

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

BIOLOGICKÉ HODNOCENÍ
FOTODYNAMICKÉ AKTIVITY AMFIFILNÍCH
ANIONICKÝCH FOTOSENZITIZÉRŮ

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2018

Bc. Marie Halašková

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala svému vedoucímu diplomové práce RNDr. Miloslavu Macháčkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky, a především za čas a trpělivost, které mi věnoval. Velké díky patří také členům vědecké skupiny doc. PharmDr. Petra Zimčíka, Ph.D. na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv za spolupráci. Děkuji také celému kolektivu z Katedry biochemických věd za jejich pomoc a vytvoření příjemného pracovního prostředí v laboratořích.

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

V Hradci Králové dne

.....

Podpis

1 ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Marie Halašková
Školitel: RNDr. Miloslav Macháček, Ph.D.
Název diplomové práce: Biologické hodnocení fotodynamické aktivity amfifilních anionických fotosenzitizérů

Nádorová onemocnění jsou celosvětově rozšířeným zdravotním problémem a jednou z nejčastějších příčin úmrtí ve vyspělých státech, proto je věnováno značné úsilí výzkumu a vývoji nových protinádorových léčiv. Běžné konvenční léčebné metody, jako jsou chemoterapie, radioterapie, chirurgické zákroky či jejich kombinace, jsou často spojeny s vážnými vedlejšími účinky a vysokými náklady na léčbu. Fotodynamická terapie (PDT) se proto stává stále více uznávanou alternativní terapií pro léčbu mnoha maligních i nemaligních stavů. PDT je klinicky schválený neinvazivní způsob léčby, který se skládá ze dvou relativně jednoduchých kroků: podání fotosenzitivní látky a následné ozáření tumoru světlem za účelem aktivace fotosenzitizéru (PS). Aktivovaný PS reaguje s molekulárním kyslíkem za tvorby vysoce reaktivních forem kyslíku (ROS). Ty v nádoru způsobí stav oxidačního stresu, který vede ke smrti nádorových buněk, poškození cévního systému nádoru a vyvolání protinádorové imunitní reakce.

Cílem této práce je zhodnocení fotodynamické aktivity nových amfifilních anionických PS na buněčné úrovni v podmínkách *in vitro* a na základě výsledků posouzení jejich schopnosti cytotoxického působení. Cytotoxické experimenty byly prováděny na lidské maligní cervikální buněčné linii HeLa pomocí testu vychytávání neutrální červeně na 96-jamkových destičkách. Hodnocena byla toxicita jak po ozáření aktivujícím světlem, tak i vlastní toxicita látek. U PS byl zjišťován také časový profil prostupu látek do buněk měřením fluorescence v buněčném lyzátu. Detekce morfologických změn na úrovni celých buněk i subcelulárních struktur byla studována s využitím fluorescenční a konfokální laserové rastrovací mikroskopie.

Výsledky jednotlivých experimentů na nádorové buněčné linii HeLa ukázaly u hodnocených PSs na vysokou fotodynamickou aktivitu po aktivaci světlem a také na velmi nízkou vlastní toxicitu všech látek. Nejvhodnějších vlastností dosáhla látka HK22Zn-COONa ($EC_{50} = 0,306 \pm 0,180 \mu\text{M}$, $TC_{50} > 1000 \mu\text{M}$, $TC_{50}/EC_{50} > 3268$). Prostup daných látek do buněk byl rychlý, zejména v prvních dvou hodinách. U všech zkoumaných látek nastaly po fotodynamické aktivaci PS výrazné morfologické změny vedoucí až ke smrti buněk.

2 ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Marie Halašková

Supervisor: RNDr. Miloslav Macháček, Ph.D.

Title of diploma thesis: Biological evaluation of photodynamic activity of amphiphilic anionic photosensitizers

Tumor diseases are a global health problem and one of the most common causes of death in developed countries. Therefore, considerable effort is devoted to research and develop novel anticancer drugs. Common conventional therapies, such as chemotherapy, radiotherapy, surgery, or their combination, are often associated with severe side effects and high treatment costs. Photodynamic therapy (PDT) is therefore being increasingly recognized as an alternative treatment modality for the treatment of many malignant and non-malignant conditions. PDT is a clinically approved non-invasive treatment which consists of two relatively simple procedures: administration of a photosensitive drug and subsequent radiation of the tumor by light to activate the photosensitizer (PS). The activated photosensitizer reacts with molecular oxygen to form highly reactive oxygen species (ROS). This creates a state of oxidative stress in the tumor which leads to tumor cell death, tumor (micro)vasculature shutdown and induction of anti-tumor immune response.

The aim of this work is to evaluate the photodynamic activity of novel amphiphilic anionic PSs at the cellular level under in vitro conditions and based on the results to assess their cytotoxic effect. Cytotoxicity experiments were performed on human malignant cervical cell line HeLa using neutral red uptake assay on 96-well plates. The toxicity experiments were performed both after the irradiation with activating light and without the presence of activating light (dark toxicity). Uptake profiles of PSs to the cells were also performed by measuring fluorescence in the cell lysate. Detection of morphological changes at the level of whole cells and subcellular structures were studied by using a fluorescence and confocal laser scanning microscopy.

The results of individual experiments on the HeLa tumor cell line have shown high photodynamic activity after irradiation and very low inherent toxicity of all studied compounds. The most suitable properties were achieved with HK22Zn-COONa ($EC_{50} = 0,306 \pm 0,180 \mu\text{M}$, $TC_{50} > 1000 \mu\text{M}$, $TC_{50}/EC_{50} > 3268$). Uptake of the substances into the cells was rapid in the first two hours than reaching steady-state. For all investigated substances, photodynamic activation of PS resulted in significant morphological changes indicating ongoing cell death.

3 OBSAH

1	ABSTRAKT	4
2	ABSTRACT.....	6
3	OBSAH.....	8
4	ÚVOD.....	11
5	SEZNAM ZKRATEK	12
6	TEORETICKÁ ČÁST	14
6.1	FOTODYNAMICKÁ TERAPIE	14
6.1.1	Fotodynamická reakce	15
6.1.2	Účinky PDT na nádory	16
6.2	SVĚTLO	22
6.2.1	„Fototerapeutické okno“ tkáně.....	22
6.2.2	Zdroje světla.....	23
6.3	KYSLÍK	24
6.3.1	Reaktivní druhy kyslíku	24
6.3.2	Oxidační stres.....	27
6.4	FOTOSENZITIZÉRY	29
6.4.1	První generace PSs.....	30
6.4.2	Ideální fotosenzitizér.....	31
6.4.3	Druhá generace PSs	32
6.4.4	Třetí generace PSs.....	35
7	CÍLE PRÁCE.....	36
8	METODICKÁ ČÁST	37
8.1	MANIPULAČNÍ VYBAVENÍ PRO PRÁCI S BUNĚČNÝMI LINIEMI	37
8.2	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ PRO MANIPULACI S BUNĚČNÝMI LINIEMI	38

8.3	REAGENCIE A CHEMIKÁLIE	38
8.4	ZKOUMANÉ FOTOSENZITIZÉRY	40
8.5	BUNĚČNÁ KULTURA	42
8.5.1	Buněčná linie HeLa	42
8.5.2	Kultivace	42
8.5.3	Pasážování	42
8.5.4	Stanovení počtu životaschopných buněk	43
8.6	STANOVENÍ CYTOTOXICITY	44
8.6.1	Fototoxicita	44
8.6.2	Dark toxicita	45
8.7	URČENÍ ŽIVOTASCHOPNOSTI BUNĚK TESTEM VYCHYTÁVÁNÍ NEUTRÁLNÍ ČERVENĚ	45
8.8	ČASOVÝ PROFIL PROSTUPU LÁTEK DO BUNĚK	46
8.8.1	Stanovení množství bílkovin	47
8.9	VYHODNOCENÍ DAT	47
8.10	FOTOGRAFICKÁ DOKUMENTACE	48
8.10.1	Subcelulární lokalizace	48
8.10.2	Morfologické změny	48
9	VÝSLEDKY	50
9.1	STANOVENÍ CYTOTOXICITY	50
9.1.1	ZIP82Zn-SO ₃ Na	50
9.1.2	HK18Zn-COONa	51
9.1.3	HK22Zn-COONa	52
9.1.4	Porovnání účinků zkoumaných PSs	53
9.2	ČASOVÝ PROFIL PROSTUPU LÁTEK DO BUNĚK	54
9.3	FOTOGRAFICKÁ DOKUMENTACE	56
9.3.1	Subcelulární lokalizace	56

9.3.2	Morfologické změny	60
10	DISKUZE	68
11	ZÁVĚRY	74
12	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	75

4 ÚVOD

Následující diplomová práce na téma „Biologické hodnocení fotodynamické aktivity amfifilních anionických fotosenzitizerů“ pojednává v teoretické části obecně o PDT, ale i o chování nově zkoumaných látek. PDT je relativně nová vyvíjející se terapeutická metoda zabývající se léčbou různých maligních i nemaligních stavů. Jedná se o klinicky schválenou neinvazivní metodu s minimálním rizikem toxicity pro organismus.

PDT zahrnuje podání fotosenzitivní látky – PS, která se selektivně akumuluje v cílených buňkách. Následně pak dochází k lokálnímu ozáření dané léze viditelným světlem o vhodné vlnové délce a intenzitě. Za přítomnosti kyslíku dojde ke vzniku fotodynamické reakce, jež má letální účinky na nádor a současně i jeho cévní systém. Nezbytným základem pro tuto metodu je tedy přítomnost tří hlavních složek: PS, světla a kyslíku.

Tato práce popisuje základní mechanismy účinku, které umožňují PDT spolehlivou onkologickou léčbu. Zabývá se obecným principem reakce, jednotlivými složkami terapie, biologickými účinky i buněčnou smrtí, a především vývojem a zkoumáním dalších PS.

Cílem mé práce bylo *in vitro* zhodnocení fotodynamické aktivity nově syntetizovaných PS ze skupiny (aza)ftalocyaninů na buněčné úrovni, určení jejich schopnosti cytotoxického působení a detekce morfologických změn vyvolaných buněčnou odpovědí na oxidační stres. Výsledky této studie tak budou moci být využity k podrobnějšímu studiu aktivity těchto látek či případně k *in vivo* experimentům.

5 SEZNAM ZKRATEK

·HO ₂	hydroperoxyl radikál
·O ₂ ⁻	superoxid anion radikál
·OH	hydroxylový radikál
¹ O ₂	singletový kyslík
ALA	5-aminolevulová kyselina (<i>Aminolevulinic Acid</i>)
AzaPc	azaftalocyanin
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
DMEM	kultivační médium (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
DMF	dimethylformamid
EC ₅₀	střední efektivní (terapeutická) koncentrace
EDTA	etylendiaminotetraoctová kyselina (<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>)
ETC	elektronový transportní řetězec (<i>Electron Transport Chain</i>)
FBS	fetální bovinní sérum
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
HpD	derivát hematoporphyrinu (<i>Hematoporphyrin Derivative</i>)
IPL	intenzivní pulzní zdroje světla
LED	světlo emitující diody (<i>Light Emitting Diodes</i>)
MQ-voda	purifikovaná ultračistá voda
mTHPC	metatetrahydroxyfenylchlorin
NIR	blízká infračervená oblast světla (<i>Near Infrared Area</i>)
NP	nanočástice (<i>Nanoparticles</i>)
NR	neutrální červeň (<i>Neutral Red</i>)

NRU	test vychytávání neutrální červeně (<i>Neutral Red Uptake Assay</i>)
P/S	penicilin/streptomycin
PBS	fosfátový pufr (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
Pc	ftalocyanin (<i>Phtalocyanine</i>)
PDT	fotodynamická terapie (<i>Photodynamic Therapy</i>)
PpIX	protoporfyrin IX
PS	fotosenzitizér (<i>Photosensitizer</i>)
ROS	reaktivní formy kyslíku (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
S ₃ AlOHPc	trisulfonovaný hydroxyhlinitý Pc
SCM	kultivační médium – DMEM médium obsahující sérum a další suplementy (<i>Serum Containing Medium</i>)
SFM	DMEM médium bez obsahu séra (<i>Serum Free Medium</i>)
SOD1/2	superoxid dismutasa 1/2
T/E	trypsin/EDTA
TB	trypanová modř (<i>Trypan Blue</i>)
TC ₅₀	střední toxická koncentrace
TNF- α	tumor nekrotizující faktor- α
TPyzPz	tetrapyrazinoporphyrin
ZnPc	zinečnatý ftalocyanin
Φ_F	kvantový výtěžek fluorescence
Φ_Δ	kvantový výtěžek singletového kyslíku

6 TEORETICKÁ ČÁST

6.1 FOTODYNAMICKÁ TERAPIE

Terapeutické vlastnosti světla jsou známy už tisíce let, ovšem teprve v minulém století se rozvinula tzv. fotodynamická terapie. V současné době je PDT klinicky používána v onkologii – k léčbě rakoviny hlavy a krku, mozku, plic, pankreatu, intraperitoneální dutiny, prsu, prostaty a kůže (Dolmans et al., 2003). Je stále více uznávána jako atraktivní alternativní léčba pro povrchové nádory.

PDT je minimálně invazivní léčebná metoda, která se skládá ze dvou relativně jednoduchých procedur. Ty zahrnují nejdříve podání exogenní fotosenzitivní látky, která je selektivně zachycena maligními či premaligními buňkami, a následně ozáření tumoru světlem, jenž způsobí aktivaci PS (Griffin & Lear, 2016; Triesscheijn et al., 2006; Weijer, 2017).

Pro tuto terapii jsou nutné tři základní elementy: PS + světlo + kyslík. Pokud je PS vystavený specifické vlnové délce, dojde k jeho aktivaci a následné reakci s molekulárním kyslíkem, což způsobí lokální produkci ROS, včetně vysoce škodlivého singletového kyslíku ($^1\text{O}_2$). To vytváří stav oxidačního stresu v tumoru, který vede ke specifické destrukci neoplastických buněk a k přerušení (mikro)vaskulárního systému nádoru. Tímto tak dojde k vyčerpání kyslíku a živin v tumoru a vyvolání protinádorové imunitní odpovědi (Savoia et al., 2015; Weijer, 2017).

PDT je obecně dobře tolerována, s minimálními vedlejšími efekty. Selektivita vychytávání PS plus trvání a hloubka působení světelného zdroje minimalizují poškození okolní zdravé tkáně. Ve skutečnosti má PDT malý potenciál způsobit poruchu DNA, mutaci či karcinogenezi (Savoia et al., 2015).

Účinnost je vysoká u malých povrchových nádorů a, s výjimkou dočasné fotosenzitivity pokožky, neexistují dlouhodobé vedlejší účinky (pokud jsou dodržovány příslušné protokoly). Zotavení nastává s malou nebo žádnou jizvou a procedury mohou být opakovány bez kumulativní toxicity. PDT se však v současné době nabízí jen v několika vybraných centrech, ačkoliv se pomalu stává přijatelnou alternativou ke konvenční léčbě rakoviny (Triesscheijn et al., 2006).

6.1.1 Fotodynamická reakce

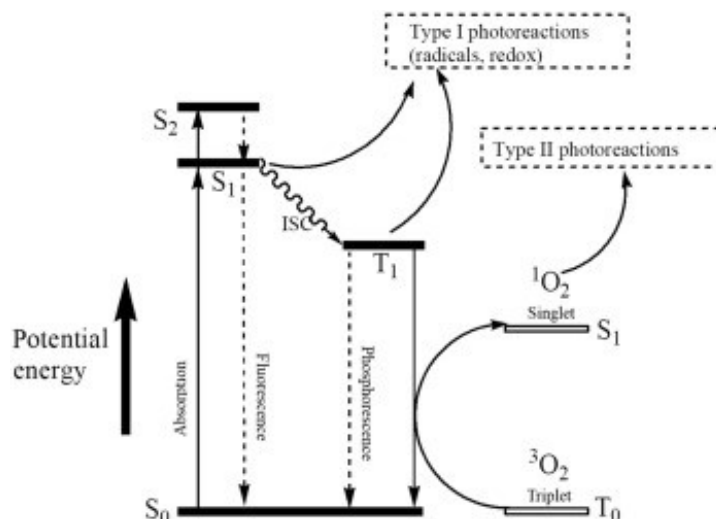
PDT vyžaduje přítomnost tří základních elementů: 1) PS, zodpovědný za senzitivitu nemocné tkáně, 2) zdroj světla způsobující mobilizaci PS a 3) kyslík rozptýlený v ošetřované tkáni. Lze říci, že PDT spoléhá na interakci mezi těmito složkami a její účinnost je přímo závislá na jejich kooperaci (Oniszczyk et al., 2016).

Jestliže je PS podán pacientovi a léčené místo je ozářeno světlem o vhodné vlnové délce, dojde k aktivaci PS ze základního singletového stavu na singletový stav excitovaný. Z tohoto stavu se látka může rozložit přímo zpět na základní stav vyzářením fluorescence, což je vlastnost, která může být klinicky použita k fotodetekci. K dosažení terapeutického fotodynamického efektu však musí být PS podroben elektronové spinové konverzi do jeho tripletového stavu.

Excitovaný tripletový stav dovede vyvolat dva druhy reakcí:

Typ I: V přítomnosti kyslíku, excitovaná molekula může reagovat přímo se substrátem (jako je buněčná membrána či molekula) a přenášet vodíkový proton nebo elektron za vzniku radikálů a radikálových iontů. Tyto radikály rychle interagují s kyslíkem, což má za následek produkci vysoce reaktivních kyslíkových produktů (superoxid anion radikál $\cdot\text{O}_2^-$, hydroxylový radikál $\cdot\text{OH}$, peroxid vodíku H_2O_2).

