

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra biochemických věd

STUDIUM NOVÝCH FTALOCYANINŮ PRO  
FOTODYNAMICKOU TERAPII NÁDORŮ ZAMĚŘENOU  
NA CÉVY

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Miloslav Macháček

Hradec Králové 2015

Petra Brázdová

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli Mgr. Miloslavu Macháčkovi za odborné vedení diplomové práce, cenné rady a připomínky, a především za jeho trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat kolegům z laboratoře za to, že mi byli nápomocní, kdykoliv jsem si nevěděla rady. Grantové Agentuře Univerzity Karlovy (projekt č. 1916214) děkuji za finanční podporu tohoto projektu. A v neposlední řadě děkuji celému kolektivu Katedry biochemických věd za příjemné pracovní prostředí a svým nejbližším za podporu.

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 .....

# 1 ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Petra Brázdová

Školitel: Mgr. Miloslav Macháček

Název diplomové práce: Studium nových ftalocyaninů pro fotodynamickou terapii nádorů zaměřenou na cévy

Nádorová onemocnění jsou jednou z vedoucích příčin úmrtí ve vyspělých státech, proto je výzkumu protinádorových léčiv věnováno velké úsilí. Fotodynamická terapie (PDT) je v této oblasti dnes již zavedenou metodou, ovšem o směřování jejího účinku na nádorové cévy se začalo uvažovat až poměrně nedávno. Fotodynamická terapie zaměřená na cévy (VTP) využívá, v porovnání s PDT, mnohem kratšího intervalu mezi podáním fotosenzitizéru (PS) a ozářením, čímž je účinek cytotoxických látek směřován na zamezení cévního zásobení nádoru. To má za cíl přerušit přístupu kyslíku a živin maligním buňkám a způsobit tak jejich poškození a smrt.

Cílem této práce je zhodnocení účinnosti nově syntetizovaných PS ze skupiny ftalocyaninů a azaftalocyaninů s využitím protokolu VTP *in vitro* podmínkách. Použité PS již byly v nedávné době studovány metodami klasické PDT, při níž prokázaly velice slibnou účinnost vůči nádorovým buňkám a nízkou vlastní toxicitu.

Hlavním cílem této práce bylo hodnocení schopnosti cytotoxického působení těchto PS po ozáření aktivačním světlem ihned po jejich aplikaci. Hodnocení životaschopnosti buněk probíhalo pomocí testu vychytávání neutrální červeně na 96 jamkových destičkách. Experimenty byly prováděny na dvou typech buněčných linií – lidská endoteliální buněčná linie EA.hy926 a lidská maligní cervikální linie HeLa.

Fluorescenční mikroskopie a mikroskopie v diferenciatním interferenčním kontrastu byly použity k hodnocení morfologických změn buněk po aktivaci PS. K detekci vybraných subcelulárních změn bylo použito fluorescenční barvení sondou JC-1 pro určení poškození mitochondrií a propidium jodid (PI) v kombinaci s Hoechst 33342 k rozlišení změn v jádře během buněčné smrti. Ta byla dále potvrzována průtokovou cytometrií s buňkami fluorescenčně značenými PI a FITC-Annexinem V.

Případné zapojení autofagie do procesu buněčné smrti bylo hodnoceno fluorescenčním značením monodansylcadaverinem.

Výsledky provedených experimentů potvrdily vysokou aktivitu těchto látek vůči vybraným buněčným liniím i ve VTP protokolu, přičemž celkově nejvhodnějším PS se ukázal být periferně substituovaný derivát ftalocyaninu s vysokou aktivitou po ozáření ( $EC_{50} = 0,57 \mu\text{M}$  pro EA.hy926, resp.  $0,24 \mu\text{M}$  pro HeLa buňky) a především velmi nízkou vlastní toxicitou ( $TC_{50} > 1500 \mu\text{M}$ ).

## 2 ABSTRACT

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

Candidate: Petra Brázdová  
Supervisor: Mgr. Miloslav Macháček  
Title of diploma thesis: Study of the novel phthalocyanines for the  
vascular-targeted photodynamic therapy of tumors

Cancer is one of the leading causes of death in developed countries, therefore a big effort is devoted on research of novel anticancer drugs. Photodynamic therapy (PDT) is currently a well-established method in this area, but targeting its effect on tumor vasculature has not been considered until recently. In comparison with PDT, vascular-targeted photodynamic therapy (VTP) takes the advantage of a much shorter interval between administration of the photosensitizer (PS) and irradiation (drug-light interval) and thus turning the effect of cytotoxic agents to tumor vasculature. It is intended to disrupt the oxygen and nutrients supply to malignant cells and thus cause their damage and death.

Aim of this work is to evaluate the efficacy of newly synthesized PSs from the group of phthalocyanines and azaphthalocyanines using the VTP protocol under *in vitro* conditions. The PSs used in this study have been investigated recently with classical PDT protocol, in which they have demonstrated very promising activity against tumor cells and exhibited low inherent toxicity.

The main objective of this study was to evaluate the ability of the cytotoxic effect of the PSs activated by an irradiation with red light immediately after their application. Evaluation of cell viability was carried out in 96-well plates using a neutral red uptake assay. Experiments were performed on two types of cell lines – human endothelial cell line EA.hy926 and malignant human cervical cell line HeLa.

Fluorescence microscopy and microscopy in differential interference contrast were employed for evaluation of morphological changes of the cells after activation of the PS. For detection of selected subcellular changes, the fluorescent probe JC-1 was

used for the determination of mitochondrial damage and propidium iodide (PI) in combination with Hoechst 33342 to distinguish changes in the nucleus during cell death. The latter was further confirmed by flow cytometry with cells fluorescently labeled with PI and FITC-Annexin V. The possible involvement of autophagy in the process of cell death was assessed by fluorescent labeling with monodansylcadaverin.

The results of the experiments confirmed the high activity of these compounds against selected cell lines and in the VTP protocol. The overall best PS was proved to be peripherally substituted phthalocyanine derivative having high activity after irradiation ( $EC_{50} = 0,57 \mu\text{M}$  for EA.hy926 or  $0,24 \mu\text{M}$  for HeLa cells) and especially very low inherent toxicity ( $TC_{50} > 1500 \mu\text{M}$ ).

### 3 OBSAH

1	ABSTRAKT .....	4
2	ABSTRACT .....	6
3	OBSAH.....	8
4	ÚVOD.....	11
5	SEZNAM ZKRATEK .....	12
6	TEORETICKÁ ČÁST .....	15
6.1	FOTODYNAMICKÁ TERAPIE .....	15
6.1.1	Historie PDT.....	15
6.1.2	Mechanismus PDT.....	16
6.1.3	Kombinace PDT s dalšími druhy protinádorových terapií .....	17
6.2	REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU.....	18
6.2.1	Vznik ROS.....	18
6.2.2	Superoxidový anion .....	19
6.2.3	Peroxid vodíku.....	19
6.2.4	Hydroxylový radikál .....	20
6.2.5	Singletový kyslík .....	20
6.2.6	Účinky ROS na organismus.....	20
6.2.7	Oxidační stres .....	21
6.3	SVĚTLO.....	21
6.3.1	Optické okno tkáně .....	22
6.3.2	Zdroje světla pro PDT.....	23
6.4	FOTOSENZITIZÉRY .....	23
6.4.1	Strukturní rozdělení fotosenzitizérů.....	23
6.4.2	Rozdělení fotosenzitizérů do generací .....	24
6.4.3	První generace fotosenzitizérů.....	25
6.4.4	Vlastnosti ideálního fotosenzitizéru.....	26
6.4.5	Druhá generace fotosenzitizérů .....	27
6.4.6	Třetí generace fotosenzitizérů.....	40



6.5	BIOLOGICKÁ ODPOVĚĎ NA PDT .....	40
6.5.1	Přímý účinek a subcelulární lokalizace fotosenzitizéru.....	41
6.5.2	Účinek na cévy.....	42
6.5.3	Aktivace imunitní odpovědi.....	43
6.6	NÁDORY A ABNORMÁLNÍ ANGIOGENEZE.....	43
6.6.1	Angiogeneze .....	44
6.7	TYPY BUNĚČNÉ SMRTI.....	47
6.7.1	Apoptóza.....	48
6.7.2	Nekróza.....	50
6.7.3	Autofagie .....	51
6.7.4	Vliv způsobu buněčné smrti po PDT na imunitní odpověď .....	52
6.8	FOTODYNAMICKÁ TERAPIE ZAMĚŘENÁ NA CÉVY (VTP) .....	52
6.8.1	Obecný úvod .....	52
6.8.2	Výhody fotodynamické terapie zaměřené na cévy .....	53
6.8.3	Průběh VTP.....	53
6.8.4	Fotosenzitizéry pro VTP .....	54
6.8.5	VTP v léčbě nádorů .....	55
7	CÍLE PRÁCE.....	57
8	METODICKÁ ČÁST .....	58
8.1	MANIPULAČNÍ VYBAVENÍ PRO PRÁCI S BUNĚČNÝMI LINIEMI..	58
8.2	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....	59
8.3	LÁTKY POUŽITÉ PŘI KULTIVACI BUNĚK .....	59
8.4	DALŠÍ REAGENCIE A CHEMIKÁLIE .....	60
8.5	POUŽITÉ FOTOLENIZIZÉRY .....	61
8.6	BUNĚČNÁ LINIE EA.hy926 .....	62
8.7	BUNĚČNÁ LINIE HeLa .....	62
8.8	PŘÍPRAVA MÉDIA .....	62
8.9	KULTIVACE .....	63
8.10	PASÁŽOVÁNÍ BUNĚK.....	63

8.11	POČÍTÁNÍ BUNĚK - STANOVENÍ POČTU ŽIVÝCH BUNĚK .....	64
8.12	NASAZOVÁNÍ BUNĚK NA EXPERIMENTY .....	64
8.13	PŘIDÁVÁNÍ STUDOVANÝCH LÁTEK K BUŇKÁM.....	65
8.14	STANOVENÍ FOTOTOXICITY .....	65
8.15	STANOVENÍ DARK TOXICITY .....	66
8.16	HODNOCENÍ VIABILITY BUNĚK POMOCÍ TESTU VYCHYTÁVÁNÍ NEUTRÁLNÍ ČERVENĚ .....	66
8.17	VYHODNOCENÍ DAT .....	67
8.18	FOTOGRAFICKÁ DOKUMENTACE .....	67
8.18.1	Fluorescenční barvení mitochondrií .....	67
8.18.2	Fluorescenční barvení jader .....	68
8.18.3	Hodnocení přítomnosti autofagie.....	69
8.19	PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE S POUŽITÍM ANNEXINU V .....	69
9	VÝSLEDKY .....	71
9.1	CYTOTOXICITNÍ EXPERIMENTY .....	71
9.1.1	Ftalocyanin ZIP120Zn .....	71
9.1.2	Ftalocyanin ZIP117Zn .....	74
9.1.3	Azaftalocyanin (tetrapyrazinoporfyrazin) ZIP65Zn .....	77
9.1.4	Porovnání cytotoxického působení studovaných fotosensitizerů .....	80
9.2	PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE.....	82
9.3	FOTOGRAFICKÁ DOKUMENTACE .....	83
9.3.1	Fluorescenční barvení jader .....	83
9.3.2	Fluorescenční barvení mitochondrií .....	86
9.3.3	Morfologické změny buněk .....	89
9.3.4	Hodnocení přítomnosti autofagie.....	91
10	DISKUZE .....	93
11	ZÁVĚRY .....	99
12	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	100

## 4 ÚVOD

Téma *Studium nových ftalocyaninů pro fotodynamickou terapii nádorů zaměřenou na cévy* jsem si pro svou diplomovou práci zvolila proto, že mě fotodynamická terapie zaujala jako celek, a to především svým principem, kdy z látek primárně netoxických nebo velmi málo toxických vznikne po ozáření světlem produkt poškozující cíleně určené místo organismu (především tedy takové, kde probíhá určitý patologický proces). Dalším důvodem mého výběru byla úzká spolupráce mezi katedrami, a to konkrétně mezi Katedrou biochemických věd, Katedrou farmaceutické chemie a kontroly léčiv a Katedrou biofyziky a fyzikální chemie. Tuto spolupráci považuji za inspirativní a přínosnou jak z hlediska pochopení dějů, které v živých organismech probíhají, tak z hlediska syntézy analogů látek, které prokázaly při experimentech vyšší účinnost.

Výsledky této práce budou použity jako podklad při dalším a hlubším studiu aktivity a toxicity těchto látek na lidských vaskulárních buněčných liniích, popřípadě v *in vivo* experimentech. Údaje obsažené v této práci mohou být také použity při podrobnějším studiu dějů vedoucích k oxidativnímu poškození a buněčné smrti, jakož i k podrobnějšímu popisu mechanismu a lokalizaci účinku látek po jejich aktivaci světlem.

## 5 SEZNAM ZKRATEK

ALA	kyselina 5-aminolevulová ( <i>5-aminolevulinic acid</i> )
AMD	věkem podmíněná (senilní) makulární degenerace ( <i>age-related macular degeneration</i> )
Ang	angiopoetin
AzaPc	azaftalocyanin(y) ( <i>azaphthalocyanine(s)</i> )
D-L interval	časový interval mezi podáním fotosenzitizéru a ozářením ( <i>drug-light interval</i> )
DIC	diferenciální interferenční kontrast
DMEM	kultivační médium ( <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> )
EC <sub>50</sub>	střední efektivní koncentrace
EGF	epidermální růstový faktor ( <i>epidermal growth factor</i> )
ER	endoplazmatické retikulum
FBS	fetální bovinní sérum (teplem inaktivované)
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv ( <i>Food and Drug Administration</i> )
FGF	fibroblastový růstový faktor ( <i>fibroblast growth factor</i> )
$\Phi_{\Delta}$	kvantový výtěžek singletového kyslíku
$\Phi_F$	kvantový výtěžek fluorescence
GA	Golgiho aparát
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxid vodíku
HAT	suplement do kultivačního média ( <i>hypoxantin, aminopterin, thymidin</i> )
HEPES	pufr ( <i>N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid</i> )
HpD	derivát hematoporfyrinu

HPPH	2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinyl pyrofeoforbid <i>a</i>
IC <sub>50</sub>	střední inhibiční koncentrace
IL	interleukin
i.v.	intravenózní/intravenózně
LDL	lipoprotein s nízkou hustotou ( <i>low density lipoprotein</i> )
MDC	monodansylcadaverin
MMP	matrixové metaloproteinázy ( <i>matrix metalloproteinases</i> )
mTOR	serin/threonin proteinkináza nazývaná mammalian target of rapamycin
NR	neutrální červeň ( <i>neutral red</i> )
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	singletový kyslík
O <sub>2</sub> <sup>-·</sup>	superoxid anion radikál
·OH	hydroxylový radikál
PBS	pufr ( <i>phosphate buffered saline</i> )
Pc	ftalocyanin(y) ( <i>phthalocyanine(s)</i> )
PDGF	růstový faktor z destiček ( <i>platelet derived growth factor</i> )
PDT	fotodynamická terapie ( <i>photodynamic therapy</i> )
PI	propidium jodid ( <i>propidium iodide</i> )
PPIX	protoporfyrin IX
PS	fotosenzitizér(y) ( <i>photosensitizer(s)</i> )
P/S	penicilin/streptomycin
ROS	reaktivní formy kyslíku ( <i>reactive oxygen species</i> )
SCM	DMEM médium obsahující sérum a další suplementy ( <i>serum containing medium</i> )

T/E	trypsin/EDTA
TC <sub>50</sub>	střední toxická koncentrace
TGF β	transformující růstový faktor beta ( <i>transforming growth factor- β</i> )
TIMP	tkáňové inhibitory matrixových metaloproteináz ( <i>tissue inhibitors of matrix metalloproteinases</i> )
TNF	tumor nekrotizující faktor ( <i>tumour necrosis factor</i> )
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor ( <i>vascular endothelial growth factor</i> )
VTP	fotodynamická terapie zaměřená na cévy ( <i>vascular-targeted photodynamic therapy</i> )
WST09	padeporfin (Tookad <sup>®</sup> )
WST11	padeliporfin (Tookad <sup>®</sup> Soluble, Stakel <sup>®</sup> )
ZIP117Zn	neperiferně substituovaný zinečnatý ftalocyanin
ZIP120Zn	periferně substituovaný zinečnatý ftalocyanin
ZIP65Zn	zinečnatý tetrapyrazinoporfyrazin

## 6 TEORETICKÁ ČÁST

### 6.1 FOTODYNAMICKÁ TERAPIE

Fotodynamická terapie (PDT) je metoda kombinující tři základní složky: fotosenzitizér (PS), světlo a kyslík. Ačkoliv je každá z nich sama o sobě netoxická, spolu spouští fotochemickou reakci, která dává vznik vysoce reaktivním a toxickým látkám způsobujícím poškození buňky až její smrt (Agostinis a kol. 2011).

Tento druh terapie vyžaduje přítomnost PS ve tkáni, která má být léčena. V prvním kroku dochází k podání PS (systémově nebo topicky) v nepřítomnosti světla. Po určité době, kdy má PS čas k distribuci a akumulaci v maligní tkáni, následuje ozáření nádoru světlem o vhodné vlnové délce, které PS aktivuje. V přítomnosti molekulárního kyslíku ( $^3\text{O}_2$ ) je energie fotonů převedena fotochemickou reakcí na vznik singletového kyslíku ( $^1\text{O}_2$ ), popřípadě reaktivních forem kyslíku (ROS), a fluorescence. Poškození buněčných struktur a bio-makromolekul pak vede k přímému poškození a smrti nádorových buněk (apoptickou nebo nekrotickou cestou), poškození cévní mikrocirkulace a vyvolání místní zánětlivé reakce účastníci se na odstranění mrtvých buněk, obnovení homeostázy a v některých případech i na vyvinutí systémové imunity (Agostinis a kol. 2011, Josefsen a Boyle 2012, Moreira a kol. 2008).

Kombinovaný přístup této léčby vede k větší selektivitě ve zničení nemocné tkáně, jelikož pouze buňky vystavené současně fotosenzitizéru, světlu a kyslíku jsou vystaveny cytotoxickým činitelům produkovaným v průběhu PDT (Allen a kol. 2001).

PDT je klinicky schválená, minimálně invazivní terapeutická metoda využívaná při léčbě různých druhů maligních i nemaligních onemocnění (Agostinis a kol. 2011, Moreira a kol. 2008, Zimcik a kol. 2010).

#### 6.1.1 Historie PDT

Počátky využívání fotodynamického procesu můžeme datovat daleko do minulosti, kdy člověk s pomocí rostlinných extraktů a slunečního záření léčil některá kožní onemocnění. Jako příklad můžeme uvést Indii 1400 let před naším letopočtem, kde byly používány psoraleny získané ze semen *Psoralea corylifolia* k léčbě vitiliga

(Allen a kol. 2001). Důležitým krokem ve vývoji fototerapie bylo ohlášení léčby pravých neštovic červeným světlem a kožní tuberkulózy ultrafialovým světlem v roce 1901 dánským lékařem Nielsem Finsenem. Ten byl za svůj objev roku 1903 oceněn Nobelovou cenou (Zimcik a Miletin 2009).

Fotodynamický efekt byl formálně zaznamenán na přelomu 20. století, kdy student medicíny Oscar Raab (pracující pod vedením Dr. H. von Tappeinera) zaznamenal letální účinky roztoku akridinové oranže na prvoky rodu *Paramecia* (trešky). Tento účinek byl závislý na intenzitě osvětlení v laboratoři. Později bylo zjištěno, že další sloučeniny, jako je eosin, jsou schopny indukovat rychlé usmrcení buněk v přítomnosti světla – ukázalo se, že pro tento efekt je nutná přítomnost rozpuštěného molekulárního kyslíku. Roku 1908 pak Hausmann zaznamenal fotohemolýzu králičích erytrocytů při použití hematoporfyrinu (Allen a kol. 2001).

Historie PDT v klinické praxi se však začíná psát až roku 1993 schválením porfimeru sodného (Photofrin<sup>®</sup>) v Kanadě pro léčbu rakoviny močového měchýře (Wang a kol. 2013). Jeho fotofyzikální a farmakokinetické vlastnosti ale nebyly optimální – jde o fotosenzitizér první generace. Jedná se totiž o komplikovanou směs oligomerů, absorbující světlo při pouhých 630 nm s dlouho trvající kožní fotosenzitivitou (až 6 týdnů). Tyto výše uvedené nevýhody pobízely k vývoji nových PS. To dalo za vznik dalším látkám - druhé generaci fotosenzitizérů. Některé z těchto látek již byly přijaty do klinické praxe (verteporfín, temoporfín, talaporfín, aminolevulová kyselina a její estery) (Zimcik a kol. 2010).

### **6.1.2 Mechanismus PDT**

Mechanismus PDT je založen na absorpci světla PS a následném přenosu energie na okolní molekuly, hlavně na kyslík (Zimcik a kol. 2010).

Po ozáření je PS excitován do svého prvního excitovaného singletového stavu. Tento excitovaný stav trvá příliš krátce (ns) na to, aby dokázal účinně reagovat s okolím, a rychle ztrácí energii zářivým (fluorescence) nebo nezářivým rozkladem. Pro PDT je nejdůležitější mezisystémový přechod na tripletový stav. Tento excitovaný stav má dobu existence již v řádu mikrosekund, což je dostatečně dlouhá doba pro interakci mezi excitovaným PS a okolními molekulami. Je tedy obecně přijímáno, že vznik



cytotoxických produktů v průběhu PDT zahrnuje interakci s excitovaným tripletovým stavem senzitizeru, ačkoliv existují případy, kde je zahrnut i singletový stav (Allen a kol. 2001).

Excitovaný tripletový stav PS může procházet dvěma typy fotoreakcí. Mechanismus Typu I zahrnuje oddělení atomu vodíku nebo přenos elektronu vedoucí ke vzniku volných radikálů a radikálových iontů. Tyto částice mohou ihned reagovat s molekulárním kyslíkem a navodit nenapravitelné oxidační poškození buňky a produkci ROS vedoucí k další biologické destrukci.

Při reakci Typu II může tripletový stav PS přenést svou energii přímo na molekulární kyslík, který je výjimečný tím, že jeho základní stav je tripletový. Vznikající singletový kyslík reaguje téměř okamžitě s nespočtem biologicky důležitých substrátů, což opět vede k závažnému oxidačnímu poškození a nakonec ke smrti buňky (Allen a kol. 2001, Castano a kol. 2004).

Oba typy reakcí mohou probíhat zároveň a poměr mezi těmito dvěma procesy záleží na typu použitého fotosenzitizeru, koncentraci substrátu a kyslíku (Castano a kol. 2004). Je však obecně přijímáno, že Typ II v průběhu PDT převažuje a že singletový kyslík je nejdůležitějším cytotoxickým agens produkovaným při tomto druhu terapie.

Životnost singletového kyslíku je velmi krátká (10 – 320 ns), což limituje jeho difuzi v buňce pouze na 10 – 55 nm (Agostinis a kol. 2011). Velikost lidských buněk se pohybuje od 10 do 100  $\mu\text{m}$ . Místo vzniku singletového kyslíku (lokalizace PS) tedy přímo určuje, který subcelulární cíl bude atakován, a rozhoduje mj. také o typu buněčné smrti (Allen a kol. 2001, Castano a kol. 2004).

### **6.1.3 Kombinace PDT s dalšími druhy protinádorových terapií**

Kombinace různých druhů terapie s nepřekrývající se toxicitou je dnes běžně používanou strategií ke zlepšení terapeutického indexu léčby v moderní onkologii. Díky tomu, že má PDT unikátní cytotoxický efekt založený na singletovém kyslíku, může být bezpečně kombinována s dalšími druhy protinádorové léčby bez rizika vzniku zkřížené rezistence. PDT tedy může být použita samostatně nebo v kombinaci s chirurgickou léčbou, radioterapií nebo chemoterapií (Agostinis a kol. 2011).

Kombinace PDT s chemoterapeutickým léčivem umožňuje nejen účinnější zničení nádorových buněk, ale také snížení škodlivých vedlejších účinků chemoterapie díky možnosti použití menší dávky léčiva při zachování účinku (Moreira a kol. 2008).

## 6.2 REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU

Pojmem reaktivní formy kyslíku označujeme skupinu látek odvozených od molekuly kyslíku ( $O_2$ ). Jedná se především o volné radikály, které mají nepárový elektron, řadíme tam však i neradikálové sloučeniny kyslíku, z nichž však radikály také mohou vzniknout (Ledvina a kol. 2005). Nejdůležitějšími zástupci jsou superoxidový anion radikál ( $O_2^{\cdot-}$ ), peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ), hydroxylový radikál ( $\cdot OH$ ) a singletový kyslík ( $^1O_2$ ). Jsou to látky vysoce reaktivní, vznikající enzymatickými nebo neenzymatickými reakcemi. Obecně jsou vnímány jako látky toxické způsobující narušení činnosti buňky, její smrt či maligní transformace. ROS však nepůsobí pouze jako látky toxické, účastní se také nespecifické imunitní obrany vůči patogenům, transdukce signálu a buněčného metabolismu (Manda a kol. 2009).

Zvýšený vznik ROS byl pozorován u nádorových a degenerativních onemocnění (Alzheimerova a Parkinsonova choroba) a při dalších patologických stavech (Lu a kol. 2007) (např. revmatoidní artritida, kardiovaskulární nemoci, AIDS, vznik šedého zákalu), stejně jako v nepatologických procesech jakým je stárnutí (Moreira a kol. 2008).

### 6.2.1 Vznik ROS

Vznik volných radikálů je z větší části neřízený, a v aerobních organismech nevyhnutelný díky jejich závislosti na oxidačních procesech. Aerobní organismy se proto adaptovaly životu v oxidačním prostředí vyvinutím silných antioxidačních mechanismů (Manda a kol. 2009)

Potenciálně cytotoxické ROS jako je  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  a  $\cdot OH$  mohou vznikat v eukaryotních buňkách v průběhu normálního energetického metabolismu (mitochondriálního elektronového transportního řetězce a oxidativní fosforylace), nebo metabolismu určitých xenobiotik.

Ve skutečnosti i vystavení se slunečnímu záření může být významným zdrojem ROS jako důsledek excitace endogenních fotosenzitizérů v kůži. Tyto látky také mohou být generovány mnoha dalšími extracelulárními činiteli jako je např. ionizující nebo neionizující záření (Moreira a kol. 2008).

Celá řada volných radikálů je produkována fagocytujícími buňkami. Při fagocytóze se spotřebuje vysoký počet kyslíkových molekul, což je označováno jako respirační vzplanutí. Při likvidaci cizorodých částic fagocytujícími buňkami jsou však účinky ROS velmi žádoucí (Ledvina a kol. 2005).

### **6.2.2 Superoxidový anion**

Jednoelektronovou redukcí kyslíku vzniká superoxid, ten není tak reaktivní a v biologických systémech nezpůsobí takové oxidační poškození. Může však difundovat z místa svého vzniku a zvýšit oxidační stres v celé buňce.  $O_2^{\cdot-}$  může reagovat v přítomnosti vodíku sám se sebou za vzniku  $H_2O_2$  a  $O_2$  (dismutace). Ta může probíhat buď spontánně, nebo za katalýzy enzymem superoxid dismutázou (Castano a kol. 2004, Manda a kol. 2009).

Superoxid je také důležitý v produkci vysoce reaktivního  $\cdot OH$ , protože se účastní redukce kovových iontů, které působí jako katalyzátory při přeměně  $H_2O_2$  na  $\cdot OH$  a hydroxidový anion ( $OH^-$ ) (Castano a kol. 2004). Sám pak způsobuje peroxidaci lipidů (Manda a kol. 2009).

### **6.2.3 Peroxid vodíku**

Peroxid vodíku vzniká ze superoxidu dismutací. Nemá nepárový elektron a není tudíž radikálem (Ledvina a kol. 2005).  $H_2O_2$  je nutný pro vznik toxickejších ROS jako je  $\cdot OH$  (vznikající Fentonovou a Haber-Weissovou reakcí) a kyselina chlorná (reakce katalyzovaná myeloperoxidázou). Interaguje s lipidy, proteiny a nukleovými kyselinami. Je rozpustný v lipidech a díky své strukturní podobnosti s vodou může volně difundovat skrze biologické membrány (buňky a tkáně) a tedy interferovat s buněčnými cíli mimo místo svého vzniku (Manda a kol. 2009).

$H_2O_2$  je důležitý v biologických systémech pro funkci mnoha enzymů, a proto je stejně jako kyslík potřebný pro správnou funkci organismu (Castano a kol. 2004).

#### **6.2.4 Hydroxylový radikál**

Hydroxylový radikál vzniká Fentonovou nebo Haber-Weissovou reakcí za účasti železnatých iontů ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Jedná se o extrémně reaktivní formu kyslíku, která atakuje většinu buněčných komponent (sacharidy, nukleové kyseliny, lipidy a proteiny) (Manda a kol. 2009).

