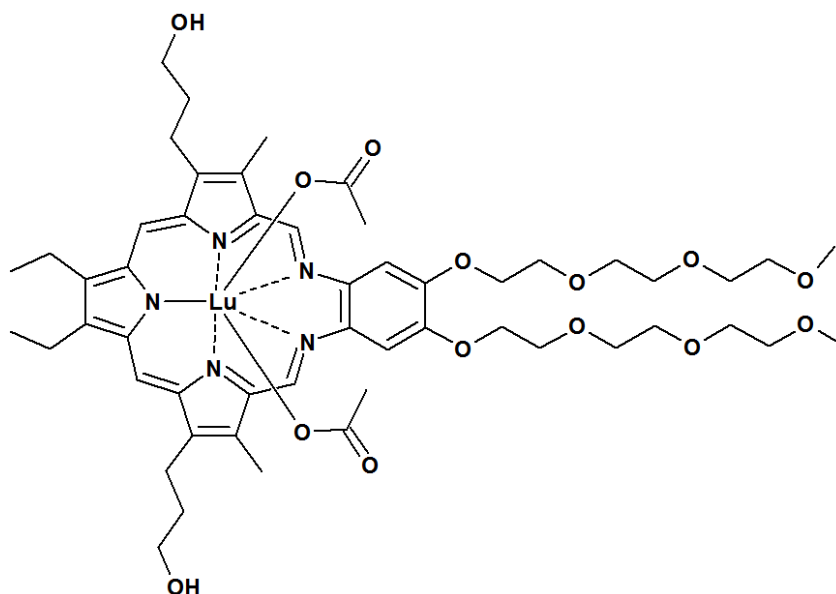
2.5.4.7. Texafyriny

Texafyriny jsou tripyrrolické pentaaza-deriváty porfyrinu. Kromě PDT mají využití při diagnostickém zobrazování (O'Connor et al. 2009, Allison a Sibata 2010).

- **Montexafin lutecitý**

Montexafin lutecitý (Lu-Tex, Lutrin[®], Obr. 12) je ve vodě rozpustný PS s vysokou afinitou k nádorové tkáni a nově vznikajícím cévám. Vykazuje Q-pás ve vyšších vlnových délkách, jeho maximum absorpce je při 732 nm. (Yano et al. 2011, Allison a Sibata 2010). Lu-Tex vykazuje dobrý Φ_{Δ} a minimální fotosenzitivitu (Allison a Sibata 2010). Podává se injekčně v relativně malé dávce (0,6 - 7,2 mg/kg) a k ozáření dochází za 3 hodiny (Yano et al. 2011). Nevýhodou tohoto PS je možná bolest během léčby, která ale může být řešena lokální anestezí (O'Connor et al. 2009).

Montexafin lutecitý je schválen pro léčbu rakoviny prostaty a děložního čípku a probíhá výzkum na jeho využití u rakoviny prsu, melanomu a Kaposiho sarkomu. Komplex s gadoliniem lze použít jako činidlo při magnetické rezonanci (MRI) a dalších zobrazovacích technikách (Yano et al. 2011). Lu-Tex je zkoumán také k použití u věkově podmíněné makulární degradace (obchodní název Optrin[®]) a k léčbě aterosklerózy (název Antrin[®]) (Ormond a Freeman, 2013).



Obr. 12 Struktura montexafinu lutecitého.

2.5.4.8. Ostatní struktury

Kromě sloučenin odvozených od porfyrinu vykazují fotodynamickou aktivitu i látky odlišných struktur. Řadíme sem některé fenothiaziny, antrachinony, xanteny, cyaniny a další (Ormond a Freeman 2013).

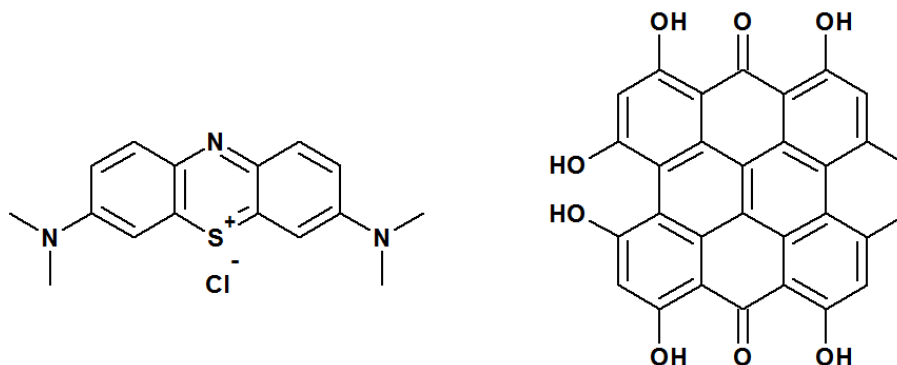
- **Methylenová modř**

Methylenová modř (MB, Obr. 13) je fenothiazinové barvivo absorbující při 666 nm. V buňce poškozuje řetězce DNA. In vitro vykazuje účinnost proti několika typům nádorových buněk, při *in vivo* podání (*i.v.* či do léze) ale nemá dostatečný efekt (O'Connor et al. 2009). To je způsobeno vysokou hydrofilitou a nízkou kumulací v nádorových buňkách (Yano et al. 2011). Další důvod nízké účinnosti MB je fakt, že některé nádorové buňky dokáží zlomy DNA způsobené MB během několika hodin opravit. Navíc může být MB inaktivována buněčnými enzymy (O'Connor et al. 2009). Syntetizované lipofilnější analogy MB měly sice o něco lepší efekt v poměru k toxicitě ve tmě, u některých analogů však tato toxicita vzrostla (Yano et al. 2011). Přes své nevýhody může mít MB uplatnění v léčbě některých kožních nádorů (Ormond a Freeman 2013).

Dalšími zástupci fenothiazinových barviv jsou **toluidinová modř** nebo **Nilská modř A** a jejich deriváty (Yano et al. 2011). Spolu s MB jsou však tyto látky více než pro účinky proti rakovinným buňkám studovány pro fotodeaktivaci mikrobů (Castano et al. 2004).

- **Hypericin**

Hypericin (Obr. 13) je přírodně se vyskytující derivát antrachinonu, získávaný z třezalky. V maximu absorpce při 590 nm produkuje vysoký Φ_{Δ} a dalších ROS. Jeho účinek je kombinovaný – způsobuje přímé poškození nádorových buněk i jejich cévního zásobení ovlivněním několika signálních drah. Hypericin se jeví jako slibný PS i díky minimální toxicitě ve tmě. Klinické výsledky zatím bohužel nejsou uspokojivé, zlepšení by mohla přinést optimalizace léčebných parametrů - dávka, podání PS, ozáření a další (O'Connor et al. 2009, Ormond a Freeman 2013).



Obr. 13 Metylenová modř (vlevo) a hypericin (vpravo).

- **4,5-dibromorhodamin methylester**

Tato látka, označovaná též TH 9404, je odvozená od struktury xanthenu. Přítomnost halogenu v molekule zvyšuje pravděpodobnost mezisystémového přechodu do tripletového stavu molekuly a zvyšuje tak Φ_{Δ} . Vykazuje účinnost při PDT reakce štěpu proti hostiteli při transplantacích (Ormond a Freeman 2013). Mohl by najít využití i v léčbě myelomu či rakoviny prsu (Sekkat et al. 2012).

- **Merocyanin 540**

Merocyanin 540 je anionické cyaninové barvivo, které působí selektivně na leukemické, neuroblastomové buňky a buňky lymfomů, normální kmenové buňky nepoškozuje. U buněk solidních nádorů je jeho efekt omezen (O'Connor et al. 2009, Ormond a Freeman 2013).

Z některých dalších neporfyrinoidních látek využitelných jako PS lze zmínit kurkuminoidy, deriváty hypocrelinu a squarainu, fullereny a mnoho dalších (Yano et al. 2011, Ormond a Freeman 2013).

2.5.5. Třetí generace fotosenzitizérů

I přes výhodné vlastnosti PS předchozí generace se většina z nich potýká s omezenou rozpustností ve vodném prostředí, zvláště při fyziologickém pH, což omezuje možnost přímého *i.v.* podání (Josefsen a Boyle 2012). Problémem je často i nízká selektivita PS k nádorovým buňkám. Tato omezení vedla k vývoji nové generace PS, kterou zatupují látky druhé generace navázané na vhodnou transportní molekulu (O'Connor et al. 2009).

Zásadní pro zacílení PS na nádorovou tkáň je fakt, že nádorové buňky obsahují na svém povrchu antigeny či receptory odlišné nebo nadměrně exprimované oproti zdravým buňkám (O'Connor et al. 2009). Jednou z možností je konjugace PS s monoklonální protilátkou, která se váže na specifický nádorový antigen. Tím je omezeno poškození zdravé tkáně. Další vhodnou molekulou jsou částice LDL nebo molekuly folátu, jejichž receptory exprimují nádorové buňky na svém povrchu ve zvýšené míře. Ke konjugaci s PS lze využít i některé sacharidy, peptidy či polymery. PS může být do příslušné tkáně dopraven i pomocí transportních systémů jako jsou liposomy nebo nanočástice (Josefsen a Boyle 2008, Yoon et al 2013).

Příkladem syntetizovaných a studovaných PS třetí generace je chlorin e6 konjugovaný s imunoglobulinem G (IgG), temoporfin konjugovaný s folátem, glykokonjugované porfyriny a chloriny (Yano et al. 2011) či nanočástice obsahující PC či Photofrin® (O'Connor et al. 2009). Tyto sloučeniny vykazují větší selektivitu a fotodynamickou účinnost než při použití PS samotných. Vývoj dalších selektivně zacílených PS může významně zlepšit účinnost PDT při léčbě maligních i nemaligních onemocnění a umožnit další použití těchto látek (Josefsen a Boyle 2008).

2.6. ÚČINKY PDT NA NÁDOROVÉ BUŇKY

Jak bylo uvedeno výše, protinádorový efekt PDT se realizuje třemi různými mechanismy – přímým poškozením maligních buněk a následným zánikem, poškozením cévního zásobení nádoru s omezením přísunu kyslíku a živin a vyvoláním systémové imunitní reakce proti buňkám nádoru (Castano et al. 2005a). Tyto tři mechanismy se mohou navzájem ovlivňovat, význam každého z nich při léčbě daného onemocnění závisí na povaze onemocnění a parametrech PDT. Pro dlouhodobou léčbu a kontrolu nádorového onemocnění je důležité propojení všech tří účinků (Dolmans et al. 2003, Juarranz et al. 2008).

2.6.1. Přímé poškození buněk

Vstup PS do buněk cílové tkáně a jejich destrukce zevnitř je pro účinnou PDT zásadní. Kvůli krátké životnosti poškozují $^1\text{O}_2$ a další ROS především orgány

v bezprostřední blízkosti místa svého vzniku (Castano et al. 2004). Vychytávání PS nádorovými buňkami a jejich kumulace v jednotlivých kompartmentech buňky záleží na vlastnostech tkáně, a především charakteru PS – náboji, polaritě a struktuře PS (viz 2.5.1). Na subcelulární lokalizaci PS závisí aktivace specifických signálních drah po vzniku ROS, buněčná odpověď na PDT a následně typ buněčné smrti (Benov 2015). Soudí se, že PS kumulované v mitochondriích či endoplasmatickém retikulu (ER) častěji vyvolávají apoptózu, zatímco PS lokalizované v lysosomech nebo cytoplasmatické membráně směřují více k nekróze. Při použití některých PS dochází též k autofagii a následné smrti buňky (Juarranz et al. 2008).

Nejčastějšími cíli pro PS v buňce jsou lysosomy a mitochondrie, mohou se však kumulovat i v dalších strukturách jako je ER, Golgiho aparát (GA), cytoplasmatická membrána nebo cytoskelet (Castano et al. 2004, Benov 2015). Často PS vykazují afinitu k více kompartmentům současně, někdy dochází v buňce v průběhu PDT k redistribuci PS do jiné struktury buňky (Agostinis et al. 2011, Castano et al. 2004).

2.6.1.1. Lysosomy

Lysosomy byly dříve považovány za hlavní cíl PS při PDT a jejich poškození za příčinu buněčné smrti. Předpokládalo se, že narušením membrány lysosomů dojde k destrukci buňky uvolněnými hydrolytickými enzymy. Později se ukázalo, že poškození lysosomů hraje v buněčné smrti menší roli, než když je PS aktivován v mitochondriích a ostatních organelách (Benov 2015). Oxidační poškození lysosomů však přesto může vést k usmrcení buňky, ať už přímo, nebo prostřednictvím navazující destabilizace mitochondrií a následné apoptózy (Castano et al. 2004)

V lysosomech se kumulují především záporně nabitě PS (s celkovým nábojem -2 a více). Příkladem PS hromadícího se v lysosomech je talaporfin (Agostinis et al. 2011, Castano et al. 2004).

2.6.1.2. Mitochondrie

V mitochondriích se dobře kumulují PS, které nesou celkový kladný náboj a jsou dostatečně lipofilní, aby prošly membránou. Mitochondrie jsou z hlediska účinné PDT důležitým cílem pro podaný PS. Při jejich oxidačním poškození dochází k narušení

dýchacího řetězce a energetického metabolismu buňky, což může velmi rychle vyvolat její apoptotickou smrt (Benov 2015, Castano et al. 2004).

Mezi PS ukládající se v mitochondriích patří benzoporfyriny (verteporfin), temoporfin či Pc4, který má kromě toho afinitu i k dalším organelám (Agostinis et al. 2011).

2.6.1.3. Další cíle v buňce

Jak bylo uvedeno výše, PS se mohou lokalizovat i v dalších částech buňky. Kumulace v cytoplasmatické membráně může způsobit její oxidační poškození (zejména oxidaci nenasycených mastných kyselin), ztrátu bariérové funkce membrány až zánik buňky (Benov 2015). Kumulace v ER a GA není příliš běžná, příkladem látky ukládající se v těchto organelách je temoporfin (Castano et al. 2004). Zajímavým cílem pro PS je také cytoskelet – mikrotubuly a mikrofilamenta, které mají zásadní význam pro pohyb a dělení buněk a transport uvnitř buňky. Jejich poškození může vyvolat zastavení buněčného cyklu a vést k apoptóze (Juarranz et al. 2008).

2.6.2. Poškození cévního zásobení nádoru

U nádorů dochází při dosažení určité velikosti k vytvoření vlastní sítě kapilár. Zajišťuje se tak dostatečný přísun kyslíku a živin pro jeho růst (Nečas 2009). Krevní cestou může také docházet šíření nádorových buněk do vzdálenějších míst organismu a vytváření dceřiných nádorů - metastáz. Proto může zasažení nádoru v místě jeho cévního zásobení přispět k efektu PDT a zvýšit účinnost léčby (Juarranz et al. 2008).

Při poškození nádorových kapilár účinným PS dochází většinou k vazokonstrikci a následně agregaci krevních elementů a vzniku trombu. Ten omezuje přísun kyslíku a nutrietů do nádorových buněk, dochází k hypoxii až anoxii a zastavení či zpomalení růstu nádoru (Juarranz et al. 2008, Dolmans et al. 2003).

Pro poškození cév nádoru je klíčový DLI. Po *i.v.* podání PS se tento nejprve nachází v cévách, po určitém čase dochází k jeho distribuci do tkáně. Vhodně zvolený DLI tedy určuje, zda dojde při PDT spíše k poškození cév nádoru či přímo jeho buněk (Castano et al. 2005a). Krátký DLI vede s větší pravděpodobností k poškození cév, zatímco delší interval umožňuje PS difundovat do cílové tkáně (Agostinis et al. 2011).

Příkladem PS cílicího na cévy je verteporfin, používaný při terapii AMD. Při DLI trvajícím 15 minut vykazuje terapie nádorů verteporfinem podstatně lepší výsledky, než při DLI ~ 3 hodiny. Podobné výsledky byly pozorovány i u talaporfinu či hypericinu (Castano et al. 2005a, Juarranz et al. 2008). Krevní kapiláry nádoru poškozují přednostně i bakteriochloriny padoporfin a padeliporfin. PDT zaměřená především na cévní zásobení léčené oblasti se označuje jako VTP (vascular-targeted PDT) (Kawczyk-Krupka et al. 2015).

2.6.3. Imunitní reakce na PDT

Význam imunitního systému při PDT ukázaly experimenty s imunokompetentními a imunodeficientními myši. Po PDT došlo u všech myší k vymizení nádoru, dlouhodobého efektu však bylo výrazněji dosaženo u myší imunokompetentních – u druhé skupiny došlo častěji k recidivě. Z tohoto je zřejmé, že v komplexní léčbě nádorového onemocnění hraje imunitní reakce významnou roli (Castano et al. 2005a, Dolmans et al. 2003).

V exponovaném místě dochází při PDT následkem oxidačního stresu a poškození buněk velmi často k vyvolání silné zánětlivé reakce. Úkolem buněk imunitního systému je hlavně odstranit poškozené buňky tkáně a nastolit homeostázu. Navíc může ale docházet k navození dlouhodobé imunity proti danému nádoru (Agostinis et al. 2011, Castano et al. 2005a).

Po poškození a smrti nádorových buněk fungují tyto jako stimuly pro zánětlivou odpověď organismu. Dochází k vyplavení mediátorů zánětu, jako jsou cytokiny, růstové faktory, složky komplementu a srážecí kaskády, enzymy a další (Dolmans et al. 2003). Nejvýznamnější roli z nich hrají prozánětlivé cytokiny IL-1 a IL-6. Následuje kumulace buněk imunitního systému (žírné buňky, monocyty/makrofágy a především neutrofilů), dochází ke vzniku otoku a eliminaci poškozených a mrtvých buněk nebo jejich částí (Agostinis et al. 2011).

Dlouhodobá kontrola nádoru může být zajištěna pomocí buněk specifické imunity – lymfocytů. Po akutní zánětlivé reakci exponují antigen prezentující buňky na svém povrchu specifické peptidy z nádorových buněk a následně dochází k aktivaci T-lymfocytů. Ty mohou zničit buňky stejného nádoru nejen v místě primární léze, ale i

ve vzdálenějších místech a uplatnit se tak v léčbě metastáz daného nádoru (Castano et al. 2005a). Lyzát z nádorových buněk vystavených *in vitro* PDT by pak podle některých studií mohl sloužit jako nadějná vakcína vyvolávající specifickou protinádorovou imunitu (Dolmans et al. 2003, Agostinis et al. 2011).

Nutno podotknout, že ne vždy je zánětlivá reakce na PDT vítaná. Příkladem je např. PDT léčba nádoru mozku, kde je rozsáhlý zánět a s ním související tvorba otoku nežádoucí (Agostinis et al. 2011).

2.7. FOTODYNAMICKÁ TERAPIE A BUNĚČNÁ SMRT

Buněčná smrt nastává tehdy, kdy buňka ztrácí schopnost zachovat nezbytné životní funkce. V lidském organismu jejím prostřednictvím probíhá přirozeně odstraňování poškozených a nadbytečných buněk k udržení homeostázy (Mfouo-Tynga a Abrahamse, 2015).

Způsobit smrt buněk nádorové tkáně je hlavním účelem PDT. Způsob buněčné smrti a její rozsah určuje řada faktorů, z nejdůležitějších to jsou fyzikálně-chemické vlastnosti PS, jeho koncentrace a subcelulární lokalizace, koncentrace kyslíku v cílové tkáni, vlnová délka a intenzita světla (Robertson et al. 2009). V souvislosti s PDT jsou uváděny především tři hlavní způsoby buněčné smrti: apoptóza, nekróza a autofagie (Buytaert et al. 2007). To, jakým procesem buňka smrt podstoupí, závisí obecně na kvantitě výše uvedených parametrů. Mírné poškození buněčných komponent může vyvolat apoptotickou smrt, zatímco intenzivní oxidační stres zabrání apoptóze a vyvolá nekrózu buňky. Podobně pak stejný PS může způsobit nekrózu ve tkáni normálně zásobené kyslíkem, zatímco v hypoxické tkáni vyvolá apoptózu (Benov 2015).

Typ vyvolané buněčné smrti může mít výrazný dopad na klinické výsledky PDT. Režimy PDT s nízkou intenzitou světla, které vedou přednostně k apoptóze buněk, vykazují menší vedlejší účinky a zlepšují efektivitu léčby (Benov 2015).

2.7.1. Apoptóza

Apoptóza je zřejmě neprostudovanější a nejčastěji se vyskytující typ buněčné smrti. Je to aktivní a přesně regulovaný proces závislý na ATP. Morfologicky se vyznačuje kondenzací a štěpením DNA na fragmenty, degradací proteinů, celkovým smrštěním buňky a jejím rozpadem na apoptotická tělíska bez porušení cytoplazmatické membrány (Buytaert et al. 2007). Tyto ohraničené vezikuly jsou poté vychytány fagocytujícími buňkami a nedochází tak k rozvoji zánětu ani poškození okolní zdravé tkáně (Robertson et al. 2009).

Klíčovou roli v procesu apoptózy mají enzymy nazývané kaspasy. Je to skupina cysteinových proteinas se substrátovou specifitou vůči aspartátu. V buňce jsou přítomny ve formě neaktivních zymogenů (Nečas 2009). K jejich aktivaci dochází buď přenosem apoptotického signálu na iniciátorovou kaspasu, nebo proteolytickým štěpením jejich proenzymů (prokaspas) kaspasou, která v signální kaskádě předchází (efektorové kaspasy). K aktivování kaspasové kaskády dochází dvěma cestami – vnější a vnitřní – které se uvnitř buňky sbíhají (Buytaert et al. 2007).

2.7.1.1. Vnější cesta apoptózy

Vnější cestu aktivace kaspas zahajuje vazba ligandů (např. TNF- α , FasL/CD95L nebo TRAIL) na příslušné receptory na povrchu buněk, označované jako receptory smrti. Reakce ligand-receptor vyvolá v buňce vznik DISC signálního komplexu, který aktivuje prokaspasy 8 a 10. Ty poté proteolyticky štěpí a aktivují efektorové kaspasy 3 a 7, vyvolávající samotné morfologické změny typické pro apoptózu (Abrahamse 2011, Buytaert et al. 2007).