Typ II: Excitovaný tripletový PS může přenést jeho energii přímo na kyslík za tvorby $^1\text{O}_2$, což je nejvíce škodlivý druh vznikající během PDT. Je velmi obtížné rozlišit dohromady tyto dva reakční mechanismy (Dolmans et al., 2003; Khandge et al., 2013; Triesscheijn et al., 2006). Reakce jsou znázorněny na **Obr. 1** pomocí modifikovaného Jablonského diagramu.



Obr. 1 Fotochemické reakce typu I a II; S_0 základní stav PS, $S_1/2$ excitovaný singletový stav PS, T_1 excitovaný tripletový stav PS, ISC mezisystémový přechod (Zhang et al., 2017).

Tvorba ROS probíhá pouze v části tkání, kde je kumulativní hladina PS, světla a kyslíku. Reaktivní molekuly napadají nádorové buňky (či jiný typ maligních buněk), což má za následek jejich poškození a smrt (Oniszcuk et al., 2016).

Oba typy reakcí (I i II) se objevují současně. Poměr mezi těmito procesy závisí na typu použitého PS, koncentracích substrátu a kyslíku, jakož i na vazebné afinitě PS k substrátu. Vzhledem k vysoké reaktivitě a krátké době života ROS, jsou účinky PDT ovlivněny pouze buňky, které se nacházejí blízko oblasti produkce ROS (oblasti lokalizace PS). Doba života 1O_2 v biologických systémech je < 40 ns a poloměr působení 1O_2 je < 20 nm.

Vzhledem k tomu, že účinky téměř všech fotodynamických látek jsou závislé na kyslíku, fotosenzibilita se obvykle nevyskytuje v anoxických oblastech tkáně. *In vivo* studie ukázaly, že indukce tkáňové hypoxie zamezila PDT účinku porfyrinů (Dolmans et al., 2003; Moan & Berg, 1991).

6.1.2 Účinky PDT na nádory

V biologickém prostředí mohou reaktivní molekuly vytvořené fotodynamickým procesem reagovat s velkým množstvím biomolekul, především s proteiny, nukleovými kyselinami a lipidy. Tři hlavní procesy, kterými ROS přispívají k ničení nádorů u PDT jsou 1) přímé nevratné poškození nádorové buňky, což vede k nekróze, apoptóze nebo

autofagii, 2) ischemie nádorové tkáně následující po cévním poranění vyvolaném PDT, a 3) aktivace imunitních odpovědí namířených proti tumorovým antigenům (Dobson et al., 2018; Zhang et al., 2017).

Ačkoliv PDT může indukovat mnoho buněčných a molekulárních signálních drah v buňkách, jeho hlavním účelem je vyvolat buněčnou smrt. Koncentrace, fyzikálně-chemické vlastnosti a subcelulární lokalizace PS, koncentrace kyslíku, vhodná vlnová délka a intenzita světla, stejně jako specifické vlastnosti buněčného typu mohou všechny ovlivňovat způsob a rozsah buněčné smrti (Robertson et al., 2009).

6.1.2.1 Způsoby buněčné smrti

PDT je schopná vyvolat tři hlavní druhy buněčné smrti: apoptózu, nekrózu a s autofagií spojenou smrt buňky (Agostinis et al., 2011). Naštěstí se degradace nádorů může uskutečnit jak programovanými (např. apoptotickými) cestami, tak i neprogramovanými (nekrotickými) cestami, neboť některé tumory mají vyvinuté genetické mutace eliminující nebo minimalizující apoptózu (Allison & Moghissi, 2013).

Poškození DNA bylo prokázáno v mnoha studiích při *in vitro* PDT, nicméně tato porucha DNA nebyla přímo spojená s letálními účinky (Robertson et al., 2009). ROS může způsobit oxidační poškození DNA bází, zlomy vláken a příčné vazby (cross-links). Avšak poškození DNA vyvolané PDT závisí nejen na mnoha fotoreakčních faktorech, ale také na buněčných mechanismech reparace a přežití. Ve srovnání s ionizujícím zářením, se nezdá být porucha DNA vyvolaná PDT letální a to kvůli rychlé obnově léčených buněk. Takže účinky PDT na buněčnou smrt nejsou přímo spojeny s tímto poškozením DNA (Y. Liu et al., 2017).

Nekróza, známá jako náhodná buněčná smrt způsobená fyzikálním či chemickým poškozením, je prudká a rychlá forma degradace postihující rozsáhlé buněčné populace. *In vitro* je charakterizována cytoplazmatickým otokem, devastací organel a narušením plazmatické membrány, což následně vede k uvolnění intracelulárního obsahu a v případech *in vivo* také k zánětu (Y. Liu et al., 2017; Robertson et al., 2009). Dříve byla nekróza charakterizována jako neřízený proces, ovšem dlouhodobé studie tuto teorii změnily. Jak Festjens *et al.* naznačují, nekróza může být dobře kontrolovaná a programovaná jako na kaspasách-závislá apoptóza. Hlavní roli v šíření a provádění nekrotické smrti buněk mají vápník a ROS, které

způsobují poškození proteinů, lipidů a DNA, a vedou tak k narušení organel a celistvosti buněk. Umírající buňky iniciují prozánětlivé signalizační kaskády aktivním uvolňováním zánětlivých cytokinů a vyplavením jejich obsahu při lýze (Oniszczyk et al., 2016). Tento únik poté způsobí letální poškození v okolních buňkách a vytvoří místní i systémovou reakci. Obecně platí, že při použití vysoké intenzity světla podstupují nádorové buňky rychle nekrózu. Destrukce buněčné a subcelulární membrány je rychlá (Allison & Moghissi, 2013).

Jiný typ buněčné smrti nazývaný apoptóza (nejznámější typ programované smrti), lze identifikovat v jednotlivých buňkách, které jsou obvykle obklopeny zdravými sousedními buňkami a jsou charakteristické smršťováním buněk. Apoptóza není tak rychlá jako nekróza, organely a plazmatická membrána mají tendenci udržovat svou strukturu po delší dobu. Základem mechanismu je kaskáda, která vede k poškození dalších neporušených buněk v okolí apoptotické buňky. Tento typ buněčného poškození znamená selektivní odstranění jedinců bez kompletního narušení tkáně. *In vitro* jsou apoptotické buňky obvykle rozděleny do sférických váčků uzavřených vícenásobnými membránami – tzv. apoptotická tělíška. Ta jsou poté *in vivo* zachytávána fagocyty, čímž předcházejí zánětu a buňky umírají imunologicky řízeným způsobem. Apoptóza vyžaduje transkripční aktivaci specifických genů, zahrnující aktivaci endonukleas, s následnou degradací DNA na oligonukleozomální fragmenty, a aktivaci kaspas. Takový způsob poškození buněk je pro organismus bezpečnější, zejména v případě velkých nádorů a nádorů mozku (Oniszczyk et al., 2016; Robertson et al., 2009).

Fotodegradace buněk může také vést ke stimulaci autofagie. Jedná se o specifický způsob poškození buněk využívající degradaci přebytečných či porušených buněčných elementů. Tento typ je zvláště významným pro léčbu nádorů. Hlavním cílem autofagie je homeostáza, avšak v mnoha případech může tento proces vést ke zničení celé buňky. Jedná se o lyzosomální dráhu pro degradaci a recyklaci intracelulárních proteinů a organel. Autofagie může být stimulována různými stresovými signály, včetně oxidačního stresu. Tento proces může mít jak cytoprotektivní tak i cytotoxickou roli po nádorových chemoterapiích, které zahrnují ROS jako primární poškozující látky. V zájmu podpory přežití buněk může být autofagie považována za obranný systém proti PDT. Autofagie a její vzájemné vztahy s apoptózou je rozhodující pro přežití buněk či naopak jejich smrt. Takto vyvolaná buněčná smrt může nastat, jestliže je inhibována

apoptóza nebo pokud se buňky pokoušejí recyklovat poškozené složky nad rámec jejich schopnosti regenerace (Agostinis et al., 2011; Oniszczuk et al., 2016).

Obecně se během PDT apoptóza vyskytuje téměř současně s nekrózou a hlavní způsob buněčné smrti závisí na mnoha faktorech jako je koncentrace PS, lokalizace PS a dávky PDT. Například, pokud jsou PSs lokalizovány v endoplazmatickém retikulu nebo mitochondriích, smrt buněk nastane přes apoptotickou cestu. Zatímco u PSs umístěných v plazmatické membráně či lysosomech si buňky mohou „zvolit“ alternativní cesty buněčné smrti – nekrotická nebo autofagická. A podobně, vyšší dávky PDT vedou spíše k nekrotické buněčné smrti, kdežto u nižších dávek se objevuje apoptóza (Y. Liu et al., 2017).

Předpokládá se, že PS se přednostně soustředí v rychle se dělících maligních buňkách, přičemž okolní normální tkáň si zachovává jen malé množství PS. V ideálním případě je PDT smrtelná pouze pro tumory bez ovlivnění zdravé tkáně. Ovšem ve skutečnosti může být jakákoli buňka obsahující PS (aktivovaný) podrobena nekróze nebo apoptóze. Pokud je tedy normální tkáň, obsahující významné množství PS, vystavena působení světla, lze očekávat závažné poškození tkáně (např. fotosenzitivitu kůže) (Allison & Moghissi, 2013).

6.1.2.2 Cévní poškození

Životaschopnost nádorových buněk závisí také na množství živin dodávaných krevními cévami. Navíc tvorba a udržování krevních cév je závislá i na růstových faktorech, které jsou produkovány nádorovými nebo hostitelskými buňkami. Zaměření na cévní systém tumoru je proto jedním z příznivých přístupů k léčbě rakoviny (Dolmans et al., 2003). Tento přístup je účinnější, snadnější v přístupu k nádorovým buňkám a má nižší pravděpodobnost rozvoje lékové rezistence, ve srovnání s konvenčními metodami, které jsou cílené na buňky.

Bylo prokázáno, že terapie zaměřená na cévy produkuje intravaskulárně ROS, zejména $^1\text{O}_2$. Předpokládá se, že tato molekula je příčinou následných strukturálních a funkčních změn cév. V případě nádorové terapie je hlavním cílem vaskulárního mechanismu maximální buněčné usmrcování, které je indukované přerušením cévního systému tumoru. Vaskulární zaměření je založeno na místně řízené dodávce PS do cévního systému, po kterém následuje světelné ozáření pro vyvolání místně

specifických vaskulárních fotosenzitivních účinků. Aktivace PS v nádorové tkáni může vést k přímému poškození endotelových buněk, po kterém následuje smrt tumoru skrze nedostatek kyslíku a živin. Jak zdůrazňují vědci, objasnění těchto mechanismů je velmi komplikované, protože zahrnuje mnoho cílů v krevních buňkách a cévách, které jsou vzájemně propojeny v komplexu kaskádovitých událostí (Y. Liu et al., 2017; Oniszczuk et al., 2016).

Stejně jako u nádoru, i v cévním systému PS vytvoří fotodynamickou reakci, je-li aktivován světlem o vhodné vlnové délce. Jestliže jsou některé cílové molekuly, jako je albumin nebo lipoprotein, vázány na PS, pak se stanou bližší cévním endotelovým buňkám v tkáni. Nastane několik událostí. Narušením cévních stěn dojde k zastavení průtoku krve do tumoru a nastane zde nedostatek kyslíku. Pokud k tomu dojde, lze očekávat nekrózu jak u zúčastněných krevních cév, tak i u okolních nádorových buněk. Uvolňování toxických látek, přebytku vápníku a dalších intracelulárních zbytků buněk vede k zablokování a zhroucení cévního zásobování nádoru. Trombocyty se aktivují a agregují. Celkově lze tedy říci, že rychlá ztráta přívodu krve společně s lýzou nádorových a endotelových buněk se pro tumor stává letální. Možná je také méně intenzivní reakce, při níž světlo proniká nižší fluencí. V takovém případě se mohou v cévním systému objevit poškození vedoucí k apoptóze, což opět ústí v hypoxii a destrukci nádoru, avšak bez cytokinové a imunitní aktivace (Allison & Moghissi, 2013; Y. Liu et al., 2017).

Klinicky dochází v neovaskulárních cévách jak k apoptóze, tak k nekróze. Tento proces významně přispívá k destrukci nádorových buněk nejen přímo nedostatkem krve a hypoxií, ale také uvolňováním biologicky aktivních látek jako jsou tromboxany, látky způsobující agregaci trombocytů a cytokiny, které také aktivují imunitní systém (Allison & Moghissi, 2013). Poškození cév, které se vyskytuje po ukončení PDT, přispívá k dlouhodobé kontrole nádorů.

Mechanismus, který je základem vaskulárních účinků během PDT, se velmi liší u různých PS. Photofrin® vede ke konstrikci cév, úniku makromolekul z cév, adhezi leukocytů a tvorbě trombů, vše patrně spojené s aktivací a uvolňováním tromboxanu. PDT s určitými ftalocyaninovými deriváty způsobuje zejména vaskulární hyperpermeabilitu a PDT s mono-L-aspartyl chlorinem *e6* vede ke stáze krevního toku především kvůli agregaci krevních destiček. Všechny tyto účinky mohou zahrnovat

komponenty související s poškozením cévního endotelu. PDT může také vést ke konstrikci cév prostřednictvím inhibice produkce či uvolňování oxidu dusnatého endotelem (Dougherty et al., 1998).

6.1.2.3 Imunitní odpověď

PDT je úzce spojena s imunitním systémem. Lze říci, že PS, cévní a imunitní systém vytváří společně skupinu bojující s nádorovými buňkami. Jak vědci naznačují, PDT indukuje modulaci imunitního systému, buď jeho stimulací, zprostředkovanou NK buňkami a makrofágy, nebo potlačením. Volné radikály a oxidační stres objevující se během PDT vedou k signální transdukcí v buňce, která je zodpovědná za produkci stresem indukovaných proteinů, aktivaci genů regulujících apoptózu a genovou expresi cytokinů (Oniszczuk et al., 2016). Je pravděpodobné, že dlouhodobá kontrola nádorů je kombinací přímých účinků PDT na lézi a její cévní systém společně s upregulací imunitního systému.

Jakmile PDT indukuje nekrózu nádorů a jejich cévního systému, dojde k iniciaci také imunitní kaskády. Z postižené oblasti dochází k uvolnění zánětlivých mediátorů (Allison & Moghissi, 2013). Tento zánětlivý proces je zprostředkován faktory, jako jsou vazoaktivní látky, složky komplementu a srážecí kaskády, proteiny akutní fáze, proteinasy, peroxidasy, ROS, chemoatraktanty leukocytů, cytokiny, růstové faktory a další imunoregulátory. Bylo prokázáno, že v reakci na PDT je spuštěna upregulace zánětlivých cytokinů interleukin IL-6 a IL-1, ale nikoliv tumor nekrotizující faktor- α (TNF- α). V roce 1996 Wil de Vree *et al.* také uvedli, že PDT aktivuje akumulaci neutrofilů, která zpomaluje růst nádoru (Dolmans et al., 2003). Uvolnění mediátorů stimuluje aktivaci různých bílých krvinek, včetně neutrofilů a makrofágů, které se shromažďují v oblasti léčby.

Počáteční kritický krok pro vývoj nádorově specifické imunity může být zprostředkován s nádory asociovanými makrofágy a/nebo dendritickými buňkami, jako antigen prezentujícími buňkami. Tyto buňky mají tendenci fagocytovat velké množství zabitých nebo poškozených nádorových buněk a prezentují specifické proteiny z těchto tumorů CD4 pomocným T-lymfocytům. Ty následně aktivují CD8 cytotoxické T-lymfocyty. S generací CD4 a CD8 T-lymfocytů mohou být nádorové buňky, jako jejich cíle, účinně rozpoznávány pro aktivovanou imunoterapii nádorů.

Ačkoliv léčba PDT je lokalizována v nádorové lézi, která může přímo zabíjet nádor, účinky PDT mohou mít i systémovou povahu kvůli indukované imunitní reakci rozpoznávající a ničící nádorové buňky během dlouhodobé destrukce tumoru. Tato imunitní reakce se tedy může objevit také v regionální a vzdálené lymfatické tkáni. Cytotoxické T-lymfocyty nemusí způsobit pouze nekrózu, ale mohou také indukovat apoptotické dráhy vždy, když se objeví nádorové buňky, dokonce i po ukončení PDT (Allison & Moghissi, 2013; Y. Liu et al., 2017).

Klinicky, pacienti léčení pomocí PDT vykazují zvýšené hladiny různých cytokinů. A také histologické hodnocení léčených nádorů rutinně vykazuje infiltraci imunitními buňkami, která opět ukazuje na imunomodulační účinek PDT (Allison & Moghissi, 2013).