#### **6.2.5 Singletový kyslík**

Vzniká excitací elektronů v molekule kyslíku spojenou se změnou spinu jednoho elektronu (Ledvina a kol. 2005).  $^1\text{O}_2$  je vysoce reaktivní forma kyslíku, která reaguje s mnoha biologickými molekulami zahrnujícími lipidy, proteiny a nukleové kyseliny (Moreira a kol. 2008).

Jak už bylo řečeno výše, je obecně přijímáno, že singletový kyslík je nejdůležitější cytotoxické agens produkované v průběhu PDT (Allen a kol. 2001). Proto při posuzování účinnosti nově nasyntetizované molekuly potenciálně použitelné pro PDT hodnotíme její fotochemické vlastnosti, mezi které řadíme i schopnost molekuly produkovat právě singletový kyslík – tzv. kvantový výtěžek singletového kyslíku ( $\Phi_{\Delta}$ ). Ten přitom silně závisí na konjugovaném systému dvojných ( $\pi$ -) vazeb PS, což ospravedlňuje široké použití  $\pi$ -konjugovaných makrocyclů, jako jsou porfyriny a ftalocyaniny (Moreira a kol. 2008).

#### **6.2.6 Účinky ROS na organismus**

Reaktivní formy kyslíku (a oxidační stres obecně) způsobují:

1) Oxidační poškození lipidů (lipoperoxidaci) – to vyvolává nejčastěji hydroperoxylový radikál (vznikající protonizací  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ),  $\cdot\text{OH}$ , méně pak  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Nejnáchylnější k oxidaci je fosfolipidová dvojvrstva biologických membrán (hlavně v endotelu cév), a v nich především dvojně vazby nenasyčených mastných kyselin (Ledvina a kol. 2005).

2) Oxidační poškození bílkovin a enzymů – důležitými cíli jsou především aminokyselinové zbytky proteinů, které obsahují SH-skupiny (cystein, methionin) nebo dvojnásobné vazby (tyrosin, histidin, tryptofan). Poškozovány jsou však také bílkoviny pojiva (kolagen a elastin) (Castano a kol. 2004, Ledvina a kol. 2005).

3) Poškození jiných makromolekul – ROS poškozují také nukleové kyseliny, polysacharidy, glykosaminoglykany, ale i nízkomolekulární látky a cholesterol (Ledvina a kol. 2005).

### **6.2.7 Oxidační stres**

Oxidační stres bývá definován jako narušení rovnováhy pro- a antioxidačních faktorů vedoucí k možnému poškození tkáně. Tato nerovnováha může být způsobena zvýšenou tvorbou reaktivních produktů nebo sníženou schopností přirozených ochranných mechanismů organismu zabránit vzniku a působení těchto reaktivních sloučenin (Moreira a kol. 2008).

V normálních buňkách proliferace buněk vyplývající ze stimulace růstovými faktory vyžaduje signalizaci pomocí ROS. To se shoduje s představou, že aktivace této cesty v nádorových buňkách je spojena se zvýšením této signalizace. Nádorové buňky tedy mohou být mnohem zranitelnější vůči oxidačnímu stresu, protože pracují už se zvýšenou hladinou signalizace pomocí ROS, která je vyžadována pro zvýšenou míru růstu. Přidání činidla způsobujícího zvýšený vznik ROS nebo snížení vychytávací kapacity může posunout nádorovou buňku za kritický bod, pokud jde o lipidovou peroxidaci, poškození DNA a oxidaci proteinů (Schumacker 2006).

Je uchvacující jak jsou schopny tak jednoduché molekuly jako ROS regulovat život a smrt (Manda a kol. 2009).

## **6.3 SVĚTLO**

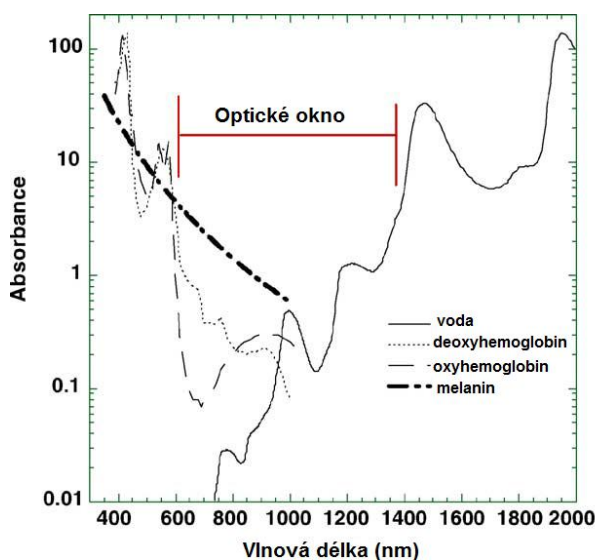
Světlo je jednou ze tří hlavních komponent PDT a je nezbytné k aktivaci molekul PS (Chen a kol. 2006). Společně s přednostním hromaděním PS v cílové tkáni přispívá k selektivě této terapie a omezuje tak poškození okolní zdravé tkáně (Macdonald a Dougherty 2001).

Volba světelného zdroje by měla být založena na absorpčním spektru PS, charakteru nemoci (místo, velikost léze, přístupnost, vlastnosti tkáně), ceně a velikosti daného zařízení. Volba optimální kombinace PS, zdroje světla a parametrů léčby je klíčová pro úspěšnou PDT (Agostinis a kol. 2011).

### 6.3.1 Optické okno tkáně

Světlo je po vstupu do tkáně buď rozptýlováno, nebo absorbováno. Rozsah obou procesů záleží na typu tkáně a vlnové délce světla. K absorpci dochází hlavně díky endogenním chromoforům, jako jsou hemoglobin, myoglobin, cytochromy a melanin (Castano a kol. 2004). Kombinace absorpce světla nižších vlnových délek (400 – 600 nm) důležitými tkáňovými chromofory (Moreira a kol. 2008) společně s menším rozptylem světla při delších vlnových délkách a přítomnosti absorpce vodou při vlnových délkách nad 1300 nm vedla ke vzniku představy „optického okna“ ve tkáni (Castano a kol. 2004).

Oblast mezi 600 a 1200 nm je tedy často nazývána optickým oknem tkáně (Obr. 1). Avšak pouze světlo do cca 800 nm může efektivně tvořit  $^1\text{O}_2$ , protože delší vlnové délky nemají dostatečnou energii ke spuštění fotodynamické reakce (Agostinis a kol. 2011).



**Obrázek 1** Optické okno tkáně s vymezením absorpčních spekter důležitých tkáňových chromoforů (Castano a kol. 2004)

### **6.3.2 Zdroje světla pro PDT**

Světlenými zdroji pro PDT mohou být lasery, nebo nekoherentní zdroje světla. Použití laseru umožňuje výběr optimální vlnové délky pro maximum absorpce daného PS, které závisí na jeho chemické struktuře. Výhodou použití laserů je také možnost jejich spojení s optickými vlákny, a tak je endoskopicky zavést do jinak nepřístupných oblastí (např. močový měchýř a gastrointestinální trakt). Pro dermatologii jsou však významnější nelaserové zdroje díky velkému povrchu, který mohou ozářit, nižší ceně, menší velikosti, spolehlivosti a snadnému nastavení (Moreira a kol. 2008).

Hloubka, do které se světlo v tkáni dostane, je závislá na optických vlastnostech tkáně a vlnové délce světla (Macdonald a Dougherty 2001). Delší vlnová délka znamená hlubší penetraci tkání (Chen a kol. 2006) – penetrace červeného světla (~ 630 nm) tkání je tedy jen výjimečně vyšší než 5 mm, zatímco při vyšších vlnových délkách ( $\leq 800$  nm) může být až 1 – 2 cm (Zimčik a kol. 2010).

## **6.4 FOTOSENZITIZÉRY**

Fotosenzitizér je molekula, která po excitaci světelnou energií může využít získanou energii ke spuštění fotochemických reakcí produkujících pro buňky toxické působky. PS jsou po podání přijímány buňkami celého těla. Samy o sobě (to jest v nepřítomnosti světla a kyslíku) však nemají žádný účinek na zdravou nebo patologickou tkáň. Jsou to pouze jejich aktivované formy, které mají cytotoxický efekt (Josefsen a Boyle 2012).

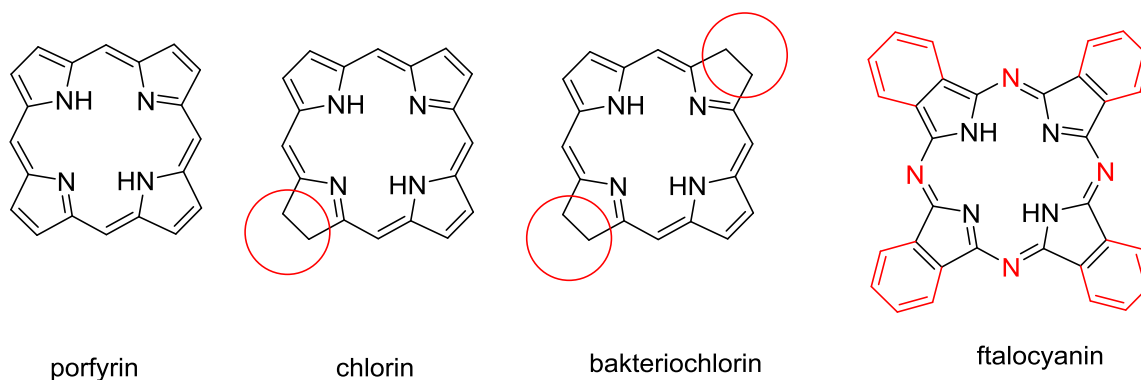
V současnosti je známo velké množství látek, které jsou potenciálními PS využitelnými v PDT. Některé z nich lze snadno připravit syntézou z látek běžně dostupných v přírodě jako je hem, chlorofyl a bakteriochlorofyl. Tento postup je šetrnější k životnímu prostředí a má také výhody ekonomické vzhledem ke komplikované totální chemické syntéze látek (Castano a kol. 2004).

### **6.4.1 Strukturní rozdělení fotosenzitizérů**

Většina fotosenzitizérů je odvozena od tetrapyrolového aromatického jádra, které se nachází v mnoha přírodně se vyskytujících pigmentech (hem, chlorofyl

a bakteriochlorofyl). Mezi plně konjugované tetrapyroly (porfyriny) s vlnovou délkou maxima kolem 630 nm patří hem (Castano a kol. 2004). Chloriny jsou tetrapyroly, které mají redukovánou jednu dvojnou vazbu (Obr. 2), čímž se posouvá i vlnová délka maxima k 650 – 690 nm, bakteriochloriny mají dva pyrolové kruhy s redukovanou dvojnou vazbou (Obr. 2), což posouvá maximum absorpce ještě dále v červené oblasti spektra (740 – 800 nm) (Castano a kol. 2004, Zimcik a Miletin 2009).

Druhou strukturální skupinou fotosenzitizérů jsou ftalocyaniny (Pc) (Obr. 2) a méně rozšířené naftalocyaniny. Vlnová délka maxima je opět > 650 nm. Přítomnost čtyř fenylových nebo naftylových skupin však způsobuje problémy s rozpustností a agregací (Castano a kol. 2004).



**Obrázek 2** Základní strukturální typy fotosenzitizérů

#### **6.4.2 Rozdělení fotosenzitizérů do generací**

Fotosenzitizéry jsou obecně děleny do tří generací. První generace fotosenzitizérů zahrnuje derivát hematoporfyrinu (HpD, porfimer sodný), komerčně dostupný jako Photofrin<sup>®</sup>. Druhá generace byla pak vyvíjena od 80. let minulého století k překonání nevýhod první generace (Yoon a kol. 2013). Těmito nedostatky jsou chemická nejednost, slabá absorpce při nižších vlnových délkách, horší prostup tkáněmi a především dlouhá kožní fotosenzitivita (Agostinis a kol. 2011, Allen a kol. 2001, Castano a kol. 2004, Moreira a kol. 2008). Jako třetí generace jsou pak označovány PS druhé generace konjugované s látkami, jako jsou cholesterol, protilátky a liposomy pro přednostní akumulaci a cílení na nádorovou tkáň (Yoon a kol. 2013).



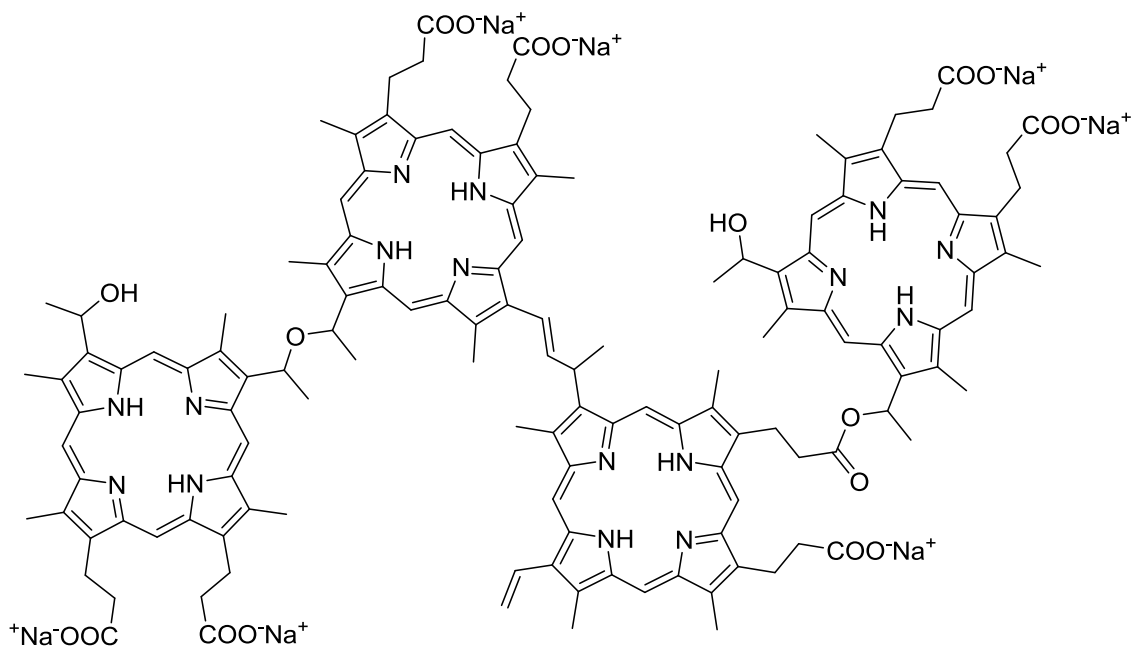
### 6.4.3 První generace fotosenzitizérů

#### 6.4.3.1 PORFYRINY

##### Porfimer sodný

Prvním PS klinicky použitým pro léčbu rakoviny byla ve vodě rozpustná směs porfyrinových monomerů, dimerů a oligomerů s nedefinovaným poměrem nazývaná derivát hematoporfyrinu (HpD) (Agostinis a kol. 2011, Zimcik a Miletin 2009). Ten byl připraven z hematoporfyrinu, látky získané z červeného krevního barviva zodpovědného za přenos kyslíku v živých organismech, tedy hemu (Zimcik a Miletin 2009). Čištěná forma HpD obohacená o více aktivní dimerní a oligomerní komponenty, porfimer sodný (Obr. 3), se později stala známá pod názvem Photofrin<sup>®</sup> (Agostinis a kol. 2011, Allen a kol. 2001). Bývá podáván intravenózně (i.v.) v dávce 2 mg/kg, ozáření následuje 48 hodin po aplikaci (Allison a kol. 2004).

Photofrin<sup>®</sup> byl schválen v některých zemích pro léčbu časných a pozdních stádií rakoviny plic, jícnu, močového měchýře, časných stádií rakoviny žaludku a děložního čípku (Agostinis a kol. 2011).



**Obrázek 3** Struktura jednoho z oligomerů porfimeru sodného

Ačkoliv je porfimer sodný pravděpodobně nejpoužívanější PS, má několik nevýhod (Agostinis a kol. 2011). 1) Jedná se o směs látek s neurčitou strukturou a složením (Castano a kol. 2004). 2) Absorbuje velmi slabě při vlnové délce 630 nm, kde není penetrace tkání optimální, což omezuje léčbu na hloubku nádoru do 5 mm. Navíc bylo prokázáno, že jsou deriváty hematoporfyrinu neúčinné pro nádory typu pigmentovaného melanomu díky překryvu absorpčních spekter PS a melaninu v maligní tkáni. 3) Deriváty hematoporfyrinu vykazují prodlouženou retenci v kožní tkáni trvající až 10 týdnů po injekci. Toto ústí v prodlouženou kožní fotosenzitivitu nevýhodnou hlavně u pacientů s pozdními stádii nádorů (Allen a kol. 2001).

Tyto důvody pobízely k aktivnímu hledání nových, chemicky dobře definovaných PS se zlepšenými optickými a farmakokinetickými vlastnostmi. Tyto látky jsou obecně známé jako fotosenzitizéry druhé generace (Moreira a kol. 2008).

#### **6.4.4 Vlastnosti ideálního fotosenzitizéru**

V souvislosti se snahou najít nové fotosenzitizéry pro PDT, byly také definovány vlastnosti, které by měl ideální PS mít.

Měla by to být chemicky čistá sloučenina s neměnným složením, jeho syntéza by měla být poměrně jednoduchá a výchozí látky snadno dostupné. PS by měl být v ideálním případě rozpustný ve vodě nebo ve směsi vodných rozpouštědel a neagregovat příliš v biologickém prostředí, protože to snižuje jeho fotochemickou účinnost. Měl by mít minimální cytotoxicitu bez přítomnosti aktivujícího záření a nízkou toxicitu po podání (alergická reakce, hypotenze). PS by měl být přednostně zadržován cílovou tkání (maligní či nemaligní), aby způsoboval pouze okrajovou toxicitu sousední zdravé tkáni. Navíc přebytečný PS by měl být rychle vyloučen z těla s projevy minimální systémové toxicity. Také by měl mít vysokou fotochemickou aktivitu s vysokými kvantovými výtěžky dlouho žijících tripletových stavů dostatečně energetických k produkci singletového kyslíku. PS by měl absorbovat v červené oblasti spektra při vlnových délkách 600 – 800 nm, kde je optimální penetrace světla tkáni (Agostinis a kol. 2011, Allen a kol. 2001, Castano a kol. 2004). Nemůžeme však očekávat, že by některý fotosenzitizér splňoval všechny tyto parametry (Allen a kol. 2001).

## **6.4.5 Druhá generace fotosenzitizérů**

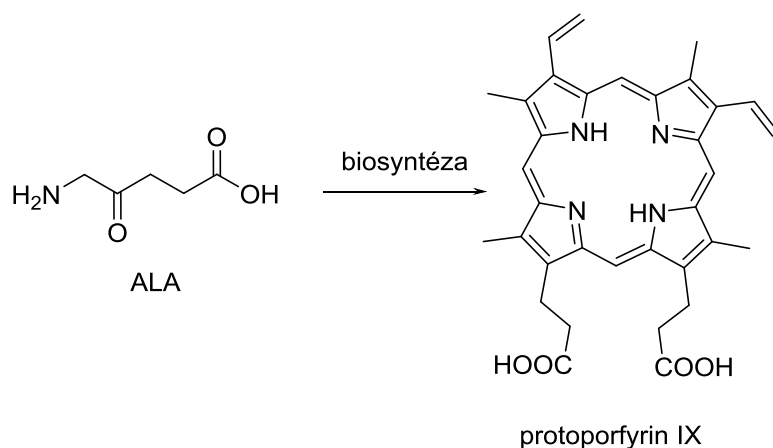
Sloučeniny druhé generace jsou definovaná chemická individua se silnější absorpcí při delších vlnových délkách, krátce trvající kožní fotosenzitivitou a nízkou toxicitou bez ozáření (Zimcik a kol. 2010). Většina zástupců druhé generace fotosenzitizérů jsou molekuly odvozené od porfyrinu: benzoporfyriny, chloriny a bakteriochloriny, pheophorbidy, texapyriny, ftalocyaniny a naftalocyaniny (Moreira a kol. 2008).

### **6.4.5.1 PORFYRINY**

#### **Kyselina 5-aminolevulová a její estery**

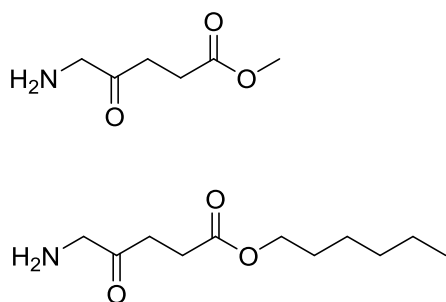
Kyselina 5-aminolevulová (ALA, Levulan<sup>®</sup>) není fotosenzitizérem sama o sobě, jedná se o metabolický prekurzor fotosenzitivního protoporfyrinu IX (PPIX) – tedy o proléčivo. Na fotodynamicky aktivní léčivo je metabolizována biosyntetickou cestou hemu *in situ* v nádoru, nebo v buňkách cílové tkáně (Obr. 4), přičemž míra syntézy a akumulace PPIX je větší v maligních a premaligních buňkách než v buňkách zdravých (Castano a kol. 2004, Moreira a kol. 2008).

Téměř všechny typy buněk v lidském těle s výjimkou zralých červených krvinek jsou vybaveny metabolickým aparátem syntézy hemu (Castano a kol. 2004). Finální kroky této syntézy probíhají v mitochondriích buněk (Zimcik a Miletin 2009). V prvním kroku vzniká ALA z glycinu a succinyl CoA pomocí ALA-syntetázy. Posledním krokem je pak začlenění železa do PPIX katalyzované enzymem ferochelatázou a vznik hemu (Castano a kol. 2004). Koncentrace hemu funguje jako zpětnovazebná inhibice této metabolické dráhy. Za fyziologických podmínek nejsou akumulovány žádné meziprodukty v buňce (Zimcik a Miletin 2009). Přidáním exogenní ALA je zpětnovazebná inhibice obcházena a PPIX se hromadí kvůli limitované kapacitě ferochelatázy (Castano a kol. 2004).



**Obrázek 4** ALA jako prekurzor, který biosyntézou poskytuje fotosenzitivní protoporfyrin IX

Důvody, proč mají rakovinné buňky tendenci syntetizovat více PPIX než normální, jsou stále předmětem výzkumu. Hypotézy naznačují, že by to mohla způsobovat vyšší exprese enzymů biosyntézy hemu nebo nižší exprese ferochelatázy. Pokusy zvýšit účinnost PDT s ALA zahrnují použití chelátorů železa ke snížení množství PPIX přeměňovaného na hem ferochelatázou odnětím volného železa, které je nezbytné pro práci enzymu. Dalším přístupem je podání polární ALA jako esteru (methyl, pentyl, hexyl, benzyl) (Obr. 5) ve snaze facilitovat příjem do buňky zvýšením lipofility molekuly (Castano a kol. 2004).



**Obrázek 5** Metylester a hexylester ALA

*In vivo* může být ALA podána perorálně, i.v. nebo topicky (Castano a kol. 2004). Je podávána několik hodin před aktivací světlem o vlnové délce 630 nm (Allison a kol. 2004). ALA vykazuje nízkou toxicitu a je rychle vylučována z těla díky existujícím eliminačním mechanismům. Navíc PPIX vznikající po aplikaci ALA vytváří fluorescenci, která může být vizualizována pod modrým světlem – možnost využití pro diagnostické účely (Moreira a kol. 2008).

ALA je používána při léčbě aktinické keratózy pokožky obličeje a hlavy (Allen a kol. 2001), zobrazování a léčbě povrchových nádorů (Josefsen a Boyle 2012). Silná hydrofilita ALA je limitující pro průnik kůži, zejména vrchní vrstvou, stratum corneum a buněčnou membránou. Z tohoto důvodu mohou být léčeny jen nádory velmi blízko povrchu (Zimcik a Miletin 2009). Je také používána při topické léčbě dermatologických problémů (psoriáza, Bowenova nemoc a akné).

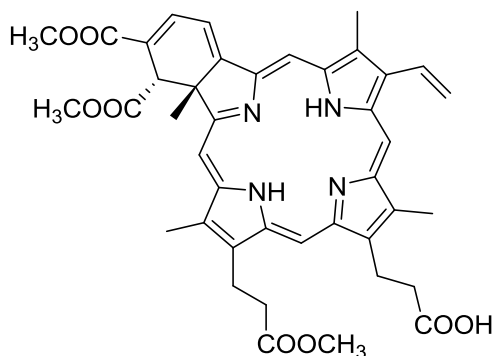
ALA deriváty jsou používány v klinice pro zobrazování a léčbu bazálního buněčného karcinomu a dalších kožních lézí. Metvix<sup>®</sup> (methylester derivát ALA), Benvix<sup>®</sup> (benzylester derivát) a Hexvix<sup>®</sup> (hexylester derivát) byly také použity při léčbě rakoviny gastrointestinálního traktu a v diagnostice rakoviny močového měchýře.

Schopnost malých molekul ALA derivátů pronikat přes kůži selektivněji v místě nádorů a vykazovat fluorescenci a fotosenzitivitu národu *in situ* díky tvorbě PPIX, je činí ideálními léčebnými činidly (Josefsen a Boyle 2012).

#### **6.4.5.2 CHLORINY**

##### **Verteporfin**

Verteporfin (Obr. 6), jinak nazývaný benzoporfyrinový derivát (BPD), je fotosenzitizér druhé generace odvozený od protoporfyrinu (Moreira a kol. 2008). Navzdory svému jménu je však benzoporfyrin členem rodiny chlorinů. Díky tomu vhodněji absorbuje až při 690 nm. Verteporfin je těžko rozpustný ve vodě, takže musí být podáván ve formě liposomů v dávce 6 mg/m<sup>2</sup> (Zimcik a Miletin 2009). Tato sloučenina má rychlý příjem tkáněmi i vylučování z organismu a je selektivně vychytávána endotelovými buňkami (Moreira a kol. 2008). Ozáření se provádí 15 až 30 minut po podání a jeho poločas v organismu je mezi 5 a 6 hodinami. Kožní fotosenzitivita je minimální a trvá obvykle po dobu 48 hodin (Zimcik a Miletin 2009). Nejčastějším nežádoucím účinkem je bolest při podání (Allison a kol. 2004).

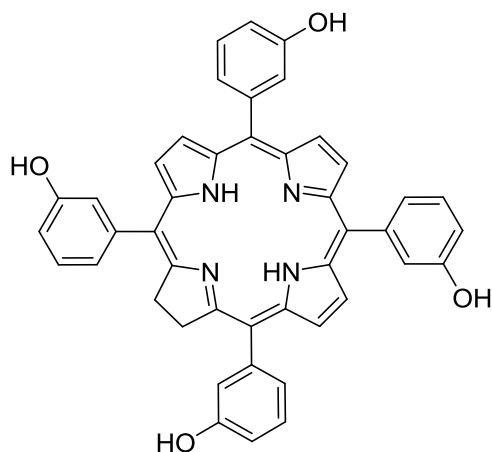


**Obrázek 6** Struktura verteporfinu

Verteporfin je schválen pod obchodním názvem Visudyne<sup>®</sup> k léčbě věkem podmíněné makulární degenerace (AMD, vedoucí příčiny slepoty u lidí nad 50 let) a používá se také u jiných onemocnění způsobujících ztrátu zraku kvůli novotvorbě abnormálních cév v cévnatce oka (choroidální neovaskularizaci) (Allen a kol. 2001). Většina klinické odpovědi verteporfinu je založena na narušení a uzavěru cév, proto se toto léčivo zdá být ideální pro poruchy způsobené novotvorbou cév (Allison a kol. 2004). Verteporfin však ukázal účinnost také v dermatologii pro léčbu nemelanomových nádorů kůže (Ormond a Freeman 2013, Zimcik a Miletin 2009).

### **Temoporfin**

Temoporfin (Obr. 7) neboli *m*-tetrahydroxyfenylchlorin (mTHPC, Foscan<sup>®</sup>) je PS druhé generace, člen rodiny chlorinů (Allison a kol. 2004, Zimcik a Miletin 2009).



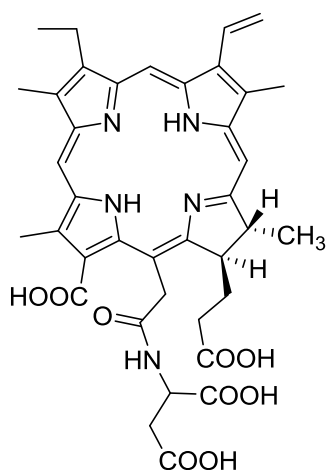
**Obrázek 7** Struktura temoporfinu

Patří mezi nejsilnější PS, protože poskytuje mimořádné množství singletového kyslíku při 652 nm. Je podáván i.v. v dávce 0,1 – 0,2 mg/kg. Trvá však asi 4 dny než se dosáhne maximální akumulace v nádoru a vyloučení z normální tkáně. Po infuzi i tlumené světlo může vést k vážné kožní fotosenzitivitě. Ozáření samotné musí být velmi přesné a dávka záření bývá jen 20 J/cm<sup>2</sup>. Přestože léčebný zásah probíhá pouze pár minut, může se objevit u pacienta značná bolest. Prodloužená kožní fotosenzitivita může trvat až 6 týdnů, ale obvykle to bývají 2 až 4 týdny (Allison a Sibata 2010).