2.7.1.2. Vnitřní cesta apoptózy

Vnitřní cesta aktivace apoptózy je z hlediska PDT mnohem zásadnější (Agostinis et al. 2011). Obecně k tomuto ději dochází vlivem mnoha podnětů uvnitř buňky, jako je poškození DNA, oxidační stres, zvýšení hladiny Ca^{2+} v cytosolu, nahromadění chybně složených proteinů v ER a mnoho dalších. Hlavní roli hrají mitochondrie, resp. mitochondriální membrány. Sbíhá se zde působení pro- a antiapoptotických signálů, které jsou zprostředkované proteiny z rodiny Bcl-2 (Galluzzi et al. 2012). Antiapoptotické proteiny této skupiny (např. Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w) jsou

zakotveny ve vnější membráně mitochondrií, ER a jádra; jejich úkolem je inhibovat aktivitu proapoptotických proteinů (Bax a Bak). Proapoptotické proteiny se dělí do dvou podskupin: multidoménové proteiny (např. Bax, Bak) a proteiny obsahující pouze BH3 doménu (např. Bid, Bad). Bax a Bak jsou po své aktivaci schopny vytvářet póry ve vnější mitochondriální membráně. Proteiny druhé podskupiny pak zvyšují jejich účinek tím, že inaktivují anti-apoptotické Bcl-2 proteiny (Buytaert et al. 2007).

Při narušení rovnováhy ve prospěch proapoptotických Bcl-2 proteinů dochází k tzv. permeabilizaci vnější mitochondriální membrány (MOMP). Důsledkem MOMP je ztráta mitochondriálního transmembránového potenciálu ($\Delta\Psi_m$), narušení dýchacího řetězce a uvolnění apoptogenních proteinů do cytosolu (Galluzzi et al. 2012).

Mezi apoptogenní faktory uvolněné z mitochondrií řadíme proteiny cytochrom c (CytC), apoptózu indukující faktor (AIF), Smac/DIABLO (Agostinis et al. 2011), Omi/HtrA2 a endonukleasu G (EndoG). CytC v cytosolu vytváří spolu s faktorem Apaf-1 za přítomnosti ATP či dATP heptamerní komplex nazývaný apoptosom (Buytaert et al. 2007). Tento komplex aktivuje kaspasu 9 a ta následně efektorové kaspasy 3 a 7 (Abrahamse 2011). Smac/DIABLO a HtrA2 fungují jako inhibitory některých antiapoptotických proteinů rodiny IAP (proteiny inhibující apoptózu) a napomáhají tak aktivaci kaspas. AIF a EndoG po uvolnění do cytosolu relokalizují do jádra, kde způsobují rozsáhlou fragmentaci DNA nezávisle na kaspasové signální kaskádě (Galluzzi et al. 2012).

Vnější a vnitřní cesta apoptózy se sbíhá nejen u efektorových kaspas 3 a 7, ale tyto cesty mohou být propojeny i prostřednictvím kaspasy 8 (Abrahamse 2011). Tato kaspasa, aktivovaná vnější cestou, způsobuje v cytosolu štěpení proapoptotického proteinu Bid. Jeho štěpný produkt (tBid) způsobuje následně MOMP a uvolnění CytC z mitochondrií (Buytaert et al. 2007). Proto také buňka, která obdrží vnější signál k aktivaci apoptózy, může vykazovat i znaky vnitřní cesty apoptózy jako MOMP a tvorbu apoptosomu (Galluzzi et al. 2012).

2.7.1.3. Apoptóza při PDT

V závislosti na umístění PS v buňce při PDT dochází k primárnímu poškození v různých kompartmentech buňky (Abrahamse 2011). PS lokalizované v mitochondriích (např. Pc4 a další ftalocyaniny) poškozují při fotoaktivaci

antiapoptotické Bcl-2 proteiny vázané v mitochondriální membráně; následuje rychlé uvolnění CytC a dalších proteinů z mezimembránového prostoru a indukce apoptotické smrti (Agostinis et al. 2004).

Nejen při poškození mitochondrií však může dojít k MOMP a následně apoptóze. PS lokalizované v lysosomech mohou vyvolat permeabilizaci lysosomální membrány, následné uvolnění lysosomálních enzymů a štěpení cytosolického Bid (Agostinis et al. 2011). Příkladem takového PS je talaporfin (Agostinis et al. 2004). Přes protein Bax pak dochází k MOMP a aktivaci kaspas.

Při primárním poškození ER dochází k uvolnění Ca^{2+} a zvýšení jeho hladiny v cytosolu. To může vyvolat následný vstup Ca^{2+} do mitochondrií a také aktivaci cytosolické fosfolipasy A_2 s následnou syntézou volných mastných kyselin jako např. arachidonová kyselina (AA). Zvýšená mitochondriální hladina Ca^{2+} , oxidační stres a AA mohou společně vést k vyvolání MOMP (Abrahamse 2011, Buytaert et al. 2007).

Oproti tomu PS lokalizované v cytoplazmatické membráně mají tendence vyvolat spíše nekrózu kvůli porušení celistvosti membrány a rychlému vyčerpání ATP. Tento jev byl pozorován např. u Photofrinu[®] (Agostinis et al. 2004).

2.7.2. Nekróza

Nekróza je typ buněčné smrti, která je charakterizovaná vakuolizací cytoplazmy, zvětšením objemu buňky, následným rozpadem cytoplazmatické membrány a vylitím buněčného obsahu do okolní tkáně. V daném místě pak dochází k rozvoji zánětlivé reakce vlivem uvolněných prozánětlivých molekul. Buňky procházející nekrotickou smrtí jeví známky morfologické změny jádra, ale nejedná se o organizovanou kondenzaci a fragmentaci DNA jako v případě apoptózy (Edinger a Thompson 2004, Proskuryakov et al. 2002).

Nekróza byla dlouho považována za pasivní a neorganizovaný děj. Vyvolat ji mohou podněty jako např. infekce, toxiny, ischemie nebo traumatické poškození (Mfouo-Tynga a Abrahamse 2015). K jejímu rozvoji dochází kvůli rychlému vyčerpání ATP z buňky pod hladinu nutnou k přežití. Nedávno se však ukázalo, že i nekróza může být regulována signálními drahami, podobně jako v případě apoptózy (Buytaert et al. 2007).

Regulovanou nekrózu může za určitých podmínek vyvolat např. alkylační poškození DNA, excitotoxiny nebo vazba ligandů na receptory smrti. Při současné inhibici kaspas, především kaspasy 8 (genetickou úpravou, farmakologicky), pak může dojít k regulované nekróze buňky (Galluzzi et al. 2012). Aktivovaná kaspasa 8 za normálních okolností štěpí a inaktivuje s receptorem interagující proteinkinasu 1 (RIP1), což je jedna ze složek vytvářející DISC při vnější cestě aktivace apoptózy. V takovém případě pak dochází ke vzniku pronekrotického komplexu RIP1-RIP3 a následné programované nekrotické smrti (Ouyang et al. 2012).

Jak již bylo zmíněno, typ buněčné smrti závisí na parametrech PDT. Přechodu z apoptózy v nekrotickou smrt buňky lze dosáhnout především zvýšením koncentrace PS nebo dávky světla. Dochází pak k masivní tvorbě ROS, rychlému poklesu ATP a zhroucení metabolismu buňky (Buytaert et al. 2007). Často k tomuto ději dochází u PS lokalizovaných v cytoplazmatické membráně. Vysoké dávky PDT také mohou fotochemicky inaktivovat kaspasy nebo další složky apoptotické kaskády (Castano et al. 2005b). Inhibicí kaspas dochází k posunu směrem k nekrotické smrti buňky (Buytaert et al. 2007).

Zda je při PDT vhodnější apoptóza či nekrotická smrt, není dosud zcela jasné. Soudí se, že v některých případech je výhodná nekróza s následnou indukci zánětu k vyvolání systémové imunity a lepší kontroly nádoru. Na druhou stranu, PDT vyvolávající přednostně apoptózu bez zánětlivé reakce a otoku je vhodnější např. pro léčbu mozkových nádorů (Abrahamse a Hamblin 2015). Použití PS vyvolávajících apoptózu pak může být také výhodnější z hlediska omezení nežádoucích účinků a zvýšení účinnosti terapie (Benov 2015).

2.7.3. Autofagie

Autofagie je katabolický proces, při kterém dochází k natrávení a recyklaci vlastních buněčných komponent (Buytaert et al. 2007). Představuje především obranný mechanismus buňky vystavené stresovým podmínkám (Galluzzi et al. 2012), jako např. oxidační stres nebo nedostatek živin, sloužící k zachování životních funkcí (Garg et al. 2015). V savčích buňkách dochází dále prostřednictvím autofagie k odstraňování poškozených organel, toxických metabolitů či intracelulárních patogenů. Kromě cytoprotektivní funkce však může autofagie způsobit i buněčnou smrt při natrávení

životně důležitých komponent buňky. K autofagické smrti zřejmě dochází především při chybějící kaspasové signalizaci nebo v případě inhibice kaspasové aktivity (Buytaert et al. 2007). Při PDT může hrát autofagie významnou roli pro vyvolání buněčné smrti, především u buněk rezistentních k apoptóze (Mfouo-Tynga a Abrahamse 2015). V případě autofagie jako způsobu buněčné smrti není zcela jasné, zda dochází k zániku buňky tímto způsobem záměrně a přímo, či jde o selhání při snaze zachovat životaschopnost buňky (Buytaert et al. 2007).

Morfologicky je pro autofagii charakteristické vytvoření autofagosomu – membránového útvaru, do kterého jsou pohlceny poškozené komponenty či organely. Následně dochází ke spojení s lyzosomy, degradaci pomocí lyzosomálních hydroláz a opětovnému využití zbylých částí rozložených komponent buňky (Mfouo-Tynga a Abrahamse 2015).

Tvorbu autofagosomu kontrolují tzv. geny související s autofagií (Atg), které byly objeveny u kvasinek a většina je zachovaná i v savčích buňkách. V buňce je autofagie regulována signálními dráhami zahrnující fosfatidylinositol-3-kinasy (PI3K) třídy I a III, které autofagii inhibují či stimulují (Buytaert et al. 2007).

Autofagie může mít v nádorových buňkách podstupujících PDT efekt cytoprotektivní a sloužit jako mechanismus k udržení životaschopnosti buňky po oxidačním poškození, ale může vést i ke smrti buňky (Agostinis et al. 2011). *In vitro* studie ukázaly, že při použití PS poškozujících mitochondrie a ER (např. verteporfin) došlo u hepatomových buněk s inaktivovaným Atg7 ke zvýšení cytotoxicity PDT; naopak u PS lokalizovaných v lyzosomech (talaporfin, padeliporfin) těchto buněk se cytotoxicita snížila (Garg et al. 2015). Na význam autofagie při současné inhibici apoptózy ukázala studie s hypericinem jako PS u buněk s inaktivovanou apoptotickou cestou (absence Bax a Bak), kde přesto docházelo k buněčné smrti, vykazující známky autofagie. Pokud pak u buněk postrádajících možnost apoptotické smrti dojde k inhibici autofagie (např. inhibitorem PI3K - wortmanninem), úmrtnost buněk významně klesá (Buytaert et al. 2007). Role autofagie v buněčné smrti vyvolané PDT však zatím není zcela objasněna (Reiners et al. 2010) a prozatímni výsledky vyžadují další testování *in vivo* k objasnění významu autofagie pro rezistenci či naopak zvýšení citlivosti k PDT (Garg et al. 2015).

3. CÍLE PRÁCE

- Stanovení fotodynamické aktivity u vybraných azaftalocyaninových fotosenzitizérů (P39-1Zn-Me, ZIP252Zn-Me, ZIP280Zn, ZIP288-OHZn) a některých klinicky užívaných látek (Photosens[®], methylenová modř) na lidské nádorové buněčné linii HeLa.
- Stanovení vlastní toxicity hodnocených látek bez expozice světlu (tzv. dark toxicita).
- Určení subcelulární lokalizace vybraných PS v buňkách.
- Fotografická dokumentace morfologických změn v buňkách po aktivaci PS pomocí konfokálního mikroskopu.
- Vytvoření časového profilu ROS vznikajících v buňkách před, během a po ukončení ozařování.
- Porovnání fotodynamické účinnosti studovaných látek, srovnání nových PS se zkoumanými klinicky využívanými látkami.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. VYBAVENÍ PRO PRÁCI S BUNĚČNOU LINIÍ

4.1.1. Pracovní pomůcky pro manipulaci

- automatické pipety, různý rozsah (Eppendorf, Německo)
- 8-kanálová elektronická pipeta e-PET BioHit 50-1200 µl (BioHit, Finsko)
- sterilní špičky, plastové, různý rozsah (Eppendorf, Německo)
- sterilní pipety, plastové, různý objem (TPP, Švýcarsko)
- pipetovací nástavce Biohit Midi Plus (Biohit, Finsko) a SwiftPet+ (HTL, Polsko)
- Pasteurovy pipety, sterilní (Brand, Německo)
- sterilní inkubační nádoby T75, plastové (TPP, Švýcarsko)
- 96-jamkové mikrotitrační destičky, ploché dno (TPP, Švýcarsko)
- Petriho misky, sterilní, vhodné pro konfokální mikroskopii (tloušťka 140 µm; WillCo Wells, Nizozemsko)
- sterilní mikroskopická sklička s kultivačním nástavcem (Eppendorf, Německo)
- sterilní mikrozkmavky, různý objem (Eppendorf, Německo)
- sterilní laboratorní sklo (Thermo Fisher Scientific, Česká republika)
- sterilní plastové vaničky
- podložní a krycí sklička (Thermo Fisher Scientific, Česká republika)
- Bürkerova komůrka (Brand, Německo)

4.1.2. Pracovní přístroje

- buněčné inkubátory s termostatem a regulací koncentrace CO₂ (Sanyo, Esco)
- box s laminárním prouděním Bio Air TopSafe 1.2 (EuroClone, Itálie)
- vodní lázeň (Memmert, Německo)
- epifluorescenční mikroskop Nikon Eclipse TS100 a Nikon Ti E (Nikon, Japonsko)
- 450 W xenonová lampa Newport (Newport Corporation, USA)
- desková třepačka Heidolph Titramax 100 (Heidolph Instruments, Německo)

- čtečka mikrotitračních destiček Tecan Infinite M200 (Tecan Group Ltd., Švýcarsko)
- konfokální laserový rastrovací mikroskop Nikon A1+ (Nikon, Japonsko)

4.1.3. Použité chemické látky a reagensy

- kultivační médium DMEM (Lonza, Belgie)
- fetální bovinní sérum, 10% (Lonza, Belgie)
- pufr HEPES, 1M (Sigma, Německo)
- roztok penicilin/streptomycin (Lonza, Belgie)
- roztok L-glutaminu (Lonza, Belgie)
- roztok trypsin/EDTA (Lonza, Belgie)
- fosfátový pufr, tablety (Sigma, Německo nebo MP Biomedicals, USA)
- roztok peroxidu vodíku, 3% (Fluka, Sigma, Německo)
- trypanová modř, 0,4% (Sigma-Aldrich, USA)
- roztok neutrální červeně, 3,3 mg/ml (Sigma-Aldrich, USA)
- fixační roztok pro neutrální červeně – 1% roztok CaCl₂ v 0,5% formaldehydu
- lyzační roztok pro neutrální červeně – 1% roztok ledové kyseliny octové v 50% etanolu
- dimethylsulfoxid (DMSO)
- fotosenzitizér P39-1Zn-Me (vědecká skupina doc. Zimčíka, FaF UK)
- fotosenzitizér ZIP252Zn-Me (vědecká skupina doc. Zimčíka, FaF UK)
- fotosenzitizér ZIP280Zn (vědecká skupina doc. Zimčíka, FaF UK)
- fotosenzitizér ZIP288-OHZn (vědecká skupina doc. Zimčíka, FaF UK)
- fotosenzitizér Photosens[®] (dar od Prof. Eugeny A. Lukyanetse, Rusko)
- fotosenzitizér methylenová modř (Sigma-Aldrich, USA)
- fluorescenční sonda Hoechst 33342 (Molecular Probes, USA)
- fluorescenční sonda MitoTracker Red CMXRos (Molecular Probes, USA)
- fluorescenční sonda CellMask Green Plasma membrane Stain (Molecular Probes, USA)
- fluorescenční sonda LysoTracker Blue DND-22 (Molecular Probes, USA)
- fluorescenční sonda MitoTracker Green FM (Molecular Probes, USA)

- ADS pufr obsahující vápník (116 mM NaCl, 5,3 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄·7H₂O, 1,13 mM NaH₂PO₄·2H₂O, 20 mM HEPES, 1 mM CaCl₂)
- paraformaldehyd (Sigma-Aldrich, USA)
- bovinní sérový albumin (BSA; Sigma-Aldrich, USA)
- Alexa Fluor 488 konjugát (Thermo Fisher Scientific)
- Alexa Fluor 555 phalloidin (Molecular Probes, USA)
- CM-H2DCFDA (Molecular Probes, USA)

4.2. PRÁCE S NÁDOROVOU BUNĚČNOU LINIÍ HeLa

Buněčná linie HeLa byla první lidskou buněčnou linií kultivovanou *in vitro*. Pochází z buněk agresivního lidského karcinomu děložního čípku odebraných roku 1951 pacientce Henriette Lacks (proto název HeLa). Díky svým výhodným vlastnostem jsou HeLa buňky kultivovány a ve velké míře využívány pro biomedicínský výzkum po celém světě (Beskow 2016, Landry 2013). Nevýhodou práce s HeLa buňkami je výskyt genů pro lidský papillomavirus 18 (HPV-18), který může vyvolat neoplastickou aktivitu (Tatalick 2005). S tím souvisí bezpečnostní opatření při práci s touto buněčnou linií. HeLa buněčná linie byla použita při všech následujících experimentech. Buňky pochází z Americké banky buněčných linií (ATCC, USA).

4.2.1. Příprava média pro kultivaci buněk

K médiu DMEM bylo přidáno fetální bovinní sérum (10 % objemu), HEPES pufr (1 % objemu), roztok penicilin/streptomycin (1 % objemu) a roztok L-glutaminu (2 % objemu). Smísením těchto složek ve sterilním prostředí laminárního boxu bylo připraveno sterilní médium obsahující sérum (SCM) pro kultivaci HeLa buněčné linie.

4.2.2. Kultivace

Kultivace HeLa buněčné linie probíhala v plastových sterilních inkubačních nádobách s plochou 75 cm² (T75) v buněčném inkubátoru při 37°C, 5% atmosféře CO₂

a stálé vlhkosti. Jako médium pro kultivaci bylo použito připravené SCM. Manipulace s buňkami probíhala ve sterilním prostředí laminárního boxu.

4.2.3. Pasážování

Pasážování je přenos buněk do nové kultivační nádoby s čerstvým médiem za účelem udržení jejich životnosti *in vitro*. Tento proces je nutno v pravidelných intervalech opakovat kvůli vyčerpání živného média.

HeLa buňky byly kultivovány v inkubačních lahvích 3-4 dny, během nichž docházelo k 80-90% nárůstu na dně lahve (konfluence). Konfluence byla před pasážováním mikroskopicky zkontrolována. Při pasážování bylo z lahve nejprve odebráno staré médium. Buňky na dně kultivační nádoby byly dvakrát omyty přehřátým pufrem (PBS) a byl k nim přidán 1 ml roztoku trypsinu, aby se buňky odloučily ode dna lahve. Tento proces probíhal po dobu 5 min v inkubátoru (37°C). Oddělení buněk ode dna a vznik jejich suspenze byl zkontrolován pod mikroskopem. Poté bylo do lahve přidáno 9 ml SCM a celý obsah byl několikrát nasát pipetou a vypuštěn proti dnu lahve, aby byla zajištěna důkladná resuspendace buněk a rozbití buněčných shluků.

Poměrná část připravené suspenze byla přenesena do nové kultivační lahve s 15 ml čerstvého SCM, obě složky byly promíchány a suspenze rozprostřena po dně nádoby. Do další pasáže byly buňky uchovávány za výše uvedených standardních podmínek v buněčném inkubátoru. Část buněčné suspenze, která nebyla použita při pasážování, byla následně využita na experimenty.

Pasážování probíhalo ve sterilním prostředí laminárního boxu, použité roztoky byly přehřány ve vodní lázni na 37°C.

4.2.4. Stanovení počtu životaschopných buněk

Stanovení probíhalo mikroskopicky s využitím Bürkerovy komůrky. V mikrozkuhavce bylo smícháno 100 µl 0,4% roztoku trypanové modři se stejným objemem suspenze HeLa buněk. Trypanová modř obarví pouze mrtvé buňky, zatímco živé zůstanou bezbarvé (jsou schopny barvivo aktivně vyloučit). Na každou stranu Bürkerovy komůrky bylo nanášeno 10 µl připravené suspenze s barvivem a živé buňky

spočítány pod mikroskopem. Z jejich zjištěného množství byl následně určen počet buněk v 1 ml suspenze.

4.2.5. Nasazování buněk

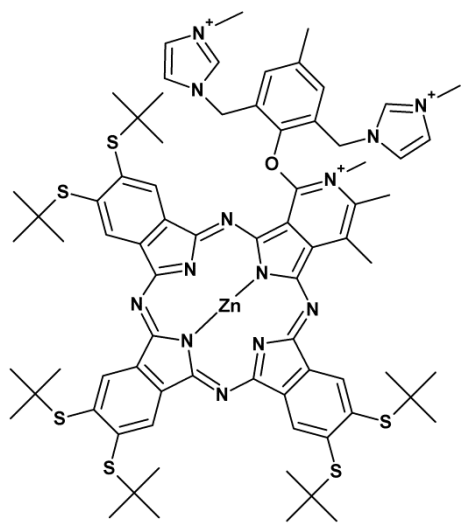
Pro cytotoxické experimenty byly HeLa buňky nasazovány na 96-jamkové mikrotitrační destičky v koncentraci 75 000 buněk/ml. Suspenze pro nasazování byla připravena přidáním přehřátého SCM k vypočtenému množství buněčné suspenze. Připravená suspenze pro nasazování byla poté pipetována na mikrotitrační destičku multikanálovou pipetou v objemu 100 μ l do každé jamky. Takto nasazená destička se před experimenty nechala 24 h inkubovat.

Pro fotografickou dokumentaci se buněčná linie nasazovala na sterilní Petriho misky vhodné pro konfokální mikroskopii (průměr 3 cm). Obdobným způsobem jako u mikrotitrační destičky se připravila buněčná suspenze o koncentraci 50 000 buněk/ml a na Petriho misku byla pipetována v objemu 2 ml.