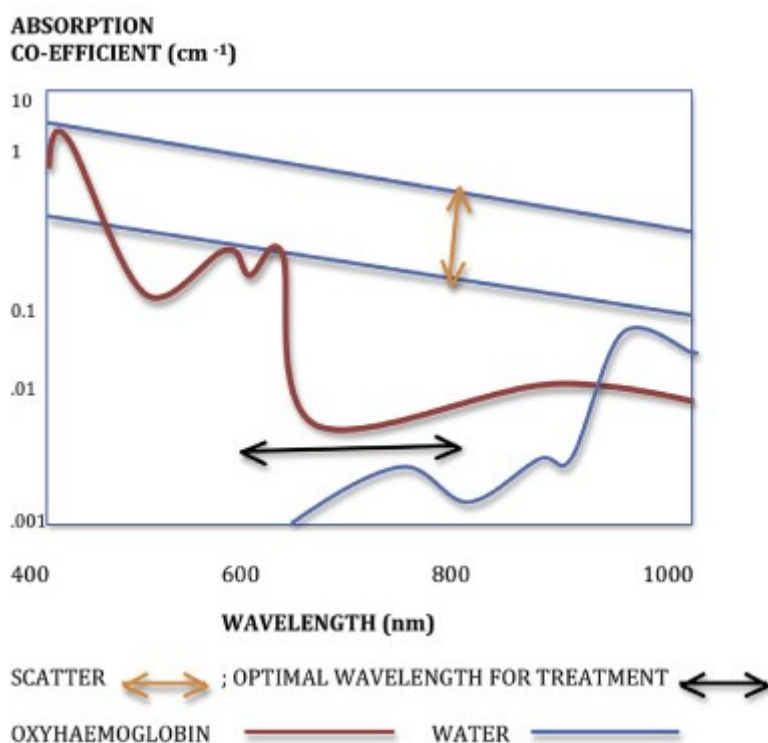
6.2 SVĚTLO

Primárním požadavkem při léčbě lézí pomocí PDT je zajistit, aby cílovým tkáním bylo dodáno dostatečné množství homogenního světla. Každý PS má svou optimální vlnovou délku a intenzitu (fluenci) světla nezbytnou pro aktivaci. Výběr světelného zdroje by proto měl být založen na absorpci PS, lokalizaci, velikosti a dostupnosti lézí, a vlastnostech tkáně. Klinická účinnost PDT závisí na komplexní dozimetrii, zahrnující celkovou dávku, dobu expozice a způsob dodávání světla. Odpověď PDT ovlivňuje také tok světla (Dobson et al., 2018), který byl identifikován jako důležitý modulátor tkáňové oxygenace a výsledku léčby. Vliv toku světla není omezen pouze cytocidními účinky, ale může být také pozorován v subletálních podmínkách, jako je třeba permeabilita cév (Henderson et al., 2006).

6.2.1 „Fototerapeutické okno“ tkáně

Většina PSs má tendenci mít silnou absorpci ve viditelné oblasti. Nicméně naše biologické tkáně s mnoha endogenními chromofory (hemoglobin, myoglobin, cytochromy, HbO₂, bilirubin, NADH, melanin a další) mohou do značné míry absorbovat viditelné světlo, při vlnových délkách delších než 320 nm. Zatímco nehomogenní struktury můžou mít vliv na šíření světelného paprsku a ztrátu jeho směru. Rozptýlení světla kolagenními vlákny určuje převážně hloubku, do které tyto vlnové

délky pronikají do pokožky. Mezi 600 – 1300 nm existuje tzv. „optické okno“ tkáně, které nabízí možnost ošetření velkých objemů tkání pomocí určitých PSs s dlouhou vlnovou délkou. Správná volba vlnové délky umožňuje určitý výběr tkáňových vrstev, které mají být přímo ovlivněny (Anderson & Parrish, 1981; Y. Liu et al., 2017; Yoon et al., 2013). Vlnová délka světla použitá pro PDT je typicky v rozmezí 600 – 800 nm – „terapeutické okno“ (**Obr. 2**). V tomto rozsahu vlnových délek je energie každého fotonu (1,5 eV) dostačující k excitaci PS a tvorbě $^1\text{O}_2$, a přesto dostatečně nízká k tomu, aby světlo proniklo do hloubky až 2 cm tkáně (Dobson et al., 2018).



Obr. 2 Absorpční spektrum pro PDT (Banerjee et al., 2017).

6.2.2 Zdroje světla

V PDT může být využíváno mnoho různých zdrojů světla. Mezi ně patří zejména širokospektrální světelné zdroje s kontinuální vlnou nebo lampy (bílé, modré, červené nebo zelené světlo), lasery, intenzivní pulzní zdroje světla (IPL), filtrové xenonové obloukové lampy, kovové halogenidové nebo fluorescenční lampy, a nověji také světlo emitující diody (LED) (Wen et al., 2017). Jedním zřejmým zdrojem je také slunce, kdy několik nedávných studií prokázalo účinnost i denního světla u PDT.

Lasery jsou jedním z hlavních zdrojů světla používaných pro PDT. Vyzařují světlo o přesných vlnových délkách ve snadno zaměřených paprscích a jsou tak nejvíce koherentními zdroji světla pro PDT. Moderní diodové lasery jsou kompaktní, přenosné a s vysokým výkonem. Nicméně tyto diodové lasery nabízejí pouze jednu výstupní vlnovou délku, což limituje jejich univerzálnost. Oproti tomu LED jsou levnější, menší, lehké a vyžadují podstatně méně energie než lasery.

Důležitou roli v PDT hraje také vývoj technologie optických vláken. Úspěšná PDT vyžaduje přesné dodání světla ze zdroje do cíle a jeho homogenní distribuci. Optická vlákna byla přizpůsobena tak, aby vyhovovala požadavkům na osvětlení v různých lokalizacích (Dobson et al., 2018; Triesscheijn et al., 2006; Yoon et al., 2013).

6.3 KYSLÍK

6.3.1 Reaktivní druhy kyslíku

PDT, jako na kyslíku závislá reakce, rychle spotřebovává velké množství kyslíku v tkáni pro tvorbu ROS. To může porušit endotelové buňky, což vede k částečnému nebo úplnému vaskulárnímu poškození a poté k potenciaci hypoxie (Y. Liu et al., 2017).

ROS hrají v organismu dvojí roli. Jsou potřebné jako signální molekuly pro mnoho důležitých reakcí při udržování fyziologických funkcí, ale jsou také toxickými vedlejšími produkty aerobního metabolismu. Nedávné studie ukázaly, že ROS jsou nezbytné pro progresi několika základních biologických procesů včetně buněčné proliferace a diferenciaci, metabolická adaptace a regulace získané i vrozené imunity. Kromě toho se nyní buněčná smrt považuje za výsledek fyziologické nebo programované dráhy smrti buněk spouštěnou prostřednictvím ROS. Za hlavní cíle ROS během oxidačního stresu jsou považovány DNA, RNA, proteiny a lipidy. Různé ROS mají odlišné stupně reaktivity vůči těmto buněčným složkám. Dostupnost volného železa ve formě Fe^{2+} je považována za nejvhodnější pro ROS toxicitu vzhledem k roli železa ve Fentonově reakci, která vede k tvorbě hydroxylových radikálů (Glasauer & Chandel, 2013; Mittler, 2017).

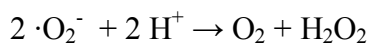
ROS jsou reprezentovány jak volnými radikály, tak i neradikálovými oxygenovanými molekulami. Zahrnují $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$ a $^1\text{O}_2$, z nichž všechny mají přirozené chemické vlastnosti poskytující reaktivitu k různým biologickým cílům. Mimo to se setkáváme také i s reaktivními druhy dusíku, uhlíku, halogenů, železa, mědi a síry. Oxidační stres a porucha redoxní rovnováhy mohou být přiřazeny těmto radikálovým druhům (Lushchak, 2014; Pisoschi & Pop, 2015; Schieber & Chandel, 2014). Dva hlavní zdroje ROS spojené s buněčnou signalizací jsou mitochondrie a rodina NADPH-oxidas.

ROS signalizace je nezbytná pro homeostázu a adaptaci na stres (Glasauer & Chandel, 2013). V živých organismech za aerobních podmínek se více než 90 % spotřebovaného kyslíku redukuje přímo na vodu pomocí cytochromoxidas v elektronovém transportním řetězci (ETC) bez uvolnění ROS. Činnost ETC je spojena s oxidační fosforylací produkující energii ve formě ATP. Mnohem méně než 10 % spotřebovaného kyslíku je redukováno postupnými jednoelektronovými cestami, které vedou k přeměně molekulárního kyslíku na $\cdot\text{O}_2^-$. Poté následuje jednoelektronová redukce se současným přijetím dvou protonů za vzniku H_2O_2 . Molekula H_2O_2 , která přijme ještě jeden elektron, se rozštěpí na $\cdot\text{OH}$ a OH^- . Nakonec $\cdot\text{OH}$ interaguje s dalším elektronem a protonem, což vede k tvorbě molekuly vody. ROS zahrnuje nejen výše uvedené molekuly, ale také různé peroxidy jako jsou lipidové peroxidy, peroxidy proteinů a nukleových kyselin (Lushchak, 2014).

6.3.1.1 Superoxid anion radikál

$\cdot\text{O}_2^-$ je výsledkem jednoelektronové redukce kyslíku různými oxidázami. Superoxid může být tvořen také v mitochondriích ETC v průběhu oxidační fosforylace. Ve vodním prostředí se $\cdot\text{O}_2^-$ ukázal jako slabé oxidační činidlo vůči kyselině askorbové a thiolům, ale jako silné redukční činidlo proti některým komplexům obsahujících železo jako třeba cytochrom C a Fe-EDTA. Jeho protonovaná forma, hydroperoxyl radikál ($\cdot\text{HO}_2$), je silnějším redoxním činidlem než $\cdot\text{O}_2^-$, ovšem je mnohem méně stabilní.

Byl označen jako aktivní nukleofil schopný napadnout kladně nabitá centra a jako oxidační činidlo, které může reagovat s donory vodíku (Pisoschi & Pop, 2015). V přítomnosti enzymu superoxid dismutasa 1 nebo 2 (SOD1/2) je rychle převeden na H_2O_2 a kyslík:

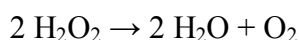


SOD1 je primárně lokalizována v cytosolu a mezimembránovém prostoru mitochondrií, zatímco SOD2 v matrix mitochondrií. SOD zabraňují akumulaci superoxidů, které mohou poškodit a inaktivovat proteiny obsahující železné a sírové klastry (Jarrett & Boulton, 2012; Pisoschi & Pop, 2015; Schieber & Chandel, 2014).

6.3.1.2 Peroxid vodíku

Peroxid vodíku může být generován jakýmkoliv systémem poskytujícím superoxid, jelikož tento radikálový aniont snadno dismutuje. Přítomnost oxidas může vést k přímé syntéze H_2O_2 dvouelektronovou redukcí molekulárního kyslíku. H_2O_2 je schopný produkovat vysoce reaktivní radikály jako výsledek jeho interakce s kovovými ionty. V přítomnosti železnatých či měďnatých iontů se H_2O_2 může stát $\cdot\text{OH}$, který je velmi reaktivní a způsobuje oxidaci lipidů, proteinů a DNA, což má za následek poškození buněk. Přímý účinek H_2O_2 zahrnuje napadení struktury hemových proteinů s uvolňováním železa, inaktivaci enzymů a oxidaci DNA, lipidů, $-\text{SH}$ skupin a ketokyselin. Na rozdíl od $\cdot\text{O}_2^-$ může H_2O_2 snadno difundovat přes membrány a v důsledku toho je ideální intracelulární signální molekulou.

V cytosolu a mitochondriích je přítomný dostatek peroxiredoxinů a glutation peroxidas, které převádějí H_2O_2 na vodu:

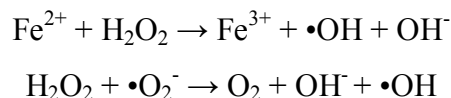


Katalasa je lokalizována především v peroxisomech a odstraňuje intracelulární H_2O_2 bez kofaktorů (Glasauer & Chandel, 2013; Lushchak, 2014; Pisoschi & Pop, 2015).

6.3.1.3 Hydroxylový radikál

$\cdot\text{OH}$ je vysoce agresivní radikálová forma zodpovědná za oxidační poškození většiny biomolekul. Jde o nejsilnější oxidační agens, které může v místě jeho vzniku reagovat s většinou organických a anorganických molekul – DNA, proteiny, lipidy, aminokyseliny, cukry a kovy (Pisoschi & Pop, 2015). Ve skutečnosti neexistuje známý enzymatický systém, který by vzniklý $\cdot\text{OH}$ eliminoval, což pravděpodobně souvisí s jeho vysokou reaktivitou. Prevence tvorby $\cdot\text{OH}$ je nejlepší způsob, jak ochránit živé organismy před jeho škodlivými účinky (Lushchak, 2014).

Obvykle jsou $\cdot\text{OH}$ generovány z H_2O_2 v přítomnosti železnatých iontů – Fentonova reakce, nebo Haber-Weissovou reakcí za účasti $\cdot\text{O}_2^-$



Z toho důvodu mají buňky mnoho různých mechanismů pro udržení homeostázy železa, aby se zabránilo tvorbě toxických hydroxylových radikálů (Mittler, 2017; Schieber & Chandel, 2014).

6.3.1.4 Singletový kyslík

$^1\text{O}_2$ je nejnižší excitovaný stav molekulárního kyslíku a oxidační činidlo pro širokou škálu organických molekul. Produkce dostatečného množství $^1\text{O}_2$ v biologickém prostředí může narušit buněčné procesy a nakonec způsobit buněčnou smrt prostřednictvím apoptózy či nekrózy. Jeho cytotoxický efekt je tudíž pro PDT velmi důležitý, jelikož kontrolovaná produkce $^1\text{O}_2$ vede k eradikaci nežádoucí tkáně. Produkce $^1\text{O}_2$ také vytváří součást mnoha přírodních signálních drah a je často důležitou odezvou na stres v buňkách (Kuimova et al., 2009).

Oxidační poškození způsobené $^1\text{O}_2$ se vyskytuje v bezprostřední blízkosti subcelulární lokalizace PS, což je velice důležité, protože určuje místo primárního poškození a následného účinku (Mitton & Ackroyd, 2008). Doba života $^1\text{O}_2$ je díky své reaktivitě velmi krátká (např. v H_2O 3,5 μs , D_2O 68 μs , v organických rozpouštědlech 10 – 100 μs , v tucích 50 – 100 μs). V důsledku vysoké reaktivity s biologickými látkami tato doba života dramaticky klesá na 0,2 μs uvnitř buněk. Rychlá reaktivita a krátká doba života omezují distribuci $^1\text{O}_2$ v buňkách. Proto jsou léčby PDT lokalizovány v místě vzniku $^1\text{O}_2$ a mají průměr pouze 10 nm (tloušťka buněčné membrány) (Ormond & Freeman, 2013).

6.3.2 Oxidační stres

Oxidační stres je definován jako porucha rovnováhy mezi výskytem ROS a schopností organismu neutralizovat jejich působení antioxidantními ochrannými systémy. Dochází k němu ze zvýšené tvorby ROS nebo z poruchy antioxidantní schopnosti, která je charakterizována sníženou kapacitou endogenních systémů v boji

proti oxidativnímu útoku zaměřenému na cílové biomolekuly. Zvýšené intracelulární hladiny ROS následně způsobují poškození lipidů, proteinů a DNA. Působení oxidačního stresu je spojováno s několika patologiemi, jako jsou kardiovaskulární onemocnění, rakovina a stárnutí. Nicméně, zvýšené hladiny ROS také působí jako signální molekuly v udržování fyziologických funkcí a v biosyntetických reakcích (Pisoschi & Pop, 2015; Schieber & Chandel, 2014).

Zvýšení rovnovážného stavu ROS, které je výsledkem nerovnováhy mezi generačními a eliminačními procesy, může ovlivnit mnoho, ne-li všechny životní procesy. Důsledky tohoto zvýšení se liší a závisí na úrovni a místě vzniku ROS, účinnosti antioxidačních systémů, dostupnosti energetických zdrojů a buněčných cílech, s nimiž se vzájemně ovlivňují (Lushchak, 2014). Nadměrně nahromaděné ROS mohou reagovat s různými buněčnými složkami, což způsobí oxidační poruchy buňky a buněčnou smrt. Přítomnost labilního železa (Fe^{2+}) v buňce značně zvyšuje riziko vzniku oxidačního stresu v důsledku Fentonovy reakce (Mittler, 2017).

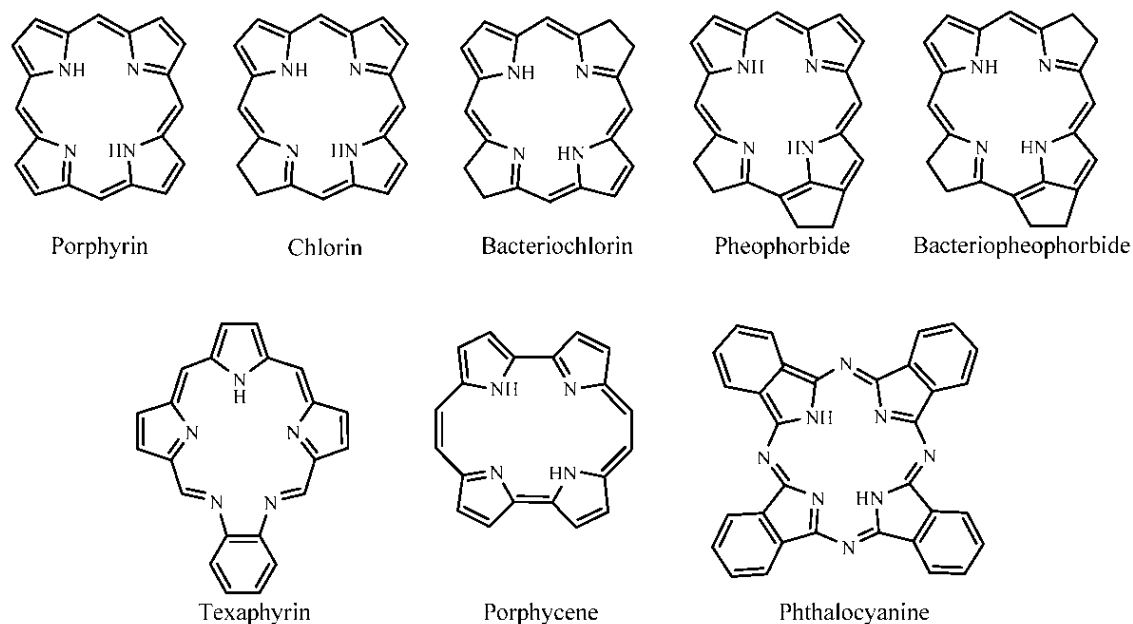
Oxidační stres způsobuje modifikace struktur i funkcí v nukleových kyselinách, lipidech a proteinech. Oxidační degradace lipidů vede k malondialdehydu a 4-hydroxynonenalu či isoprostanům z nenasycených mastných kyselin. Poškození proteinů může nastat při oxidaci thiolů, karbonylaci, oxidaci vedlejších řetězců, fragmentaci, rozvinutí a nesprávné skladbě vedoucí ke ztrátě aktivity.