V roce 2001 byl schválen pro léčbu nádorů hlavy a krku. Je jediným PS schváleným pro tento typ nádorového onemocnění. Dobré kosmetické výsledky byly také dosaženy při léčbě bazálního buněčného karcinomu během klinických studií (Zimcik a Miletin 2009).

### **Talaporfin**

Talaporfin (Obr. 8) je semisyntetický derivát chlorinu e6 (ten je možné získat z chlorofylu *a*). Spojením chlorinu e6 a kyseliny asparagové vzniká talaporfin, neboli mono-L-aspartyl chlorin e6 (Npe6, LS11, MACE, Laserphyrin<sup>®</sup>, Litx<sup>™</sup>) (Zimcik a Miletin 2009).



**Obrázek 8** Struktura talaporfinu

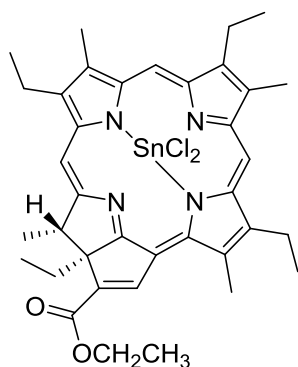
Ve formě tetrasodné soli je dobře rozpustný ve vodě, je tedy podáván i.v. v dávce 40 mg/m<sup>2</sup> (Zimcik a Miletin 2009). Talaporfin je aktivován při 664 nm a maximálního účinku je dosaženo při ozáření 2 – 4 hodiny po infuzi. Tento hydrofilní chlorin je vázán v plazmě a předpokládá se, že se jedná spíše o PS účinkující na cévy.

Eliminace probíhá žlučí, což se musí zohlednit u pacientů s onemocněním jater (Allison a Sibata 2010). Fotosenzitivita kůže je minimální a trvá obvykle 3 – 7 dní, vymizí zcela po 2 týdnech.

Talaporfin sodný, pod názvem Laserphyrin<sup>®</sup>, byl schválen v Japonsku pro léčbu časných stádií bronchopulmonárního karcinomu (Zimcik a Miletin 2009). Má také potenciál pro léčbu fibrosarkomu, rakoviny hlavy a krku, úst, hltanu a jater (Allison a Sibata 2010, Ormond a Freeman 2013).

### **Rostaporfin**

Dalším PS ze skupiny chlorinů je rostaporfin (Obr. 9), cínčitý etiopurpurin, SnEt<sub>2</sub>, Purlytin<sup>™</sup>, Photrex (Zimcik a Miletin 2009). Správněji je rostaporfin purpurinem (degradační produkt chlorofylu) (Josefsen a Boyle 2008). Centrálně má koordinovaný atom cínu, který podporuje posun absorpčního maxima na 660 nm (Allison a Sibata 2010). Tato sloučenina je hydrofobní a musí být podávána v kombinaci s emulgátorem (Zimcik a Miletin 2009). Dávka je obvykle 1,2 mg/kg a ozáření následuje po 24 hodinách od podání (Allison a kol. 2004, Zimcik a Miletin 2009). Kožní fotosenzitivita trvá asi 14 dní po infuzi (Allison a Sibata 2010).



**Obrázek 9** Struktura rostaporfinu

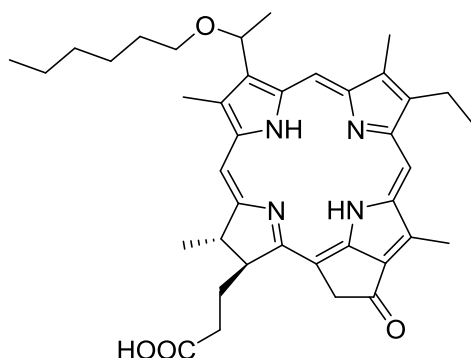
Rostaporfin byl klinicky hodnocen při léčbě metastatického prsního adenokarcinomu, bazálního buněčného karcinomu a Kaposiho sarkomu. Dokončil také třetí fázi klinického hodnocení u AMD, prozatím však nebyl schválen americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) díky požadavkům na další hodnocení účinnosti a bezpečnosti (Ormond a Freeman 2013).



### 6.4.5.3 FEOFORBIDY

#### 2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinyl pyrofeoforbid a (HPPH)

Tento chlorinový derivát, nazýván také Photochlor, se zdál nejslibnější z více než 400 fotosenzitizérů, u kterých byl zkoumán vztah struktury a aktivity (Allison a Sibata 2010).



**Obrázek 10** Struktura HPPH

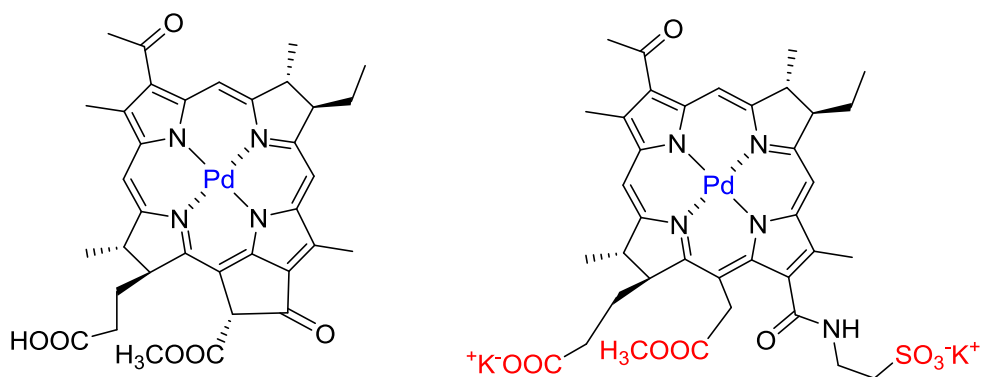
HPPH (Obr. 10) je extrémně hydrofobní sloučenina absorbující při 665 nm. Jeho nízká rozpustnost ve vodě vyžaduje přítomnost solubilizéru, možností je i podání suspenze nanokrystalů. Dávka se pohybuje v rozmezí 2 – 6 mg/m<sup>2</sup>. Díky vysoké hydrofobicitě je jeho farmakokinetika pomalá a může být detekován v plazmě dokonce i několik měsíců po infuzi. Navzdory tomuto pomalému vylučování, se však neobjevuje žádná nebo pouze minimální kožní fotosenzitivita (Zimcik a Miletin 2009).

HPPH je hodnocen v klinických studiích zabývajících se léčbou karcinomu plic, jícnu, hlavy a krku, dutiny ústní, hltanu, bazálního buněčného karcinomu a Barretova jícnu (Ormond a Freeman 2013, Zimcik a Miletin 2009).

### 6.4.5.4 BAKTERIOCHLORINY

#### Padoporfin/Padeliporfin

Oba tyto fotosenzitizéry jsou bakterioforbidové deriváty bakteriochlorofylu, bakteriálního ekvivalentu chlorofylu, obsahující v centrální dutině atom palladia. Padoporfin (WST09, Tookad<sup>®</sup>) je hydrofobní a vyžaduje nosič. Padeliporfin (WST11, Stakel<sup>®</sup>, Tookad<sup>®</sup> Soluble) je hydrofilní a jeho podání je tedy snazší (Obr. 11).



**Obrázek 11** Struktura padoporfinu (vlevo) a padeliporfinu (vpravo)

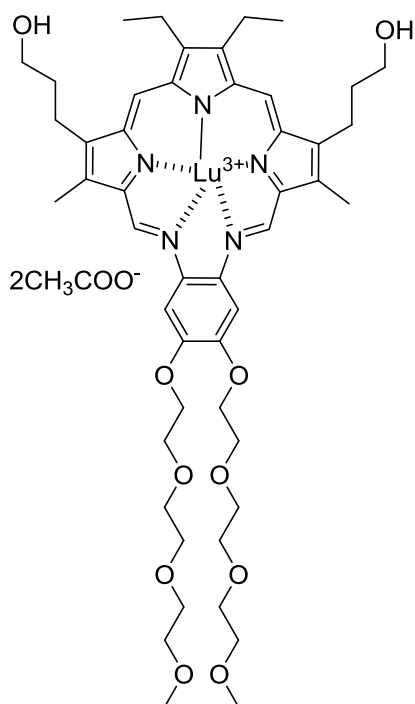
Oba se zdají být léčivými působícími na cévy, způsobují totiž uzavření cév po ozáření. Obě látky jsou rychle vylučovány, takže ozáření začíná krátce po infuzi. Fotosenzitivita je limitována na 3 hodiny, což je výhodné. Aktivace probíhá při 763 nm u WST09 a při 753 – 757 nm u WST11, což dovoluje hlubší průnik světla.

Tyto PS byly hodnoceny v souvislosti s karcinomem prostaty - WST09 v dávce 2 mg/kg (Lepor 2008) a WST11 v dávce 4 mg/kg podávané 10 minutovou infuzí s následným ozářením (Azzouzi a kol. 2013). Dosažené výsledky byly slibné, hlavně u WST11. Účinnost WST11 je zkoumána také v souvislosti s léčbou choroidální neovaskularizace účastníci se AMD (ClinicalTrials.gov - NCT01021956).

#### 6.4.5.5 TEXAPYRINY

##### Motexafin Lutetium

Motexafin lutetium (Lu-Tex, Optrin<sup>®</sup>, Antrin<sup>®</sup>, Lutrin<sup>®</sup>) (Obr. 12) je členem skupiny texapyrinů – syntetických barviv s jádrem obsahujícím 5 atomů dusíku. Díky přítomnosti polárních skupin na periferii, je Lu-Tex ve vodě rozpustný. Absorbuje při 732 nm. Dávka je přibližně 2 – 3 mg/kg, avšak optimální čas ozáření se liší v závislosti na cíli léčby. Například karcinom prostaty je ozařován 3 hodiny po injekci, zatímco ischemická choroba srdeční a karcinom prsu s 18 – 24 hodinovým odstupem. Léčivo je zadržováno v nádorových tkáních a nově vytvořených cévách. Dobře se váže na lipoproteiny, takže může být účinné proti aterosklerotickým plátům. Léčivo je rychle vylučováno z těla s poločasem 13 – 39 hodin (Zimcik a Miletin 2009).

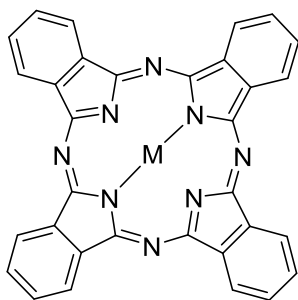


**Obrázek 12** Motexafin lutetium

Lutrin<sup>®</sup> je slibný pro léčbu lidského adenokarcinomu prostaty, byl také použit při léčbě recidivujícího karcinomu prsu a díky své absorpci při vyšších vlnových délkách dovoluje také léčbu melanomu. Lu-Tex pod značkou Optrin<sup>®</sup> je hodnocen v souvislosti s AMD. Jelikož se léčivo specificky lokalizuje také v aterosklerotických plátech, může být použito ve fotoangioplastice (novém terapeutickém přístupu k ateroskleróze). Zde se používá Lu-Tex pod označením Antrin<sup>®</sup> (Ormond a Freeman 2013, Zimcik a Miletin 2009).

#### 6.4.5.6 FTALOCYANINY

Struktura ftalocyaninů (Obr. 13) úzce souvisí s porfyriny (Moreira a kol. 2008). Ftalocyaniny mají však rozšířený konjugovaný systém – benzenový kruh připojený ke každé ze čtyř pyrolových podjednotek. Tyto benzenové kruhy působí zesílení absorpce chromoforu při vlnových délkách (670 – 780 nm) (Josefsen a Boyle 2012).



**Obrázek 13** Obecná struktura ftalocyaninu, kde M je centrální atom kovu (např. Zn, Al, Si, Mg)

Ftalocyaniny tvoří s řadou kovů koordinační komplexy poskytující intenzivně zbarvené modro-zelené sloučeniny (Josefsen a Boyle 2012). Z kovů se zdá být nejvýhodnější Zn, Al a Si (Allison a kol. 2004, Zimcik a Miletin 2009). Tyto látky mají příznivé fotofyzikální (kvantový výtěžek tripletového stavu a jeho životnost) a fotochemické vlastnosti (kvantový výtěžek singletového kyslíku). Povaha centrálního kovového kationtu významně ovlivňuje fotofyzikální vlastnosti Pc. Výtěžek singletového kyslíku je ovlivněn substituenty na periferii kruhu a axiálními ligandy připojenými k centrálnímu kovovému iontu (Allen a kol. 2001).

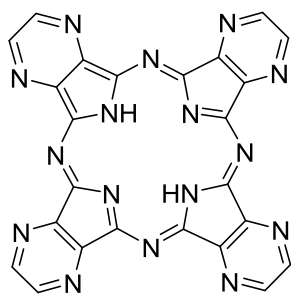
Ve vodných roztocích mají Pc tendenci agregovat nebo dimerizovat, což se děje v důsledku rozsáhlého systému  $\pi$ -vazeb (planární a lipofilní struktura) (Allen a kol. 2001, Moreira a kol. 2008, Zimcik a Miletin 2009). To značně ovlivňuje jejich spektroskopické, fotofyzikální a elektrochemické vlastnosti. Agregace redukuje životnost excitovaných stavů PS, a tudíž snižuje produkci singletového kyslíku a fluorescence (Moreira a kol. 2008, Zimcik a Miletin 2009). Vznik agregátů lze poznat díky charakteristickému posunu absorpčních pásů látky v UV-VIS spektru (Moreira a kol. 2008). Agregace může být potlačena např. zavedením objemných a/nebo nabitých substituentů na periferii makrocyklu (Zimcik a Miletin 2009).

Ftalocyaniny nacházejí použití v mnoha různých oborech od barviv, přes tiskárny, průmyslové katalyzátory, optické materiály (CD disky), fluorescenční sondy *in vitro* a *in vivo* a v neposlední řadě jako fotosenzitizéry v PDT (Allen a kol. 2001, Josefsen a Boyle 2012).

Navzdory velkému zájmu o tyto látky, existuje dosud jen několik málo klinických výsledků (Allison a kol. 2004). Jedním z Pc derivátů je hlinitý ftalocyanin tetrasulfonát (AlPcS<sub>4</sub>, Photosens), který má vlnovou délku maxima 676 nm.

Photosens byl s úspěchem použit v Rusku k léčbě nádorů žaludku, kůže, rtu, dutiny ústní a prsu. Způsobuje však kožní fototoxicitu trvající několik týdnů (Ormond a Freeman 2013, Zimcik a Miletin 2009).

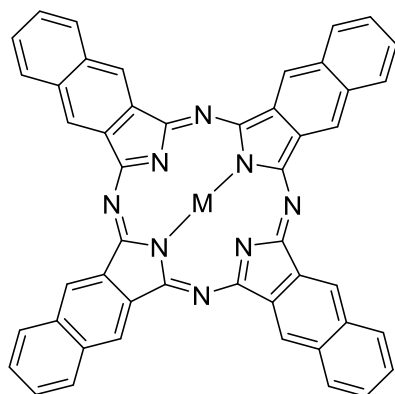
Křemičitý ftalocyanin (Pc4) absorbuje při 675 nm a dokončil první fázi klinického hodnocení pro léčbu aktinické keratózy, Bowenovy nemoci, rakoviny kůže a mycosis fungoides (Ormond a Freeman 2013).



**Obrázek 14** Obecná struktura tetrapyrazinoporfyrazinu, jednoho z možných azaftalocyaninů

Azaftalocyaniny (AzaPc) (Obr. 14) jsou aza-analogy ftalocyaninů ze skupiny tetrapyrazinoporfyrazinů s podobnými vlastnostmi (Zimcik a kol. 2010).

#### 6.4.5.7 NAFTALOCYANINY



**Obrázek 15** Obecná struktura naftalocyaninu, kde M je centrální atom kovu

Naftalocyaniny (Obr. 15) jsou deriváty ftalocyaninů rozšířené o další benzenové kruhy (Zimcik a Miletin 2009). Absorbují světlo ještě při vyšších vlnových délkách než ftalocyaniny (740 – 780 nm), což dále zvyšuje hloubku, do které mohou být použity. Jsou to tedy látky slibné pro PDT vysoce pigmentovaných nádorů, jako jsou melanomy, kde je velkým problémem prostupnost světla. Mají také potenciál jako zobrazovací

látky. Naftalocyaniny jsou však obecně méně stabilní než ftalocyaniny – rychle se rozkládají v přítomnosti světla a kyslíku (tedy hlavních složek PDT) (Josefsen a Boyle 2012), mají vyšší tendenci k agregaci a horší rozpustnost než ftalocyaniny. Relativně velká molekula může také limitovat jejich schopnost projít biologickými membránami (Zimcik a Miletin 2009).

Azaftalocyaninové makrocykly mohou být také rozšířeny o další benzenové kruhy za vzniku azanaftalocyaninů, které mají vlastnosti podobné naftalocyaninům (Zimcik a kol. 2010).

Existuje tedy celá řada různých druhů fotosenzitizérů s odlišnými vlastnostmi. Tabulka 1 shrnuje nejvýznamnější PS používané v PDT společně s jejich základními vlastnostmi a použitím.

**Tabulka 1** Fotosenzitizéry schválené pro PDT nebo hodnocené v klinických studiích (Ormond a Freeman 2013)

Strukturní skupina	Sloučenina	Obchodní název	$\lambda$ max (nm)	Použití
<b>PORFYRINY</b>	Porfimer sodný	Photofrin	632	Kanada (1993) - karcinom močového měchýře; USA (1995) - karcinom jícnu; USA (1998) - karcinom plic; USA (2003) - Barrettův jícen; Japonsko - karcinom děložního čípku; Evropa, Kanada, Japonsko, USA, Velká Británie – karcinom plic
	Kyselina 5-amino levulová (ALA)	Levulan	632	USA (1999) - aktinická keratóza
	Methylester ALA	Metvixia	-----	USA (2004) - aktinická keratóza
	Hexylester ALA	Cysview	-----	USA (2010) - diagnostika nádoru močového měchýře
<b>CHLORINY</b>	Verteoporfin	Visudyne	689	USA (1999) - AMD
	Temoporfin	Foscan	652	Evropa - nádory hlavy a krku
	Talaporfin	Laserphyrin, Litx	664	Japonsko (2003) - rakovina plic
	Rostaporfin	Purlytin	664	Klinické studie - karcinom prsu, bazální buněčný karcinom, Kaposiho sarkom, AMD
<b>FEOFORBIDY</b>	2-(1-hexyl oxyethyl)-2-devinyl pyrofeoforbid $\alpha$ (HPPH)	Photochlor	665	Klinické studie – karcinom jícnu, bazální buněčný karcinom, karcinom plic, Barrettův jícen
<b>BAKTERIO CHLORINY</b>	Padoporfin	Tookad	763	Klinické studie - karcinom prostaty
	Padeliporfin	Stakel, Tookad Soluble	753	Klinické studie - karcinom prostaty
<b>TEXAPYRINY</b>	Motexafin Lutetium	Lutrin, Optrin, Antrin	732	Klinické studie - karcinom prostaty, AMD, karcinom prsu, karcinom děložního čípku, ischemická choroba srdeční
<b>FTALOCYANI NY</b>	Hlinitý ftalocyanin tetrasulfonát (AlPcS4)	Photosens	676	Rusko (2001) – karcinom žaludku, kůže, rtu, dutiny ústní, jazyka, prsu
	Křemičitý ftalocyanin (Pc4)	-----	675	Klinické studie – aktinická keratóza, Bowenova nemoc, nádory kůže, mycosis fungoides

#### **6.4.6 Třetí generace fotosenzitizérů**

Nízká rozpustnost mnohých fotosenzitizérů první a druhé generace ve vodném prostředí (zejména při fyziologickém pH) brání i.v. podání přímo do krevního řečiště (Josefsen a Boyle 2012). Je tedy výhodné vyvinout biologicky kompatibilní přenašečové systémy, které zároveň zvyšují selektivitu vychytávání v cílové tkáni (Allen a kol. 2001, Josefsen a Boyle 2012, Moreira a kol. 2008). Klasickými přenašečovými systémy mohou být nanočástice, emulgátory (např. Cremophor EL), nebo na lipidech založené částice (liposomy) (Allen a kol. 2001). Molekulami, které mají afinitu k novotvarům, nebo receptorům exprimovaným určitými nádory, jsou monoklonální protilátky, fragmenty protilátek, peptidy, proteiny (jako transferrin, epidermální růstový faktor a insulin), lipoproteiny s nízkou hustotou (LDL), různé sacharidy, somatostatin, kyselina listová a mnoho dalších (Agostinis a kol. 2011).

Neoplastické buňky mají často zvýšený počet LDL receptorů na svém povrchu, protože zvýšená proliferace vyžaduje cholesterol pro syntézu membrán. Sérové lipoproteiny mohou inkorporovat hydrofobní senzitizery do své lipidové části. LDL je pak dopravují neoplastickým buňkám skrz mechanismus internalizace receptoru (Allen a kol. 2001).

Kumulace fotosenzitizéru v nádorové tkáni je přičítána také převaze propustných a zkroucených nádorových cév díky neovaskularizaci a absenci lymfatického odvodu (zadržování) (Agostinis a kol. 2011).

### **6.5 BIOLOGICKÁ ODPOVĚĚ NA PDT**

Byly popsány tři hlavní mechanismy, kterými PDT působí zničení nádorů.

1. Přímý letální účinek singletového kyslíku a dalších ROS na buňky.
2. Uzavření cév vedoucí ke snížení zásobení živinami a kyslíkem.
3. Aktivace imunitní odpovědi proti nádorovým buňkám aktivovaná PDT (Zimcik a Miletin 2009).



### **6.5.1 Přímý účinek a subcelulární lokalizace fotosenzitizéru**

Jelikož dosah toxických látek produkovaných PDT je limitován jejich krátkou životností, smrt buňky je důsledkem poškození subcelulárních struktur nacházejících se v bezprostřední blízkosti PS (Zimcik a Miletin 2009). V průběhu PDT mohou být napadeny všechny buněčné cíle – mitochondrie, lysozomy, endoplazmatické retikulum (ER), Golgiho aparát (GA), plazmatická membrána, i jádro (Josefsen a Boyle 2012, Moreira a kol. 2008). Fotosenzitizéry jsou však lokalizovány v buňkách převážně v lysozomech a v mitochondriích. Některé (temoporfin) i v ER nebo GA (Tab. 2). Plazmatická membrána není běžným cílem PDT a PS jsou v ní lokalizované obvykle pouze během prvních minut inkubace (Zimcik a Miletin 2009). Přesná subcelulární lokalizace PS spolu s dávkou řídí způsob buněčné smrti (Josefsen a Boyle 2012). Apoptóze nahrává, když je PS lokalizován v mitochondriích, ty jsou totiž považovány za nejdůležitější spouštěče apoptózy a jelikož jsou producentem adenosin trifosfátu (ATP), jejich poškození vede současně k narušení energetického metabolismu buňky (Zimcik a Miletin 2009).

**Tabulka 2** Subcelulární lokalizace vybraných fotosenzitizérů (Agostinis a kol. 2011, Castano a kol. 2004, Kessel 2006, Moreira a kol. 2008, Zimcik a Miletin 2009)

<b>Fotosenzitizér</b>	<b>Subcelulární lokalizace</b>
Porfimer sodný	membrány a membránové organely
ALA (resp. PPIX)	mitochondrie
Verteporfin	mitochondrie, ER
Temoporfin	mitochondrie, ER nebo GA
Talaporfin	lysozomy
Rostaporfin	lysozomy, ER
Motexafin lutetium	lysozomy
Pc4	široké spektrum, hlavně mitochondrie
AlPc	lysozomy, ER

Subcelulární lokalizace je řízena chemickým charakterem fotosenzitizéru, (molekulovou hmotností, lipofilitou, iontovým nábojem, vazbou na proteiny, popř. použitím přenašečového systému), ale i jeho koncentrací, inkubační dobou, koncentrací v séru a fenotypem cílových buněk (Castano a kol. 2004).

Hydrofobní fotosenzitizéry se dvěma a méně negativními náboji mohou difundovat skrz plazmatickou membránu a dále přes intracelulární membrány (Castano a kol. 2004, Zimcik a Miletin 2009). Tyto fotosenzitizéry mají také nejrychlejší příjem buňkami *in vitro*, převážně v relativně malých koncentracích v roztoku ( $< 1 \mu\text{M}$ ) (Castano a kol. 2004). Méně hydrofobní PS s více než dvěma zápornými náboji bývají příliš polární na to, aby difundovaly skrz membrány, a do buňky se dostávají endocytózou a nacházejí se v lysozomech (Castano a kol. 2004, Zimcik a Miletin 2009). Také bylo zjištěno, že sloučeniny s kationickým charakterem se nacházely spíše v mitochondriích, zatímco ty s anionickým charakterem v lysozomech. V lysozomech mají tendenci se kumulovat i fotosenzitizéry s vyšším stupněm agregace, což může být obecně důvodem nižšího účinku látek hromadících se v těchto organelách oproti fotosenzitizérům lokalizovaným v mitochondriích (Castano a kol. 2004).

### **6.5.2 Účinek na cévy**

Přežití nádoru záleží na zásobování kyslíkem a živinami. Poškození cévního zásobení tedy silně přispívá ke konečné kontrole nádoru a destrukce těchto zásobních cest vede k místní hypoxii, anoxii a nedostatku živin. Základní mechanismus účinku záleží na použitém PS. Porfimer sodný a hydrofobní Pc způsobují konstriktci cév, u talaporfinu bylo pozorováno utváření trombu a disulfonované Pc způsobovaly pouze zvýšenou permeabilitu cév.

Nejvyšší efekt PDT na cévy se objevuje obvykle tehdy, když je aktivace prováděna krátce po i.v. podání fotosenzitizéru (přímý efekt je důležitější při delším intervalu mezi podáním a ozáření). Zaměření PDT na cévy (VTP) může mít vyšší účinnost nebo dokonce vyšší selektivitu než přímý efekt a proto je tento režim v současnosti používán klinicky pro léčbu AMD a experimentálně pro destrukci nádoru. Tento mechanismus může být primární u léčiv s nízkou selektivitou k nádorovým buňkám nebo u těch s rychlou clearance (Zimcik a Miletin 2009).

### **6.5.3 Aktivace imunitní odpovědi**

Aktivace imunitní odpovědi po PDT není primárním mechanismem vedoucím ke smrti buněk, ale může pomoci v dlouhodobé kontrole nádoru (Zimcik a Miletin 2009).

PDT často v místě působení vyvolává silnou akutní zánětlivou reakci pozorovatelnou jako otok. Důvodem této reakce je poškození nádorové tkáně vnímané organismem jako akutní trauma, které vyvolává spuštění ochranných mechanismů. Hlavním úkolem je pak napravení narušené homeostázy, odstranění poškozených buněk a hojení tkáně s obnovením její normální funkce (Agostinis a kol. 2011).

Mechanismus aktivace zahrnuje uvolnění cytokinů (zánětlivých a chemotaktických signálů z léčené tkáně) následované invazí neutrofilů, žírných buněk, monocytů a makrofágů (Zimcik a Miletin 2009). Tomu napomáhají i změny v cévách, které se stávají propustné pro krevní proteiny a proadhezivní pro buňky zánětu. Umírající nádorové buňky a jejich zbytky jsou fagocytovány fagocytujícími buňkami včetně dendritických buněk, které migrují do místních lymfatických uzlin a mění se v profesionální antigen prezentující buňky. Toto je následováno zvýšením množství klonů lymfocytů senzitivovaných nádorem, které pak odstraní zbývající nádorové buňky nacházející se například i v ložiscích metastáz (Agostinis a kol. 2011).

Některé zdroje tvrdí, že zánětlivá odpověď a nekrotická smrt buňky po ozáření je důležitá v imunostimulační funkci PDT, zatímco další připomínají, že PS, které indukují více apoptózu a méně zánět jsou vhodnější pro aplikace, kde je otok nežádoucí, jako například u nádorů mozku (Agostinis a kol. 2011).

Zvýšit míru této imunitní odpovědi by mohlo i podání imunostimulancií před léčbou PDT. Vyvinutí nádorově specifické odpovědi by mohlo být využito i při vývoji vakcín využívajících lyzáty z nádorových buněk ovlivněných PDT *in vitro* (Agostinis a kol. 2011, Zimcik a Miletin 2009).

## **6.6 NÁDORY A ABNORMÁLNÍ ANGIOGENEZE**

Nádorová onemocnění jsou druhou nejčastější příčinou úmrtí v České republice (Český statistický úřad). Na jejich vzniku má podíl velké množství faktorů např. chemické látky zevního prostředí (polycyklické aromatické uhlovodíky, aflatoxin,

cigaretový kouř), fyzikální vlivy (především záření), viry (např. papilomaviry), hormony (zvýšená hladina estrogenů), genetické vlivy a dietetické zvyklosti (druh potravy, způsob přípravy a konzumace) (Mačák a Mačáková 2004). Zvyšující se výskyt zhoubných novotvarů je však dáván do souvislosti i se stárnutím populace. Zatímco obecně počet onemocnění roste (zhoršující se životní prostředí, zlepšená diagnóza), počet úmrtí se výrazně nemění, a to díky pokrokům v medicíně (Český statistický úřad).