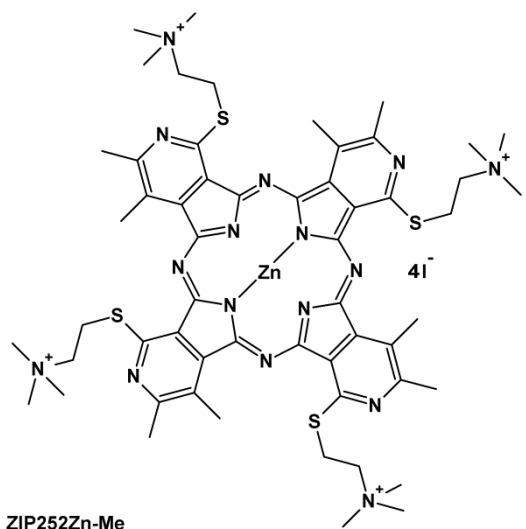
4.3. STUDOVANÉ FOTOLENIZIZÉRY

Studované látky představují chemicky různorodou skupinu. Většinu tvoří tetrapyridoporfyrinové (TPyPz) deriváty a látky od nich odvozené. TPyPz jsou aza-analogy ftalocyaninů, kde jsou všechna benzenová jádra nahrazena pyridinovými. Ze studovaných látek mají strukturu TPyPz dvě - ZIP252Zn-Me a ZIP280Zn. Fotosenzitizér P39-1Zn-Me má strukturu PC, kde je však jen jedno benzenové jádro nahrazeno pyridinovým. U fotosenzitizéru ZIP288-OHZn jsou pyridinová jádra nahrazena pyrazinovými, jedná se tedy o tetrapyrazinoporfyrin (TPyzPz). Klinicky používaný Photosens[®] má strukturu PC, methylenová modř má potom strukturu zcela odlišnou (není odvozena od porfyriu) – je to derivát fenothiazinu. Všechny struktury studovaných PS jsou uvedeny na Obr. 14.

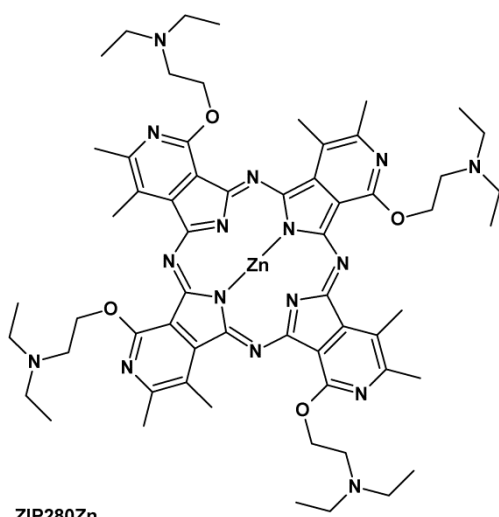
Nové studované PS obsahují ve svém středu zinečnatý iont. Na centrální strukturu mají tyto PS navázané různé substituenty, často přes heteroatomy S nebo O. Fotosenzitizéry P39-1Zn-Me a ZIP252Zn-Me mají kationický charakter.



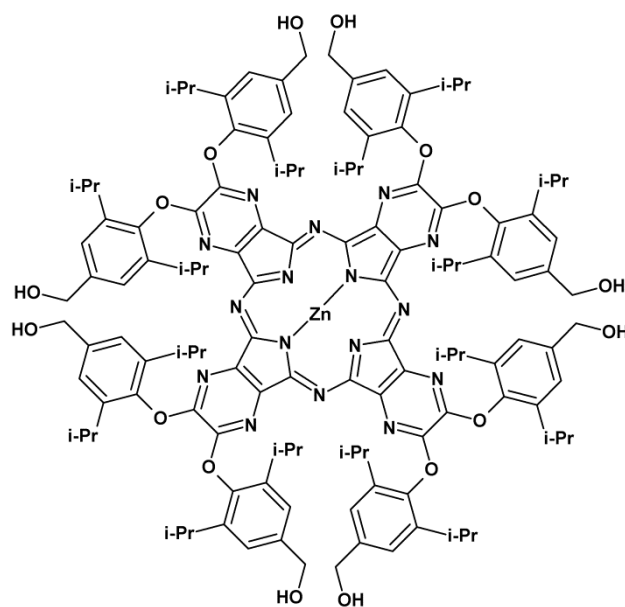
P39-1Zn-Me



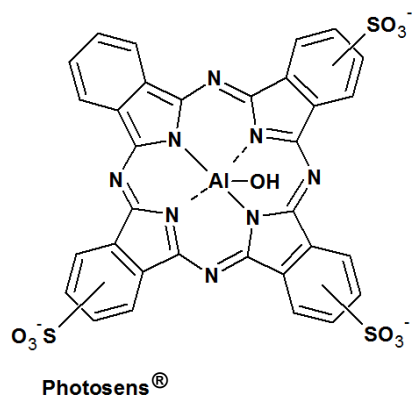
ZIP252Zn-Me



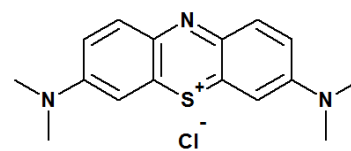
ZIP280Zn



ZIP288-OHZn



Photosens®



Methylenová mostič

Obr. 14 Struktury studovaných fotosenzitizérů

Zásobní roztoky studovaných fotosenzitizérů:

- fotosenzitizér P39-1Zn-Me (v DMSO) = 10 mM
- fotosenzitizér ZIP252Zn-Me (v SCM) = 1 mM
- fotosenzitizér ZIP280Zn (v DMSO) = 10 mM
- fotosenzitizér ZIP288-OHZn (v DMSO) = 10 mM
- fotosenzitizér Photosens[®] (v SCM) = 2,5 mM
- fotosenzitizér methylenová modř (v SCM) = 1 mM

První čtyři uvedené fotosenzitizéry byly syntetizovány vědeckou skupinou doc. Zimčíka na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Fotosenzitizér Photosens[®] byl získán jako dar od Prof. Eugeny A. Lukyanetse (Rusko), fotosenzitizér methylenová modř byl zakoupen od Sigma-Aldrich (USA).

4.4. CYTOTOXICITNÍ EXPERIMENTY

Cytotoxicitní experimenty probíhaly na 96-jamkové mikrotitrační destičce, na kterou byly nasazeny HeLa buňky v koncentraci 75 000 buněk/ml způsobem uvedeným výše (4.2.5). Buňky se před experimenty nechaly 24 h inkubovat. Po tomto časovém intervalu byly k buňkám přidány zkoumané fotosenzitizéry v různých koncentracích. Část buněk byla ponechána jako pozitivní a negativní kontrola. U buněk pozitivní kontroly došlo pouze k výměně média. Negativní kontrolu tvořily buňky usmrcené 5 μ l H₂O₂.

Zásobní roztoky studovaných látek byly naředěny rozehřátým SCM na roztoky požadované koncentrace ve sterilních mikrozkuvkách. U testovaných buněk bylo odstraněno médium a nahrazeno stejným objemem (100 μ l) roztoku fotosenzitizéru. Práce probíhala ve sterilním prostředí laminárního boxu a ve tmě, aby se zabránilo předčasné a nežádoucí aktivaci fotosenzitizérů světlem. Následně probíhalo hodnocení toxicity daného PS po aktivaci světlem (fototoxicita), nebo stanovení toxicity samotného PS bez ozáření (dark toxicita).

4.4.1. Hodnocení fototoxicity

Fototoxicita byla stanovována po naředění zásobních roztoků PS předeřtým SCM v následujícím rozmezí koncentrací:

- P39-1Zn-Me: 0,01 – 1 μM
- ZIP252Zn-Me: 0,02 – 2 μM
- ZIP280Zn: 0,1 – 10 μM
- ZIP288-OHZn: 0,01 – 50 μM
- Photosens[®]: 0,5 – 10 μM
- Methylenová modř: 0,1 – 100 μM

Na mikrotitrační destičce bylo z vybraných jamek odstraněno staré médium a bylo nahrazeno roztokem PS – každá jednotlivá koncentrace studované látky byla pipetována alespoň do tří jamek, pipetováno bylo 100 μl roztoku do každé jamky. Následovala 12 h inkubace v inkubátoru. Po tomto intervalu bylo u všech buněk vyměněno médium za čerstvé (buňky s PS i buňky kontrol). Následovalo ozáření buněk červenou částí viditelného spektra pomocí 450 W xenonové výbojky ($\lambda > 570 \text{ nm}$, $12,4 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, $11,2 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$), trvající 15 min. Destička byla poté uložena do inkubátoru a po 24 h byla hodnocena životaschopnost buněk.

4.4.2. Hodnocení dark toxicity

Vlastní toxicita fotosenzitizéru, tedy toxicita bez aktivace světlem (tzv. „dark toxicita“), byla u námi studovaných látek stanovena po naředění na následující rozmezí finálních koncentrací:

- ZIP252Zn-Me: 5 – 500 μM
- ZIP280Zn: 5 – 200 μM
- Photosens[®]: 10 – 1000 μM
- Methylenová modř: 1 – 1000 μM

Nanášené koncentrace PS byly ve většině případů několikanásobně vyšší než u fototoxických experimentů. Látky byly na buňky nanášeny stejně jako při hodnocení fototoxicity a po 24 h inkubace bez přítomnosti světla se hodnotila jejich životaschopnost. U látek P39-1Zn-Me a ZIP288-OHZn nebyla toxicita bez ozáření

stanovena, žádná z nich nevykazovala vlastní toxicitu ani po překročení limitu rozpustnosti.

4.4.3. Vyhodnocení experimentů - stanovení životaschopnosti buněk

K vyhodnocení životaschopnosti buněk po cytotoxických experimentech (fototoxicita a dark toxicita) byl použit test na vychytávání neutrální červeně.

Neutrální červeně (NR) je ve vodě rozpustné fenazinové barvivo, které může snadno prostupovat buněčnými membránami. Živé buňky jsou schopny NR aktivně vychytávat a ukládají ji do lyzosomů. Tam dochází díky nízkému pH k protonizaci aminoskupin barviva a jeho zadržení (kvůli náboji nemůže NR difundovat zpět přes membránu). U mrtvých buněk s poškozenými membránami k zadržení barviva nedochází. Množství zadržené NR je tedy úměrné počtu životaschopných buněk, jedná se o kvantitativní stanovení (Singh et al. 2008, Repetto et al. 2008).

Roztok NR o koncentraci 80 $\mu\text{l/ml}$ (přípravený ze zásobního roztoku NR naředěním predehřátým SCM) byl v objemu 100 μl přidán k buňkám po ukončení inkubace se studovanými PS. Konečná koncentrace barviva byla tedy 40 $\mu\text{g/ml}$. Takto se destička s buňkami nechala inkubovat 3 h. Následně bylo z buněk odstraněno médium a do každé jamky napipetováno 100 μl fixačního roztoku. Roztok se nechal působit 15 min při laboratorní teplotě, během této doby došlo k fixaci buněk na dno jamek mikrotitrační destičky. Po fixaci byl fixační roztok odstraněn a buňky dvakrát opláchnuty 100 μl pufru PBS. Následně se provedla lyzace buněk působením 100 μl lyzačního roztoku. Buňky byly lyzovány na deskové třepačce po dobu 30 min.

Vyhodnocení životaschopnosti buněk probíhalo spektrofotometricky na čtečce mikrotitračních destiček. Spočívalo v měření absorbance pro jednotlivé jamky destičky při vlnové délce 540 nm. Výsledek byl vyjádřen jako procentuální životaschopnost buněk vztahovaná k pozitivní kontrole. Pomocí testu na vychytávání NR byla hodnocena fototoxicita i dark toxicita studovaných látek.

Výsledky hodnocení cytotoxicity jednotlivých látek byly dále zpracovány v programu Microsoft Office Excel 2007. Grafy byly vytvořeny v programu GraphPad Prism (verze 6.04), ve kterém byly také určeny EC_{50} a TC_{50} a vytvořena statistická analýza. Získaná data byla zpracována jednofaktorovou analýzou rozptylu

s Bonferroniho *post hoc* metodou vícenásobného porovnávání. Naměřené výsledky byly porovnány s kontrolami a průměry měření byly pokládány za statisticky důležité, pokud $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ a $***p < 0,001$. Všechny cytotoxicitní experimenty byly prováděny opakovaně - hodnocení fototoxicity minimálně v počtu pěti opakování a hodnocení vlastní toxicity látek třikrát.

4.5. FOTOGRAFICKÁ DOKUMENTACE

Cílem fotografické dokumentace bylo určení subcelulární lokalizace vybraných PS po jejich akumulaci uvnitř buněk. Subcelulární lokalizace byla stanovována u všech studovaných nově syntetizovaných PS. Dále byly pozorovány a zdokumentovány morfologické změny, které v buňkách probíhaly po aktivaci PS. V našem případě byly mikrofotografie těchto změn pořízeny pouze s látkou P39-1Zn-Me, která se v průběhu cytotoxicitních experimentů jevila jako nejzajímavější a vykazovala nejvhodnější vlastnosti.

HeLa buňky byly nasazeny na sterilní Petriho misky vhodné pro konfokální mikroskopii v koncentraci 50 000 buněk/ml postupem popsáním výše (4.2.5), případně na sterilní mikroskopická sklíčka s kultivačním nástavcem. Po 24 h inkubace byl k buňkám přidán vybraný PS a inkubace probíhala dalších 12 h.

4.5.1. Subcelulární lokalizace

Při určování subcelulární lokalizace byl vybraný PS pipetovaný k buňkám v koncentraci 10 μM , resp. 1 μM pro P39-1Zn-Me (limit rozpustnosti v kultivačním médiu). U látky ZIP288Zn-OH byl při použití koncentrace 10 μM také překročen limit rozpustnosti, to ale bylo nutné pro získání signálu PS uvnitř buněk. Po 12 h inkubace byly buňky opláchnuty a byly k nim přidány fluorescenční sondy MitoTracker Green FM a LysoTracker Blue DND-22 (obě 2 μM) v čerstvém médiu a buňky se ponechaly 15 min inkubovat. Následně byly dvakrát omyty predehřátým ADS pufrém obsahujícím vápník, bylo přidáno čerstvé bezsérové kultivační médium a poté byly pořízeny mikrofotografie.

4.5.2. Morfologické změny na živých buňkách

Při fotografickém hodnocení morfologických změn byly buňky opět nasazeny výše uvedeným způsobem na Petiho misky vhodné pro konfokální mikroskopii. P39-1Zn-Me byl k buňkám přidán v koncentraci odpovídající EC_{15} (0,03 μ M) a EC_{85} (0,18 μ M). Buňky, u kterých bylo jen vyměněno médium, byly použity jako kontrolní. Po 12 h inkubace s PS bylo buňkám vyměněno médium za čerstvé a následně byly 15 min ozařovány. Za 24 h byly k buňkám přidány fluorescenční sondy: 2 μ g/ml Hoechst 33342, 0,5 μ M MitoTracker Red CMXRos a 0,5x koncentrovaný CellMask Green Plasma membrane Stain a ponechaly se 10 min inkubovat. Opět následovalo dvojnásobné omytí buněk ADS pufrém obsahujícím vápník a poté byly konfokálním laserovým rastrovacím mikroskopem pořízeny fotografie, vždy v pěti konfokálních řezech v celé tloušťce preparátu.

4.5.3. Morfologické změny na fixovaných buňkách

Pro tento účel byly buňky nasazeny, kultivovány a ozařovány jako v předchozím postupu, místo Petiho misek byla použita sterilní mikroskopická sklíčka s kultivačním nástavcem. 24 h po ozáření byly buňky fixovány přehřátým 4% paraformaldehydem v SCM po dobu 15 min při 37 °C. Poté byly 3x opláchnuty dPBS (5 min) a 15 min permeabilizovány 0,5% Triton X-100 v dPBS při pokojové teplotě. Následovalo opět 3x opláchnutí dPBS (5 min) a poté 60 min blokování buněk 3% BSA v dPBS při pokojové teplotě. Dále byly buňky 60 min barveny 2,5 μ g/ml konjugátem Alexa Fluor 488 a po trojnásobném omytí buněk dPBS byl na dalších 30 min přidán 5 U/ml Alexa Fluor 555 phalloidin. Buňky byly omyty a dále značeny 4 nM Hoechst 33342 v dPBS po dobu 15 min. Po dalším omytí byly z buněk odstraněny ionty omytím MQ-vodou (5 min) a poté ponechány uschnout a namontovány. Montovací médium se nechalo přes noc tuhnout a poté byly preparáty zapečetěny čirým lakem. Vždy sedm konfokálních řezů bylo použito pro zachycení celé tloušťky preparátů.

4.6. TVORBA ROS

Ke kvantitativnímu stanovení ROS vznikajících v buňkách slouží např. tzv. DCF analýza. Je založena na měření fluorescence, ke které dochází po reakci činidla s ROS v živých buňkách. Jako fluorescenční činidlo jsme použili chlormethylový derivát 2',7'-dichlordihydrofluorescein-diacetátu (CM-H₂DCF-DA), který může volně prostupovat do buněk. V nich dochází vlivem esteráz k odštěpení acetátů a vzniku aniontu H₂DCF⁻, kterému iontový charakter již prostup membránami neumožňuje. Tato forma vykazuje pouze slabou fluorescenci, pokud ale dojde k její oxidaci na DCF vlivem ROS, fluorescence prudce stoupá (Wang a Roper, 2014).

Naším cílem bylo stanovit časový profil vzniku ROS v buňkách před, během a po ozařování. ROS byly v buňkách vytvářeny na základě fotoreakce vybraného PS, se kterým byly buňky inkubovány. Analýza byla opět prováděna s P39-1Zn-Me, který při cytotoxicitních experimentech vykazoval nejlepší výsledky.

HeLa buňky byly nasazeny na mikrotitrační destičku v koncentraci 75 000 buněk/ml, po 24 h k nim byl přidán P39-1Zn-Me v koncentraci odpovídající EC₈₅ (0,18 μM) a buňky se nechaly 12 h inkubovat. Poté byl na destičku přidán roztok CM-H₂DCF-DA v bezsérovém médiu o finální koncentraci 2,5 μM a nechal se 30 min inkubovat. Následně byla měřena fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$) v časových intervalech 3 min. Nejprve se měřilo 6, 3 a 0 min před ozářením; poté byly buňky ozářeny červenou částí viditelného spektra po dobu 3 min a změřena fluorescence a toto měření probíhalo opakovaně (5x). Po ukončení ozařování byla měřena fluorescence opět v intervalu 3 min, tedy 3, 6, 9, 12 a 15 min po ukončení ozařování. Kromě ozařování probíhal celý experiment ve tmě a buňky byly v intervalech bez ozáření uloženy v inkubátoru.

Výsledky měření byly zpracovány v programu Microsoft Office Excel 2007, graf závislosti fluorescence na množství vznikajících ROS byl vytvořen v programu GraphPad Prism.

5. VÝSLEDKY

5.1. CYTOTOXICITNÍ EXPERIMENTY

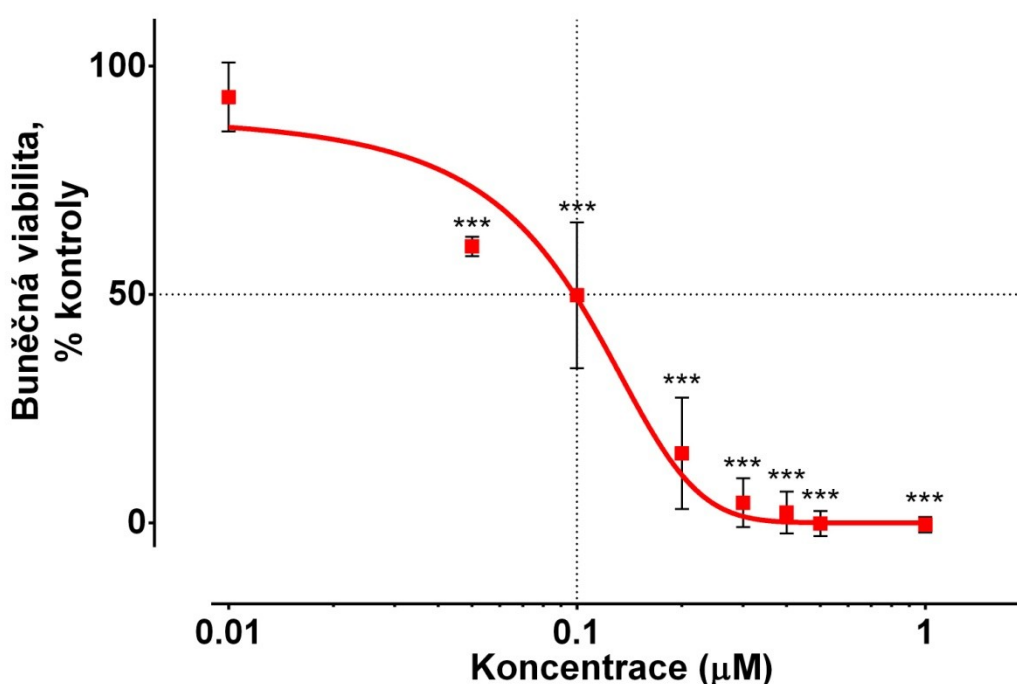
Při hodnocení fototoxicity uvedených fotosenzitizérů byla z naměřených výsledků stanovena střední efektivní koncentrace EC_{50} , tedy taková koncentrace PS, u které došlo po fotoaktivaci ke snížení životaschopnosti HeLa buněk o 50 % v porovnání s kontrolou. U stanovení dark toxicity byla ze získaných dat vyjádřena střední toxická koncentrace TC_{50} . Ta udává koncentraci PS, u které dojde u buněk ke snížení životaschopnosti o 50 % bez předchozí fotoaktivace ve srovnání s kontrolou.

Ze získaných hodnot EC_{50} a TC_{50} byl následně určen poměr TC_{50}/EC_{50} . Čím vyšší je tato hodnota, tím větší je vzdálenost efektivní a toxické koncentrace PS a tím výhodnější vlastnosti pro praktické použití má daný fotosenzitizér.

5.1.1. Fotosenzitizér P39-1Zn-Me

5.1.1.1. Fototoxicita

Fototoxicita tohoto PS byla hodnocena v rozmezí koncentrací 0,01 – 1 μM . Ze získaných výsledků byla stanovena hodnota $\text{EC}_{50} = 0,10 \pm 0,024 \mu\text{M}$. Závislost množství životaschopnosti buněk (vyjádřené jako % kontroly) na koncentraci hodnoceného PS je vyjádřena následujícím grafem (Obr. 15).