Bylo potvrzeno, že poškození vyvolané volnými radikály během oxidačního stresu, se podílí na patogenezi a patofyziologii mnoha chronických zdravotních problémů. Jedná se zejména o neurodegenerativní stavy (Parkinson, Alzheimer, Huntington choroby a amyotrofická laterální skleróza), emfyzém, kardiovaskulární a zánětlivá onemocnění, katarakt a rakovinu. Nevratná progresse oxidativního rozpadu způsobeného ROS má také svůj negativní vliv na stav biologie stárnutí, která spočívá ve zhoršení fyziologických funkcí, podpoře výskytu onemocnění a zkrácení délky života (Pisoschi & Pop, 2015).

6.4 FOTOLENZITIZÉRY

Nejvýznamnější složka mající zásadní vliv na PDT proces je PS. Vhodná volba PS je zárukou úspěšné terapie. Fotosenzitizující látky jsou přírodní nebo syntetické sloučeniny, které přenášejí světelnou energii do sousedních molekul, což je důležité pro rozpuštění kyslíku. Podané látky se akumulují v nemocných tkáních a následně ozařují viditelným světlem o vhodné vlnové délce, obvykle v červené či blízko infračervené oblasti a kompatibilní s absorpčním spektrem drogy. Specifická mutace v např. rakovinných tkáních poskytuje akumulaci PSs, což vede k tvorbě volných radikálů v této konkrétní části organismu. Nové reaktivní formy následně napadají nádorové buňky a vedou tak k jejich smrti (Dobson et al., 2018; Oleinick et al., 2002; Oniszczuk et al., 2016).

Strukturní charakteristiky jednotlivých sloučenin mají velmi významnou roli (Banerjee et al., 2017). Většina PSs používaných v nádorové terapii je založena na tetrapyrrolové struktuře, podobně jako protoporphyrin obsažený v hemoglobinu (Dobson et al., 2018). Přehled základních struktur porfyrinoidních PSs je zobrazený na **Obr. 3**.

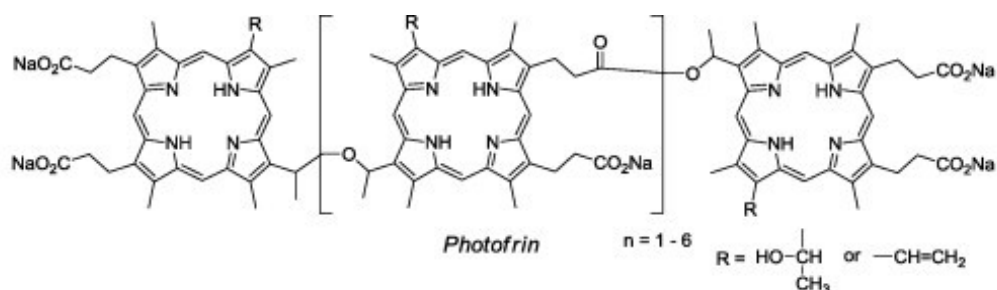


Obr. 3 Základní struktury PSs (Ormond & Freeman, 2013).

Dnes už je známo asi 400 různých PSs. Většina z nich se používá např. v medicíně. Nejvýznamnější skupinou látek jsou porfyriny a jejich deriváty – především chloriny a ftalocyaniny (Pc). Neporfyrinové PSs zahrnují: 5-aminolevulovou kyselinu (ALA), xantiny, fenotiaziny, triarylmetany, kurkumin, hypericin a další (Oniszczuk et al., 2016).

6.4.1 První generace PSs

Do PS první generace řadíme porfyriny. Prvním komerčně dostupným PS a s nejvíce klinickými zkušenostmi byl derivát hematoporfyrinu (HpD). Je směsí monomerů, dimerů a polymerů hematoporfyrinu, všech potřebných pro úspěšnou PDT. Tento PS je netoxický a při aktivaci světlem nezpůsobuje bolest, což umožňuje snadnou a spolehlivou ambulantní léčbu (Allison & Moghissi, 2013; Oniszczuk et al., 2016). Bylo prokázáno, že HpD se přednostně lokalizuje v nádorech a poskytuje dobré protinádorové účinky v kombinaci s červeným světlem. První klinická PDT moderní doby byla provedena u pacientů s rakovinou močového měchýře nebo kůže, a to s použitím právě HpD. Purifikovaná verze, porfimer sodný, se nachází na trhu pod obchodním názvem Photofrin® (**Obr. 4**) a v roce 1993 se stal prvním PS schváleným pro PDT opakující se povrchové papilární rakoviny močového měchýře. Je stále nejvíce používaným a studovaným PS. Byl schválen pro léčbu časného stádia rakoviny plic u lidí v roce 1998 a pro Barrettův jícen v roce 2003 (Banerjee et al., 2017; Dobson et al., 2018; Triesscheijn et al., 2006).



Obr. 4 Struktura Photofrinu® (Yano et al., 2011).

Porfimer sodný je směs různých hematoporfyrinových produktů s několika absorpčními píky. Absorpční pík s nejdelší vlnovou délkou (630 nm) je také nejslabší. Nicméně světlo o vlnové délce 630 nm je nejčastěji používaným v klinické praxi

k aktivaci porfimeru sodného, protože světlo s delší vlnovou délkou může pronikat hlouběji do tkáně (Triesscheijn et al., 2006).

I když byl Photofrin[®] široce používán k léčbě různých typů rakoviny, klinická aplikace byla omezená jeho vlastními nevýhodami. Tyto nedostatky zahrnují špatnou chemickou čistotu u směsi více než 60 molekul, jeho dlouhý biologický poločas a intenzivní akumulaci v kůži zodpovědnou za indukci prodloužené kožní fotosenzitivity. Ta někdy přetrvává i 2 nebo více než 3 měsíce po podání Photofrinu[®]. Dalším problémem je jeho nízký molární absorpční koeficient a jeho aktivační vlnové délky jsou příliš krátké pro dobrý průnik tkání (Zhang et al., 2017).

6.4.2 Ideální fotosenzitizér

Velké množství PSs bylo testováno *in vivo* a *in vitro* v PDT experimentech. Nicméně stále neexistuje žádná látka, která by mohla být kvalifikována jako ideální PS. Proto se nedávné studie zaměřily na vývoj a účinnost nových PSs (Y. Liu et al., 2017; Robertson et al., 2009).

V klinické praxi by měl mít úspěšný PS většinu z následujících vlastností: netoxický pokud není aktivován světlem, hydrofilní pro snadnou systémovou aplikaci, aktivovaný klinicky výhodnou vlnovou délkou světla, a spolehlivě vytvářející fotodynamickou reakci. Mezi další charakteristiky patří formace dlouhotrvajícího tripletového stavu v reakci k interakci s okolním kyslíkem či dalšími substráty pro ROS produkci a vysoká chemická čistota. Ideálně se také selektivně soustřeďuje pouze v nádorech, rychle opouští normální tkáň a je relativně rychle eliminován z těla pacienta, a je netoxický produkt degradace s jednoduchou syntézou. Stejně tak je důležitá i bezbolestná terapie a jeho komerční dostupnost. Asi nejdůležitější z vlastností jsou aktivační vlnová délka s optimální tkáňovou penetrací (620 – 800 nm), která dovoluje hlubší průnik světla tkáněmi, a doba trvání fotosenzitivity (Allison & Moghissi, 2013; Y. Liu et al., 2017; Oniszczyk et al., 2016).

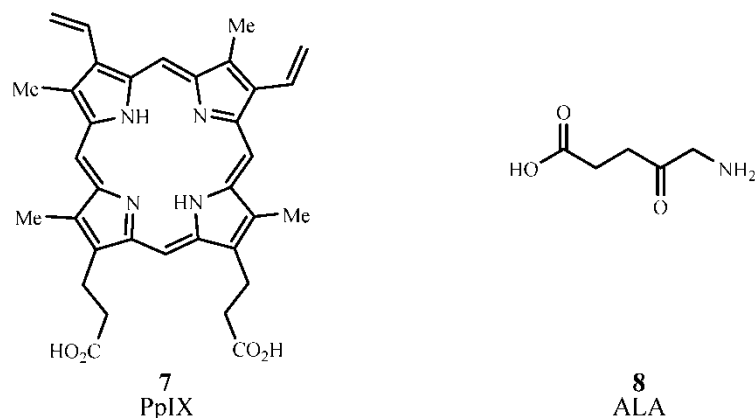
Vzhledem k mnoha rozličným požadavkům nemůže žádný PS splnit všechny tyto vlastnosti. Stále ovšem existuje mnoho PSs, které byly schváleny pro klinické použití díky jejich průběžnému objevování a rozvíjení (Y. Liu et al., 2017). Za tímto

účelem se v poslední době vyvinulo hodně nových PSs, které vstoupily do klinických studií (Dolmans et al., 2003).

6.4.3 Druhá generace PSs

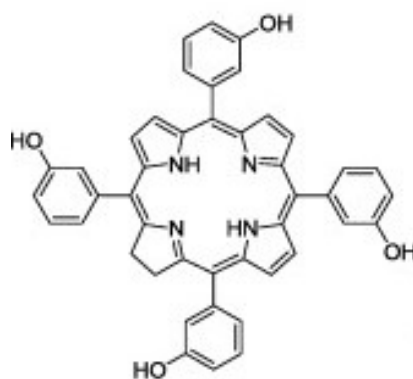
Druhá generace PSs obsahuje rozsáhlou skupinu sloučenin používaných v širokém spektru terapeutických aplikací. Nevýhody spojené s první generací PSs vedly k rozsáhlému výzkumu zaměřenému na zlepšení účinnosti molekul PS a to prostřednictvím změn periferní funkčnosti porfyrinu nebo přímé modifikace porfyrinového jádra. Jsou speciálně navrženy tak, aby měly minimální vedlejší účinky a překonaly nežádoucí vlastnosti svých předchůdců. Následující klíčové práce na první generaci PS vedly k výrobě několika nových molekul PS. Mezi ně patří zejména následující: metaloporfyriny (Lutrin[®], Lutex[®]), porfyceny, feoforbidy (Tookad[®]), purpuriny (Purlytin[®]), Pc, chloriny (Foscan[®]), prekurzory protoporfyrinu IX (Hexvix[®], Metvix[®], Levulan[®]), fenothiaziny (metylenová modř, toluidinová modř), cyaniny (merocyanin 540), dipyrrometeny, hypericin a xantany (Rose Bengal) (Banerjee et al., 2017; Zhang et al., 2017).

Z hlediska samotné nádorové terapie zahrnují ALA (Levulan[®]), která je metabolizována na porfyrinový PS, a méně hydrofilní esterifikované deriváty ALA (metyl a hexyl estery, Metvix[®], Hexvix[®]). ALA je přirozeně se vyskytující pro-PS a prekurzor pro biosyntézu molekuly hemu. Pro terapeutické účely se ALA podává topicky, orálně nebo intralezionálně. ALA vstupuje do všech buněk, avšak její příjem je potencován transportéry pro β -aminokyseliny a γ -aminomáselnou kyselinu, které jsou vysoce exprimovány na některých rakovinných buňkách a neuronech. Poté se metabolizuje na červeně fluorescenční PS protoporfyrin IX (PpIX, absorpce při 635 nm) (**Obr. 5**) a nakonec na nefluorescenční hem. Klinické výhody léčby ALA zahrnují rychlý clearance PpIX z tkáně během 12 hodin, což vede ke krátkodobé kožní fotosenzitivitě. U lidských pacientů byla ALA užívána k léčbě kožního T-lymfomu, bazocelulárního a spinocelulárního karcinomu a dalších nádorů hlavy a krku (Banerjee et al., 2017; Dobson et al., 2018).



Obr. 5 Molekulární struktury PpIX a ALA (Ormond & Freeman, 2013).

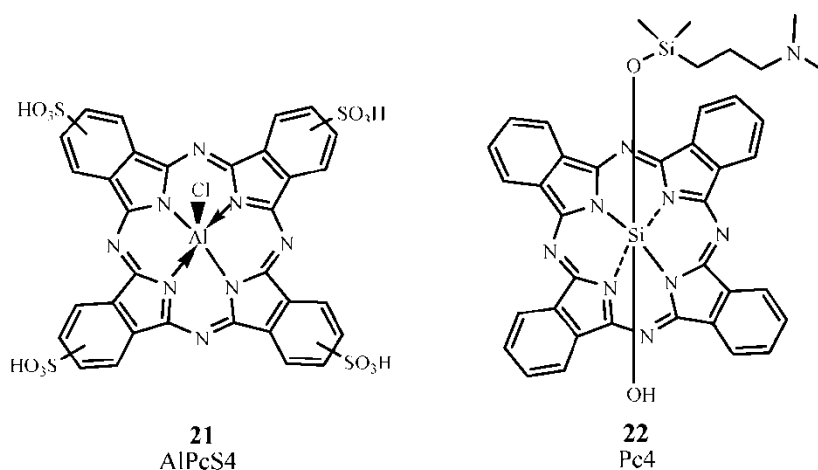
Chloriny vykazují dvě důležité vlastnosti: vysoký kvantový výtěžek $^1\text{O}_2$ a intenzivní absorpční pásmo při delších vlnových délkách ve srovnání s porfyriny (650–660 nm). Patří do hydrofilních redukovaných porfyrinů a jsou charakterizovány dobrou rozpustností ve vodných roztocích (Oniszczuk et al., 2016). Zahrnují m-tetrahydroxyphenyl chlorin (m-THPC, temoporfin, Foscan[®]), který byl schválen v roce 2001 pro léčbu nádorů hlavy a krku (**Obr. 6**). Je mnohem účinnějším PS než porfimer sodný či ALA, kožní fotosenzitivita je redukována na 2 – 4 týdny a má navíc absorpční pík při 652 nm, což lehce zvyšuje průnik světla do tkáně (Dobson et al., 2018; Triesscheijn et al., 2006).



Obr. 6 Struktura m-THPC - Foscan[®] (Yano et al., 2011).

Jednou z dalších velice významných rodin sloučenin jsou Pc – makrocyclické molekuly podobné porfyrinu, konkrétně tetrabenzo[5,10,15,20]tetraazaporfyriny. Příklady jejich struktur jsou znázorněny na **Obr. 7**. Pc se tradičně používají jako

barviva a fotovodivé látky v kopírovacích zařízeních, jako chemické senzory, elektrochromická činidla, molekulární kovy a tekuté krystaly. Ovšem jednou z jejich nejdůležitějších aplikací je využití jako PS pro PDT. Tyto sloučeniny mají intenzivnější absorpci v blízké infračervené (NIR) oblasti, ve srovnání s původními porfyriny, a to díky jejich aromatické povaze. Výhoda Pc je vysoká produkce ROS, výjimečná stabilita a absorpce světla v červené nebo NIR oblasti (650 – 700 nm). Významná nevýhoda těchto látek je nízká rozpustnost v celé řadě rozpouštědel, dokonce i v organických (W. Liu et al., 2005; Oniszczuk et al., 2016). Jelikož mnohé z neefektivnějších PSs jsou lipofilní a jsou aktivně přijímány buněčnými membránami (včetně těch organelových), usiluje se o vývoj nových transportních systémů k překonání špatné rozpustnosti těchto sloučenin ve vodě. Příkladem je zinečnatý ftalocyanin (ZnPc), který byl nedávno použit pro prozkoumání cest buněčné smrti v buněčných liniích rakoviny prsu vystavených PDT. Při podání albuminovými nanosférami se ukázal jako vhodné terapeutické činidlo s dobrou účinností a bez nežádoucích účinků (Banerjee et al., 2017). Z těchto sloučenin patří mezi jedny z nejslibnějších PSs ve vodě rozpustné Pc. Nicméně problémem je agregace těchto molekul (zejména ve vodním prostředí) způsobená jejich velkým systémem konjugovaných π -vazeb. Agregace výrazně snižuje jejich kvantový výtěžek fluorescence, zkracuje životnost tripletového stavu a redukuje tak fotosenzitivní účinnost. Důležitými a potenciálně užitečnými materiály jsou proto hydrofilní a neagregující Pc (W. Liu et al., 2005).



Obr. 7 Příklady ftalocyaninových PSs: hlinitý ftalocyanin tetrasulfonát AlPcS4 - Photosens® a křemičitý ftalocyanin Pc4 (Ormond & Freeman, 2013).