Výše zmíněné faktory vyvolávají vždy změny v genomu buňky, které mohou vést až ke vzniku onkogenů a nádorové transformaci normální buňky. Nádorové bujení má tedy (až na výjimky) původ v buňkách těla vlastních (Mačák a Mačáková 2004) a je charakterizováno selháním kontroly růstu, invazí do okolní tkáně, ztrátou tzv. kontaktní inhibice a metastazováním do vzdálených orgánů (Ledvina a kol. 2005).

### **6.6.1 Angiogeneze**

Angiogeneze, neboli vývoj nových kapilárních cév (Aranda a Owen 2009), je vícestupňový proces, ve kterém jsou nové cévy utvářeny z již existujících cév. Tento proces je regulován rovnováhou mezi pro- a antiangiogenními molekulami (Tab. 3). Vývoj kompletně nových cév v embryu označujeme pojmem vaskulogeneze (Carmeliet a Jain 2000, Yadav a kol. 2015). Patologická angiogeneze je známkou nádorových, různých ischemických a zánětlivých onemocnění (Carmeliet a Jain 2000, Chen a kol. 2006).

#### **6.6.1.1 PŘÍČINY A MECHANISMY ANGIOGENEZE**

Savčí buňky potřebují ke svému životu kyslík a živiny, nachází se proto v okruhu 100-200  $\mu\text{m}$  od krevních cév, což je difuzní limit pro kyslík. K růstu nad tuto vzdálenost musí mnohobuněčný organismus vytvořit nové krevní cévy. Bez krevních cév nemohou ani nádory růst a metastazovat do dalších orgánů. Podobně bez účinného cévního zásobení nemůžeme být schopni dopravit protinádorové léčivo do všech oblastí nádoru v účinném množství (Carmeliet a Jain 2000).

Nádorové cévy rostou různými mechanismy:

1) stávající cévní síť se rozšiřuje vznikem endotelových výrůstků (pučením) nebo přemostěním (angiogeneze)

2) nádorové cévy se přetvářejí a rozšiřují vsunutím sloupců mezibuněčné hmoty do lumen existujících cév (intususcepce – vchlípení)

3) prekuzory endotelových buněk z kostní dřeně nebo periferní krve směřují do nádorů a pomáhají utvářet endoteliální výstelku nádorových cév (vaskulogeneze)

Nádorové buňky však mohou růst i kolem stávajících cév a vytvářet kolem nich „manžetu“ (Carmeliet a Jain 2000).

Byla objevena řada signálů spouštějících angiogenezi. Mezi ně patří metabolický stres (např. nedostatek O<sub>2</sub>, nízké pH nebo hypoglykémie), mechanický stres (např. tlak generovaný proliferujícími buňkami), imunitní/zánětlivá odpověď, genetické mutace (např. aktivace onkogenů nebo delece tumor supresorových genů, které kontrolují produkci regulátorů angiogeneze). Pro- a antiangiogenní molekuly mohou být vylučovány z nádorových, endotelových a podpůrných vazivových buněk, krve a extracelulární matrix (Carmeliet a Jain 2000).

#### **6.6.1.2 PRŮBĚH ANGIOGENEZE**

Rozhodující úlohu v cévním růstu hrají členové rodiny vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGF) a angiopoetinu (Ang) (Carmeliet a Jain 2000). Když se v nádorových buňkách objeví stres způsobený hypoxií, aktivuje se transkripce HIF-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ), který zvyšuje expresi VEGF (Lee a kol. 2015). V odpovědi na VEGF cévy na počátku dilatují a stávají se propustnými. Naopak Ang1 a spojovací molekuly VE-cadherin a PECAM (platelet-endothelial cell-adhesion molecule) cévy zužují a jejich účinek musí být během angiogeneze překonán (Carmeliet a Jain 2000).

Vyloučený VEGF se váže na své receptory na povrchu endotelových buněk a zvyšuje expresi matrixové metaloproteinázy (MMP) v nádorových buňkách (Lee a kol. 2015). Ang2 a proteinázy zprostředkovávají rozpuštění dosavadní bazální membrány a mezibuněčné hmoty (Carmeliet a Jain 2000). Výsledkem je zvýšená nádorová angiogeneze vedoucí k růstu, proliferaci a migraci endotelových buněk (Lee a kol. 2015). Dozrávání nově vzniklých cév zahrnuje vznik nové bazální membrány a obklopení nových cév pericyty (Carmeliet a Jain 2000), Eichhorn a kol. 2004).

**Tabulka 3** Látky ovlivňující angiogenezi (Carmeliet a Jain 2000, Yadav a kol. 2015)

<b>Pozitivní regulátory angiogeneze</b>	<b>Funkce</b>
Vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF)	silný induktor angiogeneze, stimuluje růst a proliferaci endotelových buněk a chrání je před apoptózou, reguluje propustnost cév
Růstový faktor z destiček (PDGF)	účastní se dozrávání cév a rekrutuje hladké svalové buňky (pericyty)
Fibroblastový růstový faktor (FGF)	posilují buněčnou proliferaci, migraci a diferenciaci endotelových buněk
Epidermální růstový faktor (EGF)	působí jako nepřímý regulátor angiogeneze aktivací svých receptorů
Transformující růstový faktor beta (TGF $\beta$ )	v nízkých koncentracích podporuje angiogenezi, ve vysokých koncentracích inhibuje růst endotelových buněk
Matrixové metaloproteinázy (MMP)	degragují extracelulární matrix a uvolňují v ní obsažené angiogenní mitogeny
Tumor nekrotizující faktor (TNF)	cytokin uvolňovaný makrofágy, žírnými buňkami a T-lymfocyty, aktivuje makrofágy k sekreci angiogenních faktorů
Angiopoetiny (Ang)	mohou působit jak proangiogenně, tak i antiangiogenně
<b>Inhibitory angiogeneze</b>	<b>Funkce</b>
Interferony	snižují expresi FGF, navozují apoptózu endotelových buněk
Interleukiny (IL)	IL 1 indukuje angiogenezi, IL 12 potlačuje expresi VEGF mRNA, inhibuje proliferaci
Tkáňové inhibitory matrixových metaloproteináz (TIMP)	inhibují rozklad okolní hmoty metaloproteinázami
Angiostatin	snižuje expresi VEGF v nádorech, proliferaci a migraci endotelových buněk
Endostatin	inhibuje vazbu VEGF na endotelové buňky, váže se na jeho receptory a blokuje signalizaci způsobenou vazbou VEGF

Vzniklé nádorové cévy jsou však svou strukturou i funkcí abnormální. V porovnání s normálními cévami jsou vysoce dezorganizované, zkroucené, rozšířené s nestejným průměrem, nadměrným větvením a odklony, mohou postrádat funkční pojivové buňky, mají mnoho otvorů, rozšířené mezibuněčné spojení a nespojitou nebo nepřítomnou bazální membránu (Carmeliet a Jain 2000, Eichhorn a kol. 2004, Chen a kol. 2006, Kamarulzaman a kol. 2011). Navíc endotelové buňky jsou abnormálního tvaru, rostoucí na svých vrcholcích a vyčnívající do lumen cévy. Tyto defekty způsobují propustnost nádorových cév. Průtok krve nádorem je pak chaotický a proměnlivý, vede k hypoxii a oblastem s kyselým pH. Tyto podmínky snižují terapeutickou účinnost, upravují produkci angiogenních regulátorů a vybírají nádorové buňky, které jsou více maligní a metastatické (Carmeliet a Jain 2000).

Zánět a hypoxie přispívají angiogenezi i u nemaligních onemocnění (v ranách nebo aterosklerotických plátech). Buňky zánětu (monocyty, makrofágy, žírné buňky, leukocyty) uvolňují nespočet angiogenních faktorů jako jsou VEGF, Ang1, FGF, TGF- $\beta$ 1, PDGF, TNF- $\alpha$  a inzulinu podobný růstový faktor-1. Hypoxií řízená angiogeneze zase zachraňuje ischemický myokard a prodlužuje přežívání pacientů po mrtvici. Může však způsobit i slepotu u předčasně narozených dětí a diabetických pacientů nebo hemoragickou rupturu aterosklerotických plátů (Carmeliet a Jain 2000).

Antiangienní léčba může být tedy užitečná u nádorových onemocnění, zánětlivých poruch, diabetické retinopatie, AMD, lupénky, kardiovaskulárních a autoimunitních chorob. Naopak proangienní terapie by mohla pomoci při léčbě ischemické choroby srdeční, cévní mozkové příhody a k rychlejšímu hojení ran (Aranda a Owen 2009).

## **6.7 TYPY BUNĚČNÉ SMRTI**

PDT může vyvolat tři základní typy buněčné smrti – apoptózu, nekrózu a smrt buňky spojenou s autofagií (Agostinis a kol. 2011, Buytaert a kol. 2007, Mroz a kol. 2011). Tyto tři procesy hrají klíčovou roli v normálním vývoji organismu, tkáňové homeostáze a v eliminování abnormálních a poškozených buněk (Buytaert a kol. 2007). Apoptóza bývá vnímána jako hlavní typ buněčné smrti v odpovědi na PDT (Agostinis a kol. 2011).

Odpověď buněk na poškození záleží obecně na několika faktorech, které mohou být rozděleny na vnější a vnitřní. Mezi nejdůležitější vnější faktory u PDT patří parametry léčby (typ a použitá koncentrace PS, inkubační doba a také parametry ozáření). Vysoké koncentrace PS a dlouhá doba inkubace mohou vést k vysoké intracelulární koncentraci PS, což pak vede k závažnějšímu poškození buňky po ozáření. Zatímco buněčný metabolický stav stejně jako fáze buněčného cyklu může být řazena mezi hlavní vnitřní parametry ovlivňující citlivost buněk k fotodynamické léčbě (Plaetzer a kol. 2003).

To, které subcelulární cíle jsou v průběhu PDT poškozeny, silně ovlivní kinetiku a aktivované regulační cesty, stejně jako způsob buněčné smrti (Moreira a kol. 2008). Obecně PS akumulující se v mitochondriích nebo ER vyvolává apoptózu, zatímco PS

hromadící se v lysozomech či plazmatické membráně způsobují spíše nekrózu. Autofagie se může objevit ve snaze opravit a z hlediska buňky přežít poškození klíčových organel, může se však změnit i na signál k buněčné smrti (Buytaert a kol. 2007).

### **6.7.1 Apoptóza**

Apoptóza je programovanou buněčnou smrtí (sebevražednou cestou buňky) sloužící k eliminaci nepotřebných nebo potenciálně škodlivých buněk a k přizpůsobení tkáně na různou úroveň zatížení (Moreira a kol. 2008, Silbernagl a Lang 2001). Jedná se o komplexní, víceúrovňový a více cestami zprostředkovaný způsob buněčné smrti geneticky zakódovaný v každé buňce těla (Mroz a kol. 2011). Apoptóza je v porovnání s nekrózou, aktivní, energii vyžadující proces. energii ve formě ATP nebo jejích ekvivalentů vyžaduje vznik apoptozomu, import proapoptotických proteinů do jádra, kondenzace chromatinu a utváření apoptotických tělísek, stejně jako morfologické změny buňky (Plaetzer a kol. 2003).

Apoptóza může být spuštěna aktivací receptorů smrti na povrchu buňky (vnější cestou) nebo uvolněním cytochromu c z mitochondrií (vnitřní cestou). Obojí vede k aktivaci kaskády kaspáz známých jako efektorové kaspázy (kaspáza-3, -6 a -7). Aktivované efektorové kaspázy štěpí buněčné substráty, což vede k charakteristickým biochemickým a morfologickým změnám pozorovaným v umírajících buňkách (Mroz a kol. 2011).

Při cytotoxickém poranění apoptóze účinně zabraňují antiapoptotické proteiny rodiny Bcl-2. Ty pomáhají udržovat integritu mitochondriálních a některých dalších membrán, čímž mohou předcházet uvolnění cytochromu c a následné aktivaci kaspázy-9 (Mroz a kol. 2011).

#### **6.7.1.1 VNITŘNÍ CESTA APOPTÓZY**

Mitochondrie jsou hlavními organelami účastnicími se apoptotické kaskády, soustředí se v nich totiž různé apoptotické signály (zvenčí i zevnitř buňky). V reakci na ně pak může docházet k otevření pórů ve vnitřní a/nebo vnější mitochondriální membráně a uvolnění cytochromu c z mezimembránového prostoru do cytosolu (Mroz



a kol. 2011, Plaetzer a kol. 2003). Tam poté dochází k tvorbě apoptosomu – heptamerického komplexu složeného z cytochromu c, Apaf-1 (apoptotic-protease activating factor-1), prokaspázy-9 a ATP nebo dATP. Apoptozom štěpí prokaspázu-9 na kaspázu-9 (iniciátorová kaspáza) (Buytaert a kol. 2007, Moreira a kol. 2008, Mroz a kol. 2011, Plaetzer a kol. 2003). Kaspázy (cysteinylní **aspartic acid-proteases** = caspases) jsou smrtící proteázy katalyzující hydrolytické reakce během apoptózy. Nacházejí se ve formě proenzymů ve všech buňkách, a mohou být aktivovány autokatalýzou nebo štěpením dalšími kaspázami (Buytaert a kol. 2007, Moreira a kol. 2008, Plaetzer a kol. 2003).

Kaspáza-9 dále aktivuje efektorové kaspázy-3 a -7 (Buytaert a kol. 2007, Moreira a kol. 2008, Mroz a kol. 2011, Plaetzer a kol. 2003). Aktivace efektorových kaspáz vede v morfologickým a biochemickým změnám typickým pro apoptotickou smrt buňky. Těmito charakteristickými znaky apoptózy jsou smrštění buňky, blebbing (neboli vytváření hlubokých zářezů) plazmatické membrány, kondenzace jaderného chromatinu, fragmentace DNA a rozdělení buňky do apoptotických tělísek bez porušení plazmatické membrány. K fragmentaci DNA dochází díky uvolnění apoptosis-inducing factor (AIF) z mitochondrií a jeho přemístění do jádra (Buytaert a kol. 2007, Moreira a kol. 2008, Plaetzer a kol. 2003). Při apoptóze dochází také k vystavení fosfatidylserinu na vnější stranu plazmatické membrány a nakonec k fagocytóze sousedními buňkami (Buytaert a kol. 2007).

#### **6.7.1.2 VNĚJŠÍ CESTA APOPTÓZY**

Vnější cesta apoptózy začíná navázáním ligandů rodiny tumor nekrotizujících faktorů (FasL, TnF- $\alpha$ , TRAIL) na jejich specifické receptory (Fas, TNF-RI, TRAIL) na plazmatické membráně (Buytaert a kol. 2007, Moreira a kol. 2008, Plaetzer a kol. 2003). Tyto receptory jsou označovány jako receptory smrti a fungují jako transmembránové přenašeče signálu. Navázání ligandů způsobí aktivaci iniciátorové prokaspázy-8 a -10 (Buytaert a kol. 2007). Kaspáza-8 následně aktivuje hlavní efektorové kaspázy-3 a -7 a štěpí Bid (cytosolický proapoptotický člen rodiny Bcl-2 proteinů). Ten pak interaguje s dalšími členy této rodiny (Bax a Bak), vytváří komplex s mitochondriálním porinem a dochází k uvolnění cytochromu c, čímž se vnitřní i vnější cesta sbíhají (Buytaert a kol. 2007, Plaetzer a kol. 2003).

Celý proces apoptózy tedy zabraňuje nekontrolovanému vylití nitrobuněčného materiálu do prostředí buňky, a proto brání poškození sousedních buněk a zánětu tkáně (Kessel 2006, Moreira a kol. 2008, Plaetzer a kol. 2003).

### **6.7.1.3 PDT A APOPTÓZA**

Předpokládá se, že PDT s PS kumulujícími se převážně v mitochondriích (např. Pc4, rostaporfin nebo temoporfin), vyvolává poškození Bcl-2 a souvisejících antiapoptotických proteinů a aktivuje proapoptotické členy této rodiny (Bax a BH3-only proteiny). Tím dojde ke zvýšení poměru Bax/Bcl-2, utvoření proteinových kanálů skrz vnější membránu mitochondrií a uvolnění cytochromu c (Allen a kol. 2001, Moreira a kol. 2008, Mroz a kol. 2011).

Roli při vytvoření pórů hraje ROS způsobená oxidace SH-skupin proteinů, peroxidace a oxidace lipidů, vazba  $\text{Ca}^{2+}$  iontů (Plaetzer a kol. 2003). PDT je doprovázeno zvýšením intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ . Ten je uvolněn ze zásob v ER, mitochondriích nebo pochází zvenčí buňky. Zvýšení  $\text{Ca}^{2+}$  může vést ke spuštění apoptózy otevřením mitochondriálních pórů (Moreira a kol. 2008, Plaetzer a kol. 2003).

Hydrofilní PS se nalézají převážně v lysozomech a mohou proto navozovat apoptózu několika cestami. Mohou způsobit uvolnění kathepsinů (lysozomálních proteolytických enzymů) z poškozených lysozomů do cytoplazmy. V cytosolu kathepsiny mohou přímo aktivovat kaspázy nebo štěpit proapoptotický protein Bid a podporovat cestu zprostředkovanou tBid vedoucí k otevření mitochondriálních pórů a uvolnění cytochromu c. následované spuštěním apoptózy (Kessel 2006, Moreira a kol. 2008, Plaetzer a kol. 2003). Takto působí například talaporfin.

PDT spouští i uvolnění cytokinů z rodiny TNF, které se váží na své receptory smrti na povrchu buňky a aktivují iniciátorovou kaspázu-8 (Moreira a kol. 2008).

### **6.7.2 Nekróza**

Nekróza je obecně popisována jako neprogramovaná forma buněčné smrti. Jedná se o méně uspořádaný proces než apoptóza. Je obvykle reakcí na škodlivé činitele fyzikální (např. extrémní teplota, tlak, osmolarita, pH), chemické (toxické látky), infekce, fyzické zranění, ischemii či nadměrnou akumulaci ROS. Na rozdíl od apoptózy

je přítomná místní zánětlivá odpověď jako důsledek uvolnění buněčné debris do okolní tkáně (Josefsen a Boyle 2008, Plaetzer a kol. 2003).

Nekrotická smrt buňky je charakterizována zmenšením jádra a zhuštěním chromatinu (pyknóza), rozpadnutím jádra na drobné fragmenty (karyorexe) a jeho rozpuštěním (karyolýza) (Mačák a Mačáková 2004), dále otokem buňky a organel vedoucím k prasknutí buněčné membrány a lýze buňky, což vede k uvolnění intracelulárního obsahu do mezibuněčného prostoru a indukci zánětu (Moreira a kol. 2008, Mroz a kol. 2011).

### **6.7.2.1 PDT A NEKRÓZA**

Nekróza se může objevit v buňkách při vysoké dávce světla a koncentraci PS. Lipofilní a anionické fotosenzitizéry lokalizované v membránách způsobují peroxidaci membránového cholesterolu a dalších nenasycených fosfolipidů. To vede ke změnám v membránové permeabilitě, ztrátě pružnosti, zesíťování aminolipidů a polypeptidů, inaktivaci enzymových systémů a receptorů spojených s membránou. Peroxidace lipidů a proteinů v membráně způsobí ztrátu integrity membrány a iontové rovnováhy a může být vysvětlením pro vyvolání nekrózy (Plaetzer a kol. 2003). Je však také možné, že vysoké dávky PDT inaktivují klíčové enzymy a další komponenty apoptotické kaskády a tím vedou k nekróze (Mroz a kol. 2011).

### **6.7.3 Autofagie**

Autofagie je katabolický buněčný mechanismus, který dovoluje buňce udržet rovnováhu mezi syntézou, degradací a recyklací buněčných produktů. Autofagie je adaptivní, energii vytvářející proces zahrnující lysozomální degradaci buněčných organel a proteinů. Struktura s dvojitou membránou nazývaná autofagozom vzniká obklopením a uzavřením části cytosolu s buněčnými organelami do svého nitra. Tento vezikul pak fúzuje s lysozomem za vytvoření struktury nazývané autofagolysozom, jejíž obsah je následně degradován lysozomálními hydrolázami. Vedle usnadňování likvidace nežádoucích proteinů, organel a napadajících mikroorganismů, autofagie také dovoluje buňce přemístit své živiny z nepotřebných procesů na životně důležité v čase hladovění nebo stresu (Kessel 2006, Mroz a kol. 2011).

### **6.7.3.1 PDT A AUTOFAGIE**

Autofagie může být stimulována různými stresovými signály zahrnujícími oxidační stres. Tento proces může mít obojí výsledek – ochranu buňky i přispění k její smrti (Agostinis a kol. 2011, Mroz a kol. 2011). Nedávné studie vykreslují autofagii jako mechanismus ochrany životaschopnosti buněk po fotodynamickém poškození. Když jsou však PDT zasaženy lysozomy, není možno tento proces úspěšně dokončit a buňka směřuje ke smrti (Agostinis a kol. 2011). To, že PDT přímo spouští autofagii bylo potvrzeno studii s různými nádorovými liniemi a PS. Autofagie byla pozorována u PS, lokalizovaných v ER, mitochondriích, lysozomech a endosomech (Mroz a kol. 2011).

### **6.7.4 Vliv způsobu buněčné smrti po PDT na imunitní odpověď**

Způsob buněčné smrti navozený PDT má důležitý vliv i na poléčebnou imunitní odpověď, která může zvýšit protinádorovou účinnost léčby. Optimální se zdá kombinace obou typů buněčné smrti. Fagocytóza apoptotických buněk dopraví antigeny pro prezentaci dendritickými buňkami a nekrotické buňky zase poskytují signál nebezpečí klíčový pro aktivaci imunity (Plaetzer a kol. 2003).

## **6.8 FOTODYNAMICKÁ TERAPIE ZAMĚŘENÁ NA CÉVY (VTP)**

### **6.8.1 Obecný úvod**

Kyslík má v tkáni jen omezenou schopnost difuze, proto nádory nemohou růst více než 1 mm<sup>3</sup> bez vývoje cévní sítě (Eichhorn a kol. 2004, Kamarulzaman a kol. 2011). Zároveň s růstem nádorové masy roste i její potřeba živin a kyslíku. Stejně tak stoupá i nutnost odstraňování odpadů metabolismu a úměrně tomu se zvyšuje i počet a velikost krevních cév (Chen a kol. 2006, Kamarulzaman a kol. 2011, Wang a kol. 2013). Cévy, které zásobují nádory, však vykazují strukturní a funkční vlastnosti odlišující se od normálních cév (viz kapitola 6.6.1.2.) (Kamarulzaman a kol. 2011).

Zaměření terapie na nádorové cévy se pak jeví jako logický krok. Může být rozdělena do dvou kategorií. Antiangiogenní léčba inhibuje vývoj nových krevních cév (cytostatický efekt). Naopak terapie zaměřená na cévy je spojena s poškozením

stávajících nádorových cév (cytotoxický efekt) (Abels 2004, Eichhorn a kol. 2004, Chen a kol. 2006, Kamarulzaman a kol. 2011).

### **6.8.2 Výhody fotodynamické terapie zaměřené na cévy**

Terapie zaměřená na cévy má oproti terapiím zaměřeným na nádorové buňky několik výhod. Těmi jsou především:

- snazší dostupnost cílového místa pro i.v. podané léčivo
- efektivnější zničení nádorových buněk, jelikož každá kapilára zásobuje tisíce nádorových buněk
- možnost použití u různých typů nádorů, protože většina nádorů má podobné typy cév s podobnými markery
- menší šance vyvinutí rezistence, protože endotelové buňky jsou geneticky stabilní (Eichhorn a kol. 2004, Chen a kol. 2006, Kamarulzaman a kol. 2011, Thorpe a Derbyshire 1997)

### **6.8.3 Průběh VTP**

Nejen nádorové buňky, ale i nádorová mikrocirkulace je tedy cílem PDT, resp. VTP (Qiu a kol. 2011). VTP je typem PDT vzniklé např. zmenšením časového intervalu mezi podáním PS a ozářením místa nádoru nebo vývojem PS lokalizovaných primárně v cévním kompartmentu (Kamarulzaman a kol. 2011).

O tom, jestli PDT zasáhneme cévy nádoru či vlastní nádorovou tkáň rozhodují vlastnosti PS (farmakokinetika; příp. strukturní obměny) a také interval mezi podáním PS a ozářením tkáně (drug-light interval, D-L interval). Využijeme-li krátký D-L interval, zaměřujeme léčbu spíše na cévní zásobení nádoru, protože PS se nachází uvnitř cév. Pokud má PS delší poločas, pak delší D-L interval umožní PS dostat se do buněk nádoru a zničit je přímo (Chen a kol. 2005, Chen a kol. 2006). Pro většinu exogenně podaných PS platí, že nejvyšší koncentrace v plazmě je dosažena okamžitě po i.v. podání (Chen a kol. 2006).

Na rozdíl od klasické PDT, nádorové buňky nejsou primárním cílem pro VTP, ale jsou poškozeny nedostatkem kyslíku a živin způsobeným léčbou (Preise a kol. 2009).

Cévní účinky PDT vedou k poranění endotelu, změnám mikrocirkulace, vazokonstrikci, utvoření trombu a ke stáze krve (Qiu a kol. 2011). V důsledku toho může dojít k embolizaci, krvácení, trombóze nebo kolapsu cévy vedoucímu k ischemii a následné nekróze nádorové tkáně (Abels 2004).

Změny cévního zásobení s sebou nesou pozitivní i negativní účinky. Na jednu stranu, narušení cévního systému může vést k hypoxii, nedostatku živin, hladovění a smrti nádorových buněk. Na druhou stranu, buňky pod hypoxickými podmínkami mohou stimulovat VEGF signalizaci a spouštět angiogenezi (Wang a kol. 2013).

PDT s různými D-L intervaly může být také kombinována ke zvýšení nádorové odpovědi. Touto kombinací dojde k zaměření účinku jak na nádorové buňky, tak i na cévní zásobení nádoru. Posloupnost podání PS a světla může ovlivnit účinek kombinační léčby. Například při použití verteporfinu byl D-L interval 3 hodiny následován druhým podáním a ozářením s D-L intervalem 15 minut, což vedlo k vyššímu protinádorovému účinku. Přitom byla pozorována změna lokalizace verteporfinu z přednostně cévní 15 min po injekci, až k prostoupení celou nádorovou tkání 3 hodiny po injekci. Výsledky potvrdily, že tato kombinovaná léčba vedla k poškození cév i buněk nádoru a celkově k vyšší účinnosti léčby (Chen a kol. 2005).

#### **6.8.4 Fotosenzitizéry pro VTP**

Jak již bylo zmíněno výše, obecně je přítomnost PS omezena na nádorové cévy krátce po jeho i.v. podání a PDT s použitím krátkého D-L intervalu tedy poškozuje převážně cévy. Tento mechanismus je hlavně zodpovědný za některé z úspěšných klinických použití PDT v současnosti - léčbu AMD verteporfinem a nádorů prostaty padeporfinem a padeliporfinem (Chen a kol. 2005).

Také Photofrin<sup>®</sup> cirkuluje převážně v cévním systému po počáteční infuzi, takže ozáření krátce po injekci je výhodnější pro uzavření cév. Talaporfin sodný (chlorinový derivát) a padoporfin /padeliporfin (bakterioforbidové deriváty bakteriochlorofylu) jsou látky účinkující na cévy a způsobující jejich rychlé uzavření po ozáření. Verteporfin je

dalším typem léčiva působícího na cévy. Je vhodný pro léčbu lézí s vysokým obsahem nově vytvořených cév (Wang a kol. 2013). Verteporfin (Visudyne<sup>®</sup>) je jediným PS schváleným celosvětově pro léčbu AMD (Chen a kol. 2006). Neovaskulární forma této nemoci je charakterizována růstem abnormálních krevních cév v cévnatce oka pod žlutou skvrnou, ústící ve ztrátu zraku (Brown a kol. 2006).

Díky úspěchu verteporfinu při léčbě AMD byly v klinických studiích hodnoceny i další fotosenzitizéry jako rostaporfin (Purlytin<sup>TM</sup>) a motexafin lutetium (Optrin<sup>®</sup>) (Chen a kol. 2006).

### **6.8.5 VTP v léčbě nádorů**

Jelikož AMD a rakovina sdílí téměř stejné cévní abnormality, VTP, která byla úspěšná u AMD, by měla hrát roli i v léčbě rakoviny, pro niž byla PDT původně vyvíjena. Bylo potvrzeno, že VTP může být použita pro určité typy protinádorové léčby, a že může být účinnější v kontrole nádoru než tradiční PDT cílená na maligní buňky při použití stejného PS a dávky světla, ale delšího intervalu mezi podáním léčiva a ozářením (Chen a kol. 2006).