*Obr. 15 Graf závislosti životaschopnosti buněk na stoupající koncentraci P39-1Zn-Me aktivovaného světlem. Hodnoceno 24 h po ozáření. Počet opakování $n=6$, $*p<0,05$, $**p<0,01$ a $***p<0,001$.*

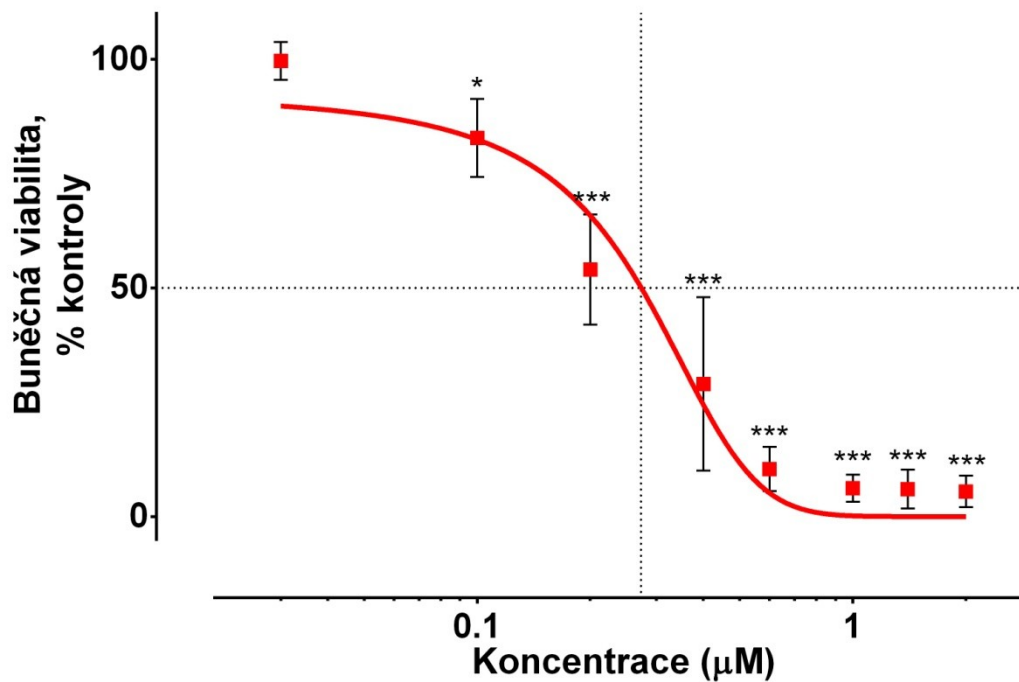
5.1.1.2. Dark toxicita

Toxicita samotného PS bez předchozí aktivace světlem nebyla stanovena. Limit rozpustnosti P39-1Zn-Me v médiu byl cca 1 μM , nad touto koncentrací již docházelo k precipitaci látky z roztoku. Látka až do limitu rozpustnosti nevykázala žádnou vlastní toxicitu. Proto nemohla být TC_{50} experimentálně stanovena.

5.1.2. Fotosenzitizér ZIP252Zn-Me

5.1.2.1. Fototoxicita

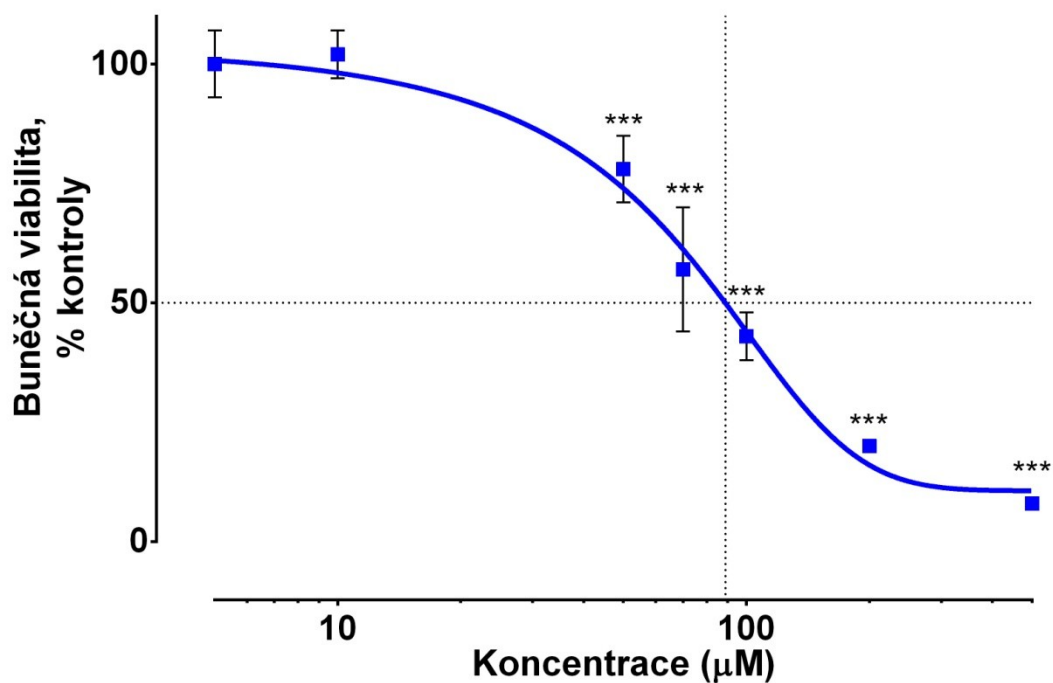
Fototoxicita této látky byla hodnocena v rozsahu koncentrací 0,02 – 2 μM . Střední efektivní koncentrace byla stanovena na $\text{EC}_{50} = 0,27 \pm 0,081 \mu\text{M}$. Výsledky jsou znázorněny v následujícím grafu (Obr. 16).



Obr. 16 Graf závislosti životaschopnosti buněk na stoupající koncentraci ZIP252Zn-Me aktivovaného světlem. Hodnoceno 24 h po ozáření. Počet opakování $n=5$, $*p<0,05$, $**p<0,01$ a $***p<0,001$.

5.1.2.2. Dark toxicita

Dark toxicita fotosenzitizéru ZIP252Zn-Me byla hodnocena v rozmezí koncentrací 5 – 500 μM . Z naměřených hodnot byla určena hodnota $\text{TC}_{50} = 90,1 \pm 15,3 \mu\text{M}$ a sestrojen následující graf (Obr. 17).

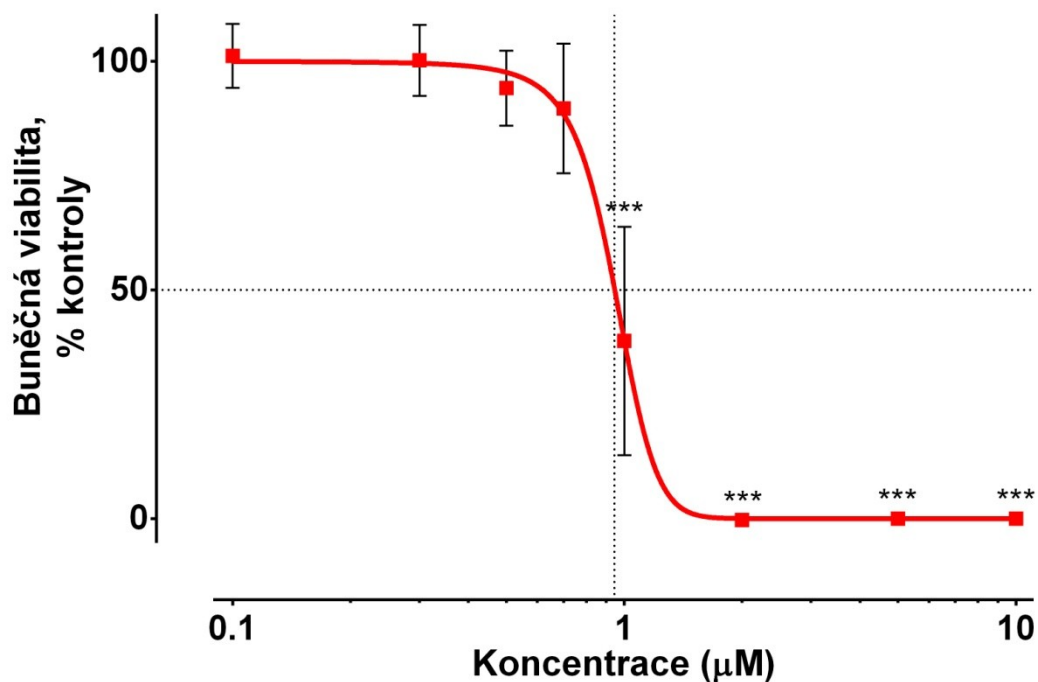


*Obr. 17 Graf závislosti životaschopnosti buněk na stoupající koncentraci ZIP252Zn-Me bez aktivace světlem. Počet opakování $n=3$, $*p<0,05$, $**p<0,01$ a $***p<0,001$.*

5.1.3. Fotosenzitizér ZIP280Zn

5.1.3.1. Fototoxicita

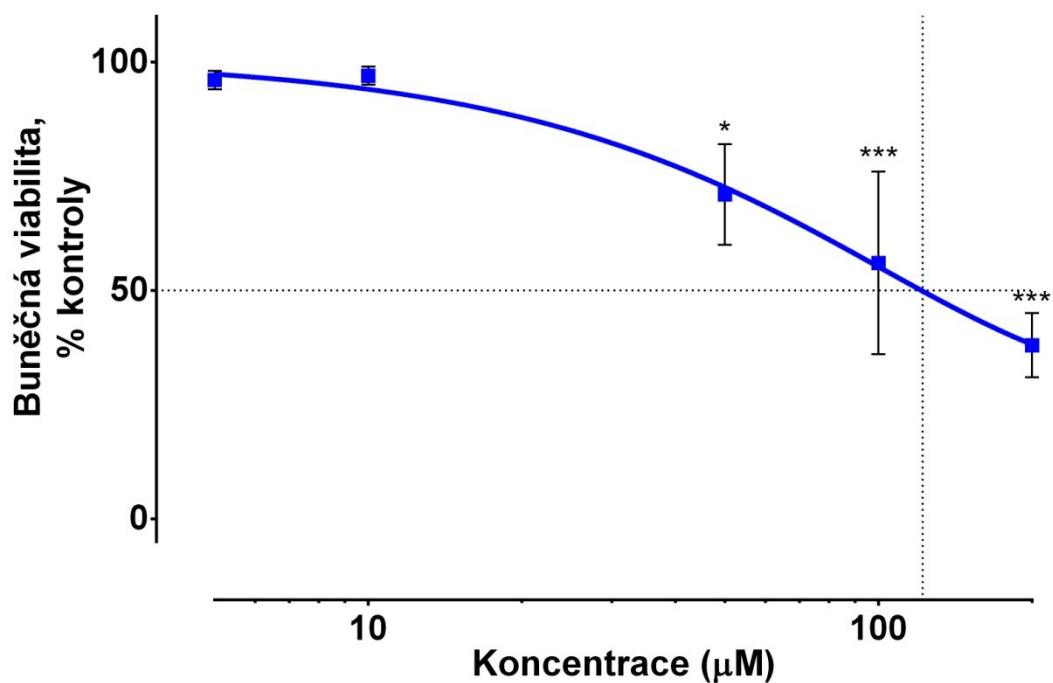
Účinnost tohoto PS byla hodnocena v rozmezí koncentrací 0,1 – 10 μM . Střední efektivní koncentrace byla stanovena na $\text{EC}_{50} = 0,96 \pm 0,082 \mu\text{M}$. Naměřené hodnoty jsou zpracovány v následujícím grafu (Obr. 18).



Obr. 18 Graf závislosti životaschopnosti buněk na stoupající koncentraci ZIP280Zn aktivovaného světlem. Hodnoceno 24 h po ozáření. Počet opakování $n=7$, $*p<0,05$, $**p<0,01$ a $***p<0,001$.

5.1.3.2. Dark toxicita

Dark toxicita studovaného fotosenzitizéru ZIP280Zn byla hodnocena v rozmezí koncentrací 5 – 200 μM . Hodnota střední toxické koncentrace této látky byla stanovena na $\text{TC}_{50} = 123,7 \pm 50,3 \mu\text{M}$, jak ukazuje následující graf (Obr. 19).

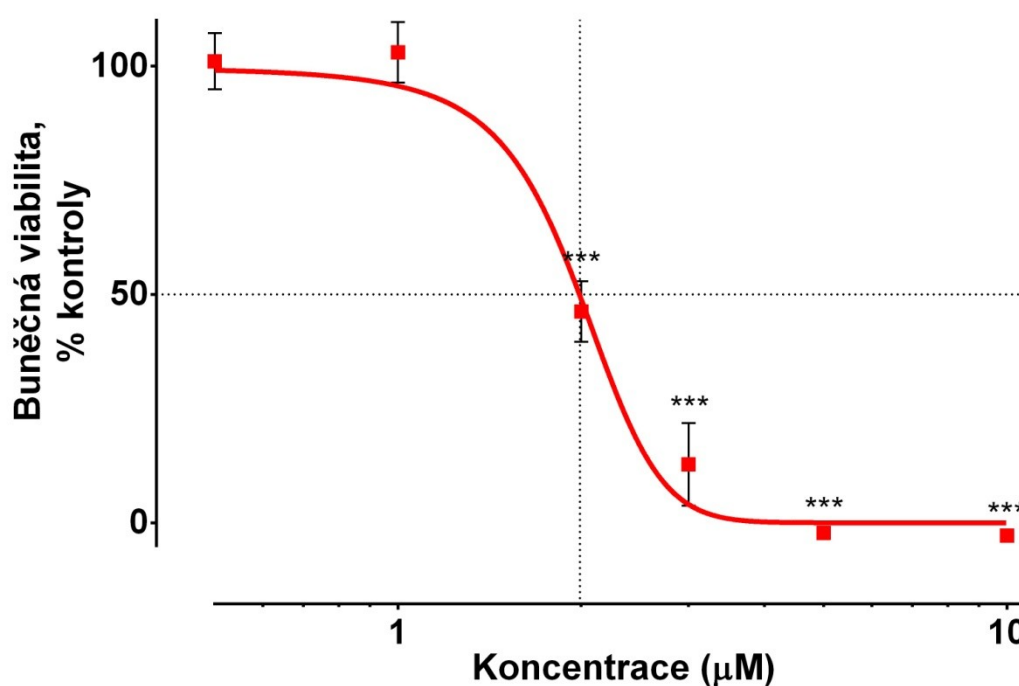


Obr. 19 Graf závislosti životaschopnosti buněk na stoupající koncentraci ZIP280Zn bez aktivace světlem. Počet opakování $n=3$, $*p<0,05$, $**p<0,01$ a $***p<0,001$.

5.1.4. Fotosenzitizér Photosens[®]

5.1.4.1. Fototoxická

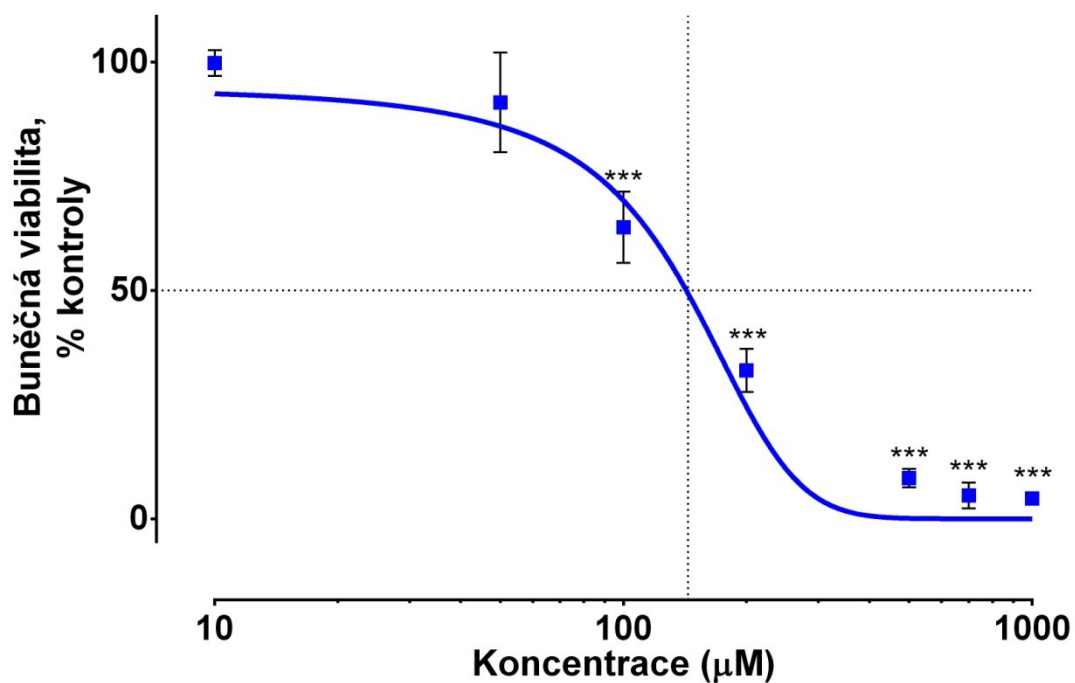
Fotosenzitizér Photosens[®] je klinicky využívanou látkou. V našich experimentech byla jeho aktivita měřena v rozmezí koncentrací 0,5 – 10 μM . Ze získaných výsledků byla stanovena hodnota $\text{EC}_{50} = 1,98 \pm 0,12 \mu\text{M}$. Naměřené hodnoty jsou zpracovány v následujícím grafu (Obr. 20).



Obr. 20 Graf závislosti životaschopnosti buněk na stoupající koncentraci Photosensu[®] aktivovaného světlem. Hodnoceno 24 h po ozáření. Počet opakování $n=5$, $*p<0,05$, $**p<0,01$ a $***p<0,001$.

5.1.4.2. Dark toxicita

Dark toxicita tohoto PS byla hodnocena v rozmezí koncentrací 10 – 1000 μM . Zjištěná střední toxická koncentrace odpovídá $\text{TC}_{50} = 145,1 \pm 14,8 \mu\text{M}$, jak ukazuje následující graf (Obr. 21).

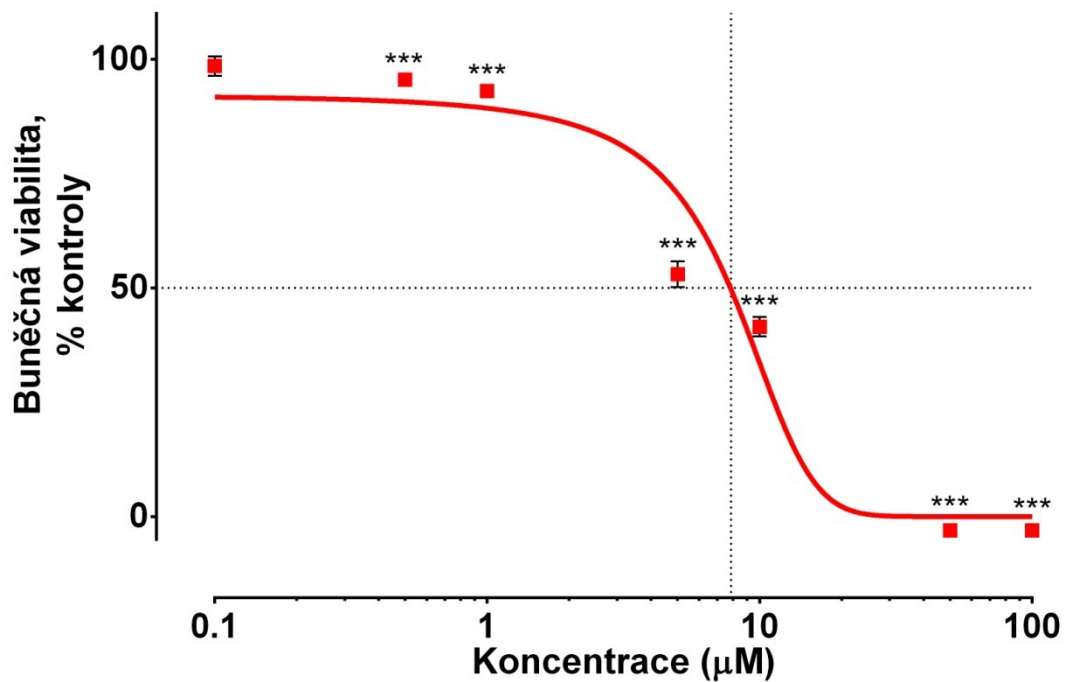


*Obr. 21 Graf závislosti životaschopnosti buněk na stoupající koncentraci Photosensu[®] bez aktivace světlem. Počtek opakování $n=3$, * $p<0,05$, ** $p<0,01$ a *** $p<0,001$.*

5.1.5. Fotosenzitizér methylenová modř

5.1.5.1. Fototoxicita

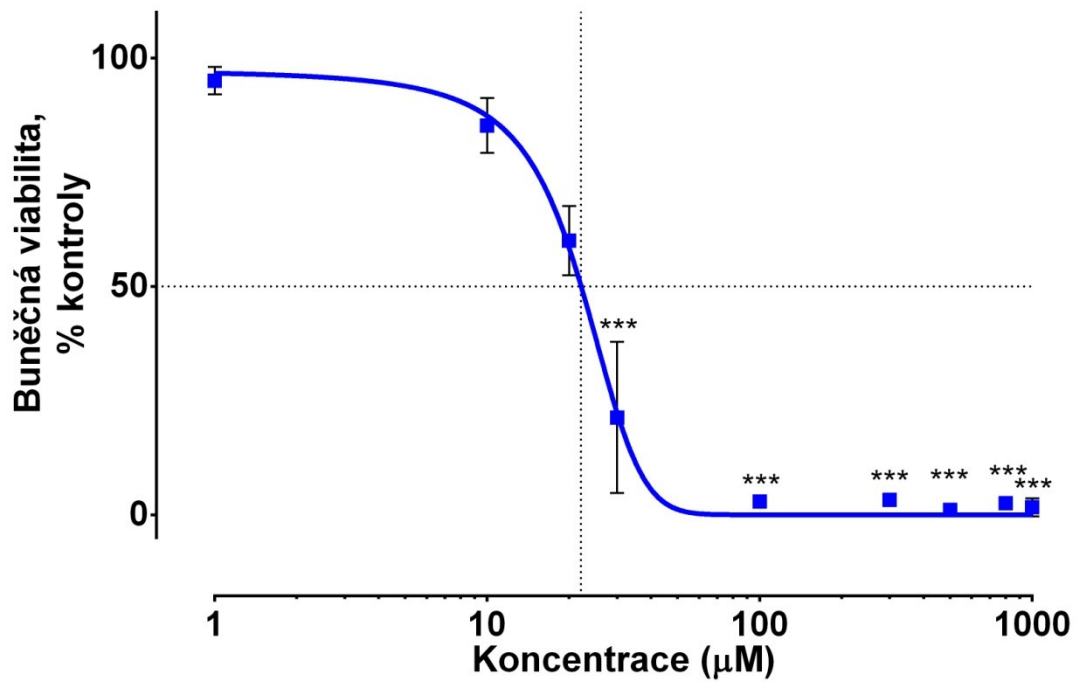
Fototoxická aktivita tohoto klinicky schváleného PS byla hodnocena v rozmezí koncentrací 0,1 – 100 μM . Z naměřených výsledků byla následně získána hodnota $\text{EC}_{50} = 7,72 \pm 0,23 \mu\text{M}$ a následující graf (Obr. 22).