V porovnání s PSs první generace jsou hlavními pokroky druhé generace PSs delší absorpční vlnová délka v oblasti červeného světla, zvýšení absorpčních koeficientů a kratší čas tkáňové akumulace. Navíc, PSs opatřené některými anionickými nebo kationickými skupinami se přednostně můžou lokalizovat v různých organelách, což je důležitý princip pro zlepšení vývoje PDT (Y. Liu et al., 2017).

Ačkoliv PSs druhé generace uskutečnily pro PDT obrovské pokroky, stále existují některé klíčové problémy jako je jejich selektivita pro nádorovou tkáň, hloubka průniku světla a chemická i fyzikální stabilita (Y. Liu et al., 2017).

6.4.4 Třetí generace PSs

Ještě následným zlepšením předchozích PSs je třetí generace PSs, která klade silný důraz hlavně na jejich dodání a cílení na nádor. Hledání nových PS třetí generace stále probíhá, a to zvláště u látek, které mohou být aktivovány světlem o delší vlnové délce, což vyvolá kratší generalizovanou fotosenzitivitu a má lepší nádorovou specifitu.

Velkou měrou podnítily vývoj PSs také nově vznikající nanotechnologie – s nanočásticemi (NP) jako nosiči PSs či donory energie, nebo s NP samotnými jako novými PS pro překonání některých nedostatků konvenčních PSs. Z toho důvodu se nanotechnologie mohou stát silným nástrojem, který v budoucnu významně povzbudí další vývoj PSs (Y. Liu et al., 2017; Triesscheijn et al., 2006).

7 CÍLE PRÁCE

- Zhodnocení fotodynamické aktivity nově syntetizovaných PSs **ZIP82Zn-SO₃Na**, **HK18Zn-COONa** a **HK22Zn-COONa** ze skupiny (aza)ftalocyaninů na buněčné linii lidského cervikálního karcinomu HeLa v *in vitro* podmínkách.
- Stanovení fototoxicity zkoumaných PSs indukované aktivujícím světlem (EC₅₀).
- Zjištění míry vlastní toxicity zkoumaných PSs bez přítomnosti aktivujícího světla – tzv. dark toxicita (TC₅₀).
- Určení časového profilu prostupu daných látek do buněk.
- Stanovení subcelulární lokalizace vybraných PS.
- Fotografická dokumentace morfologických změn na HeLa buňkách po světelné aktivaci PS.
- Stanovení typu buněčné smrti průtokovou cytometrií.

8 METODICKÁ ČÁST

8.1 MANIPULAČNÍ VYBAVENÍ PRO PRÁCI S BUNĚČNÝMI LINIEMI

- sterilní plastové serologické pipety různého objemu (TPP, Švýcarsko)
- pipetovací nástavce Biohit Midi Plus (Biohit, Finsko)
- sterilní Pasteurovy pipety (Brand, Německo)
- automatické pipety různého rozsahu (Eppendorf, Německo)
- 8-kanálová elektronická pipeta e-PET BioHit 50-1200 µl (BioHit, Finsko)
- sterilní plastové špičky různých rozsahů (Eppendorf, Německo)
- plastové sterilní inkubační nádoby T75 (TPP, Švýcarsko)
- 96-jamkové mikrotitrační destičky s plochým dnem (TPP, Švýcarsko)
- sterilní mikrozkušavky 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml a 5 ml (Eppendorf, Německo)
- sterilní laboratorní sklo (Thermo Fisher Scientific, Česká Republika)
- sterilní plastové vaničky (Eppendorf, Německo)
- podložní a krycí sklíčka (Thermo Fisher Scientific, Česká Republika)
- Bürkerova komůrka (Brand, Německo)
- sterilní mikroskopická sklíčka s kultivačním nástavcem vhodná pro konfokální mikroskopii (Eppendorf, Německo)
- sterilní plastové Petriho misky (TPP, Švýcarsko)
- sterilní Petriho misky vhodné pro konfokální mikroskopii (WillCo Wells, Nizozemí)
- plastové sterilní centrifugační zkumavky o objemu 15 ml (TPP, Švýcarsko)
- sterilní škrabky (Sigma, Německo)

8.2 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ PRO MANIPULACI S BUNĚČNÝMI LINIEMI

- buněčné inkubátory s termostatem a regulací koncentrace CO₂ (Sanyo a Esco)
- boxy s laminárním prouděním BioAir TopSafe 1.2 (EuroClone, Itálie)
- vodní lázeň (Mettler, Německo)
- desková třepačka Heidolph Titramax 100 (Heidolph Instruments, Německo)
- čtečka mikrotitračních destiček Tecan Infinite M200 (Tecan Group Ltd., Švýcarsko)
- 450 W Xenonová lampa Newport s 9 cm vodním a long-pass filtrem Newport OG570 (Newport Corporation, USA)
- centrifuga Hermle Z 300
- invertovaný fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Japonsko)
- invertovaný fluorescenční mikroskop Nikon Ti E (Nikon, Japonsko)
- konfokální mikroskop Nikon A1+ (Nikon, Japonsko)
- luminiscenční spektrometr AMINCO Bowman Series 2

8.3 REAGENCIE A CHEMIKÁLIE

- fetální bovinní sérum (FBS, inaktivované teplem, Lonza, Belgie)
- kultivační médium DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; Lonza, Belgie)
- HEPES pufr (1M, Sigma, Německo)
- tablety pro fosfátový pufr (PBS, Sigma, Německo nebo MP Biomedicals, USA)
- roztok penicilin/streptomycin (P/S, 100x koncentrovaný, Lonza, Belgie)
- roztok L-glutaminu (Lonza, Belgie)

- roztok trypsin/EDTA (T/E, 10x koncentrovaný, Lonza, Belgie)
- peroxidu vodíku (H_2O_2 , 3% roztok, Fluka, Sigma, Německo)
- trypanová modř (TB, 0,4%, Sigma, Německo)
- roztok neurální červeně (NR, 3,3 mg/ml, Sigma, Německo)
- fixační roztok pro NR (1% roztok CaCl_2 v 0,5% formaldehydu)
- lyzační roztok pro NR (1% roztok ledové kyseliny octové v 50% etanolu)
- fotosenzitizér ZIP82Zn- SO_3Na (vědecká skupina doc. PharmDr. Petra Zimčíka, Ph.D., Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, FaF UK)
- fotosenzitizér HK18Zn- COONa (vědecká skupina doc. PharmDr. Petra Zimčíka, Ph.D., Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, FaF UK)
- fotosenzitizér HK22Zn- COONa (vědecká skupina doc. PharmDr. Petra Zimčíka, Ph.D., Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, FaF UK)
- purifikovaná ultračistá voda (MQ-voda, Millipore, USA)
- fluorescenční sonda Actin Green (Molecular Probes, USA)
- fluorescenční sonda Hoechst 33342 (Molecular Probes, USA)
- fluorescenční sonda MitoTracker Red CMXRos (Molecular Probes, USA)
- fluorescenční sonda MitoTracker Green FM (Molecular Probes, USA)
- fluorescenční sonda LysoTracker Blue DND-22 (Molecular Probes, USA)
- ADS pufr (116 mM NaCl, 5,3 mM KCl, 1,2 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,13 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 mM HEPES)
- permeabilizační pufr (0,5% Triton X-100 v dPBS)
- bovinní sérový albumin
- roztok BCA (Bicinchoninic acid)
- 4% roztok $\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

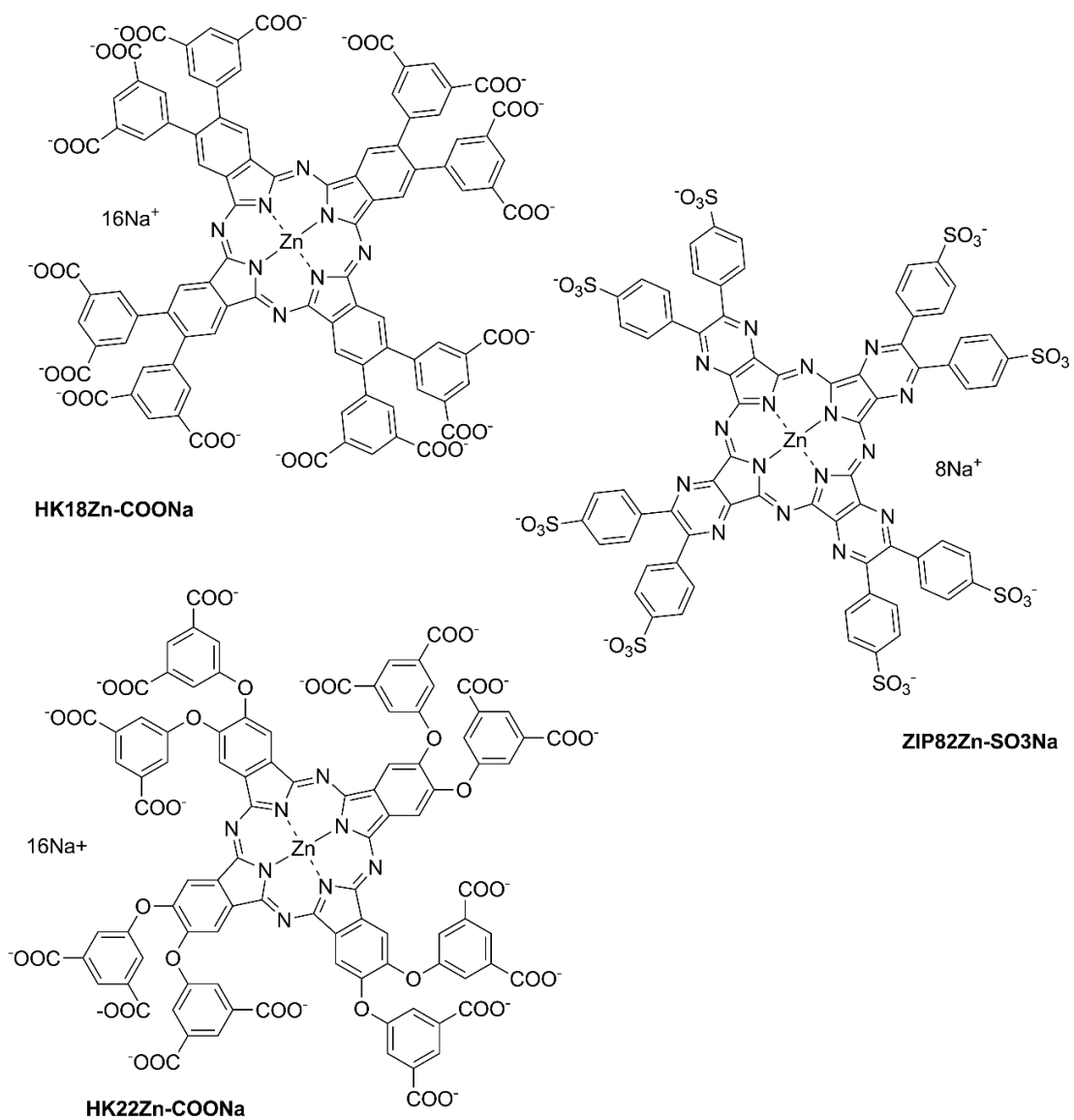
- 4% roztok paraformaldehydu v dPBS (pH = 7,3)
- ProLong AntiFade reagentie (ThermoFisher Scientific)

8.4 ZKOUMANÉ FOTOSENZITIZÉRY

Testované PS (**Obr. 8**) použité pro veškeré experimenty byly získány přímo jejich syntézou na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty v Hradci Králové vědeckou skupinou doc. PharmDr. Petra Zimčička, Ph.D.

Látka **HK22Zn-COONa** je novým neagregovaným ve vodě rozpustným ftalocyaninem se 16 karboxylovými substituenty a centrálně vázaným atomem zinku. Sloučenina nemá strukturní isomery a obsahuje velké množství negativně nabitých karboxylátových skupin při deprotonaci. Tato vysoce negativně nabitá molekula se může zacílit na nádory-asociovanými makrofágy prostřednictvím scavenger receptorů bez nutnosti konjugace jakýchkoli biologických ligandů. PS vykazuje nízkou dark toxicitu, fototoxicitu při nízkých dávkách světla (1 J/cm^2), značný uptake buňkami a příznivou intracelulární lokalizaci. Významné absorpční spektrum vykazuje při 673 nm, emisi fluorescenčního záření při 684 nm ($\Phi_F = 0,26$) a je také účinným generátorem $^1\text{O}_2$ ($\Phi_\Delta = 0,40$) (Choi et al., 2004; W. Liu et al., 2005). Tato látka byla podrobena experimentům v našich podmínkách jako jedna z referenčních látek.

Další dvě zkoumané látky (ftalocyanin **HK18Zn-COONa** a azaftalocyanin **ZIP82Zn-SO₃Na**) jsou nově navržené a syntetizované, a doposud nebyly publikovány.



Obr. 8 Struktury zkoumaných látek

8.5 BUNĚČNÁ KULTURA

8.5.1 Buněčná linie HeLa

HeLa je nejrozšířenější modelová buněčná linie pro studium lidské buněčné a molekulární biologie. Buněčná linie HeLa je odvozena z buněk lidského cervikálního karcinomu a jde o první lidskou kultivovanou buněčnou linii pocházející již z roku 1951 (Landry et al., 2013).

8.5.2 Kultivace

Kultivační médium pro HeLa buňky obsahující sérum (SCM, serum containing medium) bylo připraveno ze základního média DMEM, které bylo dále suplementováno. Postupně bylo přidáno FBS (10 %), HEPES pufr (1 %), P/S (1 %) a L-glutamin (2 %). Kromě HEPES pufru, byly všechny tyto roztoky předem vytemperovány ve vodní lázni na 37 °C. Celá příprava kultivačního média probíhala za sterilních podmínek v prostorách laminárního boxu.

V takto připraveném SCM byly poté buňky kultivovány na sterilních plastových inkubačních lahvích T75 za standardních podmínek v buněčném inkubátoru při 37 °C, 5% CO₂ a konstantní humiditě. Veškerá manipulace s buněčnou linií probíhala opět sterilně v laminárním boxu.

8.5.3 Pasážování

Buňky v kultivačních nádobách rostou až do doby, kdy dosáhnou vysokého procenta konfluency (80 – 90 %), což je stav, kdy buňky zaplní povrch dna a dostanou se do vzájemného kontaktu. Tento stav se kontroluje mikroskopicky před samotným pasážováním a trvá obvykle 3 – 4 dny. V té době je potřeba buňky zpasážovat – přenesení části buněk do nové kultivační nádoby obsahující čerstvé médium.

Proces začíná vždy nejprve odebráním starého média z láhve. Následně byly buňky dvakrát opláchnuty PBS puftrem a poté byl přidán 1 ml trypsinu a rovnoměrně rozprostřen po celém povrchu láhve. Uzavřená láhev se vloží na max. 5 minut při 37 °C

do inkubátoru. Nastává proces trypsinizace, kdy jsou buňky působením proteás odlepeny ode dna lahve a stávají se suspenzními. Po této době bylo přidáno 9 ml SCM, který ihned způsobil inaktivaci trypsinu. Poté byly buňky v láhvi důkladně resuspendovány pomocí pipety.

Určitá část takto vytvořené suspenze buněk byla přenesena do nové sterilní inkubační láhve s 15 ml čerstvého média, opět důsledně promíchána a rozprostřena rovnoměrně po dně nádoby. Objem přenášených buněk byl volen dle aktuálního stavu konfluence a také poměru z předchozí pasáže. Takto připravená láhev s buňkami se uchovává za standardních podmínek v inkubátoru znovu až do další pasáže. Zbytek buněčné suspenze ze staré láhve byl vzápětí použit pro nasazování na experimenty.

Všechny použité roztoky byly předem vytemperovány ve vodní lázni na 37 °C. Veškeré kroky tohoto procesu probíhaly za sterilních podmínek v laminárním boxu.

8.5.4 Stanovení počtu životaschopných buněk

Počítání buněk bylo prováděno v Bürkerově komůrce pomocí mikroskopu. Počet živých buněk se stanovoval po obarvení buněk trypanovou modří. Jedná se o barvivo difundující skrze plazmatickou membránu buněk, kdy živé buňky jsou schopny toto barvivo aktivně transportovat ven ze svého nitra, kdežto buňky mrtvé ho zadržují. Pod mikroskopem tedy vidíme živé buňky jako světlé sférické útvary na jemně modrém pozadí a mrtvé buňky obarvené modře.

Připravila se mikrozkmavka, do které bylo napipetováno 100 μ l 0,4% trypanové modří a 100 μ l dobře promíchané buněčné suspenze. Obsah se řádně promíchal a nechal inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě. Po opětovném důkladném promíchání bylo odebráno po 10 μ l suspenze a aplikováno na každou polovinu Bürkerovy komůrky. Následně byl spočítán počet životaschopných buněk a výsledek přepočítán na počet buněk v 1 ml suspenze.

8.6 STANOVENÍ CYTOTOXICITY

K nasazování buněk na experimenty byla ve sterilní vaničce smíšena část řádně promíchané buněčné suspenze (zbylé po pasážování) s čerstvým vytemperovaným médiem. Množství bylo voleno tak, aby bylo dosaženo výsledné požadované koncentrace 75 000 buněk/ml. Důkladně promíchaná výsledná suspenze byla poté pipetována elektronickou multikanálovou pipetou do 96-jamkových mikrotitračních destiček po 100 μ l do každé jamky. Každá jamka tedy obsahovala přibližně 7 500 buněk. Takto připravené destičky byly uloženy na 24 hodin při 37 °C do buněčného inkubátoru.