Dalším PS využívaným pro metodu VTP je padoporfin (WST09, Tookad<sup>®</sup>) – paladium bakteriofeoforbid syntetizovaný z přírodního bakteriochlorofylu, molekuly produkované za aerobních podmínek ve tmě rostoucími bakteriemi (Chen a kol. 2006, Lepor 2008). Tookad<sup>®</sup> není ve vodě rozpustný a vyžaduje přenašečový systém na bázi Cremophoru, aby bylo možné podat jej intravenózně. Plazmatický poločas je pouze 20 min, proto je nezbytné osvětlit místo téměř ve stejný čas nebo krátce po podání PS, aby byla cévní odpověď optimální (Chen a kol. 2006).

Později byl připraven jeho ve vodě rozpustný derivát padeliporfin (WST11, Stakel<sup>®</sup>, Tookad<sup>®</sup> Soluble). Obě sloučeniny zůstávají přítomné pouze v cirkulaci až do vyloučení v micelách (WST09) nebo jako nekovalentně vázaný komplex s lidským sérovým albuminem (WST11) (Lepor 2008, Azzouzi a kol. 2013). WST11 je ve druhé fázi klinického hodnocení pro AMD (Preise a kol. 2009) a třetí fázi klinického hodnocení pro lokalizovaný karcinom prostaty (ClinicalTrials.gov - NCT01875393).

VTP s Pd-bakteriochlorofylovými deriváty se liší od klasické PDT v mnoha ohledech. Na rozdíl od PDT, i.v. podaný PS nevystupuje z cév a zůstává omezený na cirkulaci, proto ROS produkované lokálně po ozáření zůstávají v cévním kompartmentu nádoru, což vede k vážnému cévnímu poškození a akutní stáze krve (Preise a kol. 2009).

Další hlavní výhodou těchto dvou PS je jejich rychlé vyloučení nejdřív z cirkulace a pak z jater. Díky tomu se pacienti nemusí tak dlouho vyhýbat slunečnímu záření. WST11 má o dost vyšší terapeutický index a může být mnohem snadněji použit pro VTP, které vyžaduje ve vodě rozpustné cirkulující léčivo (Lepor 2008).



## 7 CÍLE PRÁCE

- modifikace a zavedení metod pro studium fotodynamické terapie zaměřené na cévy
- studium světlem indukované toxicity ( $EC_{50}$ ) nově syntetizovaných ftalocyaninových fotosenzitizérů **ZIP120Zn**, **ZIP117Zn** a **ZIP65Zn** na lidské immortalizované endotelové buněčné linii EA.hy926 a buněčné linii lidského cervikálního karcinomu (HeLa)
- zjistit míru toxicity samotných struktur bez přítomnosti aktivujícího světla (tzv. dark toxicita,  $TC_{50}$ )
- porovnat schopnost těchto látek účinně poškozovat endotelové buňky s jejich dark toxicitou a zjistit poměr těchto toxicit ( $TC_{50}/EC_{50}$ ), který je obdobou terapeutického indexu
- pokusit se podrobněji popsat jevy, které budou probíhat během buněčného poškození VTP

## 8 METODICKÁ ČÁST

### 8.1 MANIPULAČNÍ VYBAVENÍ PRO PRÁCI S BUNĚČNÝMI LINIEMI

- plastové sterilní inkubační nádoby T75, 96-jamkové, 12-jamkové a 6-jamkové mikrotitrační destičky s plochým dnem (TPP, Švýcarsko)
- sterilní plastové Petriho misky o různé ploše dna (TPP, Švýcarsko)
- sterilní Petriho misky určené pro konfokální mikroskopii (WillCo Wells, Nizozemí)
- plastové sterilní centrifugační zkumavky o objemu 15 ml a 50 ml (TPP, Švýcarsko)
- sterilní mikrozukavky 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml a 5 ml (Eppendorf, Německo)
- pipetky SwiftPet+ (HTL, Polsko) a Biohit Midi Plus (Biohit, Finsko)
- sterilní plastové serologické pipety různého objemu (TPP, Švýcarsko)
- automatické pipety Eppendorf různého rozsahu (Eppendorf, Německo)
- 8-kanálová elektronická pipeta e-PET BioHit 50-1200  $\mu$ l (BioHit, Finsko)
- 8-kanálová elektronická pipeta e-PET BioHit 5-100  $\mu$ l (BioHit, Finsko)
- sterilní plastové špičky různých rozsahů (Eppendorf, Německo)
- sterilní Pasteurovy pipety (Brand, Německo)
- sterilní laboratorní sklo (Thermo Fisher Scientific, Česká Republika)
- Bürkerova komůrka (Brand, Německo)
- sterilní plastové vaničky
- podložní a krycí sklíčka

## 8.2 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

- vodní lázně (Memmert, Německo)
- box s laminárním prouděním BioAir TopSafe 1.2 (EuroClone, Italy)
- buněčné inkubátory s termostatem a regulací koncentrace CO<sub>2</sub> Sanyo a Esco
- 450 W Xenonová lampa Newport s 9 cm vodním a long-pass filtrem Newport OG570 (Newport Corporation, USA)
- desková třepačka Heidolph Titramax 100 (Heidolph Instruments, Německo)
- centrifuga Hermle Z 300
- průtokový cytometr BDAccuri C6 (BD Bioscience, USA)
- čtečka mikrotitračních destiček Tecan Infinite M200 (Tecan Group Ltd., Švýcarsko)
- invertovaný fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Japan)
- invertovaný fluorescenční mikroskop Nikon Ti E (Nikon, Japan)

## 8.3 LÁTKY POUŽITÉ PŘI KULTIVACI BUNĚK

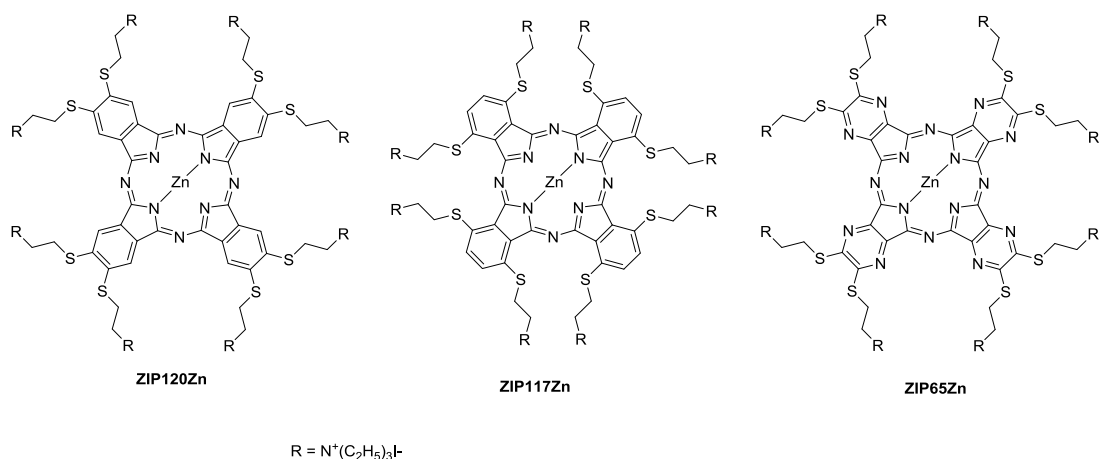
- Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Lonza, Belgie)
- fetální bovinní sérum inaktivované teplem (FBS, Lonza, Belgie)
- HEPES pufr 1M roztok (Sigma, Německo)
- HAT 50x koncentrovaný roztok (směs hypoxanthinu (5 mM), aminopterinu (20 μM) a thymidinu (0,8 mM); Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA)
- penicilin/streptomycin 100× koncentrovaný roztok (P/S, koncentrace 10 000 jednotek/ml penicilinu a 10 mg/ml streptomycinu; Lonza, Belgie)
- tablety pro fosfátový pufr (PBS; Sigma, Německo nebo MP Biomedicals, USA)
- trypsin/EDTA 10× koncentrovaný roztok (roztok 0,5% trypsinu a 0,02% EDTA, Lonza, Belgie)

## 8.4 DALŠÍ REAGENCIE A CHEMIKÁLIE

- trypanová modř 0,4% (Sigma, Německo)
- peroxid vodíku 3% roztok (Fluka, Sigma, Německo)
- fotosenzitizér ZIP117Zn (Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové)
- fotosenzitizér ZIP120Zn (Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové)
- fotosenzitizér ZIP65Zn (Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové)
- neutrální červeň roztok 3,3 g/l (Sigma, Německo)
- chlorid vápenatý bezvodý (Sigma, Německo)
- formaldehyd (Penta, Česká Republika)
- kyselina octová ledová p.a.  $\geq 99,9$  (Penta, Česká Republika)
- ethanol absolutní p.a.  $\geq 99,9\%$  (Penta, Česká Republika)
- purifikovaná ultračistá voda (Millipore, USA)
- fluorescenční sonda JC-1 (Molecular Probes, USA)
- fluorescenční sonda Hoechst 33342 (Molecular Probes, USA)
- fluorescenční sonda MitoTracker Green FM (Molecular Probes, USA)
- fluorescenční sonda monodansylcadaverin (MDC; Molecular Probes, USA)
- propidium iodid (Molecular Probes, USA)
- Annexin V, FITC konjugát (Molecular Probes, USA)
- rapamycin (Sigma, Německo)

## 8.5 POUŽITÉ FOTOSENZITIZÉRY

Fotosenzitizéry použité pro veškeré experimenty byly nasyntetizovány skupinou doc. Zimčíka na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv.



**Obrázek 16** Struktury použitých fotosenzitizérů - ftalocyanin ZIP120Zn a ZIP117Zn, azaftalocyanin ZIP65Zn

Látky ZIP120Zn a ZIP117Zn jsou dva Pc lišící se polohou substituentů ([triethylammonio)ethyl]sulfanyl), která ovlivňuje kvantový výtěžek singletového kyslíku ( $\Phi_{\Delta}$ ). ZIP120Zn má periferní substituci (poloha  $\beta$ ), zatímco ZIP117Zn obsahuje neperiferní substituci (poloha  $\alpha$ ) (Obr. 16) a má vyšší  $\Phi_{\Delta}$  (Tab. 4). Látka ZIP65Zn je AzaPc, u kterého můžeme pozorovat nižší  $\Phi_{\Delta}$  a kvantové výtěžky fluorescence ( $\Phi_F$ ) z důvodu světlem vyvolaného přenosu elektronu (PET), který způsobuje zhášení excitovaných stavů tohoto PS. Absorpční maximum tohoto PS je nižší než u jeho Pc analogu, kterým je ZIP120Zn.

**Tabulka 4** Základní informace o testovaných látkách (převzato z Machacek a kol. 2015)

Sloučenina	Typ jádra	$\lambda_{\max}/\text{nm}$	$\Phi_{\Delta}$	$\Phi_F$
ZIP120Zn	Pc	704	0,68	0,12
ZIP117Zn	Pc	756	0,91	0,017
ZIP65Zn	AzaPc	656	0,2	0,06

## **8.6 BUNĚČNÁ LINIE EA.hy926**

Buněčná linie EA.hy926 byla získána z Americké banky buněčných linií (American Type Culture Collection, ATCC, USA). Jedná se o immortalizovanou linii lidských endoteliálních buněk, která vznikla spojením buněk získaných z lidské pupečnickové žíly (HUVEC) a permanentní buněčné linie A549 odvozené od lidského plicního karcinomu (Edgell a kol. 1983). Tato buněčná linie je velmi podobná nativním endotelovým buňkám HUVEC, není však identická. Výhodou oproti nativním endotelovým buňkám je její nižší cena, snazší a delší pasážovatelnost, a tedy i delší doba, po kterou poskytuje relevantní výsledky. Buněčná linie EA.hy926 je často využívána při výzkumu angiogeneze *in vitro* (Baranska a kol. 2005).

## **8.7 BUNĚČNÁ LINIE HeLa**

Buněčná linie HeLa byla taktéž získána z Americké banky buněčných linií (ATCC, USA). Vychází z lidských buněk karcinomu děložního čípku. Je to první kultivovaná lidská buněčná linie (pochází již z roku 1951) a v biologickém výzkumu je velice široce používána (Landry a kol. 2013). Její výhodou je velice snadná pasážovatelnost a rychlý nárůst buněčné hmoty. Nevýhodou je přítomnost HPV provirů v genomu a s tím spojené potenciální pracovní riziko. Pro náš výzkum jsme ji použili jako zástupce tkáňových rakovinných buněk.

## **8.8 PŘÍPRAVA MÉDIA**

Plné kultivační médium bylo připraveno ze základního média DMEM, ke kterému byly přidány další suplementy. Jejich finální koncentrace v připraveném médiu byla 10% FBS, 2% HAT suplementu, 1% P/S a 1% HEPES pufru. Všechny tyto roztoky kromě HEPES byly před smícháním vytemperovány ve vodní lázni na 37°C. Příprava poté probíhala za sterilních podmínek v laminárním boxu.

Médium pro buněčnou linii HeLa má stejné složení, nepřidá se však HAT suplement, který tato buněčná linie nevyžaduje.

## 8.9 KULTIVACE

Buňky byly kultivovány v připraveném médiu ve sterilních plastových kultivačních lahvích T75 nebo na sterilních plastových Petriho miskách o povrchu 150 cm<sup>2</sup> (případně na jiných dle naplánovaných pokusů, viz dále). Kultivace probíhala v inkubátoru za standardních podmínek - tzn. při teplotě 37°C s 5% koncentrací oxidu uhličitého a konstantní vlhkostí.

## 8.10 PASÁŽOVÁNÍ BUNĚK

Buňky byly ponechány v kultivačních nádobách, dokud nedorostly maximálně 80-90% konfluence, čehož dosáhly přibližně za 3-4 dny. Aby nedocházelo k nežádoucím změnám vlastností buněk, musela se jejich poměrná část přenést do nové kultivační lahve s čerstvým médiem. Množství přenášených buněk bylo voleno podle poměru z předchozí pasáže a aktuálního stavu konfluence.

Pasážování jsme vždy začínali odebráním starého média sterilní pipetou. Poté byly buňky 2x opláchnuty sterilním roztokem PBS. Nakonec byl přidán 1 ml předeřhátého trypsinu s EDTA a roztok byl rozprostřen po celém dně lahve. Trypsinizace probíhala v uzavřené lahvi v inkubátoru po dobu 5 min při 37°C. Poté bylo pomocí mikroskopu zkontrolováno, zda se všechny buňky staly suspenzními.

Trypsin byl ihned inaktivován přidáním 9 ml SCM. Buňky byly poté důkladně resuspendovány opakovaným nasátím do pipety a vypuštěním proti dnu lahve. Potřebná část buněk pak byla přenesena do nové sterilní kultivační lahve s 15 ml čerstvého předeřhátého SCM. Suspenze byla promíchána a vodorovným pohybem láhvi rovnoměrně rozprostřena po dně. Buňky byly do další pasáže uchovávány za standardních podmínek v inkubátoru. Zbytek buněčné suspenze byl využit při nasazování na experimenty.

Všechny úkony, které byly s buňkami prováděny, probíhaly za sterilních podmínek v laminárním boxu a všechny roztoky, které k nim byly přidávány, byly vytemperovány na 37°C.

## **8.11 POČÍTÁNÍ BUNĚK - STANOVENÍ POČTU ŽIVÝCH BUNĚK**

Počet živých buněk byl zjišťován mikroskopickou metodou pomocí Bürkerovy komůrky barvením trypanovou modří. Trypanová modř je barvivo, které difunduje přes plazmatickou membránu buněk. Živé buňky ho však ze svého nitra aktivně transportují ven, v mrtvých buňkách zůstává a obarví je. Buňky, které jsou živé, tedy vidíme jako světlé sférické útvary na slabě modrém pozadí.

Do mikrozkušavky bylo nejprve napipetováno 100  $\mu$ l 0,4% roztoku trypanové modři a poté byl přidán stejný objem řádně promíchané buněčné suspenze. Vše bylo promíseno a inkubováno 5 min při laboratorní teplotě. Po uplynutí časového intervalu byl obsah mikrozkušavky opět řádně promíchán a na každou polovinu Bürkerovy komůrky bylo nanášeno 10  $\mu$ l suspenze. Výsledný počet buněk byl pak přepočítán na 1 ml suspenze.

## **8.12 NASAZOVÁNÍ BUNĚK NA EXPERIMENTY**

Buněčná suspenze, která zbyla po pasážování, byla naředěna dle potřeby čerstvým předeštěným médiem tak, abychom získali suspenzi o koncentraci 100 000 buněk/ml. Ta byla potom elektronickou multikanálovou pipetou nanášena na 96 jamkové destičky po 100  $\mu$ l na jamku. V každé jamce tedy bylo přibližně 10 000 buněk. Destičky byly umístěny na 24 hodin do inkubátoru.

Pro fotografickou dokumentaci byly buňky nasazovány na sterilní destičky s menším počtem jamek (12 nebo 6; mikroskop Nikon TS100), případně na sterilní plastové Petriho misky se skleněným dnem určené pro konfokální mikroskopii (mikroskop Nikon Ti-E). Velikosti jamek, popřípadě Petriho misek byl pak uzpůsoben objem nasazované buněčné suspenze. Na 6 jamkové destičky a Petriho misky bylo napipetováno po 2 ml, na 12 jamkové destičky po 1 ml buněčné suspenze na jamku.



## 8.13 PŘIDÁVÁNÍ STUDOVANÝCH LÁTEK K BUŇKÁM

Po 24 hodinové inkubaci destiček byly k buňkám přidány zkoušené látky. Destička byla rozdělena na část, která nám sloužila jako kontrola (standard životaschopnosti, pozitivní kontrola), část pro přidání studované látky a část sloužící jako negativní kontrola.

Buňkám, které byly použity jako kontrolní, bylo pouze vyměněno médium za čerstvé, negativní kontrole byla přidána do média letální dávka peroxidu vodíku (200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Další postup už se už lišil v závislosti na tom, zda byla hodnocena vlastní toxicita látek, tzn. bez aktivace světlem (tzv. dark toxicita), nebo toxicita látek po aktivaci světlem (fototoxicita).

K dispozici jsme měli zásobní roztoky (aza)ftalocyaninů o koncentraci 1500  $\mu\text{M}$  (u ZIP120Zn a ZIP65Zn), nebo 500  $\mu\text{M}$  (u ZIP117Zn). Tyto zásobní roztoky byly připraveny rozpuštěním krystalické látky v SCM (stejně jako se používá pro kultivaci buněk, ke kterým byly látky přidávány) a poté sterilně přefiltrovány přes bakteriální filtr - MCE membrána s póry o průměru 0,22  $\mu\text{m}$ . Jelikož se tyto látky aktivují světlem, veškerá manipulace s nimi a jejich uchovávání musí probíhat bez přítomnosti aktivujícího světla.

## 8.14 STANOVENÍ FOTOTOXICITY

Pro hodnocení fototoxicity látek byly ze zásobních roztoků připraveny roztoky o koncentraci 100  $\mu\text{M}$  a z nich pak byly ředěny roztoky o nižších koncentracích (0,05–50  $\mu\text{M}$ ). K ředění roztoků bylo použito SCM předehřáté na 37°C.

Staré médium bylo z buněk opatrně odebráno automatickou pipetou a následně bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  roztoku o požadované koncentraci. Nanesení celé koncentrační řady muselo být rychlé a provedeno do cca 3 min, aby se zabránilo nežádoucímu příjmu látek do buněk před expozicí aktivačním světlem. Poté byla destička okamžitě přenesena a 15 minut ozařována červenou částí viditelného spektra 450 W xenonové výbojky osazené vodním a long-pass filtrem ( $\lambda > 570 \text{ nm}$ ; 12,4  $\text{mW cm}^{-2}$ ; 11,2  $\text{J cm}^{-2}$ ). Po ozáření byly buňky inkubovány dalších 24 hodin a poté vyhodnocena jejich viabilita.

## 8.15 STANOVENÍ DARK TOXICITY

Pro hodnocení vlastní toxicity látek byly použity výrazně vyšší koncentrace studovaných látek. Přímou ze zásobních roztoků (1500 a 500  $\mu\text{M}$ ) byly naředěny požadované koncentrace (10  $\mu\text{M}$  až 500  $\mu\text{M}$ , resp. 1500  $\mu\text{M}$ ), které pak byly obdobně napipetovány na destičku. Inkubace probíhala 24 hodin v inkubátoru bez přítomnosti aktivujícího světla a poté stejným způsobem vyhodnocena životaschopnost buněk.

## 8.16 HODNOCENÍ VIABILITY BUNĚK POMOCÍ TESTU VYCHYTÁVÁNÍ NEUTRÁLNÍ ČERVENĚ

Neutrální červeň (neutral red, NR) je slabě kationické barvivo, které do buňky vstupuje pasivní difúzí v nenabité formě a koncentruje se v lysozomech. U živých buněk je v lysozomech udržován protonový gradient, díky němuž je pH v lysozomech kyselější než v cytoplazmě. Neutrální červeň je v kyselém prostředí protonizována a nedochází tak k její zpětné difúzi z lysozomálního lumen do cytosolu. U buněk, které mají lysozomy poškozeny, je tento gradient narušen a neutrální červeň může z těchto organel unikat. Proto je množství zadrženého barviva přímo úměrné počtu živých buněk (Repetto a kol. 2008).

Ze zásobního roztoku NR (3,3 g/l) a čistého DMEM byl naředěn pracovní roztok NR (80  $\mu\text{g/ml}$ ) a přidán k buňkám. Do každé jamky bylo napipetováno 100  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku NR, výsledná koncentrace v jamkách tedy činila 40  $\mu\text{g/ml}$ . Buňky byly s NR inkubovány 2 – 3 hod v inkubátoru při teplotě 37 °C.

Po uplynutí inkubace bylo médium s NR v jamkách nahrazeno 100  $\mu\text{l}$  fixačního roztoku (1% roztok  $\text{CaCl}_2$  v 0,5% formaldehydu). Buňky byly fixovány 15 min při laboratorní teplotě. Fixační roztok byl poté odstraněn a buňky dvakrát opláchnuty 100  $\mu\text{l}$  PBS. Nakonec bylo do jamek napipetováno 200  $\mu\text{l}$  lyzačního roztoku (1% roztok ledové kyseliny octové v 50% etanolu). Destičky byly dány na deskovou třepačku a při laboratorní teplotě 30 min lyzovány.

Vyhodnocení pokusů probíhalo spektrofotometricky pomocí multifunkční čtečky mikrotitračních destiček Tecan Infinite 200M, přičemž byla měřena absorbance při 540 nm. Životaschopnost buněk byla vyjádřena jako procenta kontroly.

## 8.17 VYHODNOCENÍ DAT

Ke zpracování výsledků byl použit program Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA). Grafické zpracování výsledků, výpočet hodnot  $EC_{50}$  a  $TC_{50}$  a statistická analýza byly provedeny pomocí softwaru GraphPad Prism verze 6.04 (GraphPad Software, USA). Statistické hodnocení bylo provedeno jednofaktorovou analýzou rozptylu (one-way ANOVA) s Bonferroniho metodou vícenásobného porovnávání. Hodnoty byly vztaženy k viabilitě kontrolních buněk (100 %). Výsledky byly považovány za signifikantní, jestliže  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  a  $***p < 0.001$ . Data jsou vyobrazena v grafech jako průměrné hodnoty se směrodatnou odchylkou.

Při vyhodnocení dark toxicity byla u každé látky stanovena hodnota střední toxické koncentrace  $TC_{50}$  (koncentrace látky, při které dochází i bez aktivace světlem ke snížení viability buněk na 50 % oproti kontrole). U fototoxicity byla stanovena hodnota střední efektivní koncentrace  $EC_{50}$  (koncentrace látky, která po aktivaci světlem způsobí snížení viability buněk na 50 %). Z těchto dvou hodnot byl pak vypočítán index  $TC_{50}/EC_{50}$ , který je obdobou terapeutického indexu, tzn. poměr mezi vlastní a světlem indukovanou toxicitou dané látky. Všechny experimenty byly prováděny nejméně ve třech opakováních ( $n \geq 3$ ).

## 8.18 FOTOGRAFICKÁ DOKUMENTACE

K pořizování fotografické dokumentace byl použit invertovaný epifluorescenční mikroskop Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Japan) s chlazenou CCD kamerou COOL-13/Q (VDS Vosskühler GmbH, Německo), případně invertovaný fluorescenční mikroskop Nikon Ti E (Nikon, Japan) s chlazenou sCMOS kamerou Andor Zyla 5.5 (Andor Technology, Spojené Království).

### 8.18.1 Fluorescenční barvení mitochondrií

K zobrazení mitochondrií při fotografické dokumentaci byla použita fluorescenční sonda JC-1. Jedná se o kationické barvivo vykazující fluorescenci závislou na potenciálu v mitochondriích. Akumuluje se v místech s vysokým elektrickým potenciálem (nepoškozené mitochondrie), kde dimerizuje a vytváří červeně

fluoreskující J-agregáty. Poškození mitochondrií vede k depolarizaci, což se projeví poklesem červené a vzrůstem zelené fluorescence vydávané monomerní sondou nacházející se v cytoplazmě.

Po 24 hodinách od nasazení byly buňky opláchnuty PBS a bylo jim vyměněno médium. Poté došlo k přidání sondy JC-1 (2  $\mu\text{M}$ ), 15 minutové inkubaci při 37°C, opětovné výměně média a přidání studované látky. Ihned následovalo 15 minutové ozařování buněk a fotografování.

Další možností fluorescenčního zobrazení mitochondrií je sonda MitoTracker, která se koncentruje v aktivních mitochondriích a její fluorescence není závislá na membránovém potenciálu. Hodí se tedy ke studiu morfologie těchto organel.

### **8.18.2 Fluorescenční barvení jader**

Pro fluorescenční zviditelnění jader buněk byla použita fluorescenční sonda Hoechst 33342 v kombinaci s PI.

PI je červené fluorescenční barvivo vázající se na DNA, resp. RNA interkalací mezi bázemi. PI neprochází celistvými membránami, nachází se tedy za normálního stavu mimo živé buňky. Při poškození plazmatické a jaderné membrány se však do buňky, resp. jádra dostává, a proto se běžně používá k identifikaci buněk pozdně apoptických a nekrotických.

Hoechst 33342 je modrá fluorescenční sonda, která prochází membránami a barví nukleové kyseliny všech buněk. Toto barvivo je velmi citlivé ke konformaci DNA a chromatinu v buňkách a může detekovat postup jaderného poškození. Lze tedy použít i k identifikaci buněk podstupující různé fáze apoptózy.

Po 24 hodinách od nasazení byly buňky opláchnuty PBS a bylo jim vyměněno médium. Poté došlo k přidání sondy Hoechst 33342 (10 ng/ml) a PI (1 ng/ml). Buňky byly s těmito látkami inkubovány 15 minut při 37°C. Následovalo přidání studované látky, 15 minutové ozařování buněk s PS a fotografování.

### **8.18.3 Hodnocení přítomnosti autofagie**

Při hodnocení přítomnosti autofagie byl jako pozitivní kontrola použit rapamycin (1 nM) – inhibitor serin/threonin proteinkinázy nazývané mTOR (mammalian target of rapamycin). Inhibicí mTOR dochází k blokadě signálů vyžadovaných pro buněčný růst a proliferaci, což napodobuje buněčné hladovění, což je jeden z neúčinnějších spouštěčů autofagie.

K zobrazení lysozomů a autofagozomů bylo použito fluorescenční barvení pomocí fluorescenční sondy monodansylcadaverin (MDC) vychytávané v kyselých oblastech buňky (lysosomy, autofagolysosomy).

Při hodnocení autofagie byla použita koncentrace odpovídající  $IC_{15}$  daných látek a buňky byly ozářeny. Po požadovaném čase proběhlo přidání MDC (50  $\mu$ M), 10 minutové barvení, opláchnutí buněk a focení.

## **8.19 PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE S POUŽITÍM ANNEXINU V**

V průběhu apoptózy dochází k vystavení membránového fosfolipidu fosfatidylserinu na vnější stranu plazmatické membrány. Annexin V konjugovaný s fluorescein izotiokyanátem (FITC) se na tento negativně nabitý fosfolipid váže a umožňuje tak detekovat apoptotickou smrt buňky. Fosfatidylserin je však dostupný pro vazbu annexinu také při nekrotické smrti buňky, a proto bylo použito současné barvení buněk PI. Díky tomu je možné rozlišit buňky živé, apoptické a pozdně apoptické nebo nekrotické (Henry a kol. 2013) (Tab. 5).

**Tabulka 5** Rozlišení stavu buňky pomocí průtokové cytometrie a barvení Annexinem V-FITC a PI

<b>Buňky</b>	<b>Annexin V-FITC</b>	<b>PI</b>
živé (neapoptické)	-	-
apoptické	+	-
pozdně apoptické/ nekrotické	+	+

Buňky byly inkubovány na Petriho miskách s průměrem 6 cm při použitém objemu 5 ml. Přidání studovaných látek k buňkám bylo následováno ozářením za standardních podmínek. Po stanovené době byly buňky opláchnuty 2× PBS, trypsinovány, resuspendovány v nahřátém SCM a přemístěny do centrifugační zkumavky. Centrifugace probíhala 5 minut/1500 otáček. Médium pak bylo slito, k buněčné peletě bylo přidáno 500 µl nahřátého bezsérového média a proběhla důkladná resuspendace. Buněčná suspenze pak byla pipetou přemístěna do 2 ml mikrozkuavek. Poté byl přidán Annexin V-FITC (1 vol %). Následná inkubace probíhala 15 minut v nepřítomnosti světla, přičemž 3 minuty před koncem inkubace byl přidán PI (7,5 µM). Inkubace byla ukončena umístěním mikrozkuavek na led, aby došlo k zastavení reakce. Měření probíhalo na průtokovém cytometru C6 Accuri.