*Obr. 22 Graf závislosti životaschopnosti buněk na stoupající koncentraci methylenové modři aktivované světlem. Hodnoceno 24 h po ozáření. Počet opakování $n=5$, $*p<0,05$, $**p<0,01$ a $***p<0,001$.*

5.1.5.2. Dark toxicita

Dark toxicita methylenové modři byla hodnocena v rozmezí koncentrací 1 – 1000 μM a byla stanovena $\text{TC}_{50} = 21,60 \pm 1,02 \mu\text{M}$. Naměřené hodnoty jsou znázorněny v následujícím grafu (Obr. 23).



*Obr. 23 Graf závislosti životaschopných buněk na stoupající koncentraci methylenové modři bez aktivace světlem. Počtek opakování $n=3$, $*p<0,05$, $**p<0,01$ a $***p<0,001$.*

5.1.6. Fotosenzitizér ZIP288-OHZn

Derivát tetrapyrazinoporfyrazinu, fotosenzitizér ZIP288-OHZn, nevykazoval oproti kontrole signifikantní fototoxický ani vlastní toxický efekt na HeLa buňky, a to ani při použití vyšších koncentrací (1 - 100 μM). Tato látka však vykazovala nad koncentrací 10 μM značnou míru precipitace z důvodu překročení limitu rozpustnosti v kultivačním médiu. Hodnoty EC_{50} , TC_{50} a poměr $\text{EC}_{50}/\text{TC}_{50}$ proto nebyly stanoveny.

5.1.7. Porovnání cytotoxicitních výsledků stanovovaných fotosenzitizérů

Ze získaných hodnot EC_{50} a TC_{50} byl vypočítán poměr $\text{TC}_{50}/\text{EC}_{50}$ pro jednotlivé PS. Tyto hodnoty jsou u studovaných látek shrnuty v Tab. 1. Nejsou uvedeny hodnoty pro PS ZIP288-OHZn, které nebyly stanoveny.

Tab. 1 Shrnutí získaných hodnot EC_{50} , TC_{50} a $\text{TC}_{50}/\text{EC}_{50}$ jednotlivých fotosenzitizérů.

fotosenzitizér	EC_{50}	TC_{50}	$\text{TC}_{50}/\text{EC}_{50}$
P39-1Zn-Me	$0,10 \pm 0,024 \mu\text{M}$	$> 1 \mu\text{M}$	> 10
ZIP252Zn-Me	$0,27 \pm 0,081 \mu\text{M}$	$90,1 \pm 15,3 \mu\text{M}$	334
ZIP280Zn	$0,96 \pm 0,082 \mu\text{M}$	$123,7 \pm 50,3 \mu\text{M}$	129
Photosens [®]	$1,98 \pm 0,12 \mu\text{M}$	$145,1 \pm 14,8 \mu\text{M}$	73
methylenová modř	$7,72 \pm 0,23 \mu\text{M}$	$21,60 \pm 1,02 \mu\text{M}$	3

Z uvedených výsledků vyplývá, že nejlepší aktivitu a zároveň nízkou toxicitu vykazují látky P39-1Zn-Me a ZIP252Zn-Me. U látky P39-1Zn-Me nebylo možné určit hodnotu $\text{TC}_{50}/\text{EC}_{50}$. V aplikovatelných dávkách, tedy pod limitem rozpustnosti (koncentrace v médiu $< 1 \mu\text{M}$) ovšem nevykazoval tento PS žádnou vlastní toxicitu. Ze studovaných látek se proto jeví jako nejúčinnější a nejvhodnější pro další experimenty. Druhá zmíněná látka dosahuje relativně vysoké hodnoty $\text{TC}_{50}/\text{EC}_{50}$, proto by také mohla být použita při PDT. Další studované látky už dosahovaly nižších hodnot $\text{TC}_{50}/\text{EC}_{50}$ (ZIP280Zn), nebo nevykazovaly žádný signifikantní účinek (ZIP288-OHZn).

Klinicky používané látky Photosens[®] a methylenová modř dosahovaly oproti nově hodnoceným PS (kromě ZIP288-OHZn) výrazně nižších hodnot $\text{TC}_{50}/\text{EC}_{50}$.

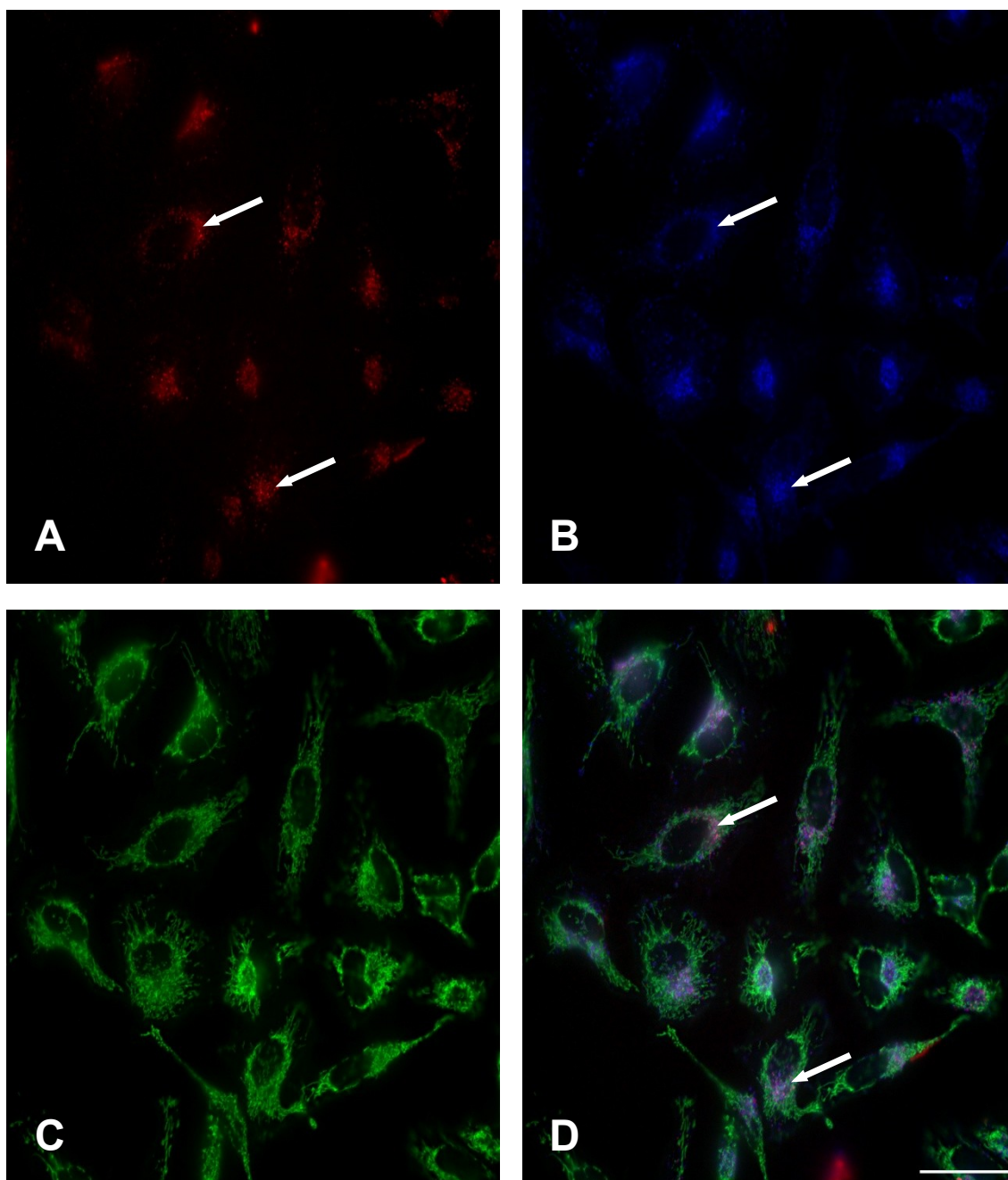
5.2. FOTOGRAFICKÁ DOKUMENTACE

Fotografická dokumentace byla pro tuto práci provedena u studovaných azaftalocyaninových PS. U všech byla zkoumána a zdokumentována subcelulární lokalizace. Pro vyobrazení morfologických změn byl použit pouze P39-1Zn-Me, který při cytotoxicitních experimentech dosahoval nejlepších výsledků. Kromě buněk obsahujících tuto látku byly použity i buňky kontroly, které byly inkubovány bez přidaného PS.

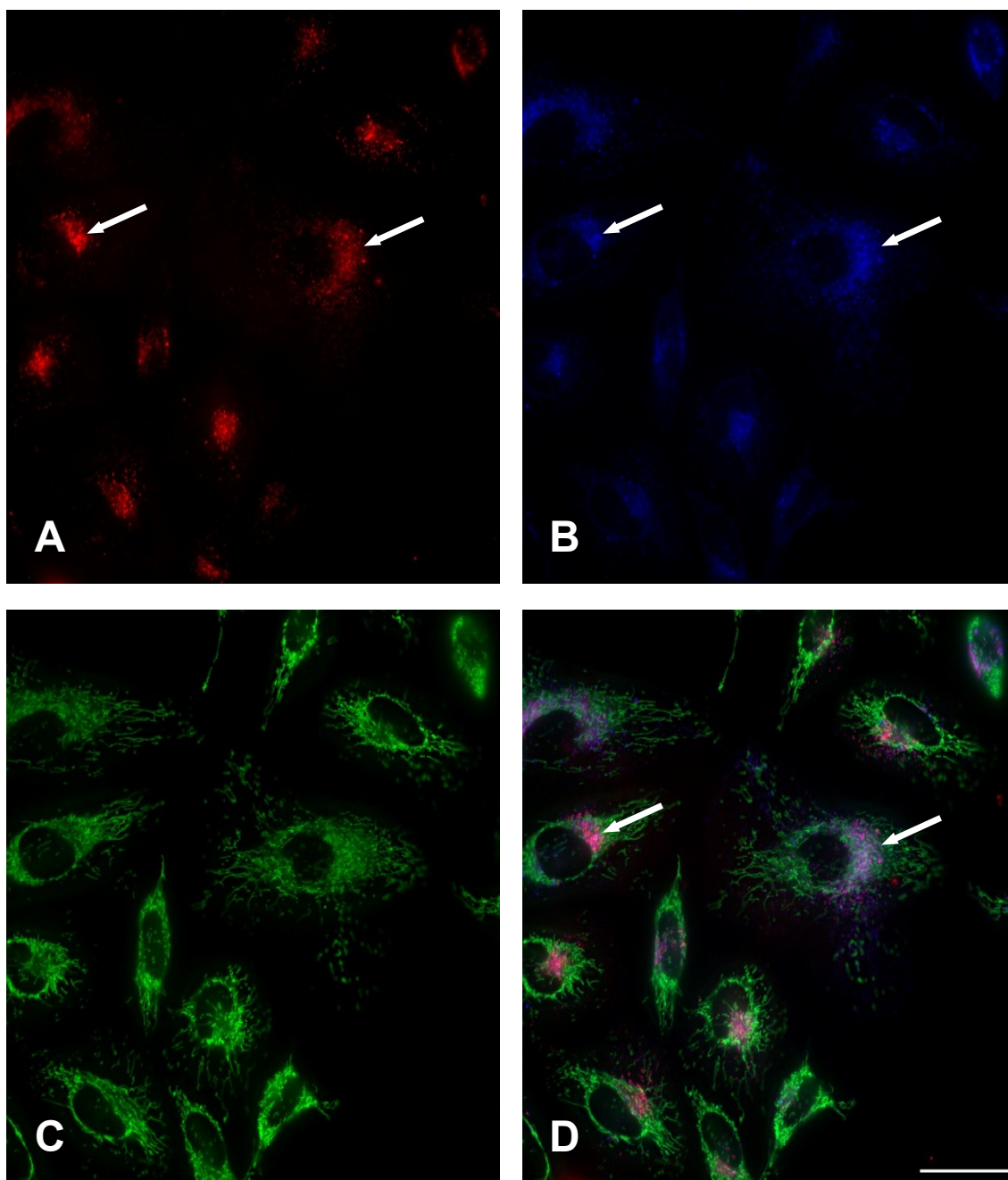
5.2.1. Subcelulární lokalizace

Pro zjištění, v kterých buněčných kompartmentech se studované PS kumulují, byla provedena fotodokumentace HeLa buněk inkubovaných s jednotlivými PS. Buňky byly předem značeny fluorescenčními sondami MitoTracker Green FM a LysoTracker Blue DND-22, které umožňují barevné značení buněčných struktur – mitochondrií (zeleně), resp. lyzosomů (modře). Takto značené buňky byly fotografovány na fluorescenčním mikroskopu za použití vhodných filtrů (Cy5, DAPI a FITC).

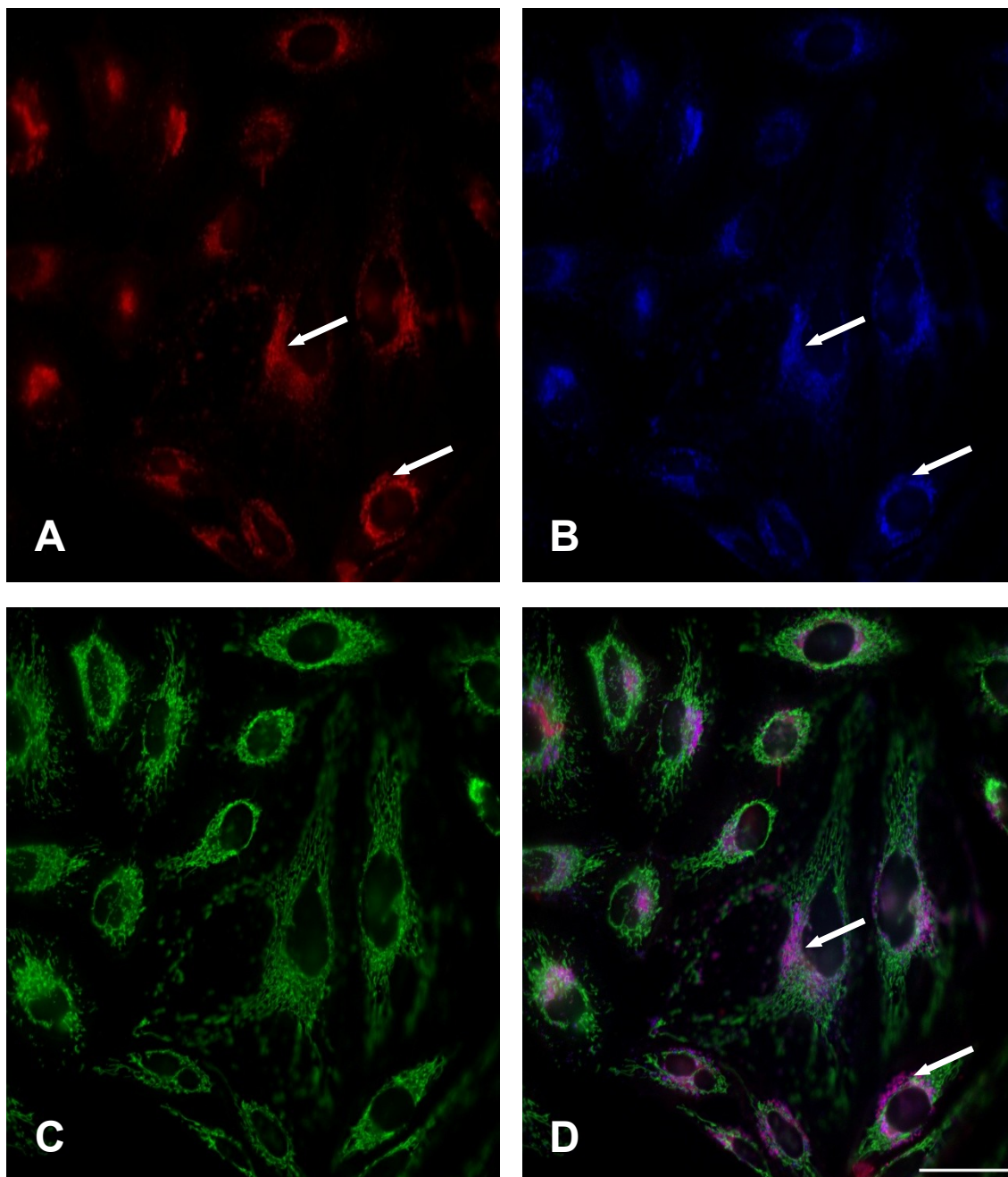
Všechny studované PS se nacházely především v lyzosomech, jak je patrné z Obr. 24 - Obr. 27: červená fluorescence značí samotný PS, modře zbarvené jsou lyzosomy. Překryv těchto signálů je dobře patrný u všech studovaných látek. Zelenou fluorescenci vykazují mitochondrie. Z fotografií lze tedy určit, že primárním cílem všech hodnocených PS v buňce jsou lyzosomy.



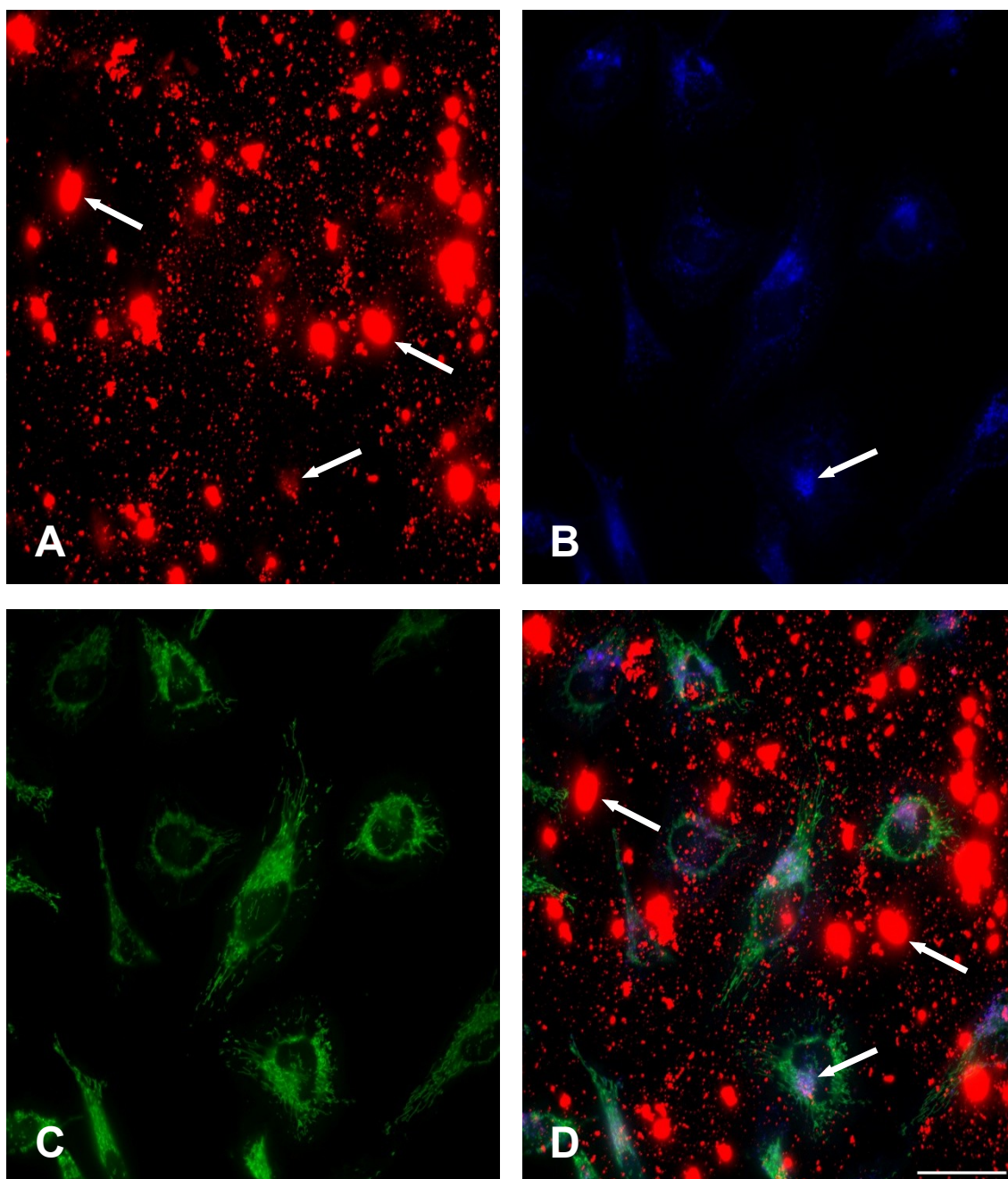
Obr. 24 Subcelulární lokalizace P39-1Zn-Me. A – fluorescence PS; B – lyzosity; C – mitochondrie; D – překryv fluorescenčních kanálů znázorňující lokalizaci PS v lyzosomech. Měřítko odpovídá 50 μm .



Obr. 25 Subcelulární lokalizace ZIP252Zn-Me. A – fluorescence PS; B – lyzosity; C – mitochondrie; D – překryv fluorescenčních kanálů znázorňující lokalizaci PS v lyzosomech. Měřítko odpovídá 50 μm .



Obr. 26 Subcelulární lokalizace ZIP280Zn. *A* – fluorescence PS; *B* – lyzosity; *C* – mitochondrie; *D* – překryv fluorescenčních kanálů znázorňující lokalizaci PS v lyzosomech. Měřítka odpovídá 50 μm .