Po uplynutí 24 hodin byly k buňkám přidávány studované látky. Potřebné koncentrace testovaných PSs byly připravovány sterilně ze zásobních roztoků naředěním SCM v mikrozskumavkách a jednotlivé koncentrace poté nasazovány do jednotlivých jamek opatrnou výměnou za médium. Výjimkou byly zásobní roztoky PSs rozpuštěných v bezsérovém médiu (SFM, serum free medium) u nichž bylo nutné místo SCM používat SFM. Buňky se s PSs nechaly 12 nebo 24 hodin inkubovat.

Veškerá manipulace se zásobními i pracovními roztoky PSs probíhala za tmy, aby nedošlo k předčasné fotoaktivaci PS. Všechny použité roztoky byly také předem vytemperovány ve vodní lázni na 37 °C a veškeré výše popsané úkony byly prováděny ve sterilním prostoru laminárního boxu.

Experimenty byly prováděny v SCM i SFM médiích. V závislosti na tom, zda měla být hodnocena vlastní toxicita látek po aktivaci světlem – fototoxicita, či bez aktivace světlem – tzv. dark toxicita, se poté ubíral další postup experimentu.

8.6.1 Fototoxicita

Po proběhlé zhruba 12 hodinové inkubaci následovala sterilní výměna média v celé destičce. Pomocí automatické multikanálové pipety bylo odebráno staré médium a nahrazeno čerstvým předeštěným médiem bez testovaných látek. Toto se opakovalo dvakrát, aby se odstranily veškeré zbytky PSs, které nejsou přítomny v buňkách. Ihned poté byla destička přenesena pod 450 W xenonovou lampu osazenou vodním a long-pass filtrem a ozářena světlem z červené části viditelného spektra po dobu 15 minut

($\lambda > 570$ nm; 12,4 mW cm⁻²; 11,2 J cm⁻²). Po skončení doby ozáření byla destička vrácena zpět do inkubátoru na dalších 24 hodin a následně byla hodnocena výsledná životaschopnost buněk.

8.6.2 Dark toxicita

Při stanovování tzv. dark toxicity bylo zapotřebí použít výrazně vyšší koncentrace studovaných látek (až 1000 μ M). Po naředění těchto potřebných koncentrací ze zásobních roztoků PSs byly postupně nasazovány na destičku a poté inkubovány po dobu 24 hodin v inkubátoru. Po skončení inkubace byla stejným způsobem vyhodnocena životaschopnost buněk. Celý proces musel probíhat přísně ve tmě, tedy za nepřítomnosti aktivujícího světla.

8.7 URČENÍ ŽIVOTASCHOPNOSTI BUNĚK TESTEM VYCHYTÁVÁNÍ NEUTRÁLNÍ ČERVENĚ

Test vychytávání neutrální červeně (NRU, neutral red uptake assay) je testem chemosenzitivity viabilních buněk založený na schopnosti životaschopných buněk inkorporovat a vázat supravitální barvivo neutrální červeně. Jde o slabé kationické barvivo, které snadno proniká přes buněčné membrány pasivní difuzí a akumuluje se intracelulárně v lysozomech. Změny, zejména v integritě membrán lysozomů, způsobené například působením xenobiotik tak mají za následek snížení absorpce a vázání neutrální červeně buňkami. Z toho důvodu je tedy možné rozlišovat mezi životaschopnými buňkami a buňkami poškozenými či mrtvými. Testem získáváme kvantitativní informaci o počtu životaschopných buněk, kdy množství absorbovaného barviva je přímo úměrné počtu živých buněk v buněčné kultuře (Fields et al., 2017).

Po 24 hodinové inkubaci s testovanými látkami byly buňky opláchnuty a byl k nim přidán pracovní roztok NR o koncentraci 80 μ g/ml. Ten byl připraven naředěním zásobního roztoku NR (3,3 g/l) příslušným množstvím média. Pracovní roztok NR byl pipetován po 100 μ l do každé jamky. Výsledná koncentrace NR v každé jamce tedy činila 40 μ g/ml. Poté se buňky s barvivem nechaly inkubovat po dobu 2 hodin při teplotě 37 °C v inkubátoru.

Následně bylo z destiček odstraněno veškeré médium a nahrazeno fixačním roztokem (1% roztok CaCl_2 v 0,5% formaldehydu) po 100 μl na každou jamku. Buňky se nechaly fixovat po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Po skončení fixace byly buňky dvakrát opláchnuty PBS pufrem opět po 100 μl . Posledním krokem bylo přidání 100 μl lyzačního roztoku (1% roztok ledové kyseliny octové v 50% etanolu) do každé jamky. Destičky byly přeneseny na deskovou třepačku, kde se ponechaly lyzovat na 30 minut při laboratorní teplotě.

Po skončení lyzace následovalo spektrofotometrické vyhodnocení výsledků. Absorbance byla měřena pomocí čtečky mikrotitračních destiček Tecan Infinite M200 při 540 nm. Celková životaschopnost buněk byla vyjádřena jako procenta pozitivní kontroly.

8.8 ČASOVÝ PROFIL PROSTUPU LÁTEK DO BUNĚK

Na experiment byly nasazeny HeLa buňky na sterilní plastové Petriho misky o průměru 6 cm v koncentraci 100 000 buněk o objemu 5 ml SCM. Po 24 hodinové inkubaci byl zjišťován časový profil prostupu zkoumané látky do buněk – tzv. uptake.

Buňky byly opláchnuty a bylo přidáno čerstvé SFM nebo SCM médium. Postupně v časových intervalech 12, 8, 6, 4, 2, 1, $\frac{1}{2}$ a 0 hodin před vyhodnocováním experimentu byly k buňkám přidávány hodnocené PS ve finální koncentraci 4 μM . Po dané časové inkubaci byly buňky na Petriho miskách dvakrát opláchnuty PBS pufrem, předem vytemperovaným ve vodní lázni na 37 °C. Následně bylo přidáno dalších 5 ml PBS a s využitím škrabky byly buňky důkladně seškrabány ze dna misky. Obsah byl pomocí Pausterovy pipety přenesen do 15 ml zkumavky. Dalšími 5 ml PBS byly opláchnuty zbylé buňky a opět přeneseny do téže zkumavky. Vzorky se nechaly centrifugovat na 5 minut při 70× g. Supernatant byl odstraněn a buňky byly lyzovány přidáním 500 μl purifikované ultračisté vody a vymrazováním při -80°C. Stanovení koncentrace látek ve vzorcích pak probíhalo pomocí fluorescenčního měření s přidavkem 10 μl 1M roztoku NaOH v případě látek HK18Zn-COONa a HK22Zn-COONa. V případě látky ZIP82ZnSO₃Na bylo přidáno 50 μl pyridinu.

8.8.1 Stanovení množství bílkovin

Stanovení množství bílkovin ve vzorku bylo provedeno metodou BCA (Bicinchoninic acid). Rozpuštěním bovinního sérového albuminu v MQ-vodě byla vytvořena koncentrační řada roztoků o koncentracích 0, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 a 2000 $\mu\text{g/ml}$ k sestrojení kalibrační přímky. Pracovní roztok BCA byl připraven smícháním 4% $\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a zásobního roztoku BCA v poměru 1:50. Takto připravený roztok byl následně přidán k 10 μl vzorku v 96-jamkové mikrotitrační destičce (200 μl /jamku) a inkubován po dobu 30 minut při 37 °C v buněčném inkubátoru. Poté byla měřena výsledná absorbance při 562 nm na čtečce mikrotitračních destiček Tecan Infinite M 200.

8.9 VYHODNOCENÍ DAT

Při vyhodnocování fototoxicity byla u každé látky určena hodnota střední efektivní (terapeutické) koncentrace EC_{50} - koncentrace testované látky způsobující po aktivaci světlem snížení viability buněk na 50 % vzhledem k neovlivněným buňkám. Stejně tak u dark toxicity byla u každé látky určena hodnota střední toxické koncentrace TC_{50} – koncentrace testované látky způsobující i bez aktivace světlem snížení viability buněk na 50 % vzhledem ke kontrole. Ze získaných hodnot byl následně vypočítán index $\text{TC}_{50}/\text{EC}_{50}$, který značí poměr mezi vlastní a světlem indukovanou toxicitou studované látky. Je výhodné, aby studované látky měly tento index co nejvyšší. Čím je totiž hranice toxicity vyšší oproti efektivní léčebné dávce, tím lepší vlastnosti a méně negativních účinků bude daná látka mít.

Výsledky cytotoxicitních experimentů byly zpracovány v programu Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA). Pomocí softwaru GraphPad Prism verze 7.04 (GraphPad Software, USA) bylo provedeno grafické zpracování výsledků, zjištění EC_{50} a TC_{50} a statistická analýza dat. Statistické hodnocení bylo provedeno jednofaktorovou analýzou rozptylu (one-way ANOVA) s Bonferroniho *post hoc* metodou vícenásobného porovnávání. Výsledné hodnoty byly považovány za signifikantní, jestliže $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ a $***p < 0.001$. Data jsou uváděna jako průměrné hodnoty se směrodatnou odchylkou. Všechny uvedené experimenty byly uskutečněny minimálně ve 3 opakováních ($n \geq 3$).

8.10 FOTOGRAFICKÁ DOKUMENTACE

Fotografická dokumentace byla pořizována pomocí invertovaného fluorescenčního mikroskopu Nikon Eclipse Ti E (Nikon, Japan) s chlazenou sCMOS kamerou Andor Zyla 5.5 (Andor Technology, Spojené Království) a LED fluorescenčním zdrojem (CoolLED pE-300white, CoolLED Ltd., Spojené Království), případně laserovým rastrovacím konfokálním mikroskopickým systémem Nikon A1+.

Buňky byly nasazeny na sterilní plastové Petriho misky pro konfokální mikroskopii o průměru 3 cm po 2 ml a o koncentraci 30 000 buněk/ml SCM, eventuálně na sterilní 8-jamková mikroskopická sklíčka s kultivačním nástavcem po 0,5 ml v koncentraci 45 000 buněk/ml SCM.

8.10.1 Subcelulární lokalizace

Ke zjišťování subcelulární lokalizace látek v buňkách byly HeLa buňky nasazeny na sterilní plastové Petriho misky určené pro konfokální mikroskopii. Buňky se nechaly 24 hodin inkubovat, poté k nim byl přidán zkoumaný PS v koncentraci 10 μM a nechaly se inkubovat 12 hodin při 37 °C v inkubátoru. Po proběhlé inkubaci byly buňky značeny fluorescenčními sondami 2 μM MitoTracker Green FM a 2 μM LysoTracker Blue DND-22 po dobu 15 minut a následně dvakrát opláchnuty ADS pufrům s obsahem vápníku (1 mM CaCl_2). Za využití fluorescenčních filtrů pro DAPI, FITC a Cy5 a 60 \times olejovém objektivu byly zhotoveny mikrofotografie buněk na fluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse Ti E.

8.10.2 Morfologické změny

Pro sledování morfologických změn byly buňky nasazeny na sterilní mikroskopická sklíčka s kultivačním nástavcem. Po 24 hodinové inkubaci byl k buňkám přidán vybraný PS a to v koncentracích odpovídajících hodnotám EC_{15} a EC_{85} . Inkubace probíhala 12 hodin, poté byly buňky opláchnuty a 2 ml čerstvého SCM bylo přidáno. Následně byla připravená sklíčka ozařována po dobu 15 minut a vrácena zpět do inkubátoru na 24 hodin. Po inkubaci probíhalo opláchnutí buněk, přidání 0,3 μM MitoTracker Red CMXRos v SCM a 30 minut inkubace. Po barvení byly buňky

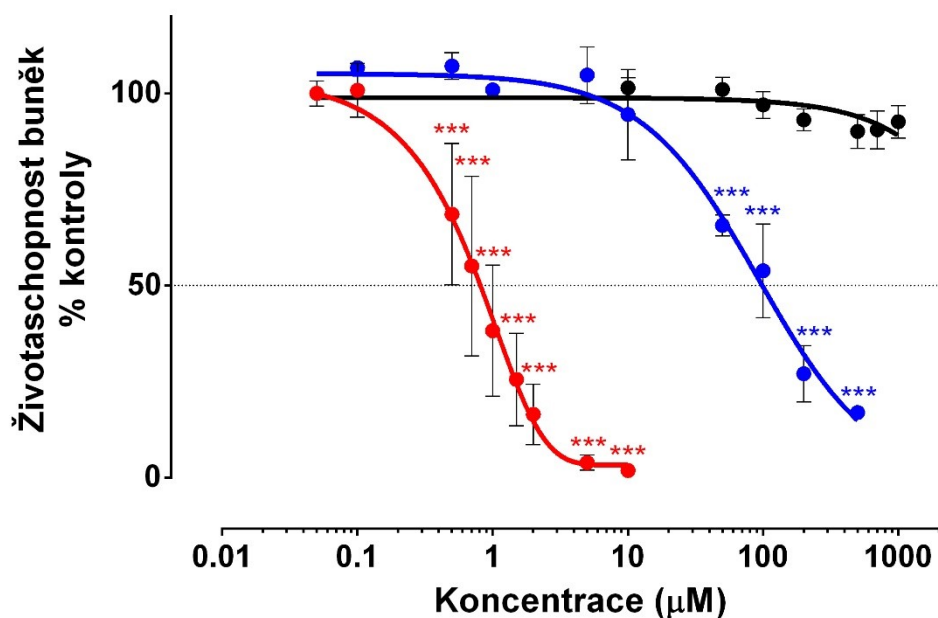
inkubovány 5 min v čistém SCM pro odstranění zbytků nenavázané sondy. Fixace buněk byla provedena 15 minut za použití přehřátého 4% paraformaldehydu v SCM (pH = 7,3), poté byly buňky třikrát opláchnuty dPBS (celkový čas 5 min). Na dalších 15 minut byl přidán permeabilizační pufr, znovu třikrát opláchnuty dPBS a blokovány přidáním 3% BSA v dPBS (60 minut). Následovalo opláchnutí buněk, barvení Actin Green po dobu 30 minut, opět opláchnutí a nakonec barvení Hoechst 33342 (1 µg/ml kapka/ml, 30 minut). Po opláchnutí dPBS byly během 5 minut z preparátu odstraňovány ionty v MQ-vodě. Zcela suché zhotovené preparáty byly montovány na podložní sklíčko pomocí ProLong AntiFade reagentie (ThermoFisher Scientific). Mikrofotografie byly pořízeny další den na laserovém skenovacím konfokálním mikroskopu Nikona A1+ s objektivem 20×, kdy probíhalo snímání vždy 7 konfokálních řezů v celé tloušťce daného preparátu bez použití konfokálního zoomu.

9 VÝSLEDKY

9.1 STANOVENÍ CYTOTOXICITY

9.1.1 ZIP82Zn-SO₃Na

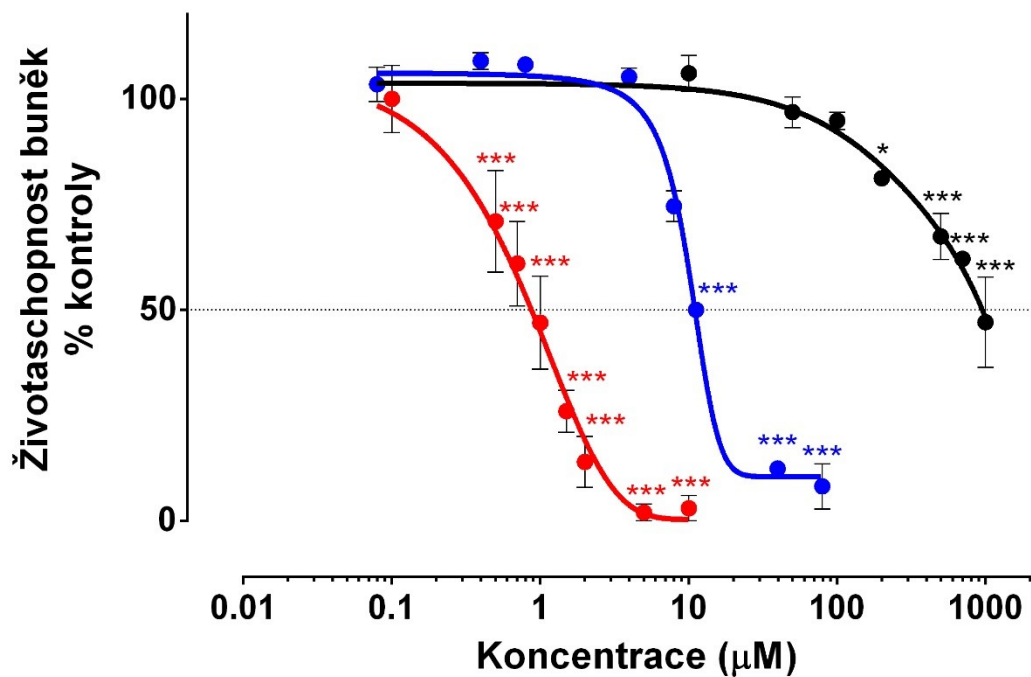
Účinnost daného PS na HeLa buňky byla sledována v širokém rozsahu koncentrací. Zjištěná fototoxicita látky v SFM odpovídá $EC_{50} = 0,833 \pm 0,312 \mu\text{M}$ a v SCM $EC_{50} = 99,80 \pm 23,47 \mu\text{M}$. Vlastní toxicita této látky bez ozáření světlem byla vyšší než nejvyšší použitá koncentrace ($TC_{50} > 1000 \mu\text{M}$). Experimentálně získaná data jsou znázorněna na **Obr. 9**.