## 9 VÝSLEDKY

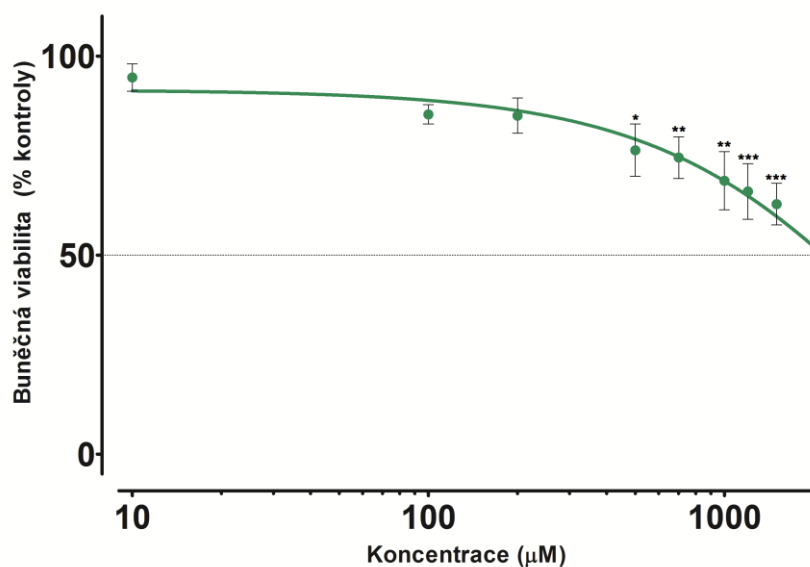
### 9.1 CYTOTOXICITNÍ EXPERIMENTY

#### 9.1.1 Ftalocyanin ZIP120Zn

##### 9.1.1.1 DARK TOXICITA

Vlastní toxicita ftalocyaninu ZIP120Zn byla hodnocena na buněčné linii EA.hy926 a to v celé škále koncentrací od 10  $\mu\text{M}$  do 1500  $\mu\text{M}$ . Přitom ani při nejvyšší možné koncentraci nedosáhla toxicita látky takových hodnot, aby způsobila snížení viability buněk na 50 % ( $\text{TC}_{50}$  = střední toxická koncentrace) (Obr. 17).

$\text{TC}_{50}$  pro buněčnou linii EA.hy926 byla > 1500  $\mu\text{M}$ . Teoretická hodnota  $\text{TC}_{50}$  je 1909  $\mu\text{M}$ .



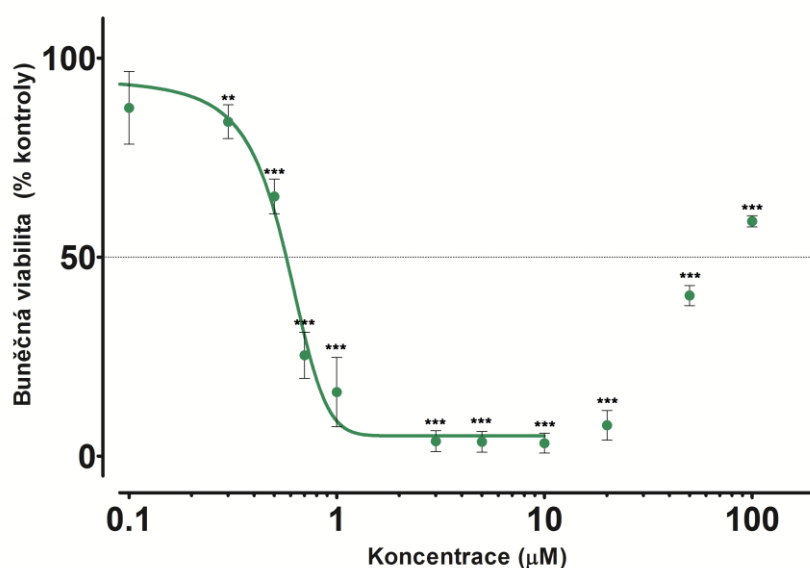
**Obrázek 17** Viabilita buněk EA.hy926 hodnocená po 24 hodinové inkubaci s fotosenzitizérem ZIP120Zn v nepřítomnosti aktivujícího záření. Životaschopnost buněk klesá v závislosti na zvyšující se koncentraci PS. Počet opakování  $n=3$ , \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  a \*\*\* $p<0.001$ .

### 9.1.1.2 FOTOTOXICITA

Účinek látky po aktivaci světlem byl taktéž sledován v široké škále různých koncentrací, a to u buněčné linie EA.hy926 od 0,05  $\mu\text{M}$  do 100  $\mu\text{M}$ , u buněčné linie HeLa pak pouze od 0,05  $\mu\text{M}$  do 10  $\mu\text{M}$ . Střední efektivní koncentrace látky ( $\text{EC}_{50}$ ) je vyobrazena v jednotlivých grafech a to zvlášť pro každou buněčnou linii. Nárůst viability buněk u koncentrací  $>10 \mu\text{M}$  je způsoben absorpcí aktivujícího záření samotnými fotosenzitizéry v roztoku.

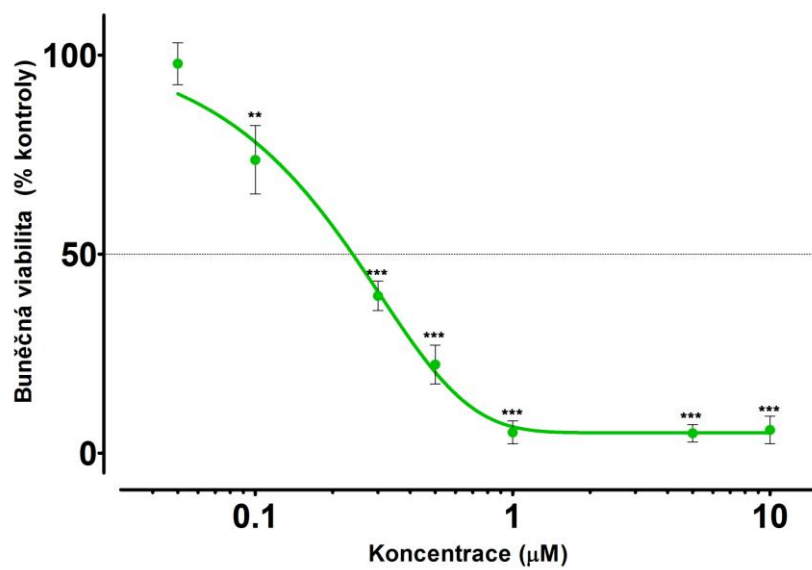
$\text{EC}_{50}$  pro buněčnou linii EA.hy926 odpovídala hodnotě 0,57  $\mu\text{M}$  (Obr. 18).

$\text{EC}_{50}$  pro buněčnou linii HeLa byla stanovena jako 0,24  $\mu\text{M}$  (Obr. 19). Výsledky tedy naznačují, že tato buněčná linie je k působení použitého ftalocyaninu citlivější než buněčná linie EA.hy926 představující model endotelových buněk.



**Obrázek 18** Viabilita buněk EA.hy926 vystavených stoupající koncentraci ftalocyaninu ZIP120Zn v přítomnosti aktivujícího záření hodnocená po 24 hodinách. Počet opakování  $n=6$ ,  $*p<0.05$ ,  $**p<0.01$  a  $***p<0.001$ .



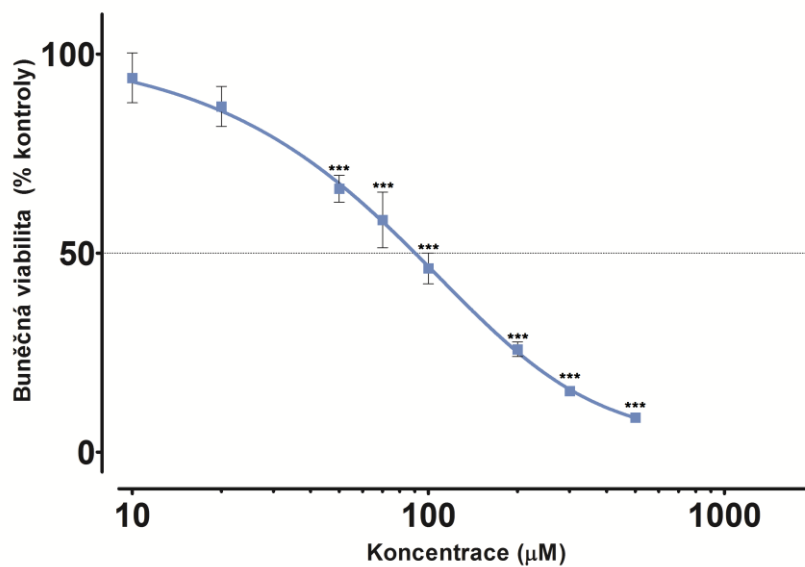


**Obrázek 19** Viabilita buněk HeLa vystavených rostoucí koncentraci ftalocyaninu ZIP120Zn v přítomnosti aktivujícího záření hodnocená po 24 hodinách. Počet opakování  $n=3$ ,  $*p<0.05$ ,  $**p<0.01$  a  $***p<0.001$ .

## 9.1.2 Ftalocyanin ZIP117Zn

### 9.1.2.1 DARK TOXICITA

U ftalocyaninu ZIP117Zn byla taktéž sledována vlastní toxicita na buněčné linii EA.hy926. Rozsah koncentrací byl od 10 do 500  $\mu\text{M}$ . Pokles viability buněk je mnohem strmější než v případě předchozího ftalocyaninu a dosahuje hodnoty  $\text{TC}_{50} = 90,71 \mu\text{M}$ , což značí, že tato látka je pro buňky i přes nepřítomnost aktivujícího záření mnohem toxičtější (Obr. 20).



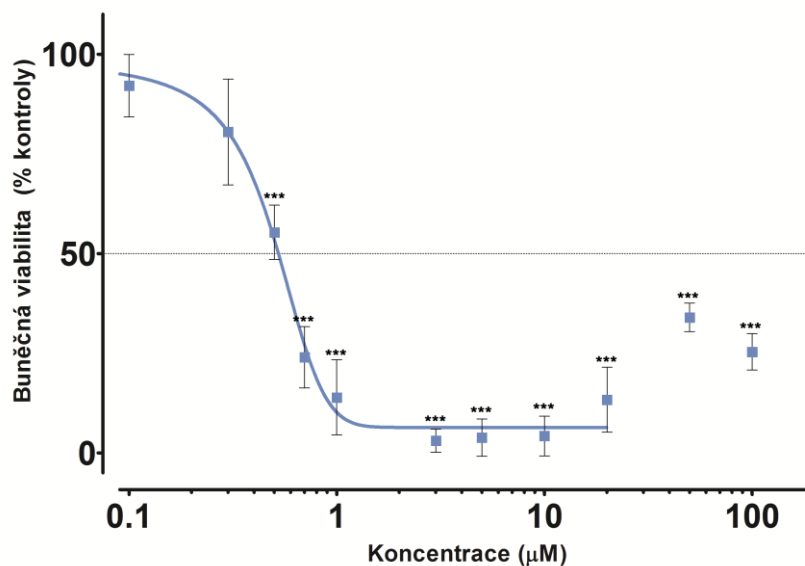
**Obrázek 20** Viabilita buněk EA.hy926 hodnocená po 24 hodinové inkubaci s fotosenzitizérem ZIP117Zn v nepřítomnosti aktivujícího záření. Počet opakování  $n=3$ , \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  a \*\*\* $p<0.001$ .

### 9.1.2.2 FOTOTOXICITA

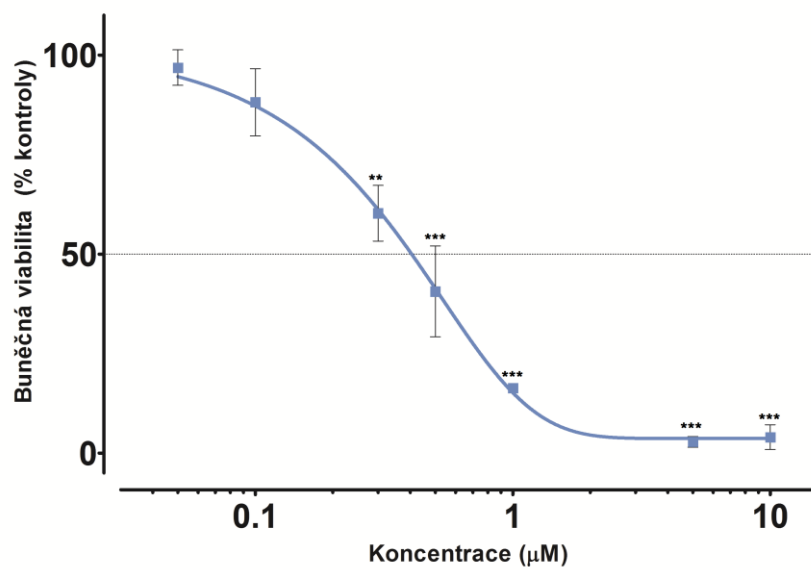
Toxicita látky po aktivaci světlem byla opět sledována u obou buněčných linií, přičemž byla použita stejná koncentrační řada jako v předchozím případě (0,05  $\mu\text{M}$  – 100  $\mu\text{M}$  u buněčné linie EA.hy926 a 0,05  $\mu\text{M}$  – 10  $\mu\text{M}$  u buněčné linie HeLa).  $\text{EC}_{50}$  je opět vyobrazena v grafech, a to zvlášť pro každou buněčnou linii. Nárůst viability buněk u koncentrací  $> 10 \mu\text{M}$  je opět způsoben absorpcí aktivujícího záření samotnými fotosenzitizéry v roztoku.

$\text{EC}_{50}$  pro buněčnou linii EA.hy926 odpovídala hodnotě 0,50  $\mu\text{M}$  (Obr. 21).

$\text{EC}_{50}$  pro buněčnou linii HeLa byla stanovena jako 0,40  $\mu\text{M}$  (Obr 22).



**Obrázek 21** Viabilita buněk EA.hy926 vystavených rostoucí koncentraci ftalocyaninu ZIP117Zn v přítomnosti aktivujícího záření hodnocená po 24 hodinách. Počet opakování  $n=6$ ,  $*p<0.05$ ,  $**p<0.01$  a  $***p<0.001$ .



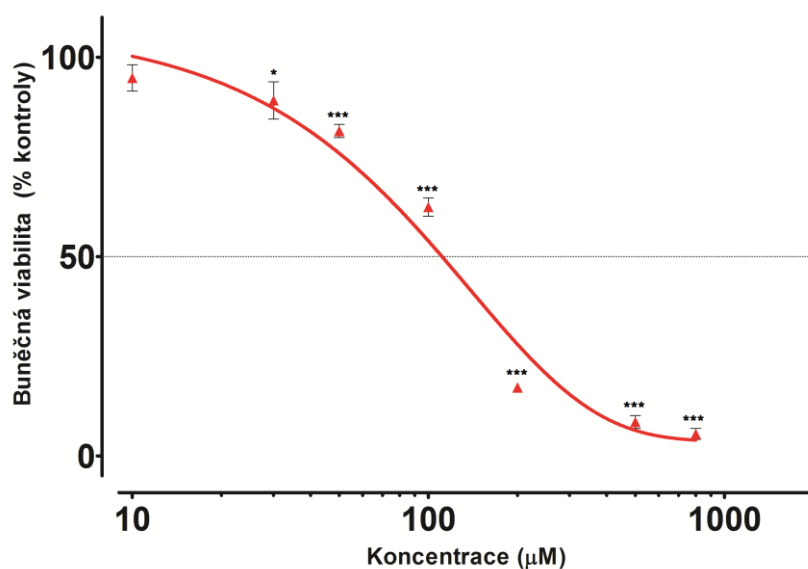
**Obrázek 22** Viabilita buněk HeLa vystavených rostoucí koncentraci ftalocyaninu ZIP117Zn v přítomnosti aktivujícího záření hodnocená po 24 hodinách. Počet opakování  $n=3$ ,  $*p<0.05$ ,  $**p<0.01$  a  $***p<0.001$ .

### 9.1.3 Azaftalocyanin (tetrapyrazinoporfyrizin) ZIP65Zn

#### 9.1.3.1 DARK TOXICITA

Také u této látky byla hodnocena její vlastní toxicita na buněčné linii EA.hy926. Použité koncentrace byly v rozsahu 10  $\mu\text{M}$  až 800  $\mu\text{M}$ . (Obr. 23).

$\text{TC}_{50}$  pro buněčnou linii EA.hy926 byla 118,60  $\mu\text{M}$ .



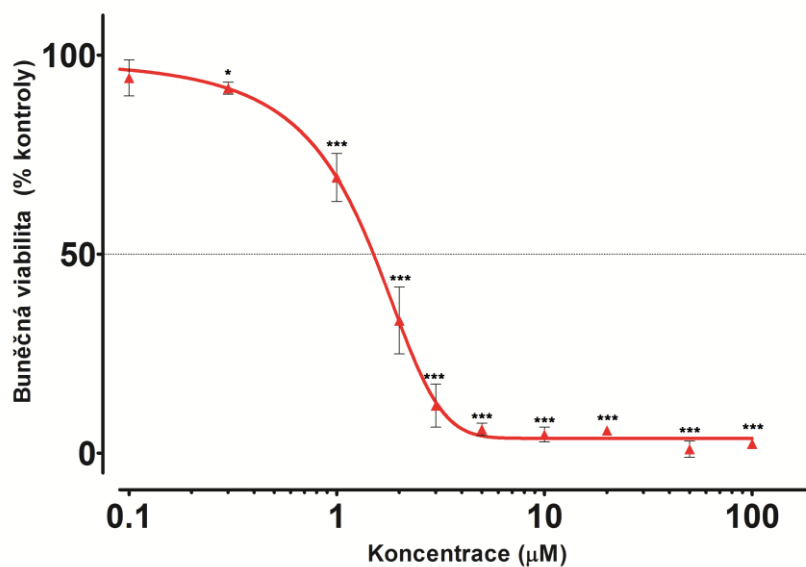
**Obrázek 23** Viabilita buněk EA.hy926 hodnocená po 24 hodinové inkubaci s fotosenzitizérem ZIP65Zn v nepřítomnosti aktivujícího záření. Životaschopnost buněk klesá v závislosti na zvyšující se koncentraci PS. Počet opakování  $n=3$ , \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  a \*\*\* $p<0.001$ .

### 9.1.3.2 FOTOTOXICITA

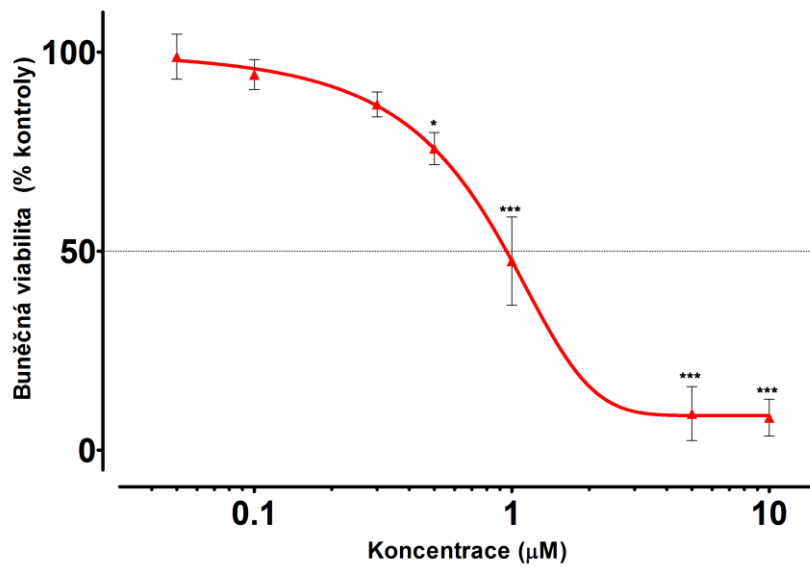
Toxicita látky po aktivaci světlem byla sledována u obou buněčných linií, přičemž byly použity obdobné koncentrace jako v předchozích experimentech (0,1  $\mu\text{M}$  – 100  $\mu\text{M}$  u buněčné linie EA.hy926 a 0,05  $\mu\text{M}$  – 10  $\mu\text{M}$  u buněčné linie HeLa).  $\text{EC}_{50}$  je opět vyobrazena v grafech zvlášť pro každou buněčnou linii.

$\text{EC}_{50}$  pro buněčnou linii EA.hy926 odpovídala hodnotě 1,50  $\mu\text{M}$  (Obr. 24).

$\text{EC}_{50}$  pro buněčnou linii HeLa byla stanovena jako 0,96  $\mu\text{M}$  (Obr. 25).



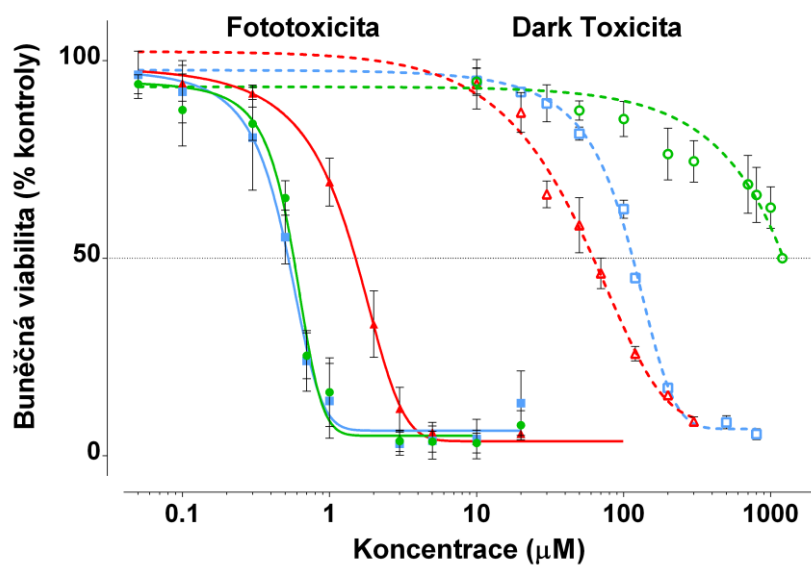
**Obrázek 24** Viabilita buněk EA.hy926 vystavených rostoucí koncentraci azaftalocyaninu ZIP65Zn v přítomnosti aktivujícího záření hodnocená po 24 hodinách. Počet opakování  $n=6$ ,  $*p<0.05$ ,  $**p<0.01$  a  $***p<0.001$ .



**Obrázek 25** Viabilita buněk HeLa vystavených rostoucí koncentraci azaftalocyaninu ZIP65Zn v přítomnosti aktivujícího záření hodnocená po 24 hodinách. Počet opakování  $n=3$ ,  $*p<0.05$ ,  $**p<0.01$  a  $***p<0.001$ .

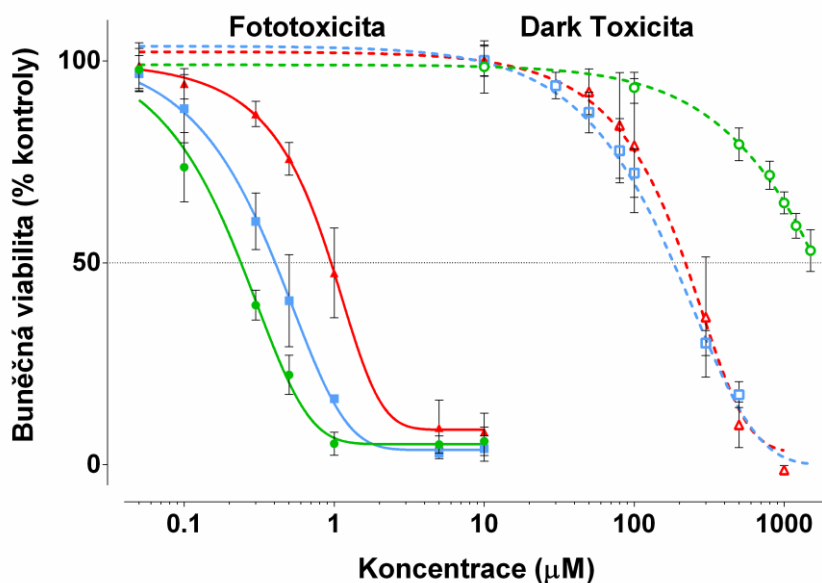
### 9.1.4 Porovnání cytotoxického působení studovaných fotosensitizerů

Ze získaných výsledků byly sestrojeny souhrnné grafy ukazující rozdíl toxické a účinné koncentrace jednotlivých (aza)ftalocyaninů u buněčných linií EA.hy926 (Obr. 26) a HeLa (Obr. 27). Zelená barva vždy označuje ftalocyanin ZIP120Zn, modrá ftalocyanin ZIP117Zn a červená azaftalocyanin ZIP65Zn, přičemž plná křivka odpovídá fototoxicitám a přerušovaná křivka dark toxicitám.



Obrázek 26 Cytotoxické působení studovaných PS na buněčnou linii EA.hy926





**Obrázek 27** Cytotoxické působení studovaných PS na buněčnou linii HeLa (hodnoty dark toxicit byly převzaty z Machacek a kol. 2015)

Z provedených experimentů byly pro jednotlivé látky získány hodnoty  $TC_{50}$  a  $EC_{50}$ . Z těchto hodnot pak byl vypočítán poměr  $TC_{50}/EC_{50}$ , který je obdobou terapeutického indexu a značí poměrový rozdíl mezi toxickou a účinnou koncentrací pro danou látku. Veškeré hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 6.

V konečném důsledku se nejvhodnějším fotosenzitizérem ze studované série zdá být ftalocyanin ZIP120Zn, a to z důvodu jeho dobré účinnosti po aktivaci světlem, ale především díky velice nízké vlastní toxicitě této látky, která nedosáhla ani při nejvyšší použité koncentraci (1500  $\mu\text{M}$ ) hodnot  $TC_{50}$ . Přestože ostatní fotosenzitizéry vykazují také poměrně dobré hodnoty  $EC_{50}$ , poměry  $TC_{50}/EC_{50}$  dosahují kvůli jejich vyšší vlastní toxicitě mnohem nižších hodnot.