Obr. 27 Subcelulární lokalizace ZIP288-OHZn. *A* – fluorescence PS; *B* – lyzosity; *C* – mitochondrie; *D* – překryv fluorescenčních kanálů znázorňující lokalizaci PS v lyzosomech. Na snímcích *A* a *D* je patrný signál látky mimo buňky. Ta je způsobena překročením limitu rozpustnosti a precipitací PS v médiu. Měřítka odpovídá 50 μm .

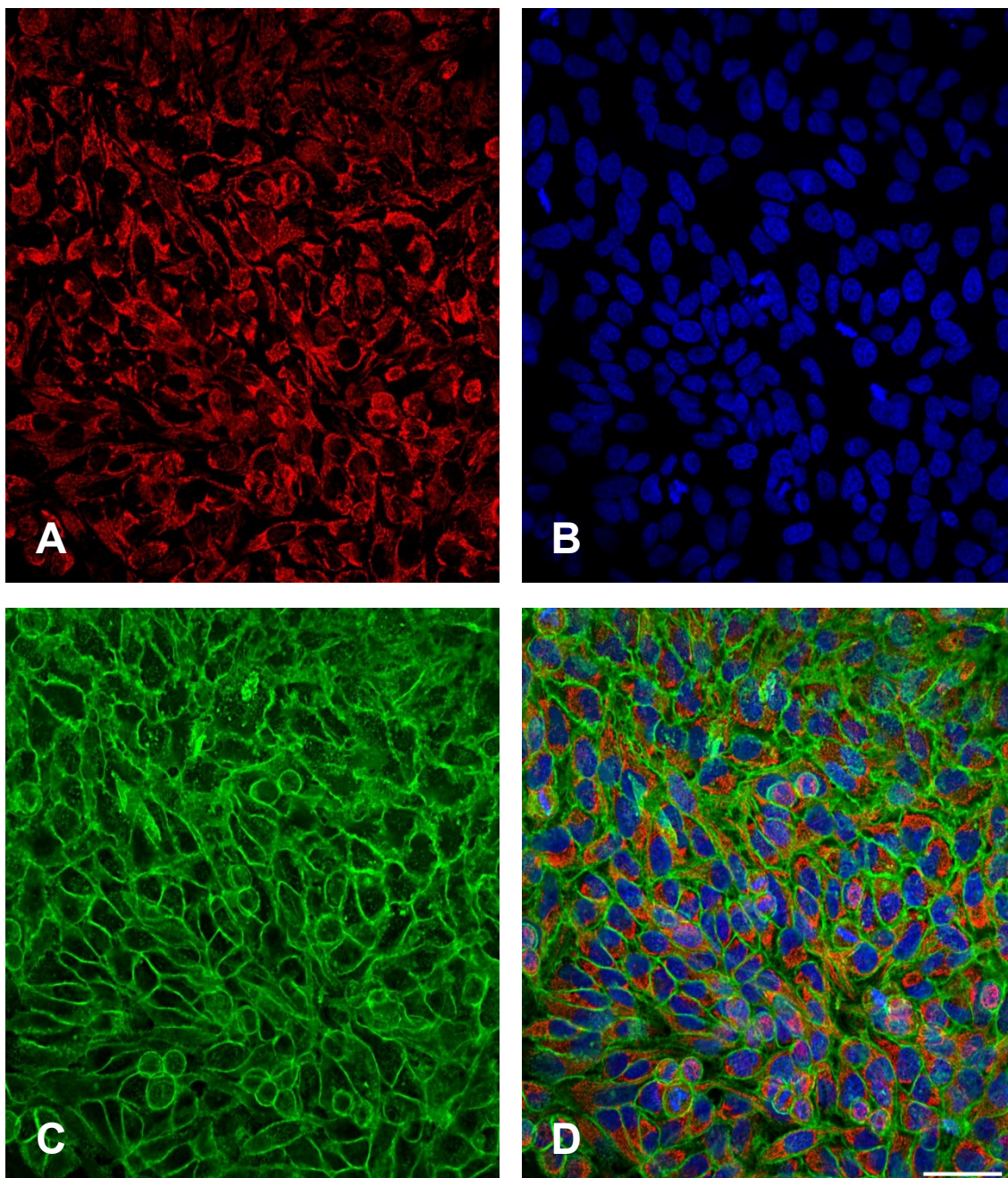
5.2.2. Morfologické změny

Morfologické změny byly pozorovány po fotoaktivaci P39-1Zn-Me. Byly použity koncentrace odpovídající EC_{15} ($0,03 \mu\text{M}$) a EC_{85} ($0,0,18 \mu\text{M}$) a dále byly sledovány buňky kontroly bez přidaného PS. Buňky byly značeny sondami Hoechst 33342 (jádra, modře), MitoTracker Red CMXRos (mitochondrie, červeně), CellMask Green Plasma membrane Stain (cytoplazmatické membrány, zeleně), Alexa Fluor 555 phalloidin (aktinový cytoskelet, červeně) a Alexa Fluor 488 konjugát (tubulinový cytoskelet, zeleně).

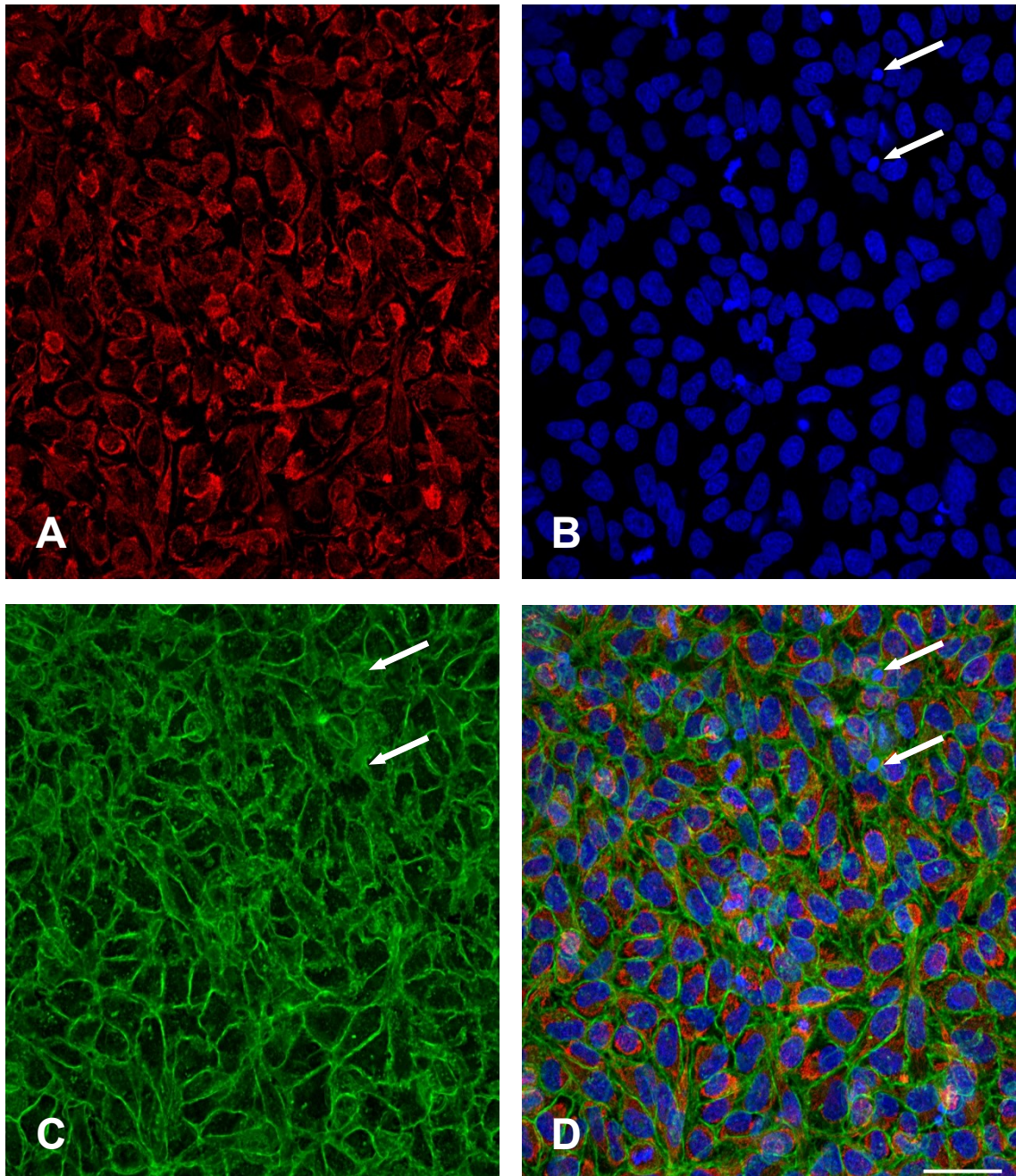
U buněk kontroly (Obr. 28 a Obr. 31) pozorujeme normální morfologii beze změn – protáhlý tvar buňky, vřetenovité nebo vláknité mitochondrie, jádro bez strukturálních změn chromatinu, vláknitou strukturu aktinu se stresovými vlákny a síťovitou strukturu tubulinu. U některých buněk je možné pozorovat buněčné dělení s charakteristickými změnami tvaru buňky a jádra (kulovitý tvar buňky, zhuštění jaderného chromatinu) a uspořádání tubulinu za tvorby dělicího vřetenka.

Na buňkách vystavených koncentraci PS odpovídající EC_{15} (Obr. 29 a Obr. 32) nejsou ještě patrné výrazné morfologické změny. Stále lze pozorovat normální tvar buněčných struktur i dělicí se buňky. Na některých buňkách lze ale nalézt změny - kondenzaci jaderného chromatinu, která může naznačovat programovanou buněčnou smrt. Pozorovatelná je u některých buněk i reorganizace aktinu na periferii buňky.

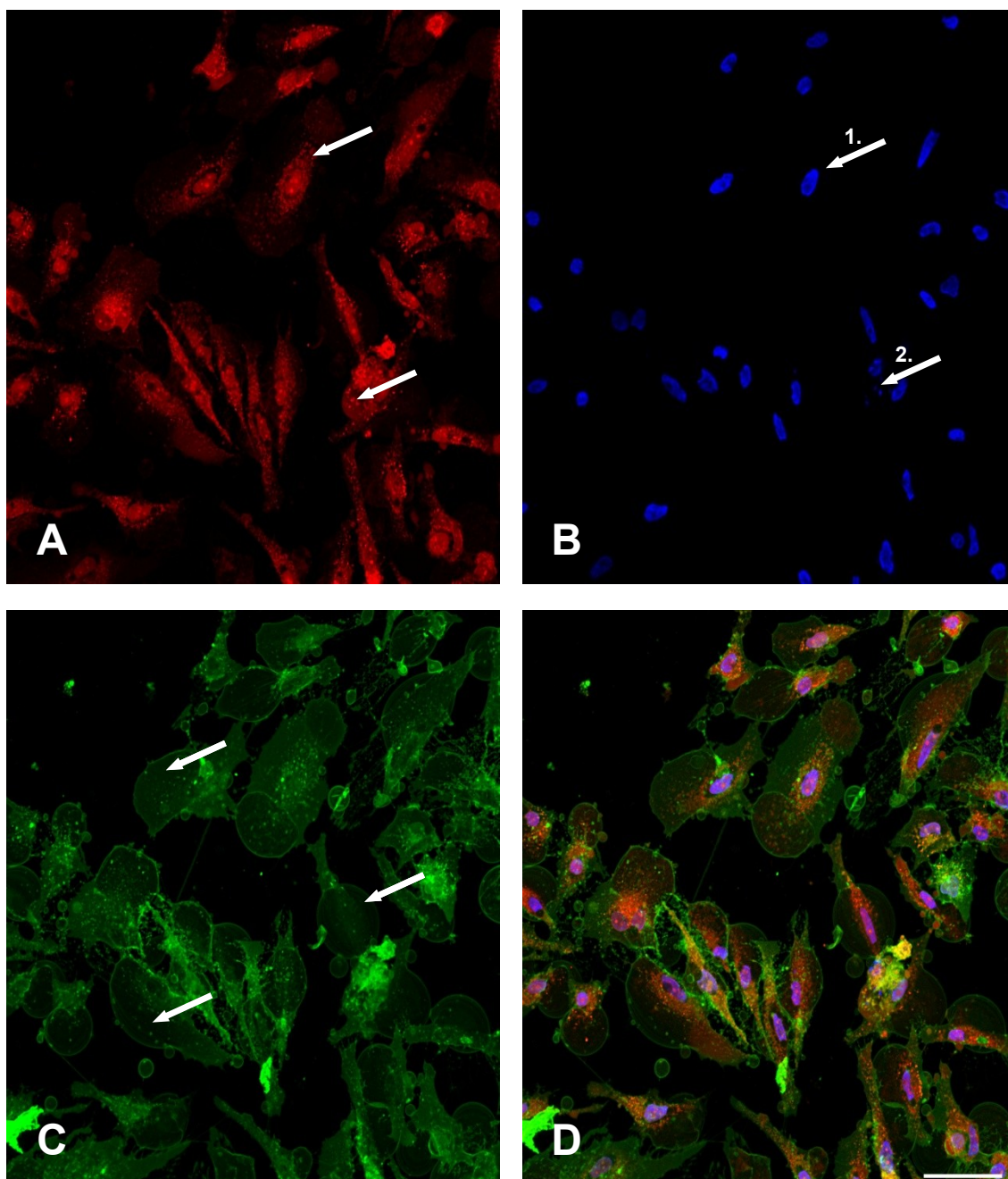
Mnohem výraznější změny v morfologii buněk jsou patrné při použití PS v koncentraci odpovídající EC_{85} (Obr. 30 a Obr. 33). Většina buněk vykazuje rozsáhlé poškození membrán s tvorbou membránových blebů. U mitochondrií došlo ke změně tvaru z vřetenovitého na kulovitý. U silně poškozených buněk není vidět mitochondriální morfologie a signál mitochondriální sondy je difuzní v celé cytoplazmě. Buněčná jádra jsou smrštěná, chromatin kondenzovaný, u některých buněk je patrný rozpad jádra, který může naznačovat apoptózu. Pozorovatelná je i změna uspořádání cytoskeletu – u aktinu je viditelné shlukování vláken na periferii buňky a změna vláknité struktury, změny na tubulinu se v některých buňkách projeví také reorganizací na periferii, případně nahuštěním mikrotubulů v živých buňkách. Usmrčené buňky vykazují jen slabý signál aktinu a tubulinu.



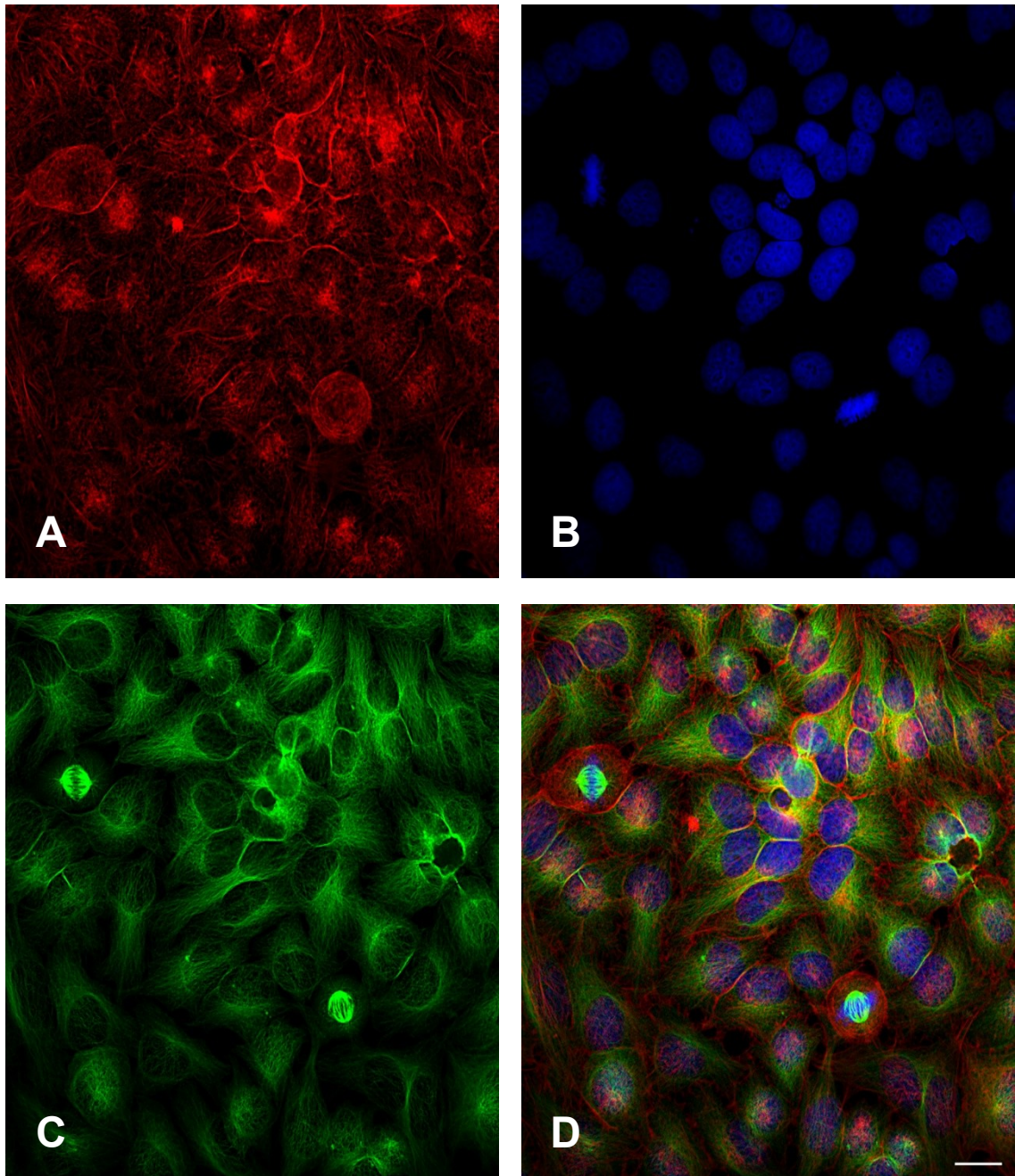
Obr. 28 Morfologie buněk kontroly (bez působení PS). Buňky jsou protáhlé a beze změn. A – mitochondrie typického vřetenovitého až vláknitého tvaru; B – jádra bez strukturních změn; C – cytoplazmatické membrány, protáhlé a beze změn; D – překryv všech fluorescenčních kanálů. Měřítka odpovídá 50 μm .



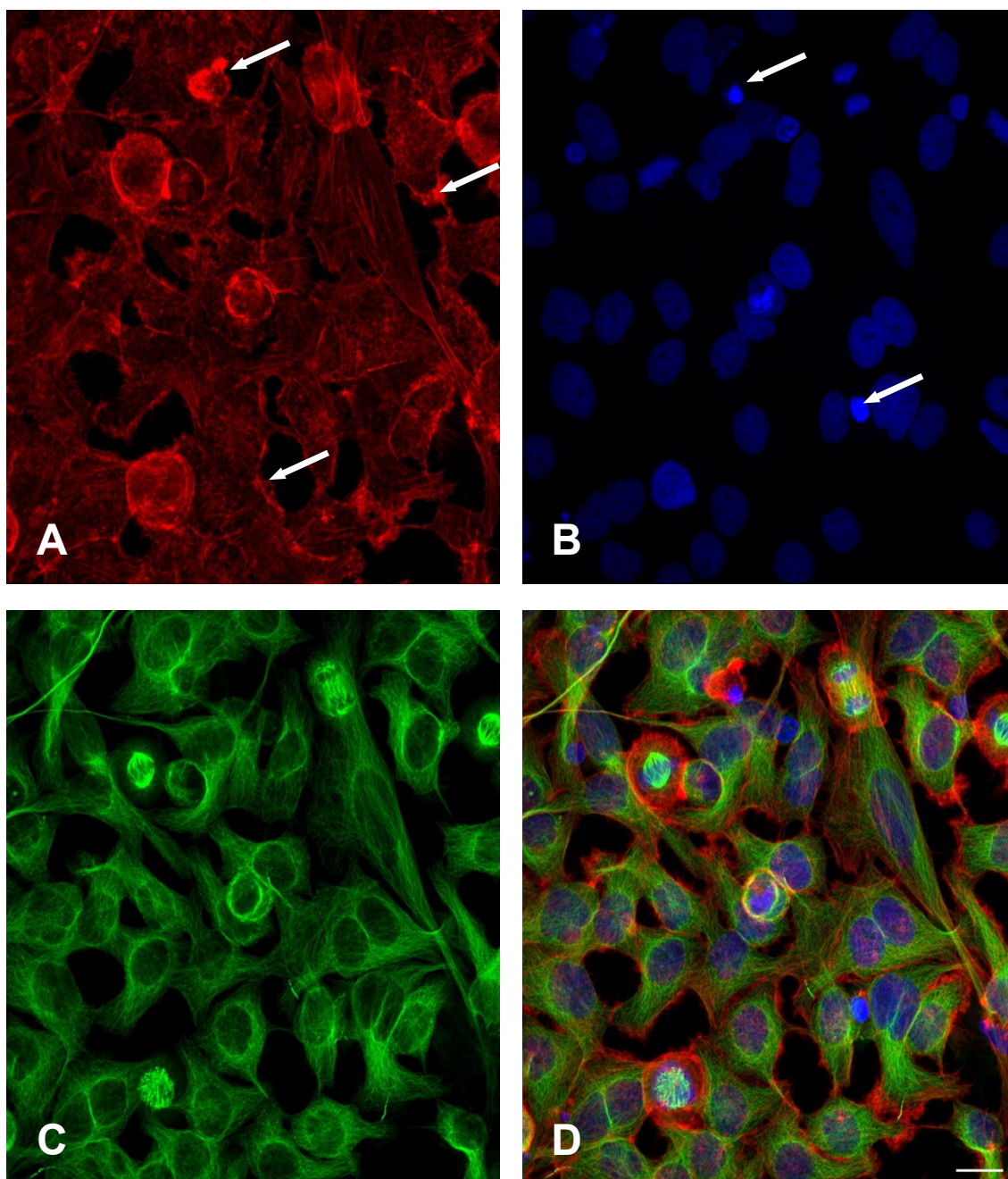
Obr. 29 Morfologické změny buněk po fotoaktivaci P39-IZn-Me v koncentraci odpovídající EC_{15} . Morfologické změny oproti kontrole nejsou výrazné. Tvar buněk je normální. A – mitochondrie bez výrazných změn; B – u některých jader lze pozorovat změny, související pravděpodobně s buněčnou smrtí (kondenzace chromatinu); C – cytoplazmatické membrány bez výrazných změn, u poškozených buněk změna tvaru; D – překryv všech fluorescenčních kanálů. Měřítko odpovídá 50 μm .