Obr. 9 Životaschopnost HeLa buněk v závislosti na stoupající koncentraci ZIP82Zn-SO₃Na: po ozáření světlem v SFM (●) a v SCM (●), a bez ozáření aktivujícím světlem (●).

9.1.2 HK18Zn-COONa

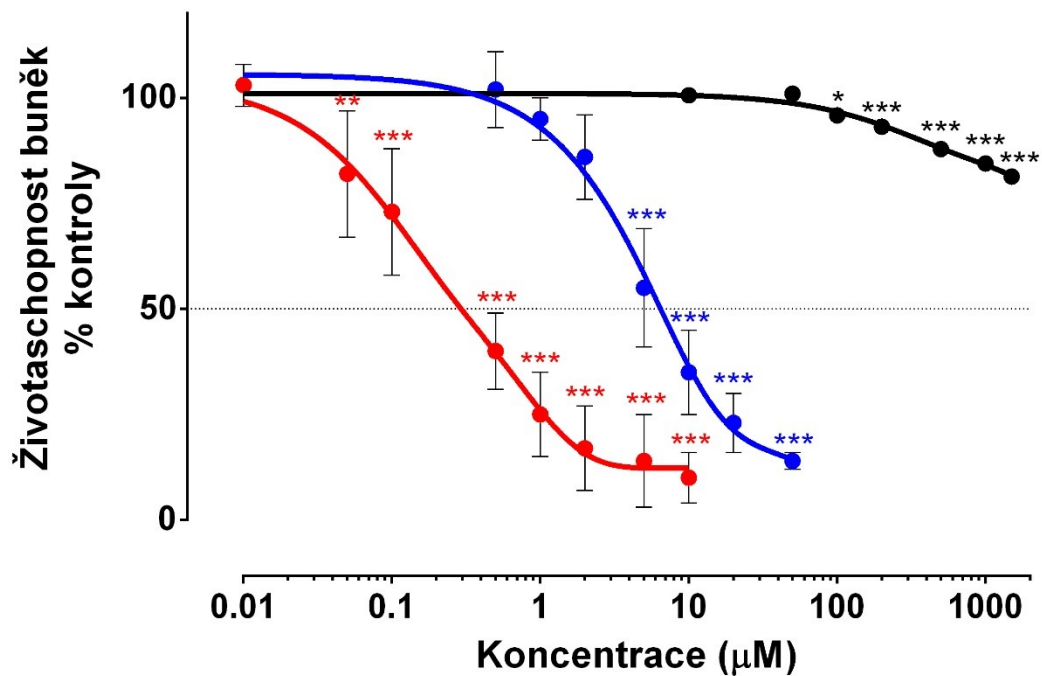
Účinnost daného PS na HeLa buňky byla sledována v rozsahu koncentrací 0,1 – 1000 μM . Zjištěná fototoxicita látky v SFM je $\text{EC}_{50} = 0,817 \pm 0,113 \mu\text{M}$ a v SCM $\text{EC}_{50} = 10,31 \pm 1,02 \mu\text{M}$. Vlastní toxicita této látky bez ozáření světlem je $\text{TC}_{50} = 1043 \pm 169 \mu\text{M}$. Experimentálně získaná data jsou znázorněna v následujícím grafu (Obr. 10).



Obr. 10 Životaschopnost HeLa buněk v závislosti na stoupající koncentraci HK18Zn-COONa: po ozáření světlem v SFM (●) a v SCM (●), a bez ozáření aktivujícím světlem (●).

9.1.3 HK22Zn-COONa

Účinnost daného PS na HeLa buňky byla sledována v rozsahu koncentrací od 0,005 do 1000 μM . Toxicita látky po ozáření aktivujícím světlem v SFM je $\text{EC}_{50} = 0,306 \pm 0,180 \mu\text{M}$ a v SCM $\text{EC}_{50} = 5,402 \pm 1,417 \mu\text{M}$. Vlastní toxicita této látky bez ozáření byla vyšší než nejvyšší použitá koncentrace ($\text{TC}_{50} > 1000 \mu\text{M}$). Experimentálně získaná data jsou znázorněna na **Obr. 11**.



Obr. 11 Životaschopnost HeLa buněk v závislosti na stoupající koncentraci HK22Zn-COONa: po ozáření světlem v SFM (●) a v SCM (●), a bez ozáření aktivujícím světlem (●).

9.1.4 Porovnání účinků zkoumaných PSs

K porovnání cytotoxického působení anionických PSs byl ze všech experimentálně získaných hodnot TC_{50} a EC_{50} vypočítán index TC_{50}/EC_{50} . V následující tabulce jsou uvedeny výsledné hodnoty v jednotlivých médiích (**Tab. 1**).

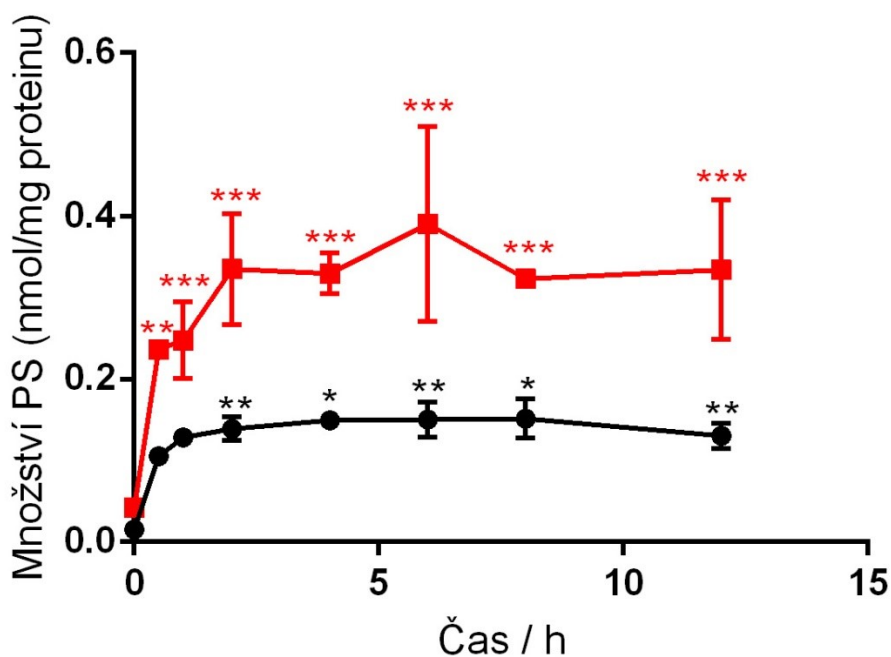
Tab. 1 Shrnutí výsledných hodnot u jednotlivých PSs.

	TC_{50}/EC_{50} v SCM	TC_{50}/EC_{50} v SFM
ZIP82Zn-SO ₃ Na	> 10	> 1200
HK18Zn-COONa	101	1277
HK22Zn-COONa	> 185	> 3268

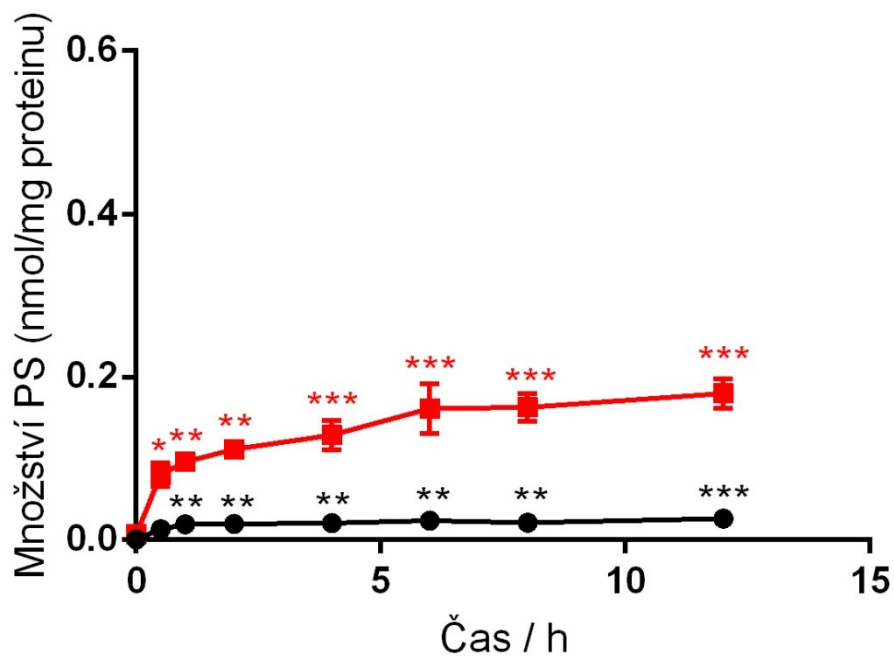
Výrazně lepších výsledků bylo u všech látek dosaženo v SFM. Nejvýhodnějším PS z daných látek se jeví být HK22Zn-COONa, jelikož vykazuje nejvyšší hodnotu TC_{50}/EC_{50} . Tato látka dosáhla v experimentech velmi dobré účinnosti po ozáření již při nízkých koncentracích a zároveň si zachovala nízkou toxicitu v absenci aktivujícího záření. Látky ZIP82Zn-SO₃Na a HK18Zn-COONa prokázaly dobrou účinnost, avšak díky vyšším hodnotám obou toxicit EC_{50} byla jejich hodnota TC_{50}/EC_{50} indexu výrazně nižší.

9.2 ČASOVÝ PROFIL PROSTUPU LÁTEK DO BUNĚK

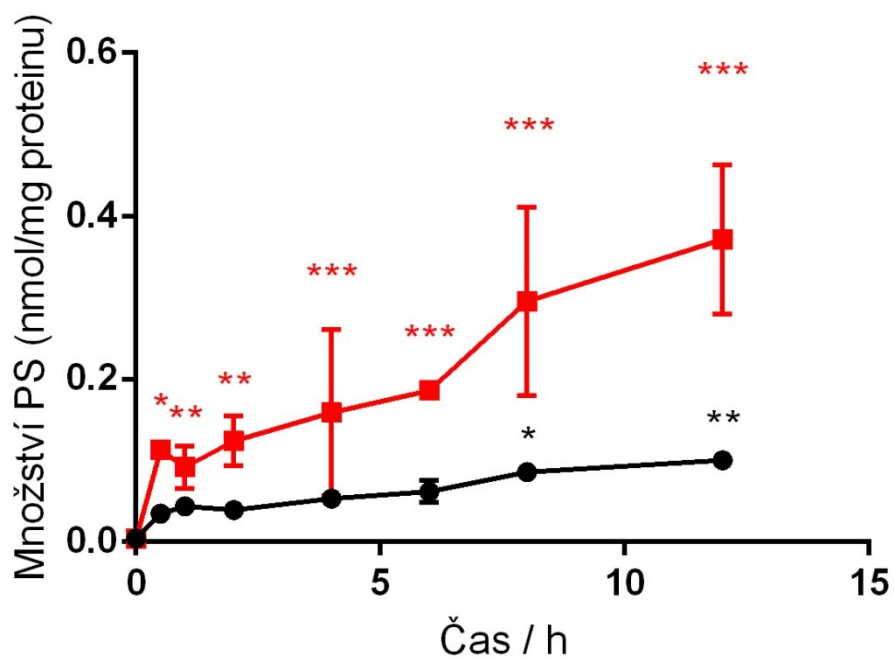
U testovaných PS byl sledován časový profil prostupu látek do buněk, a to v časových intervalech 1, ½, 1, 2, 4, 6, 8 a 12 hodin. Časový prostup zkoumaných Pc do buněk byl rychlý během prvních dvou hodin a u látek HK18Zn-COONa a HK22Zn-COONa bylo poté dosaženo plató fáze kolem 12 hodiny. Výsledné hodnoty byly zpracovány graficky (Obr. 12, 13, 14) jako závislost množství látky na čase. Množství látky ve vzorku bylo odečteno z kalibrační přímky vytvořené přidáváním známého množství PS k buněčnému lyzátu a následně vztaženo na množství bílkoviny v každém vzorku.



Obr. 12 Časový prostup HK18Zn-COONa do HeLa buněk po inkubaci s 4 μ M koncentrací PS v SFM (■) a SCM (●).



Obr. 13 Časový průběh HK22Zn-COONa do HeLa buněk po inkubaci s 4 μ M koncentrací PS v SFM (■) a SCM (●).



Obr. 14 Časový průběh ZIP82Zn-SO₃Na do HeLa buněk po inkubaci s 4 μ M koncentrací PS v SFM (■) a SCM (●).

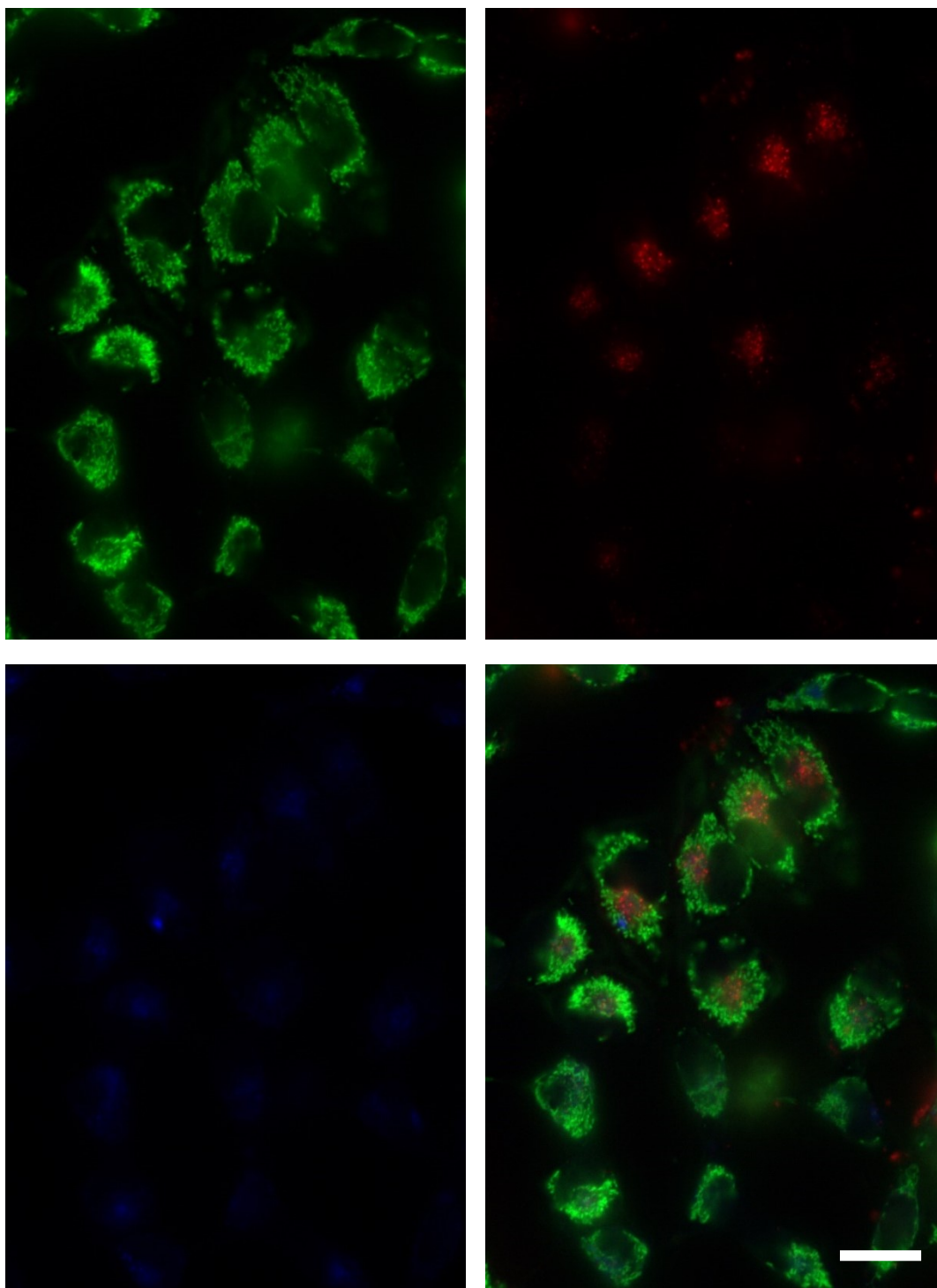
9.3 FOTOGRAFICKÁ DOKUMENTACE

Fotografická dokumentace byla provedena u všech zkoumaných anionických PSs na nádorové buněčné linii HeLa. Buňky, ke kterým nebyla přidána hodnocená látka, jsou označeny jako kontrola.