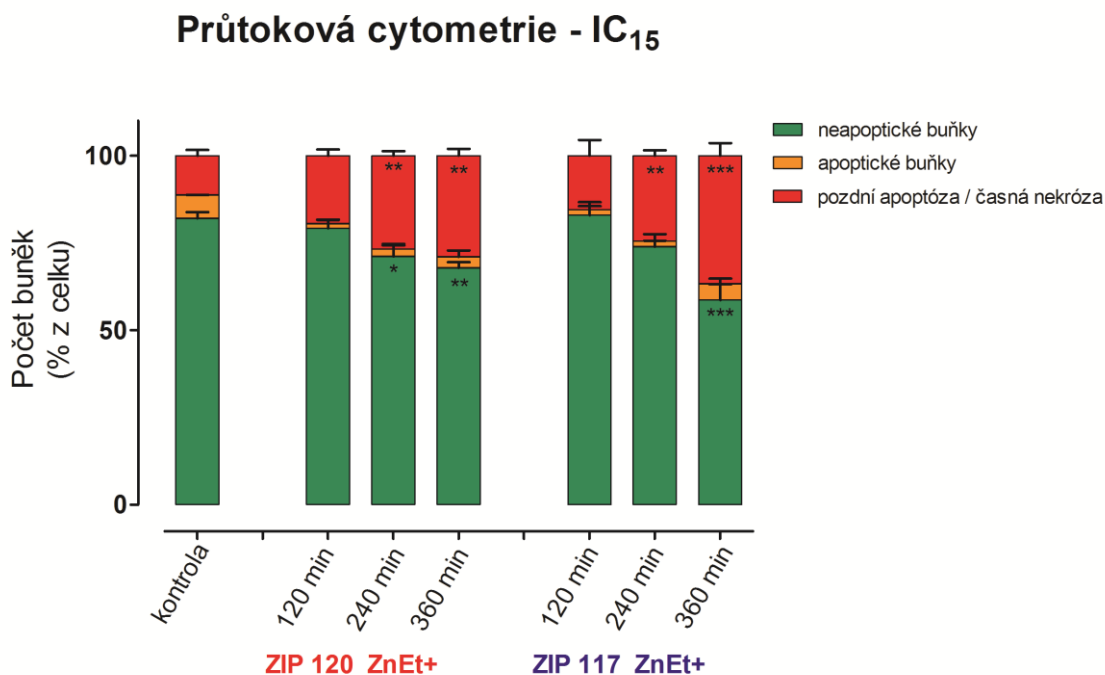
**Tabulka 6** Souhrnné výsledky cytotoxicitních experimentů (\* převzato z Machacek a kol. 2015)

Látka	EA.hy926			HeLa		
	$TC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$EC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$TC_{50}/EC_{50}$	$TC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$EC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$TC_{50}/EC_{50}$
<b>ZIP120Zn</b>	>1500	0,5671	<b>&gt;2645</b>	1639*	0,238	<b>6887</b>
<b>ZIP117Zn</b>	90,71	0,4956	183	192*	0,404	475
<b>ZIP65Zn</b>	118,6	1,503	79	226*	0,955	237

## 9.2 PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

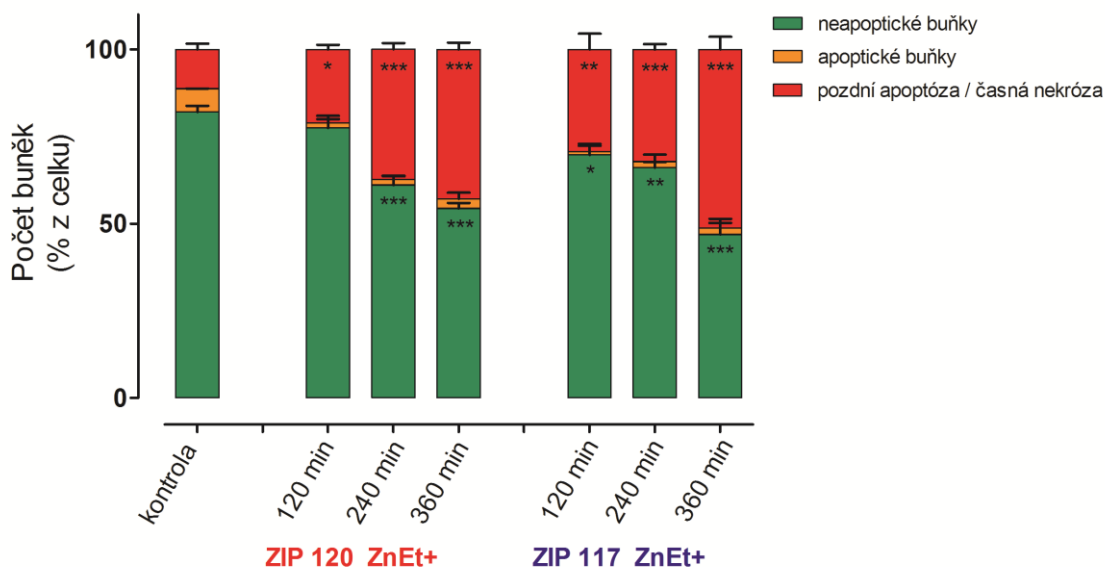
Další metodou použitou pro hodnocení buněčné smrti byla průtoková cytometrie s použitím Annexinu V-FITC a propidium jodidu. Jak lze vidět na Obr. 28 při koncentraci  $IC_{15}$  byla většina buněk negativní na Annexin V-FITC a PI a to až do času 6 hodin po ozáření. Byl však přítomen značný podíl nekrotických a pozdně apoptických buněk.

Při použití vyšší dávky fotosenzitizérů ( $IC_{85}$ ) byl podíl populace nekrotických a pozdně apoptických buněk ještě výraznější a v průběhu času se opět zvyšoval (Obr. 29).



**Obrázek 28** Hodnocení způsobu buněčné smrti navozené ftalocyaninovými fotosenzitizéry ZIP120Zn a ZIP117Zn u buněčné linie EA.hy926 při použití koncentrace  $IC_{15}$ . Počet opakování  $n=2$ ,  $*p<0.05$ ,  $**p<0.01$  a  $***p<0.001$ .

## Průtoková cytometrie - IC<sub>85</sub>



**Obrázek 29** Hodnocení způsobu buněčné smrti navozené ftalocyaninovými fotosenzitizéry ZIP120Zn a ZIP117Zn u buněčné linie EA.hy926 při použití koncentrace IC<sub>85</sub>. Počet opakování n=2, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  a \*\*\* $p < 0.001$ .

### 9.3 FOTOGRAFICKÁ DOKUMENTACE

Veškerá fotografická dokumentace probíhala pouze s buněčnou linií EA.hy926 a s ftalocyaniny ZIP120Zn a ZIP117Zn, které při cytotoxicitních experimentech prokázaly vhodnější vlastnosti. V důsledku toho azaftalocyanin ZIP65Zn do podrobnější dokumentace probíhajících dějů nebyl zahrnut.

Jako negativní kontrola jsou ve snímcích označovány buňky, ke kterým nebyl přidáván PS ani H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Jako pozitivní kontrola jsou na snímcích označovány buňky usmrcené letální dávkou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 9.3.1 Fluorescenční barvení jader

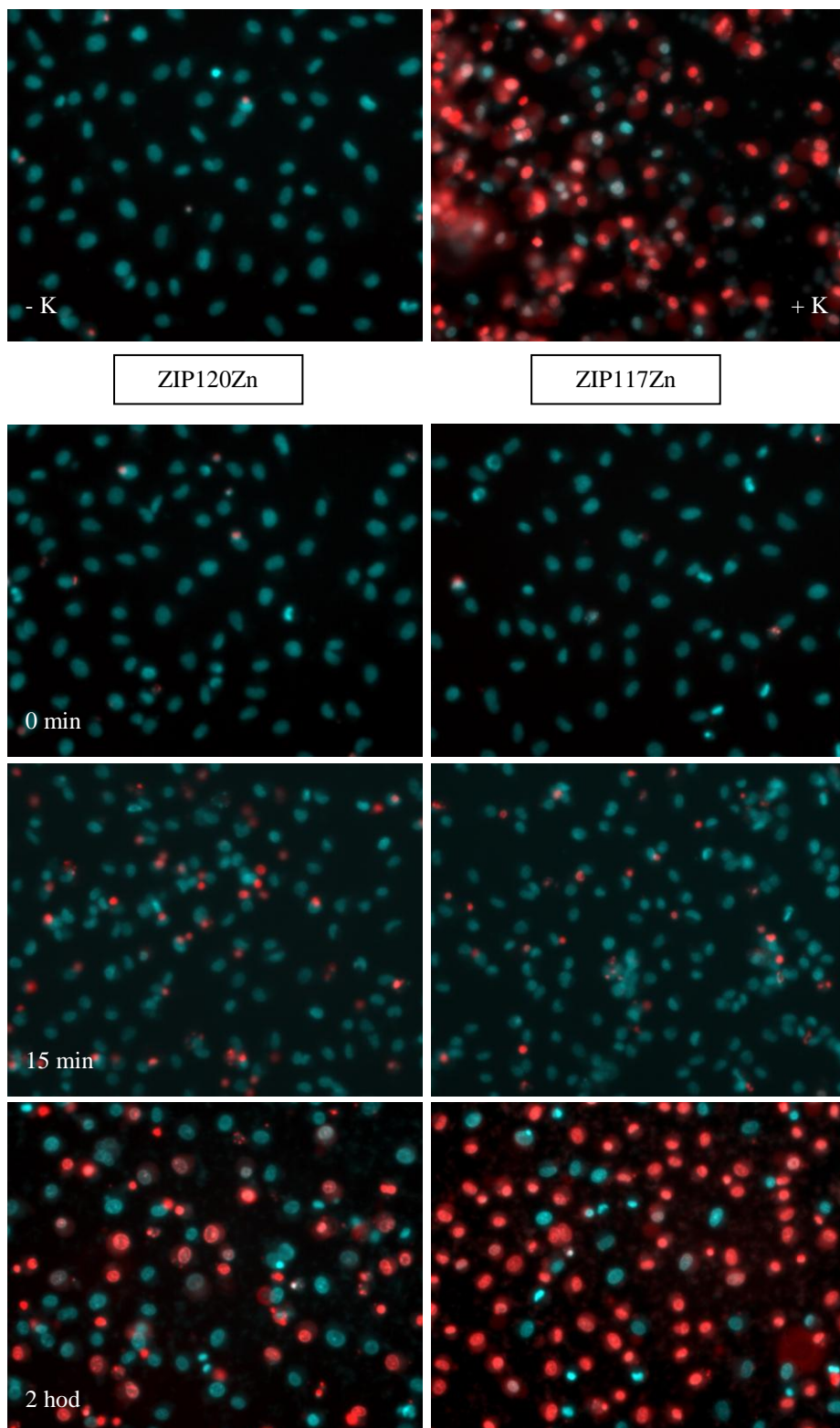
K zobrazení probíhajících změn byla použita fluorescenční sonda Hoechst 33342 a PI (Obr. 30). Fotografie byly pořízeny invertovaným fluorescenčním mikroskopem Nikon Eclipse TS100.

Kontrolní buňky (negativní kontrola, -K) a buňky v čase 0 min, ke kterým již byl přidán PS, prozatím však nebyly ozářeny, jsou zbarveny pouze modře fluorescenční sondou Hoechst 33342. Ta proniká i nepoškozenými buněčnými membránami a barví jádra všech buněk. Životaschopnost těchto buněk tedy prozatím nebyla negativně ovlivněna. Pozitivní kontrola (+K) vykazuje jasně červenou fluorescenci PI.

Z pořízených fotografií je patrný nárůst červeného signálu PI již těsně po ukončení ozáření, tedy v čase 15 min. Tento nárůst koresponduje s vážným poškozením buněčných membrán buněk podstupujících nekrotickou smrt (nebo buněk ve fázi pozdní apoptózy). Ta je způsobena cytotoxickými působky vznikajícími po aktivaci PS světlem. Po 2 hodinách od ozáření je červený signál patrný u většinové části ozářené populace.

Nárůst červené fluorescence PI odhalil, že smrt buněk nastává již v průběhu ozařování. Fotodynamický účinek PS způsobil nevratné poškození buněčných komponent následované buněčnou smrtí detekovatelné jako nárůst PI positivity zasažených buněk. Z porovnání obou látek se ftalocyanin ZIP117Zn jeví jako účinnější, což koreluje i s výsledky cytotoxických experimentů.

Pro fotografování byla použita koncentrace ftalocyaninů odpovídající jejich hodnotě  $EC_{85}$ .



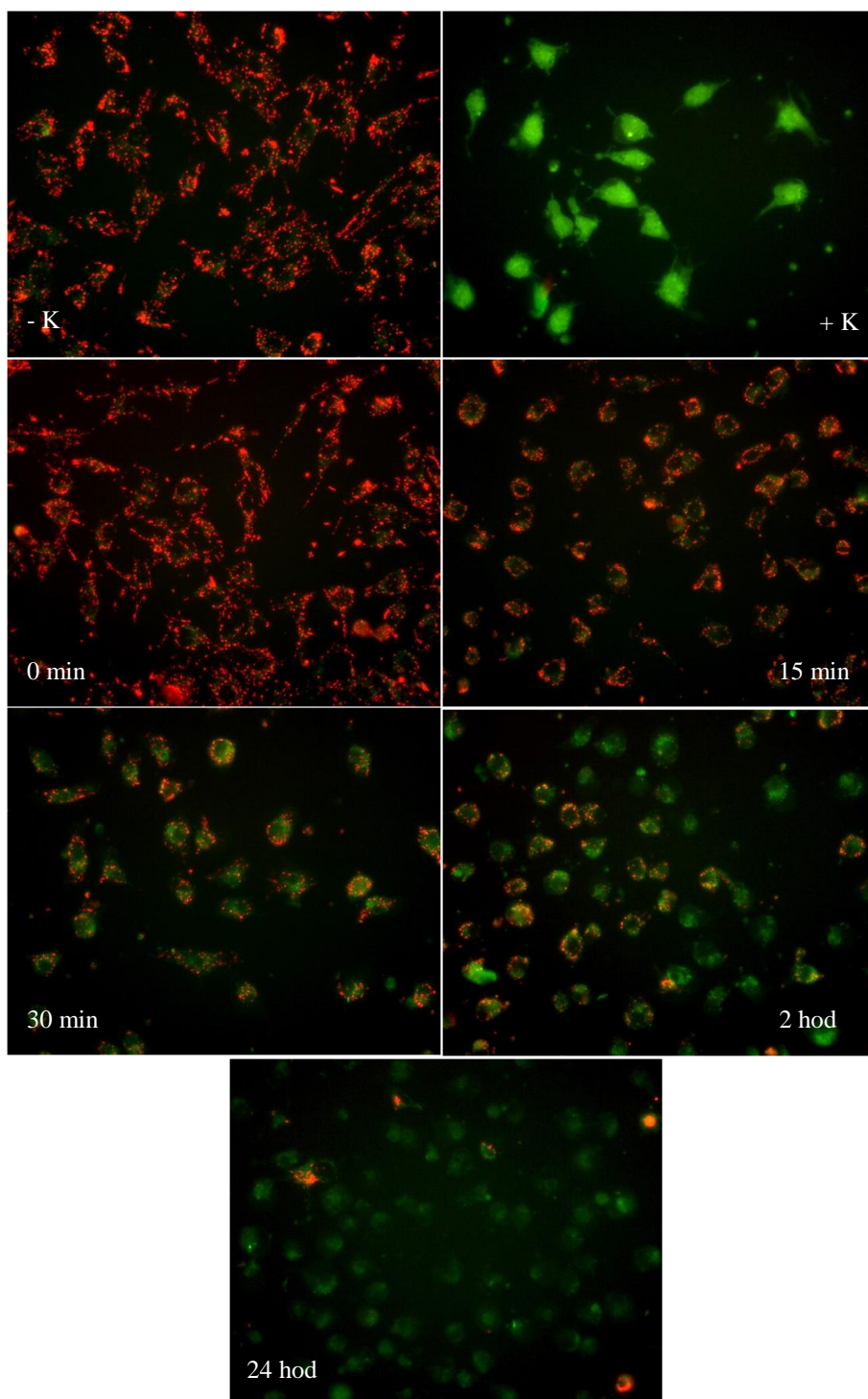
**Obrázek 30** Jádra buněk EA.hy926 zobrazené s použitím fluorescenční sondy Hoechst 33342 a PI – na horních snímcích je vidět rozdíl mezi nepoškozenými buňkami (-K; pouze modrá fluorescence) a buňkami usmrcenými peroxidem vodíku (+K; přítomnost červené fluorescence). Z dalších fotografií je pak patrný nárůst PI pozitivity, který je způsoben poškozením plazmatické membrány buněk cytotoxickými produkty vznikajícími po ozáření a aktivaci PS.

### **9.3.2 Fluorescenční barvení mitochondrií**

K zobrazení funkčnosti mitochondrií byla použita fluorescenční sonda JC1, a to u obou ftalocyaninů – ZIP120Zn (Obr. 31) a ZIP117Zn (Obr. 32). Fotografie byly pořízeny invertovaným fluorescenčním mikroskopem Nikon Eclipse TS100.

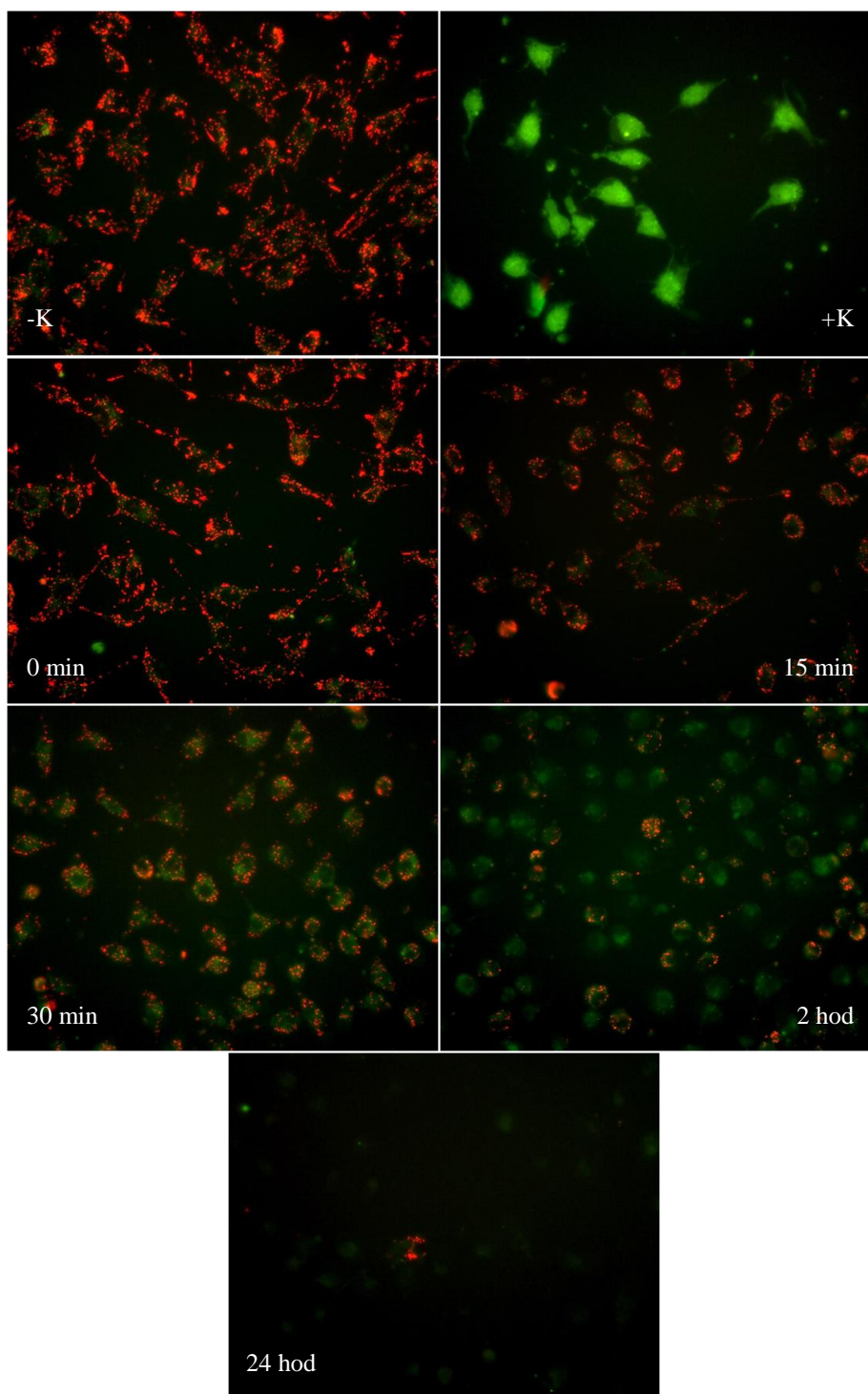
Buňky negativní kontroly a buňky na počátku ozařování (v čase 0 min) vykazují převažující červený fluorescenční signál vydávaný sondou tvořící v mitochondriích agregáty. V buňkách usmrcených  $H_2O_2$  naopak převažuje zelená fluorescence vydávaná monomerní formou sondy uvolněné do cytosolu při depolarizaci mitochondrií. Po ozáření dochází k slábnutí červené a nárůstu zelené fluorescence, což značí narušení potenciálu mitochondrií a poškození buňky.

Pro fotografování byla použita koncentrace obou ftalocyaninů odpovídající jejich  $EC_{85}$ .



**Obrázek 31** Poškození mitochondrií buněk EA.hy926 při VTP s použitím ftalocyaninu ZIP120Zn sledované fluorescenční sondou JC-1 – na prvních dvou fotografiích je opět patrný rozdíl mezi nepoškozenými buňkami (-K; červená fluorescence) a buňkami usmrcenými  $H_2O_2$  (+K, zelená fluorescence). Na dalších snímcích je pak patrný nárůst zelené fluorescence monomerní formy sondy JC1, který je způsoben narušením potenciálu mitochondrií a jejím směřováním ke smrti.





**Obrázek 32** Poškození mitochondrií buněk EA.hy926 při VTP s použitím ftalocyaninu ZIP117Zn sledované fluorescenční sondou JC-1 – míra poškození mitochondrií je detekována zvyšujícím se nárůstem zelené fluorescence monomerní sondy uvolněné z mitochondrií do cytosolu.

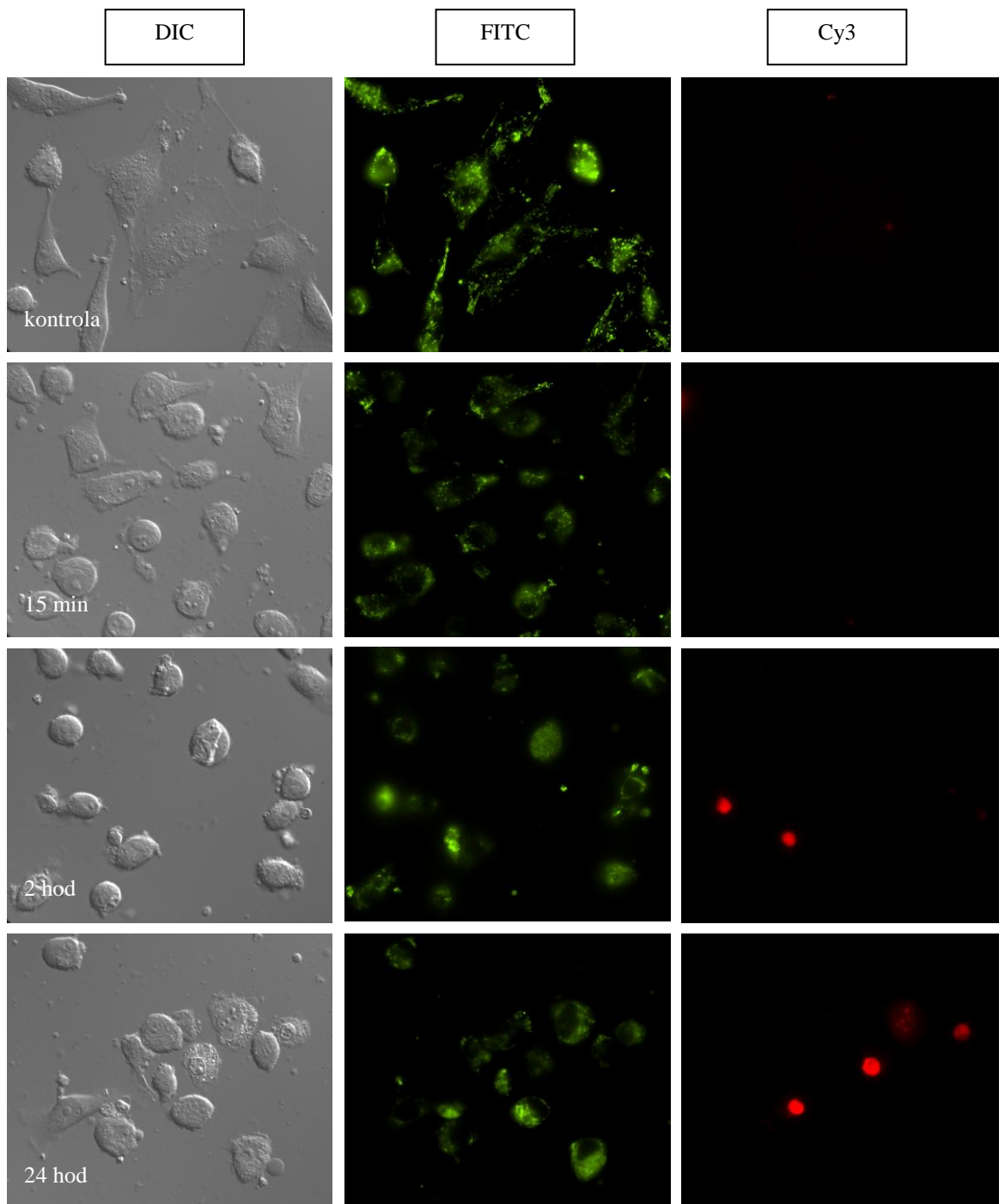


### **9.3.3 Morfologické změny buněk**

Morfologické změny v buňkách EA.hy926, způsobené po aktivaci fotosenzitizéru ZIP120Zn, byly sledovány v diferenciálním interferenčním kontrastu (DIC) a s použitím fluorescenční mikroskopie. K fluorescenčnímu barvení byla použita sonda MitoTracker Green FM (zelené zbarvení mitochondrií), Hoechst 33342 (modré zbarvení jader) a PI (červené zbarvení jader) (Obr. 33). Fotografie byly pořízeny invertovaným fluorescenčním mikroskopem Nikon Ti E.

Na snímcích vlevo lze pozorovat změnu tvaru buňky, který je u živých buněk protáhlý. V důsledku poškození buňky způsobeného VTP dochází k zakulacování buněk, poté ale dochází k otoku a prasknutí plazmatické membrány spojené s uvolněním intracelulárního obsahu do extracelulárního prostoru. To je známkou probíhající nekrózy, kterou potvrzuje i souběžné barvení jader PI (červená fluorescence v pravém sloupci). Mitochondrie (prostřední sloupec) ztrácí svůj typický vláknitý tvar, zakulacují se, až se jejich signál ztrácí (zelený signál se stal difúzním v celé cytoplazmě).

Koncentrace použitá při tomto druhu barvení odpovídala EC<sub>15</sub>.



**Obrázek 33** Změny morfologie buněk EA.hy926 po aplikaci VTP s využitím ftalocyaninu ZIP120Zn – lze pozorovat změnu tvaru buňky z protáhlého až na zakulacený, ale přitom dochází i k otoku, prasknutí buněčné membrány a vylití nitrobuněčného obsahu do vnějšího prostředí, což je známkou probíhající nekrózy. Toto potvrdilo i souběžné barvení jader PI.

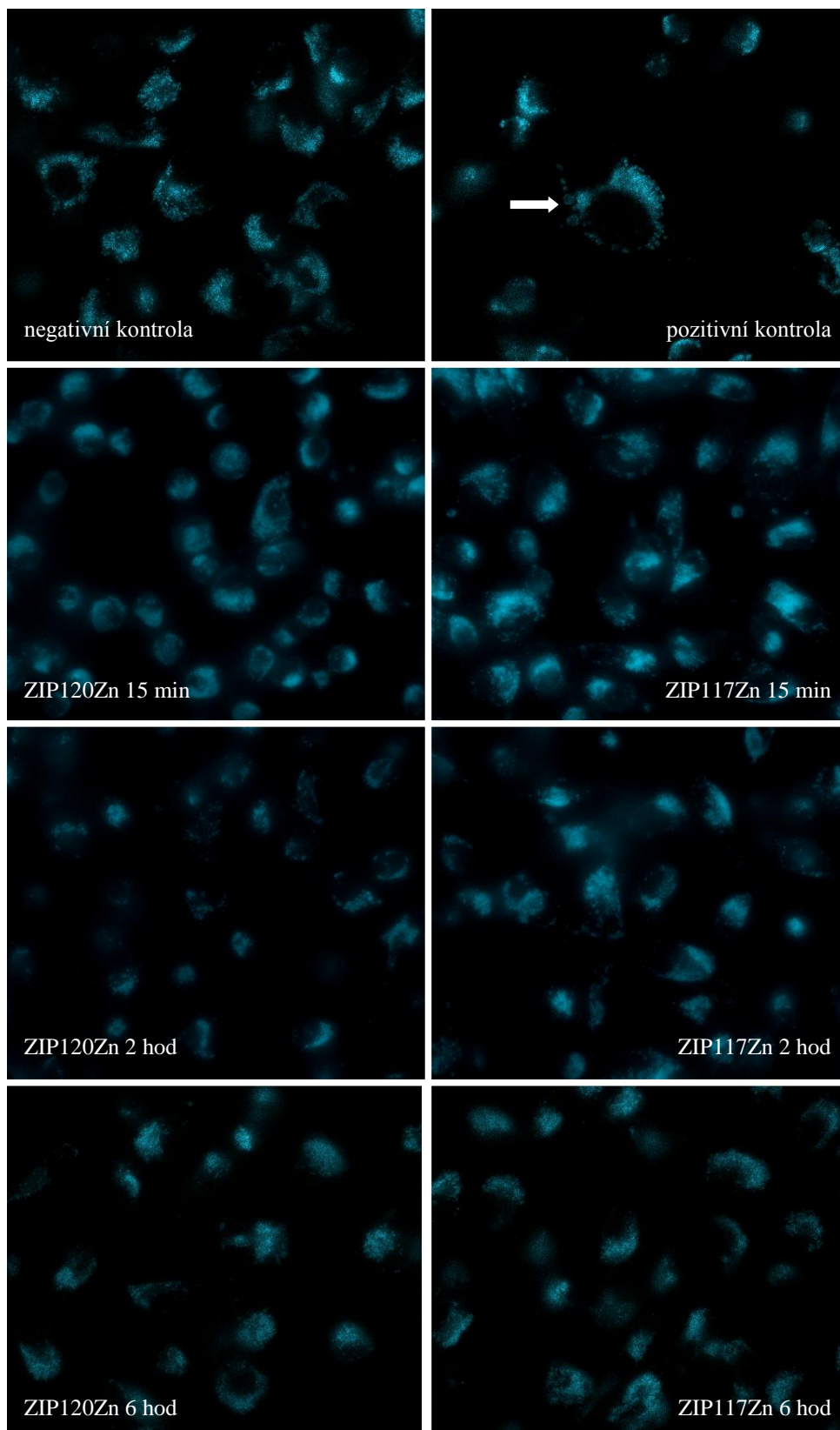
#### **9.3.4 Hodnocení přítomnosti autofagie**

V průběhu hodnocení látek bylo také sledováno, zda se při poškození buněk fotodynamickým procesem objevuje autofagie, ať už jako snaha buňky přežít poškození nebo jako způsob buněčné smrti

Přítomnost autofagozomů byla sledována s pomocí fluorescenční sondy MDC vychytávající se v kyselém prostředí lysozomů a autofagozomů. Jako pozitivní kontrola byl použit rapamycin – inhibitor mTOR, který autofagii vyvolává. Fotografie byly pořízeny invertovaným fluorescenčním mikroskopem Nikon Ti E.