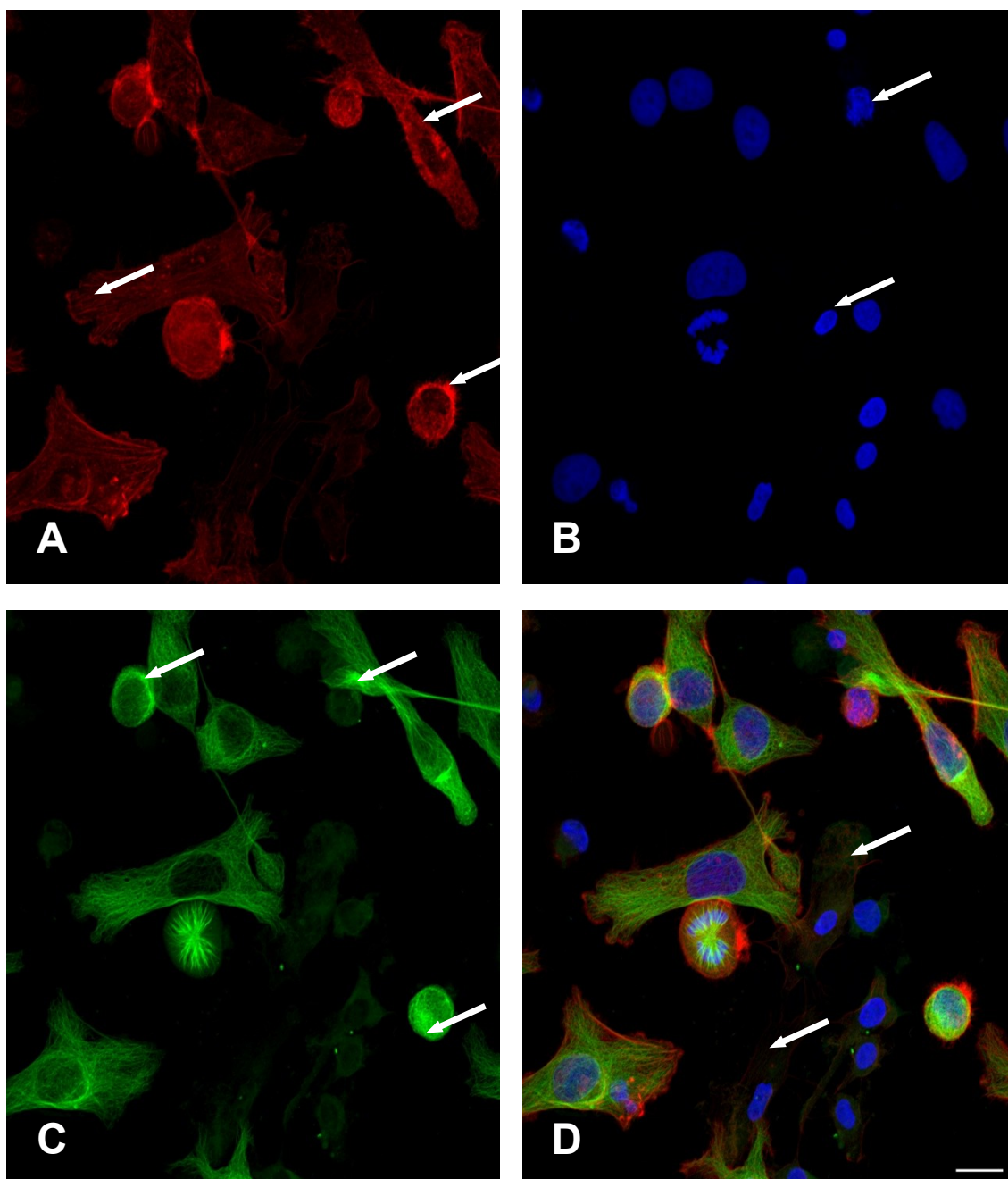
Obr. 30 Morfologické změny buněk po fotoaktivaci P39-1Zn-Me v koncentraci odpovídající EC_{85} . V této koncentraci pozorujeme změny na všech sledovaných buněčných strukturách. A – u mitochondrií došlo ke ztrátě vřetenovitého tvaru, jsou kulovité a fragmentované; B – buněčná jádra jsou smrštěná, s výrazně kondenzovaným chromatinem (1.), u některých buněk lze pozorovat rozpad jádra (2.); C – cytoplazmatické membrány jsou poškozené a tvoří rozsáhlé membránové bleby, D – překryv všech fluorescenčních kanálů. Měřítko odpovídá 50 μm .



Obr. 31 Morfologie buněk kontroly (bez působení PS, fixované buňky). Buňky jsou bez morfologických změn. A – aktinový cytoskelet vláknité struktury; B – jádra bez strukturních změn; C – síťovitá struktura tubulinu; D – překryv všech fluorescenčních kanálů. Měřítko odpovídá 20 μm .



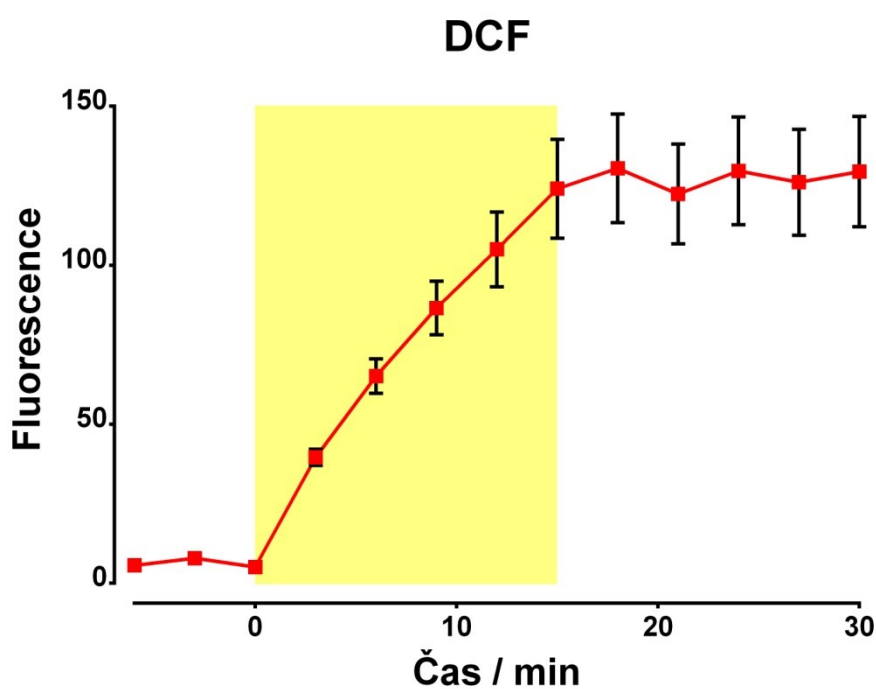
Obr. 32 Morfologické změny buněk po fotoaktivaci P39-1Zn-Me (fixované buňky) v koncentraci odpovídající EC_{15} . Morfologické změny oproti kontrole pozorujeme jen u některých buněk. A – u některých buněk je pozorovatelná reorganizace aktinu; B – většina jader má nezměněnou strukturu, u poškozených buněk lze pozorovat smrštění jádra; C – síťovitá struktura tubulinu, u poškozených buněk změna morfologie málo patrná; D – překryv všech fluorescenčních kanálů. Měřítko odpovídá 20 μm .



Obr. 33 Morfologické změny buněk po fotoaktivaci P39-1Zn-Me (fixované buňky) v koncentraci odpovídající EC_{85} . V této koncentraci pozorujeme změny na všech sledovaných buněčných strukturách. A – pozorovatelná výrazná reorganizace aktinu; B – smrštění jader poškozených buněk, C – viditelná reorganizace tubulinu a nahuštění mikrotubulů v živých, smrštěných buňkách; D – překryv všech fluorescenčních kanálů; u poškozených buněk viditelný jen slabý signál aktinu a tubulinu. Měřítko odpovídá 20 μ m.

5.3. TVORBA ROS

Pro DCF analýzu byl opět využit fotosenzitizér P39-1Zn-Me. Z měření fluorescence v tříminutových intervalech byl získán graf (Obr. 34), který demonstruje dynamiku vzniku ROS v buňkách měřenou před, během a po ozařování. Z grafu je patrné, že před ozařením vzniká v buňkách jen nepatrné množství ROS, které je fyziologické a potřebné pro biochemické pochody uvnitř buněk. Po ozaření dochází k prudkému nárůstu fluorescence způsobené růstem signálu DCF. Ten vznikl v buňce oxidací H_2DCF^- v důsledku reakce s ROS vyprodukovanými fotoreakcí sledovaného PS. Po ukončení ozařování již nedochází k nárůstu fluorescence, protože uvnitř buněk nedochází k dalšímu generování ROS.



Obr. 34 Graf znázorňující vznik ROS v buňkách inkubovaných s P39-1Zn-Me před, během a po ozařování. Žlutá plocha značí čas, po který byly buňky ozařovány. Měřeno v tříminutových intervalech.

6. DISKUZE

Kvůli zvyšujícímu se výskytu nádorových onemocnění je potřebné vyvíjet nové protinádorově účinné látky a léčebné metody. PDT je jednou z moderních, klinicky schválených terapeutických metod, která je minimálně invazivní (Agostinis et al. 2011). Vzhledem k této vlastnosti a potenciální vysoké selektivitě oproti konvenčně používaným postupům (chemoterapie či radioterapie) je tato metoda v posledních letech intenzivně studována a mnohé potenciálně účinné látky klinicky testovány.

PDT využívá tři základní komponenty – PS, světlo a $^3\text{O}_2$. Tyto složky dávají v kombinaci vznik cytotoxickým ROS, především $^1\text{O}_2$, které poškozují blízké buněčné struktury a mohou být příčinou buněčné smrti (Agostinis et al. 2011). Kromě přímého cytotoxického účinku se na celkovém efektu PDT podílí také poškození cévního zásobení nádoru a aktivace imunitního systému (Benov 2015).

Buňky mohou po PDT podléhat buněčné smrti, a to především apoptózou, nekrózou nebo autofagií (Buytaert et al. 2007). Způsob buněčné smrti určuje především charakter použitého PS (Robertson et al. 2009) a kvantitativní parametry PDT (Benov 2015).

Jako PS jsou nejčastěji využívány látky obsahující ve své molekule tetrapyrrolové jádro, tedy látky typu porfyrinů, chlorinů, bakteriochlorinů, PC a jejich deriváty (Yano et al. 2011). PC představují slibnou skupinu PS, vyznačující se vysokým Φ_{Δ} a absorpcí ve vyšších hodnotách vlnové délky (~ 700 nm). Nevýhodou těchto látek je jejich nízká rozpustnost ve vodě a tendence k tvorbě agregátů (Zimčík et al. 2010).

V rámci této práce byly *in vitro* studovány látky, které jsou strukturně deriváty aza-analogů PC. Konkrétně šlo o deriváty TPyPz (ZIP252Zn-Me, ZIP280Zn), TPyzPz (ZIP288-OHZn) a PC, u kterého bylo jedno benzenové jádro nahrazeno pyridinovým (P39-1Zn-Me). Všechny tyto látky byly syntetizovány vědeckou skupinou doc. Zimčíka na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Pro porovnání byly hodnoceny i dva klinicky využitelné PS – Photosens[®] (derivát PC) a methylenová modř (derivát fenothiazinu). Studované nové PS obsahují ve své molekule různé substituenty, připojené na základní skelet heteroatomy O nebo S. Jako centrální atom obsahují tyto látky atom zinku.

Prozatím nebylo publikováno mnoho výsledků, které by experimentálně hodnotily fotoaktivitu aza-analogů PC. V roce 2010 byly publikovány první výsledky fotodynamické aktivity látek typu zinečnatých TPyZPz a zinečnatých azanaftalocyaninů, hodnocených *in vitro*. Na základní skelet jsou vázány 2-(diethylamino)ethylsulfanylové, resp. 2-(triethylamonium)ethylsulfanylové skupiny. Kationické deriváty těchto látek byly rozpustné ve vodě a jevíly silnou fotodynamickou účinnost s vysokým Φ_{Δ} , a tedy slibným použitím pro PDT. Jejich dark toxicita byla stanovena na $> 200 \mu\text{M}$, fototoxicita byla stanovena na $\text{EC}_{50} = 0,104 \mu\text{M}$ (derivát TPyZPz), resp. $0,220 \mu\text{M}$ (derivát azanaftalocyaninu). Experimenty probíhaly na Hep2 buněčné linii (linie lidských černošských cervikálních nádorových buněk), fototoxicita byla hodnocena po 4 h inkubace. Hlavním subcelulárním cílem těchto látek se ukázaly být lyzosomy (Zimčík et al. 2010).

Deriváty PC často trpí nízkou rozpustností ve vodě a tvorbou agregátů, což snižuje jejich fotodynamickou aktivitu. Jedním z řešení těchto problémů se ukázalo být navázání objených a nabitých substituentů na základní skelet PC. Tímto způsobem byl připraven neagregující, ve vodě rozpustný zinečnatý PC, nesoucí 16 periferních kvarternizovaných imidazolylových skupin. Tato zajímavá látka vykazovala vysoký Φ_{Δ} , vysokou fotodynamickou aktivitu a nízkou dark toxicitu. Byla stanovena její $\text{EC}_{50} = 36,7 \text{ nM}$ (HeLa buňky) a $\text{TC}_{50} = 395 \mu\text{M}$ (3T3 – nemaliní linie myších fibroblastů), resp. $\text{TC}_{50} = 628 \mu\text{M}$ (HeLa buňky). Poměr $\text{TC}_{50}/\text{EC}_{50}$ u této látky dosahuje výjimečně vysokých hodnot ($> 10\,000$) (Makhseed et al. 2013).

Zajímavé jsou také výsledky studie, která hodnotí možnosti ovlivnění aktivity aza-PC (konkrétně TPyPz) pomocí různých periferních substituentů, které jsou na základní skelet vázány přes heteroatom (O, S, N). Studovány byly deriváty TPyPz obsahující zinek, hořčík nebo bez atomu kovu, s navázanými alkylsulfanylovými, (dialkylamino)ethylsulfanylovými, (trialkylamonium)ethylsulfanylovými, dialkylamino a aryloxy substituenty. Z těchto derivátů jevíly výraznější fotodynamickou aktivitu látky obsahující Zn s navázanými dialkylamino a alkylsulfanylovými skupinami. Díky rozpustnosti ve vodě a relativně vysokému Φ_{Δ} se pak z těchto sloučenin jako nejvhodnější pro PDT jeví zinečnatý (trialkylamonium)ethylsulfanylový derivát TPyPz (Váchová et al. 2015).

Fotodynamická aktivita zkoumaných látek byla hodnocena na buněčné linii HeLa. Studována byla jejich fototoxicita (při $\lambda > 570$ nm, $12,4 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-1}$, $11,2 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$) a jejich toxicita bez aktivace světlem (dark toxicita). Nejlepších výsledků dosáhl v našich experimentech P39-1Zn-Me – projevil nejvyšší fototoxicitu vyjádřenou hodnotou $EC_{50} = 0,10 \pm 0,024 \text{ }\mu\text{M}$. Strukturálně tento PS částečně vychází z nově syntetizovaných PS – neagregujícího, ve vodě rozpustného zinečnatého PC (Makhseed et al. 2013) a TPyPz6 (Macháček et al. 2016b), připraveného stejnou vědeckou skupinou jako PS hodnocené v této práci. U těchto látek je zásadní přítomnost kvarternizovaných imidazolylových skupin, v případě druhé zmíněné látky i kvarternizovaných pyridinů, která brání jejich agregaci ve vodě. Látka P39-1Zn-Me obsahuje pouze dvě kvarternizované imidazolylové a jednu kvarternizovanou pyridinovou skupinu, je tedy nesymetrickým PS; zbytek molekuly obsahuje navázané *terc*-butylsulfanylové skupiny (Obr. 14). Z toho důvodu není P39-1Zn-Me dobře rozpustný ve vodě, limit rozpustnosti v médiu byl cca $1 \text{ }\mu\text{M}$. Do této hodnoty ovšem experimentálně nevykazoval žádnou vlastní toxicitu. TC_{50} , stejně jako TC_{50}/EC_{50} tedy nebylo možné experimentálně stanovit.

Dobrych výsledků dosahoval v našich experimentech i ZIP252Zn-Me, který je strukturální obměnou již syntetizovaným a studovaným kationickým TPyPz (Váchová et al. 2015). Na rozdíl od nich obsahuje přes ethylensulfanylový můstek vázanou trimethylamoniovou skupinu (Obr. 14). Byla stanovena jeho nízká dark toxicita ($90,1 \pm 15,3 \text{ }\mu\text{M}$), relativně vysoká fototoxicita ($EC_{50} = 0,27 \pm 0,081 \text{ }\mu\text{M}$) a i index TC_{50}/EC_{50} dosahoval poměrně uspokojivé hodnoty (334).

Další hodnocené látky už dosahovaly nižších hodnot TC_{50}/EC_{50} (ZIP280Zn, Tab. I) nebo nevykazovaly žádnou fotodynamickou aktivitu ani ve vyšších koncentracích (ZIP288-OHZn).

Zajímavé bylo porovnání studovaných nových PS s látkami určenými pro klinické použití. Photosens[®] i methylenová modř vykazovaly nekolikanásobně nižší hodnoty TC_{50}/EC_{50} (73 pro Photosens[®], 3 pro methylenovou modř), rozdíl těchto hodnot oproti ostatním hodnoceným látkám byl především v případě methylenové modři markantní. Photosens[®] se klinicky používá v Rusku k léčbě různých typů nádorů, má ale značné nevýhody jako je výrazná fotosenzitivita po léčbě a nejednotné složení (Jiang et al. 2014, Ormond a Freeman 2013). Methylenová modř se může uplatňovat

v léčbě některých kožních nádorů (Ormond a Freeman), spíše se však využívá ve fotodynamické inaktivaci infekčních agens (Usacheva et al. 2004).

Při určování subcelulární lokalizace hodnocených nově syntetizovaných PS byly jako primární cíl všech těchto látek stanoveny lyzosomy. U kationických P39-1Zn-Me a ZIP252Zn-Me je tento fakt v rozporu s rozšířeným názorem, že se kationické PS lokalizují do mitochondrií (Macdonald a Dougherty 2001). Stejný subcelulární cíl vykazovaly i další aza-PC, syntetizované a studované tou samou vědeckou skupinou, zmíněnou výše (Zimčík et al. 2010, Váchová et al. 2015, Macháček et al. 2016b).

U P39-1Zn-Me, která se v průběhu cytotoxicitních experimentů jevila jako nejzajímavější, byly pozorovány a dokumentovány morfologické změny vyvolané fotoaktivací této látky. Při použití koncentrace odpovídající EC_{15} nebyly morfologické změny příliš patrné a projevovaly se jen na některých izolovaných buňkách. Mnohem výraznější byly tyto změny při použití koncentrace PS odpovídající EC_{85} , kdy byly na většině buněk pozorovatelné výrazné komplexní změny membrán, jader, mitochondrií i cytoskeletu. Podle pozorovaných změn (především rozpad membrán s tvorbou blebů) byla zřejmě hlavní příčinou buněčné smrti nekróza. U některých buněk ale bylo možné pozorovat morfologické změny připomínající apoptózu (především fragmentace buněčného jádra). Bez dalších experimentů však toto nejde zcela s jistotou konstatovat.

K zobrazení průběhu vzniku ROS v buňkách po aktivaci fotoaktivní látky byl opět použit P39-1Zn-Me. Z naměřených dat byl sestrojen graf, který znázorňuje časový průběh vzniku ROS. Je patrné, že P39-1Zn-Me dokáže i v nízké koncentraci ($0,18 \mu\text{M}$) vyvolat tvorbu ROS, která se projevila vzrůstajícím fluorescenčním signálem.

Ze studovaných fotodynamicky aktivních aza-analogů PC prokázaly zajímavé vlastnosti a nejlepší výsledky zejména kationické deriváty P39-1Zn-Me a ZIP252Zn-Me, a to v porovnání s dalšími studovanými aza-PC i klinicky schválenými látkami. Především první zmíněná látka, která v aplikovatelných dávkách ($< 1 \mu\text{M}$) nevykazovala žádnou vlastní toxicitu, se jeví jako potenciálně využitelná pro PDT a zasluhuje si další pozornost a hlubší studium své fotodynamické aktivity v *in vitro*, případně v budoucnu i *in vivo* studiích.

7. ZÁVĚRY

- Ze studovaných látek vykazovaly nejlepší fotodynamickou aktivitu kationické deriváty P39-1Zn-Me a ZIP252Zn-Me. Projevily se vysokou fototoxicitou vůči HeLa buněčné nádorové linii, vyjádřenou jako $EC_{50} = 0,01 \mu\text{M}$, resp. $0,27 \mu\text{M}$. Ostatní hodnocené látky projevily ve srovnání s nimi aktivitu menší (ZIP280Zn > Photosens[®] > methylenová modř) nebo prakticky žádnou (ZIP288-OHZn).
- Vlastní toxicita bez aktivace světlem většiny studovaných látek byla relativně nízká. Vzhledem k fototoxicitě vykazoval ZIP252Zn-Me nejlepší poměr TC_{50}/EC_{50} (334). U P39-1Zn-Me nebylo možné dark toxicitu stanovit, neboť daná látka neprojevila vlastní toxicitu do dosažení limitu rozpustnosti ($1 \mu\text{M}$).
- Hlavním subcelulárním cílem všech nových studovaných látek byly lyzosomy.
- Z pořízené fotografické dokumentace buněk vystavených aktivovanému P39-1Zn-Me byly patrné výrazné morfologické změny. Účinkem tohoto PS došlo ke změně tvaru buněk, poškození membrán s tvorbou membránových blebů, změnou tvaru mitochondrií a jader a reorganizací cytoskeletu.
- DCF analýzou byl znázorněn časový průběh vzniku ROS v buňkách před, během a po fotoaktivaci P39-1Zn-Me. Před a po ozařování nedocházelo k významné produkci ROS, zatímco v průběhu ozařování signál znázorňující ROS strmě vzrostl.
- Látky určené pro klinické použití při PDT, hodnocené v této práci (Photosens[®], methylenová modř) vykazovaly oproti nově studovaným PS výrazně menší fotoaktivitu.
- ZIP252Zn-Me a především P39-1Zn-Me jsou vhodné pro další studium jako potenciální látky využitelné pro PDT.

