

# 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<sup>®</sup>, methylenová modř). Hodnocení PS probíhalo *in vitro* na nádorové buněčné linii HeLa. Byla stanovena aktivita uvedených látek po expozici aktivujícím

záření i jejich vlastní toxicita bez aktivace světlem a stanoven poměr  $TC_{50}/EC_{50}$ . 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  $\mu$ M); 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.