Na snímcích lze vidět lysozomy obarvené fluorescenční sondou MDC. Buňka podstupující autofagii je patrná pouze na snímku pozitivní kontroly při použití rapamycinu (Obr. 34, šipka). Můžeme tedy říci, že u buněčné linie EA.hy926 při použití fotosenzitizerů ZIP120Zn a ZIP117Zn ve VTP *in vitro* autofagie neprobíhá.

Při hodnocení autofagie byly použity koncentrace PS odpovídající hodnotám jejich  $EC_{15}$ .



**Obrázek 34** Hodnocení autofágie u buněčné linie EA.hy926 – autofágie je patrná pouze na snímku pozitivní kontroly (šipka), kde byl k buňkám přidán induktor autofágie, rapamycin. Při použití studovaných látek a metody VTP nebyla autofágie objevena.

## 10 DISKUZE

Nádorová onemocnění patří mezi civilizační choroby dávané do souvislosti s moderní dobou a nezdravým způsobem života (Šíma 2009). Mnohá z těchto onemocnění prozatím nedokážeme účinně vyléčit, proto jsou hledány stále nové metody a látky, které by tomu mohly napomoci.

Fotodynamická terapie je poměrně nová, klinicky schválená, minimálně invazivní terapeutická metoda nacházející uplatnění při léčbě mnoha druhů maligních i nemaligních onemocnění (Agostinis a kol. 2011, Moreira a kol. 2008). Jejím principem je absorpce světla o vhodné vlnové délce molekulou PS a přenos energie fotonů na okolní molekuly, hlavně na kyslík. Cytotoxické látky vznikající v průběhu ozáření, z nichž nejdůležitější je  $^1\text{O}_2$ , pak poškozují okolní buněčné struktury, což nakonec vede k buněčné smrti (Zimcik a kol. 2010).

Destrukce nádorů pomocí PDT probíhá několika mechanismy. Ty zahrnují přímý letální účinek  $^1\text{O}_2$  a dalších ROS na buňky, uzavření cévního zásobení nádoru vedoucí k nedostatku kyslíku a živin a aktivaci imunitní odpovědi vůči nádorovým buňkám (Zimcik a Miletin 2009).

Zaměření terapie na cévy je možno dosáhnout dvěma přístupy: antiangiogenní léčbou, která zamezuje vzniku cév *de novo* nebo dalšími druhy terapií, které jsou spojeny s poškozením již vytvořených cév (Abels 2004, Eichhorn a kol. 2004, Chen a kol. 2006, Kamarulzaman a kol. 2011).

VTP je typem PDT zaměřeným právě na poslední zmíněné, tedy poškození v oblasti již vytvořených cév. Využívá buď kratší D-L interval nebo navázání molekul napomáhajících kumulaci PS v cévním kompartmentu (Kamarulzaman a kol. 2011). Těmito molekulami mohou být různé peptidy, protilátky a další ligandy s vysokou afinitou a specifitou k nově vytvořeným cévám (Chen a kol. 2006). Jednou z vlastností ideálního PS je jeho schopnost kumulovat se selektivně v cílové tkáni, čímž dochází ke zvýšení účinku terapie (Wang a kol. 2013). Proto se pro metodu VTP jako ideální jeví PS hydrofilní, které jsou omezeny pouze na oblast cév a nedochází k jejich extravazaci do okolních tkání (Brandis a kol. 2005).

První molekulou, která byla schválena, a která využívá principy VTP ke svému účinku, byl verteporfin, člen skupiny chlorinů. Indikací, pro kterou byl schválen, je AMD, vedoucí příčina ztráty zraku u lidí nad 50 let ve vyspělých státech. Jejím podkladem je novotvorba abnormálních cév v cévnatce oka (choroidální neovaskularizace) (Allen a kol. 2001). Verteporfin je však těžko rozpustný ve vodě, takže musí být podáván ve formě liposomů (Zimcik a Miletin 2009).

Některé výsledky naznačují, že se jako terapeuticky optimální zdá použití kombinace PDT s VTP, která ji následuje, což ukázal Chen a kol. (2005) u verteporfinu. D-L interval 3 hodiny odpovídal v této studii klasické PDT, kdy se PS po podání do organismu distribuoval do buněk nádoru, zatímco D-L interval 15 minut aplikovaný následně odpovídal metodě VTP, kdy je PS přítomen v cévním kompartmentu a jeho cílem je cévní zásobení nádoru. Použití kombinace těchto dvou intervalů zvyšovalo účinek PDT, protože dochází k poškození, jak nádorových buněk, tak i cév, které jej zásobují živinami a kyslíkem.

Ke tvorbě abnormálních cév dochází také při růstu nádorové tkáně, proto nachází metoda VTP uplatnění i zde a její další vývoj se obrátil spíše tímto směrem.

V současnosti je největší pozornost věnována PS ze skupiny bakteriochlorofylů WST09 (Tookad<sup>®</sup>) a WST11 (Tookad<sup>®</sup> Soluble, Stakel<sup>®</sup>). WST09 reprezentuje hydrofobní (vazba na lipoproteiny) a WST11 hydrofilní (vazba na sérový albumin) derivát bakteriochlorofylu vyvinutý speciálně pro VTP. Oba mají za cíl uzavření cévního systému nádoru. Nádor je ozářen, když je koncentrace léčiva v krvi vysoká, to jest okamžitě po i.v. podání PS (Brandis a kol. 2005, Mazor a kol. 2005).

Tookad<sup>®</sup> byl prvním z těchto léčiv, který vstoupil do klinických hodnocení pro léčbu opakujícího se karcinomu prostaty po selhání radiační terapie. Ale cévní destrukce tímto PS zahrnovala hemoragickou nekrózu, která je v některých orgánech jako mozek či plíce nežádoucí. Navíc hemoragická nekróza může navodit místní zánět a následnou proliferaci nových cév, což může brzdit terapeutický účinek (Brandis a kol. 2005). Z důvodu jeho nízké rozpustnosti ve vodných roztocích, byl podáván ve formě Cremophoru, ten je však také biologicky a farmakologicky aktivní sloučenina a může způsobit nežádoucí účinky (Mazor a kol. 2005).

Tyto nevýhody vedly k přípravě WST11, ve vodě rozpustného derivátu s negativně nabitými zbytky s afinitou k sérovému albuminu. To je pro VTP výhodné, protože tato vazba zvyšuje pravděpodobnost, že PS zůstane přítomen v cévním systému nádoru. (Brandis a kol. 2005, Mazor a kol. 2005). WST11 je účinný a bezpečný PS, který nezpůsobuje zvýšenou permeabilitu cév a na rozdíl od WST09 nenavozuje hemoragickou nekrózu (Brandis a kol. 2005). Pod obchodním názvem Tookad<sup>®</sup> Soluble nyní dokončil třetí fázi klinického hodnocení pro lokální karcinom prostaty (ClinicalTrials.gov - NCT01875393). Další klinické studie třetí fáze hodnotící benefit této molekuly dále probíhá (ClinicalTrials.gov - NCT01310894).

V našich experimentech jsme použili ve vodě rozpustné a neagregující deriváty ftalocyaninů nasyntetizované skupinou doc. PharmDr. Petra Zimčíka, Ph.D. na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv. Ftalocyaniny obecně jsou syntetické makrocyclické látky s fotofyzikálními vlastnostmi výhodnými pro PDT. Typicky absorbují nad 680 nm a mají vysoký výtěžek singletového kyslíku. Nevýhodou je jejich nízká rozpustnost ve vodě a tendence k agregaci, která značně snižuje fotodynamický efekt. Použité sloučeniny obsahují 8 kationických nábojů na substituentech navázaných na jádro Pc v periferních ( $\beta$ ; ZIP120Zn) nebo neperiferních ( $\alpha$ ; ZIP117Zn) pozicích nebo na aza-analogu ftalocyaninu (ZIP65Zn). Kationické náboje těchto sloučenin zvyšují rozpustnost molekul ve vodě a předpokládá se, že redukují agregaci skrz elektrostatické odpudivé síly. Ačkoliv byly nasyntetizovány také hořečnaté komplexy daných látky, v našich experimentech jsme použili pouze zinečnaté komplexy, a to z důvodu vyšších  $\Phi_{\Delta}$ . Látka ZIP117Zn má nejvyšší produkci  $^1\text{O}_2$  (0,91) a nejvýše položené maximum absorpce (756 nm), z tohoto důvodu je pro použití v PDT velmi zajímavá (Machacek a kol. 2015).

Dark toxicita látek byla v našich experimentech hodnocena na endoteliální buněčné linii EA.hy926. U buněk vystavených rostoucím koncentracím látek (až do 1500  $\mu\text{M}$ ) byla hodnocena  $\text{TC}_{50}$ . Nejmenší vlastní toxicitu má ftalocyanin ZIP120Zn, jehož  $\text{TC}_{50}$  přesahuje hodnotu 1500  $\mu\text{M}$ . To odpovídá hodnotám naměřeným Machacek a kol. (2005) na nemaligní buněčné linii 3T3 (myší fibroblasty) a nádorové buněčné linii HeLa. Vyšší dark toxicita však byla pozorována u ostatních studovaných látek. Neperiferně substituovaný ZIP117Zn byl u obou pokusů nejtoxičtější následovaný aza-analogem ZIP65Zn, zatímco periferně substituovaný ZIP120Zn měl více než

o jeden řád nižší toxicitu. Vlastní toxicita látek byla tedy ovlivněna typem makrocyklu a pozicí substituentu. Přičemž ftalocyanin ZIP120Zn může být považován za PS s jednou z nejnižší dark toxicitou zaznamenanou v literatuře (Machacek a kol. 2015), což jsme potvrdili v této práci i experimenty na endoteliální linii EA.hy926.

Hodnocení fotodynamické aktivity látek probíhalo jak na endoteliální buněčné linii EA.hy926, tak i na nádorové buněčné linii HeLa. K fotodynamickému působení všech sloučenin byla citlivější nádorová buněčná linie HeLa. Hodnoty  $EC_{50}$  rostly v pořadí ZIP117Zn, ZIP120Zn, ZIP65Zn pro obě buněčné linie – obdobný cytotoxický efekt vykazovaly tyto PS i v experimentech na izolované lidské buněčné linii HUVEC provedených naší vědeckou skupinou (nepublikované výsledky). Zajímavé je, že fotodynamická aktivita studovaných (aza)ftalocyaninů byla řádově srovnatelná jak u VTP protokolu, tak s využitím klasického PDT protokolu na několika nádorových buněčných liniích (Machacek a kol. 2015). Výsledný poměr  $TC_{50}/IC_{50}$  vyšel u obou buněčných linií nejlépe pro ftalocyanin ZIP120Zn a činil  $> 2645$  pro EA.hy926, resp. 6887 pro HeLa buňky – to z něj dělá spolu s nízkou mírou agregace velice nadějný PS pro případné *in vivo* experimenty.

Po fotodynamické léčbě, poškozené buňky podstupují buněčnou smrt převážně skrz apoptotické nebo nekrotické cesty (Machacek a kol. 2015). Apoptóza je programovaná buněčná smrt vyžadující ATP a je pro ni typické smrštění buňky, vytváření záhybů v membráně (tzv. bleby), kondenzace chromatinu, utváření apoptotických tělísek a vystavení fosfatidylserinu na povrch buňky (Buytaert a kol. 2007). Nekróza je obecně prezentovaná vakuolizací cytoplazmy, otokem a eventuálně rupturou plazmatické membrány (Moreira a kol. 2008, Mroz a kol. 2011).

Typ buněčné smrti spuštěný VTP u endoteliální buněčné EA.hy926 byl dále studován pouze s ftalocyaniny ZIP120Zn a ZIP117Zn, které při předchozích experimentech prokázaly vyšší účinnost. Hodnocení typu buněčné smrti probíhalo jednak průtokovou cytometrií s použitím kombinace PI a Annexinu V-FITC a jednak s pomocí mikroskopických metod. Annexin V-FITC se váže na fosfatidylserin vystavený na povrch buňky v průběhu apoptózy a umožňuje tak detekovat její přítomnost. Díky rozsáhlému poškození buněčných membrán se Annexin V však váže i na buňky podstupující nekrotickou buněčnou smrt. Získané výsledky naznačují, že



nekróza v buněčné smrti vyvolané těmito PS převažuje. Nekrotická buněčná smrt dominovala u těchto látek i v průběhu PDT (Machacek a kol. 2015). Autofagie nebyla zaznamenána ani v jednom případě.

Otázkou je, jak přesně tyto látky v průběhu VTP smrti buňky působí. Například u bakteriochlorinu WST11 byl v *in vitro* experimentech hodnocen také příjem molekuly (uptake) buňkami myšší imortalizované endoteliální buněčné linie H5V. Ten byl velmi rychlý v průběhu prvních 5 – 10 minut inkubace a ustálil se asi po 1 hodině. Jelikož je molekula hydrofilní a v cirkulaci se váže na sérový albumin, uptake do buněk probíhá endocytózou. K dosažení fototoxicity musí komplexy léčiva se sérovým albuminem pravděpodobně vstoupit do lysozomů, kde s největší pravděpodobností disociují. Akumulace hydrofilních senzitizerů v lysozomech byla popsána již dříve (Mazor a kol. 2005).

Buněčný uptake byl hodnocen dříve také u použitých fotosenzitizerů ZIP120Zn a ZIP65Zn, u látky ZIP117Zn nebyl hodnocen kvůli její nízké fluorescenci, která nedovolovala jeho určení. Experimenty byly prováděny na nádorové linii HeLa. Uptake ZIP120Zn byl relativně rychlý v průběhu prvních dvou hodin a dosahoval plateau fáze přibližně za 12 hodin. Kationické Pc ZIP120Zn a ZIP117Zn se do buněk dostávají pravděpodobně endocytózou a jejich subcelulární lokalizací jsou lysozomy (Machacek a kol. 2015). Dynamika příjmu těchto látek do buněčné linie EA.hy926 se předpokládá, že bude obdobná. V době ozáření tedy dochází k toxickému působení látky jen z extracelulárního prostředí v bezprostřední blízkosti cytoplazmatické membrány (krátká životnost singletového kyslíku a ROS).

V nedávné době byl vědci z Kuvajtské univerzity nasyntetizován ve vodě vysoce rozpustný zinečnatý ftalocyanin nesoucí šestnáct kladných nábojů na periferii. Tato látka vykazovala absenci agregace a vysoké výtěžky singletového kyslíku ve vodném prostředí. Ve spolupráci s naší výzkumnou skupinou byla zhodnocena její *in vitro* aktivita. Látka prokázala vynikající účinnost na nádorové buněčné linii HeLa s hodnotou  $EC_{50} = 36,7$  nM, což je ještě o řád vyšší než u neúčinnějšího ftalocyaninu studovaného v této práci. I tento neagregující ftalocyanin vykázal nízkou dark toxicitu na nemaligních 3T3 buňkách ( $TC_{50} = 395$   $\mu$ M) i na HeLa buňkách ( $TC_{50} = 628$   $\mu$ M). Index  $TC_{50}/EC_{50}$  tedy dosahoval hodnot přesahujících 10 000, což je vynikající

předpoklad pro úspěšné léčivo (Makhseed a kol. 2013). Jelikož se jedná o vysoce hydrofilní sloučeninu, mohla by tato látka být podrobena dalšímu hodnocení účinnosti metodou VTP, které se v poslední době dostává čím dál větší pozornosti.

Výsledky předkládané v této práci principiálně souhlasí s již dříve publikovanými poznatky o studovaných ftalocyaninech a jejich aktivitě (Machacek a kol. 2015) i o průběhu VTP. Do budoucna je však potřeba tyto domněnky potvrdit hlubším studiem procesu buněčné smrti *in vitro*, stejně tak potvrdit aktivitu těchto látek *in vivo*, kde se do procesu eradikace nádoru kromě míry účinnosti látek způsobit kolaps cévního zásobení nádoru (kdy ne vždy je nutné endoteliální výstelku zcela zničit) zapojuje i systémová odpověď organismu.

## 11 ZÁVĚRY

- Byl standardizován postup pro hodnocení fotodynamické účinnosti fotosenzitizérů metodou VTP.
- Všechny studované fotosenzitizéry prokázaly schopnost zabíjet buňky v přítomnosti aktivujícího záření u obou typů buněčných linií, přičemž nejlepší výsledků dosáhly ftalocyaninové fotosenzitizéry ZIP120Zn (u buněčné linie HeLa) a ZIP117Zn (u buněčné linie EA.hy926).
- Vlastní toxicita samotných struktur bez přítomnosti aktivujícího světla byla nízká, nejnižší dark toxicita byla zjištěna u ftalocyaninu ZIP120Zn.
- V rámci srovnání fototoxicity a dark toxicity na buněčné linii EA.hy926 nejlepšího poměru  $TC_{50}/EC_{50}$  bylo dosaženo u ftalocyaninu ZIP120Zn a to převážně díky jeho extrémně nízké dark toxicitě.
- Jako hlavní typ buněčné smrti navozené fotosenzitizéry byla určena nekróza. Autofagie u použitého uspořádání experimentu nebyla detekována.
- Ftalocyanin ZIP120Zn má z použitých látek nejvýhodnější vlastnosti, a proto je vhodný pro další podrobnější studium.

## 12 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ABELS, Ch. Targeting of the vascular system of solid tumours by photodynamic therapy (PDT). *Photochemical & photobiological sciences*, 2004, 3(8), 765-771.

AGOSTINIS, P.; BERG, K.; CENGEL, K. A.; FOSTER, T. H.; GIROTTI, A. W.; GOLLNICK, S. O.; HAHN, S. M.; HAMBLIN, M. R.; JUZENIENE, A.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; MROZ, P.; NOWIS, D.; PIETTE, J.; WILSON, B. C.; GOLAB, J. Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2011, 61(4), 250-281.

ALLEN, C. M.; SHARMAN, W. M.; VAN LIER, J. E. Current status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2001, 5(2), 161-169.

ALLISON, R. R.; DOWNIE, G. H.; CUENCA, R.; HU, X.; CHILDS, C. JH.; SIBATA, C. H. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2004, 1(1), 27-42.

ALLISON, R. R.; SIBATA, C. H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2010, 7(2), 61-75.

ARANDA, E.; OWEN, G. I. A semi-quantitative assay to screen for angiogenic compounds and compounds with angiogenic potential using the EA. hy926 endothelial cell line. *Biological research*, 2009, 42(3), 377-389.

AZZOUZI, A. R.; BARRET, E.; MOORE, C. M.; VILLERS, A.; ALLEN, C.; SCHERZ, A.; MUIR G.; WILDT M.; BARBER N. J.; LEBDAI S.; EMBERTON M. **TOOKAD®** Soluble vascular-targeted photodynamic (VTP) therapy: determination of optimal treatment conditions and assessment of effects in patients with localised prostate cancer. *BJU international*, 2013, 112(6), 766-774.

BARANSKA, P.; JERCZYNSKA, H.; PAWLOWSKA, Z.; KOZIOLKIEWICZ, W.; CIERNIEWSKI, C. S. Expression of integrins and adhesive properties of human endothelial cell line EA. hy 926. *Cancer Genomics-Proteomics*, 2005, 2(5), 265-269.

BRANDIS, A.; MAZOR, O.; NEUMARK, E.; ROSENBACH-BELKIN, V.; SALOMON, Y.; SCHERZ, A. Novel water-soluble bacteriochlorophyll derivatives for vascular-targeted photodynamic therapy: Synthesis, solubility, phototoxicity and the effect of serum proteins. *Photochemistry and photobiology*, 2005, 81(4), 983-992.

BROWN, D. M.; KAISER, P. K.; MICHELS, M.; SOUBRANE, G.; HEIER, J. S.; KIM, R. Y.; SY, J. P.; SCHNEIDER S. Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. *New England Journal of Medicine*, 2006, 355(14), 1432-1444.

BUYTAERT, E.; DEWAELE, M.; AGOSTINIS, A. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 2007, 1776(1), 86-107.

CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases *Nature*, 2000, 407(6801), 249-257.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one — photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2004, 1(4), 279-293.

CLINICALTRIALS.GOV *ClinicalTrials.gov: A service of the U.S. National Institutes of Health* [online]. Poslední revize 2015-04-27 [cit. 2015-08-31]. Dostupné z: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=wst11&Search=Search>.

ČESKÝ STATISTICKÝ ÚŘAD, *Úmrtí na novotvary* [online]. Poslední revize 2014-12-20 [cit. 2015-08-31]. Dostupné z: [https://www.czso.cz/csu/czso/13-7222-03--umrti\\_na\\_novotvary](https://www.czso.cz/csu/czso/13-7222-03--umrti_na_novotvary).

EDGELL, C. J.; MCDONALD, C. C.; GRAHAM, J. B. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1983, 80(12), 3734-3737.

EICHHORN, M. E.; STRIETH, S.; DELLIAN, M. Anti-vascular tumor therapy: recent advances, pitfalls and clinical perspectives. *Drug Resistance Updates*, 2004, 7(2), 125-138.

- HENRY, C. M.; HOLLVILLE, E.; MARTIN, S. J. Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. *Methods*, 2013, 61(2), 90-97.
- CHEN, B.; POGUE, B. W.; HOOPEES, P. J.; HASAN, T. Combining vascular and cellular targeting regimens enhances the efficacy of photodynamic therapy. *International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics*, 2005, 61(4), 1216-1226.
- CHEN, B.; POGUE, B. W.; HOOPEES, P. J.; HASAN, T. Vascular and cellular targeting for photodynamic therapy. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, 2006, 16(4), 279-305.
- JOSEFSEN, L. B.; BOYLE R. W. Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. *Metal-Based Drugs*, 2008, 2008: 1-23.
- JOSEFSEN, L. B.; BOYLE, R. W. Unique diagnostic and therapeutic roles of porphyrins and phthalocyanines in photodynamic therapy, imaging and theranostics. *Theranostics*, 2012, 2(9), 916-966.
- KAMARULZAMAN, E. E.; FROCHOT, C.; GUILLEMIN, F.; WAHAB, H. A.; BENACHOUR, H.; BARBERI-HEYOB, M.; VANDERESSE, R. *Vascular-Targeted Photodynamic Therapy (VTP)*. INTECH Open Access Publisher, 2011.
- KESSEL, D. Death pathways associated with photodynamic therapy. *Medical Laser Application*, 2006, 21(4), 219-224.
- LANDRY, J. J. M.; PYL, P. T.; RAUSCH, T.; ZICHNER, T.; TEKKEDIL, M. M.; STUTZ, A. M.; JAUCH, A.; AIYAR, R. S.; PAU, G.; DELHOMME, N.; GAGNEUR, J.; KORBEL, J. O.; HUBER, W.; STEINMETZ, L. M. The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. *G3: Genes/Genomes/Genetics*, 2013, 3(8), 1213-1224.
- LEDVINA, M.; STOKLASOVÁ A.; CERMAN, J. *Biochemie pro studující medicíny*. Praha: Karolinum, 2005.
- LEE, S. H.; JEONG, D.; HAN, Y. S.; BAEK, M. J. Pivotal role of vascular endothelial growth factor pathway in tumor angiogenesis. *Annals of surgical treatment and research*, 2015, 89(1), 1-8.

- LEPOR, H. Vascular targeted photodynamic therapy for localized prostate cancer. *Reviews in urology*, 2008, 10(4), 254-261.
- LU, W.; OGASAWARA, M. A.; HUANG, P. Models of reactive oxygen species in cancer. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 2007, 4(2), 67-73.
- MACDONALD, I. J.; DOUGHERTY, T. J. Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2001, 5(02), 105-129.
- MAČÁK, J.; MAČÁKOVÁ, J. *Patologie*. Grada Publishing, a.s., Praha, 2004.
- MACHACEK, M.; CIDLINA, A.; NOVAKOVA, V.; SVEC, J.; RUDOLF, E.; MILETIN, M.; KUCERA, R.; SIMUNEK, T.; ZIMCIK, P. Far-red-absorbing cationic phthalocyanine photosensitizers: Synthesis and evaluation of the photodynamic anticancer activity and the mode of cell death induction. *Journal of medicinal chemistry*, 2015, 58(4), 1736-1749.
- MAKHSEED, S.; MACHACEK, M.; ALFADLY, W.; TUHL, A.; VINODH, M.; SIMUNEK, T.; NOVAKOVA, V.; KUBAT, P.; RUDOL, E.; ZIMCIK, P. Water-soluble non-aggregating zinc phthalocyanine and in vitro studies for photodynamic therapy. *Chemical Communications*, 2013, 49(95), 11149-11151.
- MANDA, G.; NECHIFOR, M. T.; NEAGU, T. M. Reactive oxygen species, cancer and anti-cancer therapies. *Current Chemical Biology*, 2009, 3(1), 22-46.
- MAZOR, O.; BRANDIS, A.; PLAKS, V.; NEUMARK, E.; ROSENBACH-BELKIN, V.; SALOMON, Y.; SCHERZ, A. WST11, A Novel water-soluble bacteriochlorophyll derivative; Cellular uptake, pharmacokinetics, biodistribution and vascular-targeted photodynamic activity using melanoma tumors as a model. *Photochemistry and photobiology*, 2005, 81(2), 342-351.
- MOREIRA, L. M.; DOS SANTOS, F. V.; LYON, J. P.; MAFTOUM-COSTA, M.; PACHECO-SOARES, C.; DA SILVA, N. S. Photodynamic therapy: porphyrins and phthalocyanines as photosensitizers. *Australian journal of chemistry*, 2008, 61(10), 741-754.

MROZ, P.; YAROSLAVSKY, A.; KHARKWAL, G. B.; HAMBLIN, M. R. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers*, 2011, 3(2), 2516-2539.

ORMOND, A. B.; FREEMAN, H. S. Dye sensitizers for photodynamic therapy. *Materials*, 2013, 6(3), 817-840.

PLAETZER, K.; KIESSLICH, T.; VERWANGER, T.; KRAMMER, B. The modes of cell death induced by PDT: an overview. *Medical Laser Application*, 2003, 18(1), 7-19.

PREISE, D.; OREN, R.; GLINERT, I.; KALCHENKO, V.; JUNG, S.; SCHERZ, A.; SALOMON, Y. Systemic antitumor protection by vascular-targeted photodynamic therapy involves cellular and humoral immunity. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2009, 58(1), 71-84.

QIU, H.; GU, Y.; WANG, Y.; HUANG, N. Twenty years of clinical experience with a new modality of vascular-targeted photodynamic therapy for port wine stains. *Dermatologic Surgery*, 2011, 37(11), 1603-1610.

REPETTO, G.; PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, 2008, 3(7), 1125-1131.

SCHUMACKER, P. T. Reactive oxygen species in cancer cells: Live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell*, 2006, 10(3), 175-176.

SILBERNAGL, S.; LANG, F. *Atlas patofyziologie člověka*. GradaPublishing, spol. s r.o., Praha, 2001.

ŠÍMA, P. Civilizační nemoci aneb Nemoci západního životního stylu. *Mladá Fronta - Zdravotnictví a medicína: Lékařské listy* [online]. 2009, Poslední revize 2009-10-05 [cit. 2015-08-30]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/civilizacni-nemoci-aneb-nemoci-zapadniho-zivotniho-stylu-447075>.

THORPE, P. E.; DERBYSHIRE, E. J. Targeting the vasculature of solid tumours. *Journal of controlled release*, 1997, 48(2), 277-288.

WANG, W.; MORIYAMA, L. T.; BAGNATO, V. S. Photodynamic therapy induced vascular damage: an overview of experimental PDT. *Laser Physics Letters*, 2013, 10(2), 023001.



YADAV, L.; PURI, N.; RASTOGI, V.; SATPUTE, P.; SHARMA, V. Tumour angiogenesis and angiogenic inhibitors: A review. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 2015, 9(6), XE01-XE05.

YOON, I.; LI J. Z.; SHIM Y. K. Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. *Clinical Endoscopy*, 2013, 46(1), 7-23.

ZIMCIK P.; MILETIN M. Photodynamic therapy. In: Lang, A. R. (ed.) *Dyes and Pigments: New Research*, New York: Nova Science Publishers, Inc., 2009, 1-62.

ZIMCIK, P.; MILETIN, M.; RADILOVA, H.; NOVAKOVA, V.; KOPECKY, K.; SVEC, J.; RUDOLF, E. Synthesis, properties and in vitro photodynamic activity of water-soluble azaphthalocyanines and azanaphthalocyanines. *Photochemistry and Photobiology*, 2010, 86(1), 168-175.