SEZNAM ZKRATEK

·NO	oxid dusnatý
·O ₂ ⁻	superoxidový anion radikál
·OH	hydroxylový radikál
¹ O ₂	singletový kyslík
³ O ₂	molekulární kyslík
AA	arachidonová kyselina
AIDS	syndrom získaného selhání imunity
AIF	apoptózu indukující faktor
ALA	5-aminolevulová kyselina
AlPcS	sulfonovaný hlinitý ftalocyanin
AMD	věkově podmíněná okulární degenerace
Apaf-1	apoptotickou proteasu aktivující faktor 1
Atg	rodina genů souvisejících s autofagií
ATMPn	9-acetoxy-2,7,12,17-tetra(β-methoxyethyl)porfycen
ATP	adenosintrifosfát
Bad	proapoptotický protein rodiny Bcl-2
Bak	proapoptotický protein rodiny Bcl-2
Bax	proapoptotický protein rodiny Bcl-2
Bcl-2	rodina proteinů (též genů) účastnících se apoptózy; antiapoptotický protein rodiny Bcl-2
Bcl-w	antiapoptotický protein rodiny Bcl-2
Bcl-X _L	antiapoptotický protein rodiny Bcl-2
BH3	jedna z domén proapoptotických proteinů
Bid	proapoptotický protein rodiny Bcl-2
BSA	bovinní sérový albumin
CD95L	apoptózu indukující ligand (synonymum FasL)
CytC	cytochrom c
dATP	deoxyadenosintrifosfát
DCF	dichlorfluorescein
DIABLO	IAP přímo vážící protein s nízkým pI
DISC	signální komplex indukující smrt

DLI	interval mezi podáním a ozářením fotosenzitizéru
DMEM	kultivační médium
DMSO	dimethylsulfoxid
dPBS	modifikovaný PBS pufr
EC ₁₅	efektivní koncentrace, která sníží životaschopnost buněk o 15 %
EC ₅₀	střední efektivní koncentrace
EC ₈₅	efektivní koncentrace, která sníží životaschopnost buněk o 85 %
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EndoG	endonukleasa G
ER	endoplasmatické retikulum
FasL	Fas ligand, apoptózu indukující ligand
GA	Golgiho aparát
GPx	glutathionperoxidasa
H ₂ DCF ⁻	anion redukováného dichlorfluoresceinu
H ₂ DCF-DA	2',7'-dichlordihydrofluorescein-diacetát
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
HALA	hexylester 5-aminolevulové kyseliny
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
HpD	derivát hematoporfyrinu
HPPH	2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinyl pyrofeoforbid
HPV-18	lidský papillomavirus 18
HtrA2	vysokou teplotou podmíněný protein (synonymum Omi)
i.v.	intravenózní podání
IAP	protein inhibující apoptózu
IgG	imunoglobulin G
IL-1	interleukin-1
IL-6	interleukin-6
LDL	nízkodenzitní lipoprotein
MALA	methylester 5-aminolevulové kyseliny
MB	methylenová modř
MOMP	permeabilizace vnější mitochondriální membrány
MRI	magnetická rezonance
<i>m</i> -THPC	<i>m</i> -(tetrahydroxyfenyl)chlorin
NC	naftalocyanin

NPe6	N-aspartylchlorin e6
NR	neutrální červeň
Omi	stresem regulovaná protéza (synonymum HtrA2)
OONO ⁻	peroxynitrit
PBS	fosfátový pufr
PC	ftalocyanin
Pc4	křemičitý ftalocyanin 4
PDT	fotodynamická terapie
PI3K	fosfatidylinositol-3-kinasa
PpIX	protoporfyrin IX
PS	fotosenzitizér
RIP1	s receptorem interagující proteinkinasa 1
RIP3	s receptorem interagující proteinkinasa 3
ROS	reaktivní formy kyslíku
SCM	DMEM médium obsahující sérum a další látky
Smac	mitochondriální aktivátor kaspas (synonymum DIABLO)
SnET2	ethyletiopurpurin cíničitý
SOD	superoxiddismutasa
tBid	štěpný produkt proteinu Bid
TC ₅₀	střední toxická koncentrace
TNF- α	tumor nekrotizující faktor α
TPyPz	tetrapyridoporfyrasin
TPyzPz	tetrapyrazinoporfyrasin
TRAIL	apoptózu indukující ligand související s TNF
VTP	fotodynamická terapie zaměřená na cévy
ZnPc	zinečnatý ftalocyanin
ZnPcS ₂ P ₂	disulfo-diftalimidomethylftalocyanin
$\Delta\Psi_m$	mitochondriální transmembránový potenciál
ϵ	molární absorpční koeficient
λ	vlnová délka
Φ_{Δ}	kvantový výtěžek singletového kyslíku

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ABRAHAMSE, H. Photodynamic Cancer Therapy - Recent Advances. *AIP Conference Proceedings* [online]. 2011, **1380**(1), 5-11 [cit. 2017-03-20]. ISSN 0094243X. Dostupné z: doi: 10.1063/1.3631802

ABRAHAMSE, H. a M. R. HAMBLIN. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochemical Journal* [online]. 2016, **473**(4), 347-364 [cit. 2017-03-20]. ISSN 02646021. Dostupné z: doi: 10.1042/BJ20150942

AGOSTINIS, P., E. BUYTAERT, H. BREYSSSENS a N. HENDRICKX. Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. *Photochemical & Photobiological Sciences* [online]. 2004, **3**(8), 721- [cit. 2017-03-20]. ISSN 1474905x. Dostupné z: doi: 10.1039/b315237e

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, **61**(4), 250-281 [cit. 2017-03-20]. ISSN 00079235. Dostupné z: doi: 10.3322/caac.20114

ALLISON, R. R., G. H. DOWNIE, R. CUENCA, X.-H. HU, C. J. H. CHILDS a C. H. SIBATA. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* [online]. 2004, **1**(1), 27-42 [cit. 2017-03-20]. ISSN 15721000. Dostupné z: doi: 10.1016/S1572-1000(04)00007-9

ALLISON, R. R. a C. H. SIBATA. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* [online]. 2010, **7**(2), 61-75 [cit. 2017-03-20]. ISSN 15721000. Dostupné z: doi: 10.1016/j.pdpdt.2010.02.001

AZZOUZI, A.-R., S. LEBDAI, F. BENZAGHOU a C. STIEF. Vascular-targeted photodynamic therapy with TOOKAD® Soluble in localized prostate cancer:

- standardization of the procedure. *World Journal of Urology* [online]. 2015, **33**(7), 937-944 [cit. 2017-03-20]. ISSN 07244983. Dostupné z: doi: 10.1007/s00345-015-1535-2
- BENOV, L. Photodynamic Therapy: Current Status and Future Directions. *Medical Principles and Practice* [online]. 2015, **24**(s1), 14-28 [cit. 2017-03-20]. ISSN 14230151. Dostupné z: doi: 10.1159/000362416
- BESKOW, L. M. Lessons from HeLa Cells: The Ethics and Policy of Biospecimens. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* [online]. 2016, **17**(1), 395-417 [cit. 2017-04-06]. ISSN 15278204. Dostupné z: doi: 10.1146/annurev-genom-083115-022536
- BUYTAERT, E., M. DEWAELE a P. AGOSTINIS. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* [online]. 2007, **1776**(1), 86-107 [cit. 2017-03-20]. ISSN 0304419x. 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, **1**(4), 279-293 [cit. 2017-03-20]. ISSN 15721000. 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, **2**(2), 91-106 [cit. 2017-03-20]. ISSN 15721000. 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, **2**(1), 1-23 [cit. 2017-03-20]. ISSN 15721000. Dostupné z: doi: 10.1016/S1572-1000(05)00030-X

- DAVIES, M. J. Protein oxidation and peroxidation. *Biochemical Journal* [online]. 2016, **473**(7), 805-825 [cit. 2017-03-20]. ISSN 02646021. Dostupné z: doi: 10.1042/BJ20151227
- DOLMANS, D. E. J. G. J., D. FUKUMURA a R. K. JAIN. TIMELINE: Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer* [online]. 2003, **3**(5), 380-387 [cit. 2017-03-20]. ISSN 1474175x. Dostupné z: doi: 10.1038/nrc1071
- EDINGER, Aimee L a Craig B THOMPSON. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology* [online]. 2004, **16**(6), 663-669 [cit. 2017-03-20]. ISSN 09550674. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ceb.2004.09.011
- GALLUZZI, L., I. VITALE, J. M. ABRAMS, E. S. ALNEMRI, E. H. BAEHRECKE, M. V. BLAGOSKLONNY, T. M. DAWSON, V. L. DAWSON, W. S. EL-DEIRY, S. FULDA, E. GOTTLIEB, D. R. GREEN, M. O. HENGARTNER, O. KEEP, R. A. KNIGHTT, S. KUMAR, S. A. LIPTON, X. LU, F. MADEO, P. VANDENABEELE, E. WHITE, J. YUAN, B. ZIVOTOVSKY, G. MELINO a G. KROEMER. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation* [online]. 2012, **19**(1), 107-120 [cit. 2017-03-20]. ISSN 13509047. Dostupné z: doi: 10.1038/cdd.2011.96
- GARG, A. D., H. MAES, E. ROMANO a P. AGOSTINIS. Autophagy, a major adaptation pathway shaping cancer cell death and anticancer immunity responses following photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol. Sci* [online]. 2015, **14**(8), 1410-1424 [cit. 2017-03-20]. ISSN 1474905x. Dostupné z: doi: 10.1039/C4PP00466C
- HOFMANOVÁ, J. Nádorové onemocnění, úvod a základní pojmy. *Genotoxicita a karcinogeneze* [online]. Masarykova univerzita (Brno), 2013 [cit. 2017-03-22]. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/web/pages/01_nador.html
- HUANG, H.-F., Y.-Z. CHEN, Y. WU, N.-N. LI a P. CHEN. Efficacy of ZnPcS2P2 photodynamic therapy solely or with tumor vaccines on mouse tumor models.

- Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* [online]. 2007, **4**(2), 100-105 [cit. 2017-03-20]. ISSN 15721000. Dostupné z: doi: 10.1016/j.pdpdt.2007.02.001
- ISTOMIN, Y. P., T. P. LAPZEVICH, V. N. CHALAU, S. V. SHLIAKHTSIN a T. V. TRUKHACHOVA. Photodynamic therapy of cervical intraepithelial neoplasia grades II and III with Photolon®. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* [online]. 2010, **7**(3), 144-151 [cit. 2017-03-20]. ISSN 15721000. Dostupné z: doi: 10.1016/j.pdpdt.2010.06.005
- JIANG, Z., J. SHAO, T. YANG, J. WANG a L. JIA. Pharmaceutical development, composition and quantitative analysis of phthalocyanine as the photosensitizer for cancer photodynamic therapy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2014, **87**, 98-104 [cit. 2017-03-20]. ISSN 07317085. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jpba.2013.05.014
- JOSEFSEN, L. B. a R. W. BOYLE. Photodynamic therapy: novel third-generation photosensitizers one step closer? *British Journal of Pharmacology* [online]. 2008, **154**(1), 1-3 [cit. 2017-03-20]. ISSN 00071188. Dostupné z: doi: 10.1038/bjp.2008.98
- 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, **2**(9), 916-966 [cit. 2017-03-20]. ISSN 1838-7640. Dostupné z: doi: 10.7150/thno.4571
- JUARRANZ, Á., P. JAÉN, F. SANZ-RODRÍGUEZ, J. CUEVAS a S. GONZÁLEZ. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clinical and Translational Oncology* [online]. 2008, **10**(3), 148-154 [cit. 2017-03-20]. ISSN 1699048x. Dostupné z: doi: 10.1007/s12094-008-0172-2
- KAWCZYK-KRUPKA, A., K. WAWRZYNIEC, S. K. MUSIOL, M. POTEMPA, A. M. BUGAJ a A. SIERNÓ. Treatment of localized prostate cancer using WST-09 and WST-11 mediated vascular targeted photodynamic therapy-A review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* [online]. 2015, **12**(4), 567-574 [cit. 2017-03-20]. ISSN 15721000. Dostupné z: doi: 10.1016/j.pdpdt.2015.10.001

- LANDRY, J. J. M., P. T. PYL, T. RAUSCH, T. ZICHER, 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* [online]. 2013, **3**(8), 1213-1224 [cit. 2017-04-06]. 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, 546 s. ISBN 9788024614144.
- LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2014, **224**, 164-175 [cit. 2017-03-20]. ISSN 00092797. Dostupné z: doi: 10.1016/j.cbi.2014.10.016
- MACDONALD, I. J. a T. J. DOUGHERTY. Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines (JPP)* [online]. 2001, **05**(02), 105-129 [cit. 2017-03-20]. ISSN 10884246. Dostupné z: doi: 10.1002/jpp.328
- MAČÁK, J. a J. MAČÁKOVÁ. *Patologie*. Vyd. 1. Praha: Grada, 2004, 347s., [20] s. obr. příl. ISBN 8024707853.
- MACHÁČEK, M. *Studium nových fotosenzitizérů ze skupiny ftalocyaninů a azaftalocyaninů pro fotodynamickou léčbu nádorových onemocnění*. Hradec Králové, 2016a. Disertační práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra biochemických věd.
- MACHÁČEK, M., J. DEMUTH, P. CERMAK, et al. Tetra(3,4-pyrido)porphyrazines Caught in the Cationic Cage: Toward Nanomolar Active Photosensitizers. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2016b, **59**(20), 9443-9456 [cit. 2017-05-06]. ISSN 00222623. Dostupné z: doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b01140
- MAKHSEED, S., M. MACHACEK, W. ALFADLY, et al. Water-soluble non-aggregating zinc phthalocyanine and in vitro studies for photodynamic therapy. *Chemical Communications* [online]. 2013, **49**(95), 11149- [cit. 2017-05-06]. ISSN 13597345. Dostupné z: doi: 10.1039/c3cc44609c

- MANDELKER, L. *Oxidační stres: role mitochondrií, volných radikálů a antioxidantů*. Praha: Pierot, 2009, 220 s. České vydání Veterinary clinics of North America. Praxe malých zvířat. ISBN 9788073531355.
- MFOUO-TYNGA, I. a H. ABRAHAMSE. Cell Death Pathways and Phthalocyanine as an Efficient Agent for Photodynamic Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2015, **16**(5), 10228-10241 [cit. 2017-03-20]. ISSN 14220067. Dostupné z: doi: 10.3390/ijms160510228
- NEČAS, E. *Obecná patologická fyziologie*. 3. vyd. Praha: Karolinum, 2009, 377 s. ISBN 9788024616889.
- O'CONNOR, A. E., W. M. GALLAGHER a A. T. BYRNE. Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology* [online]. 2009, **85**(5), 1053-1074 [cit. 2017-03-20]. ISSN 00318655. Dostupné z: doi: 10.1111/j.1751-1097.2009.00585.x
- ORMOND, A. a H. FREEMAN. Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. *Materials* [online]. 2013, **6**(3), 817-840 [cit. 2017-03-20]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi: 10.3390/ma6030817
- OUYANG, L., Z. SHI, S. ZHAO, F.-T. WANG, T.-T. ZHOU, B. LIU a J.-K. BAO. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Proliferation* [online]. 2012, **45**(6), 487-498 [cit. 2017-03-20]. ISSN 09607722. Dostupné z: doi: 10.1111/j.1365-2184.2012.00845.x
- 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, **24**(2), 259-268 [cit. 2017-03-20]. ISSN 02688921. Dostupné z: doi: 10.1007/s10103-008-0539-1
- POVÝŠIL, C. a I. ŠTEINER. *Obecná patologie*. Praha: Galén, c2011, 290 s. ISBN 9788072627738.

- PROSKURYAKOV, S. Y., A. G KONOPLYANNIKOV a V. L GABAI. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Experimental Cell Research* [online]. 2003, **283**(1), 1-16 [cit. 2017-03-20]. ISSN 00144827. Dostupné z: doi: 10.1016/S0014-4827(02)00027-7
- REINERS JR., J. J., P. AGOSTINIS, K. BERG, N. L. OLEINICK a D. Kessel. Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy. *Autophagy* [online]. 2010, **6**(1), 7-18 [cit. 2017-03-20]. Dostupné z: PMC 2010 Apr 30.
- REPETTO, G., A. DEL PESO a J. L. ZURITA. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols* [online]. 2008, **3**(7), 1125-1131 [cit. 2017-04-10]. ISSN 17542189. 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, **96**(1), 1-8 [cit. 2017-03-20]. ISSN 10111344. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jphotobiol.2009.04.001
- RODRIGUEZ, L., A. BATLLE, G. DI VENOSA, S. BATTAH, P. DOBBIN, A. J. MACROBERT a A. CASAS. Mechanisms of 5-aminolevulinic acid ester uptake in mammalian cells. *British Journal of Pharmacology* [online]. 2006, **147**(7), 825-833 [cit. 2017-03-20]. ISSN 00071188. Dostupné z: doi: 10.1038/sj.bjp.0706668
- SEKKAT, N., H. VAN DEN BERGH, T. NYOKONG a N. LANGE. Like a Bolt from the Blue: Phthalocyanines in Biomedical Optics. *Molecules* [online]. 2012, **17**(12), 98-144 [cit. 2017-03-20]. ISSN 14203049. Dostupné z: doi: 10.3390/molecules17010098
- SHLIAKHTSIN, S. V., T. V. TRUKHACHOVA, H. A. ISAKAU a Y. P. ISTOMIN. Pharmacokinetics and biodistribution of Photolon® (Fotolon®) in intact and tumor-bearing rats. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* [online]. 2009, **6**(2), 97-104 [cit. 2017-03-20]. ISSN 15721000. Dostupné z: doi: 10.1016/j.pdpdt.2009.04.002

- SINGH, H. K., M. SAQUIB, M. M. HAQUE a M. MUNEER. Heterogeneous photocatalysed decolorization of two selected dye derivatives neutral red and toluidine blue in aqueous suspensions. *Chemical Engineering Journal* [online]. 2008, **136**(2-3), 77-81 [cit. 2017-04-10]. ISSN 13858947. Dostupné z: doi: 10.1016/j.cej.2007.05.009
- STOCKERT, J. C., M. CAÑETE, A. JUARRANZ, A. VILLANUEVA, R. W. HOROBIN, J. I. BORRELL, J. TEIXIDÓ a S. NONELL. Porphycenes: Facts and Prospects in Photodynamic Therapy of Cancer. *Current Medicinal Chemistry* [online]. 2007, (14), 997-1026 [cit. 2017-03-20]. Dostupné z: databáze Proquest.
- TATALICK, L. M., C. J. GERARD, R. TAKEYA, D. N. PRICE, B. A. THORNE, L. M. WYATT a P. ANKLESARIA. Safety characterization of HeLa-based cell substrates used in the manufacture of a recombinant adeno-associated virus-HIV vaccine. *Vaccine* [online]. 2005, **23**(20), 2628-2638 [cit. 2017-04-06]. ISSN 0264410x. Dostupné z: doi: 10.1016/j.vaccine.2004.11.027
- TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology* [online]. 2003, **552**(2), 335-344 [cit. 2017-03-20]. ISSN 00223751. Dostupné z: doi: 10.1113/jphysiol.2003.049478
- USACHEVA, M. N., M. C. TEICHERT a M. A. BIEL. The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [online]. 2003, **71**(1-3), 87-98 [cit. 2017-05-06]. ISSN 10111344. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jphotobiol.2003.06.002
- ÚSTAV ZDRAVOTNICKÝCH INFORMACÍ A STATISTIKY ČR. *Novotvary 2014 ČR: Cancer Incidence in the Czech Republic, 2014* [online]. Praha, 2014 [cit. 2017-03-22]. Dostupné z: <http://www.uzis.cz/node/7686>
- 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. *Org. Biomol. Chem* [online]. 2015,

13(20), 5608-5612 [cit. 2017-05-06]. ISSN 14770520. Dostupné z: doi: 10.1039/C5OB00651A

VALKO, M., C. J. RHODES, J. MONCOL, M. IZAKOVIC a M. MAZUR. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2006, **160**(1), 1-40 [cit. 2017-03-20]. ISSN 00092797. Dostupné z: doi: 10.1016/j.cbi.2005.12.009

WANG, X. a M. G. ROPER. Measurement of DCF fluorescence as a measure of reactive oxygen species in murine islets of Langerhans. *Anal. Methods* [online]. 2014, **6**(9), 3019-3024 [cit. 2017-04-20]. ISSN 17599660. Dostupné z: doi: 10.1039/C4AY00288A

WILSON, B. C. a M. S. PATTERSON. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Physics in Medicine and Biology* [online]. 2008, **53**(9), R61-R109 [cit. 2017-03-20]. ISSN 00319155. Dostupné z: doi: 10.1088/0031-9155/53/9/R01

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Cancer* [online]. 2017 [cit. 2017-03-22]. Dostupné z: <http://www.who.int/cancer/en/>

YANO, S., S. HIROHARA, M. OBATA, Y. HAGIYA, S.-I. OGURA, A. IKEDA, H. KATAOKA, M. TANAKA a T. JOH. Current states and future views in photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* [online]. 2011, **12**(1), 46-67 [cit. 2017-03-20]. ISSN 13895567. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jphotochemrev.2011.06.001

YOON, I., J. Z. LI a Y. K. SHIM. Advance in Photosensitizers and Light Delivery for Photodynamic Therapy. *Clinical Endoscopy* [online]. 2013, **46**(1), 7- [cit. 2017-03-20]. ISSN 22342400. Dostupné z: doi: 10.5946/ce.2013.46.1.7

ZHONG, H. a H. YIN. Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: Focusing on mitochondria. *Redox Biology* [online]. 2015, **4**, 193-199 [cit. 2017-03-22]. ISSN 22132317. Dostupné z: doi: 10.1016/j.redox.2014.12.011

ZIMCIK, 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, **86**(1), 168-175 [cit. 2017-05-06]. ISSN 00318655. Dostupné z: doi: 10.1111/j.1751-1097.2009.00647.x