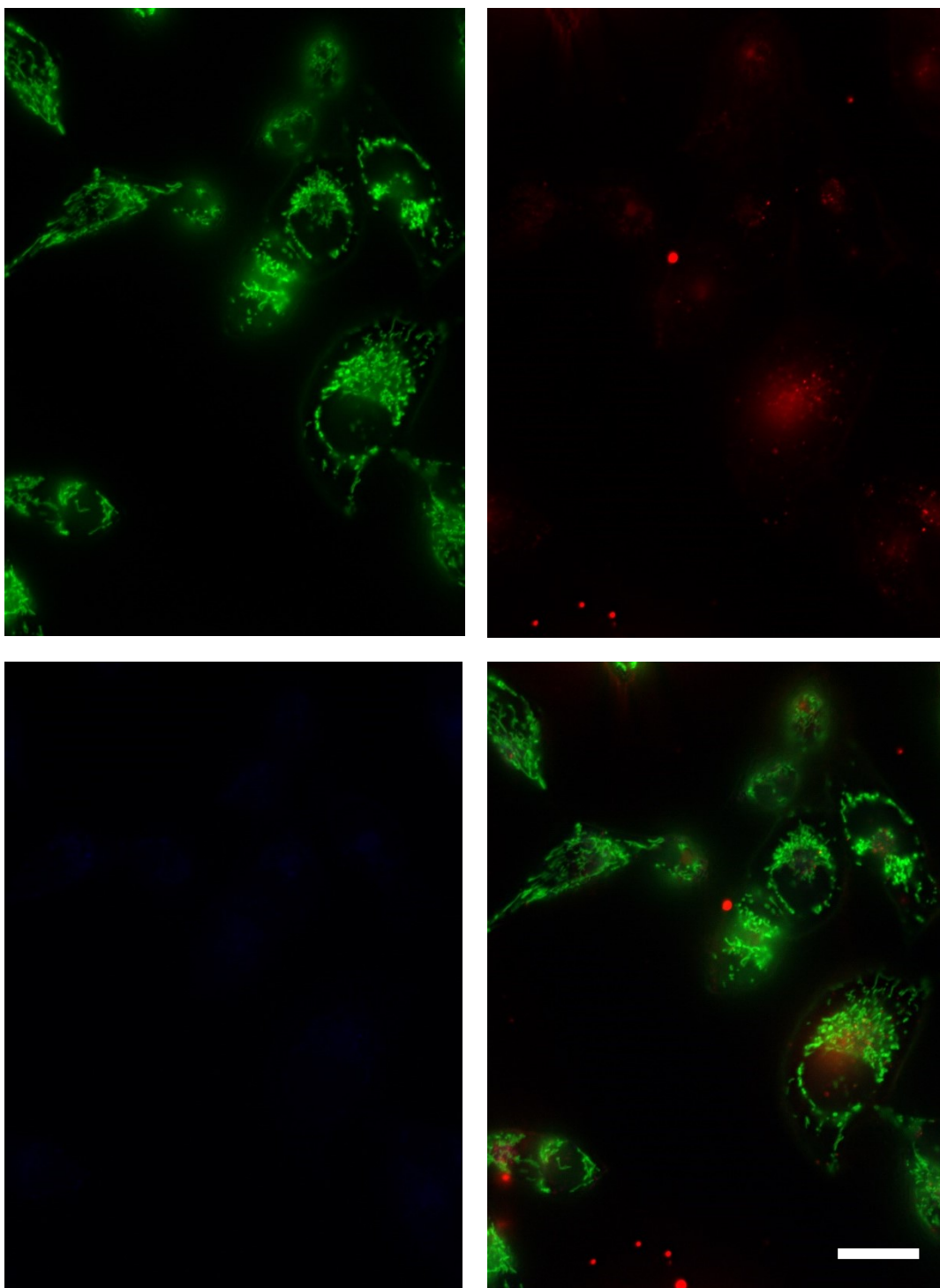
9.3.1 Subcelulární lokalizace

Subcelulární lokalizace PSs uvnitř buněk byla hodnocena pomocí fluorescenčních sond, které jsou specifické pro různé organely. Pro mitochondrie byla použita sonda MitoTracker Green FM a pro lyzosomální kompartmenty sonda LysoTracker Blue DND-22. U všech hodnocených látek byly pořízeny mikrofotografie za využití fluorescenčních filtrů pro Cy5, DAPI a FITC (**Obr. 15, 16, 17**).

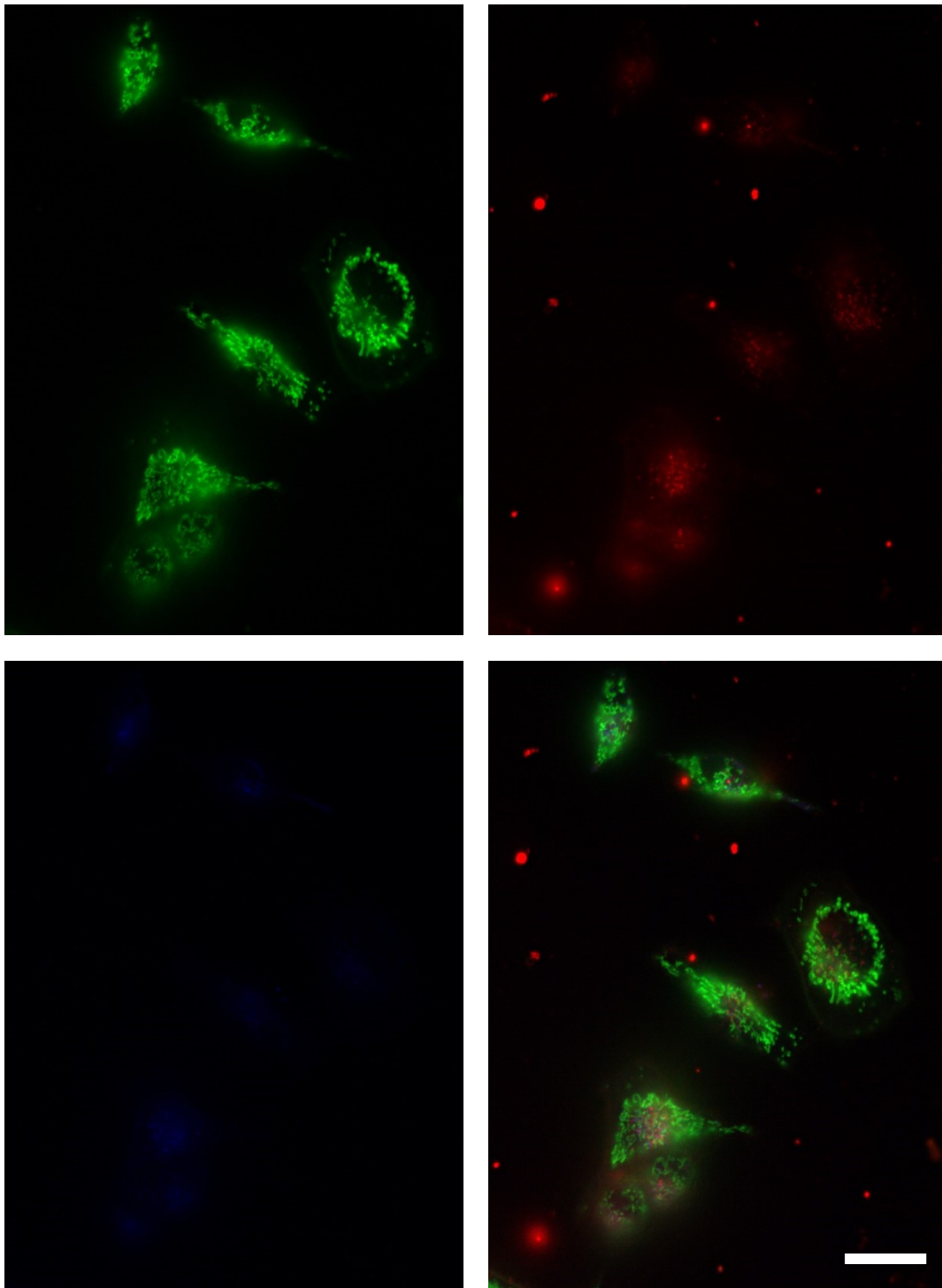
Cílem lokalizace PSs vykazujících červenou fluorescenci v buňkách byl určen endolyzosomální systém, což se vzhledem k povaze PSs dalo očekávat – jde totiž o látky velké molekulové hmotnosti nesoucí několik nabitých skupin. Předpokládáme tedy endocytotický způsob prostupu do buněk. Po inkubaci testovaných látek s fluorescenční sondou LysoTracker nebyl viditelný téměř žádný signál, jelikož LysoTracker pravděpodobně vytváří komplexy s anionickými PSs a následně tak vede ke vzájemnému zhášení fluorescence těchto sloučenin (Macháček et al., 2016b). Charakter a lokalizace vlastní fluorescence PSs však odpovídá endolyzosomálnímu kompartmentu. Překryv se signálem MitoTrackeru nebyl pozorován. Primární cíl tvorby $^1\text{O}_2$ a dalších ROS tedy představují lyzosomy.



Obr. 15 Subcelulární lokalizace HK18Zn-COONa v HeLa buňkách: zelená fluorescence – mitochondrie, FITC; červená fluorescence – PS, Cy5; modrá fluorescence – lysosomy, DAPI; vpravo dole je zobrazený překryv fluorescenčních kanálů. Měřítko odpovídá 20 μm .



Obr. 16 Subcelulární lokalizace HK22Zn-COONa v HeLa buňkách: zelená fluorescence – mitochondrie, FITC; červená fluorescence – PS, Cy5; modrá fluorescence – lyzomy, DAPI; vpravo dole je zobrazený překryv fluorescenčních kanálů. Měřítka odpovídá 20 μm .



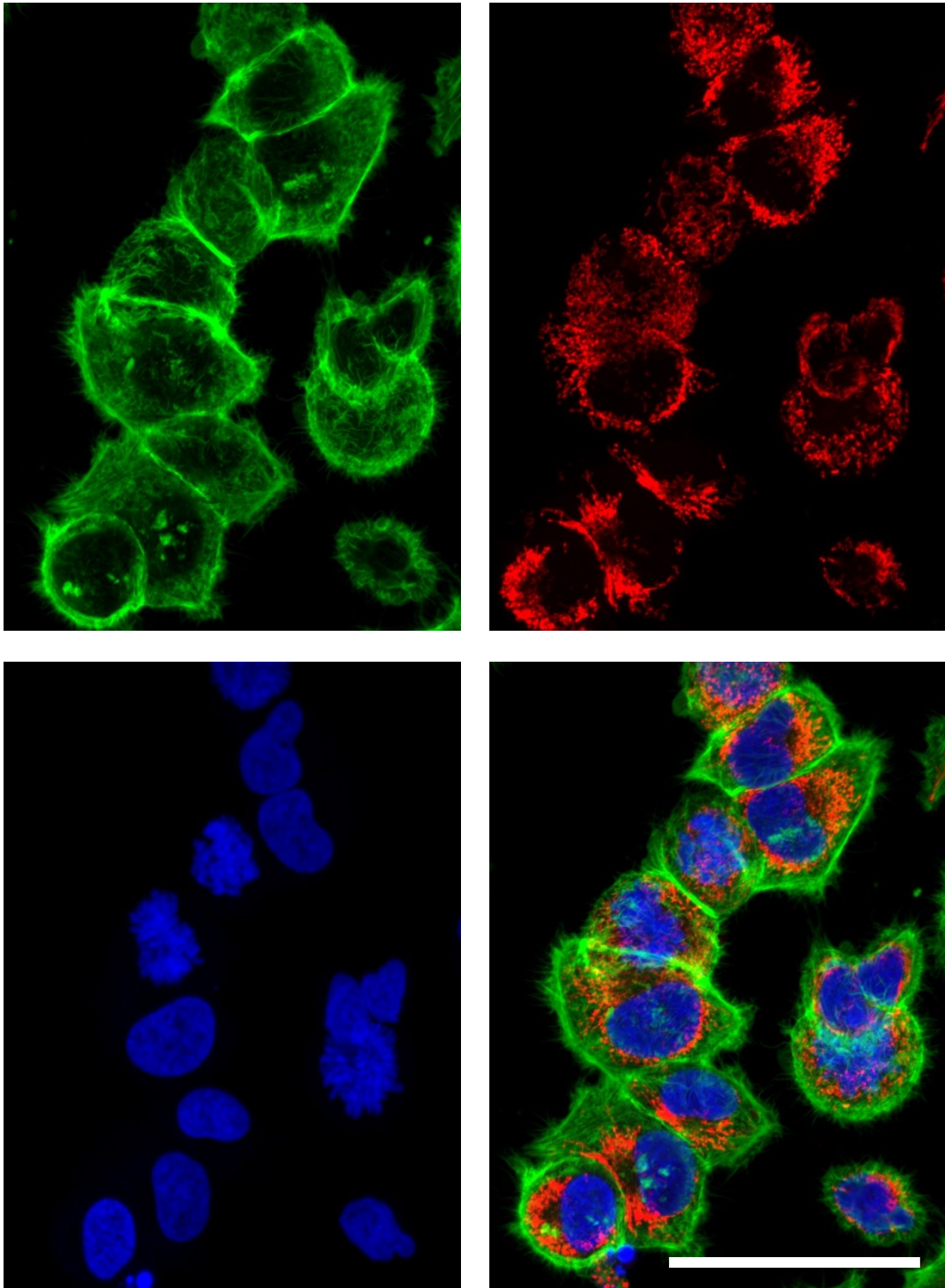
Obr. 17 Subcelulární lokalizace ZIP82Zn-SO₃Na v HeLa buňkách: zelená fluorescence – mitochondrie, FITC; červená fluorescence – PS, Cy5; modrá fluorescence – lysosomy, DAPI; vpravo dole je zobrazený překryv fluorescenčních kanálů. Měřítka odpovídá 20 μm.

9.3.2 Morfologické změny

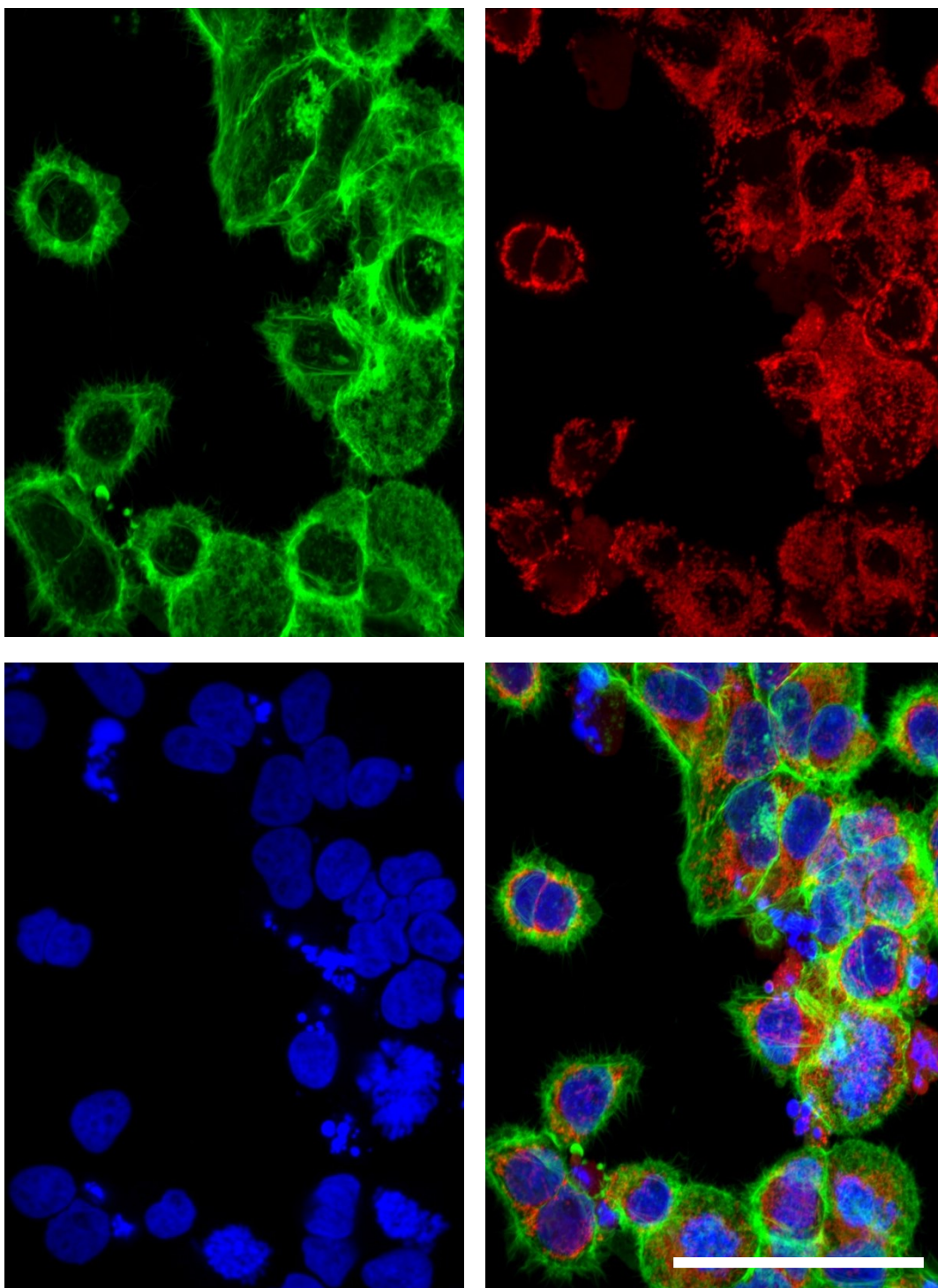
Rozsáhlé morfologické změny na HeLa buňkách, které byly způsobeny působením PS po jeho světelné aktivaci, byly sledovány s využitím fluorescenčních sond MitoTracker Red CMXRos pro mitochondrie, Hoechst 33342 pro buněčná jádra a fluorescenčně značeného faloidinu (Actin Green) pro značení aktinového cytoskeletu. Mikrofotografie buněk byly pořízeny s použitím laserů 405, 488 a 561 v kombinaci s příslušnými emisními filtry (FITC, DAPI a Cy3).

Buňky, které nebyly vystaveny cytotoxickému působení PS (kontrola), mají normální tvar s vřetenovitými až vláknitými mitochondriemi. Buněčná struktura jader je beze změn tvaru i chromatinu. Aktinový cytoskelet má charakteristickou vláknitou strukturu. Buňky kontroly jsou zobrazeny na **Obr. 18**.

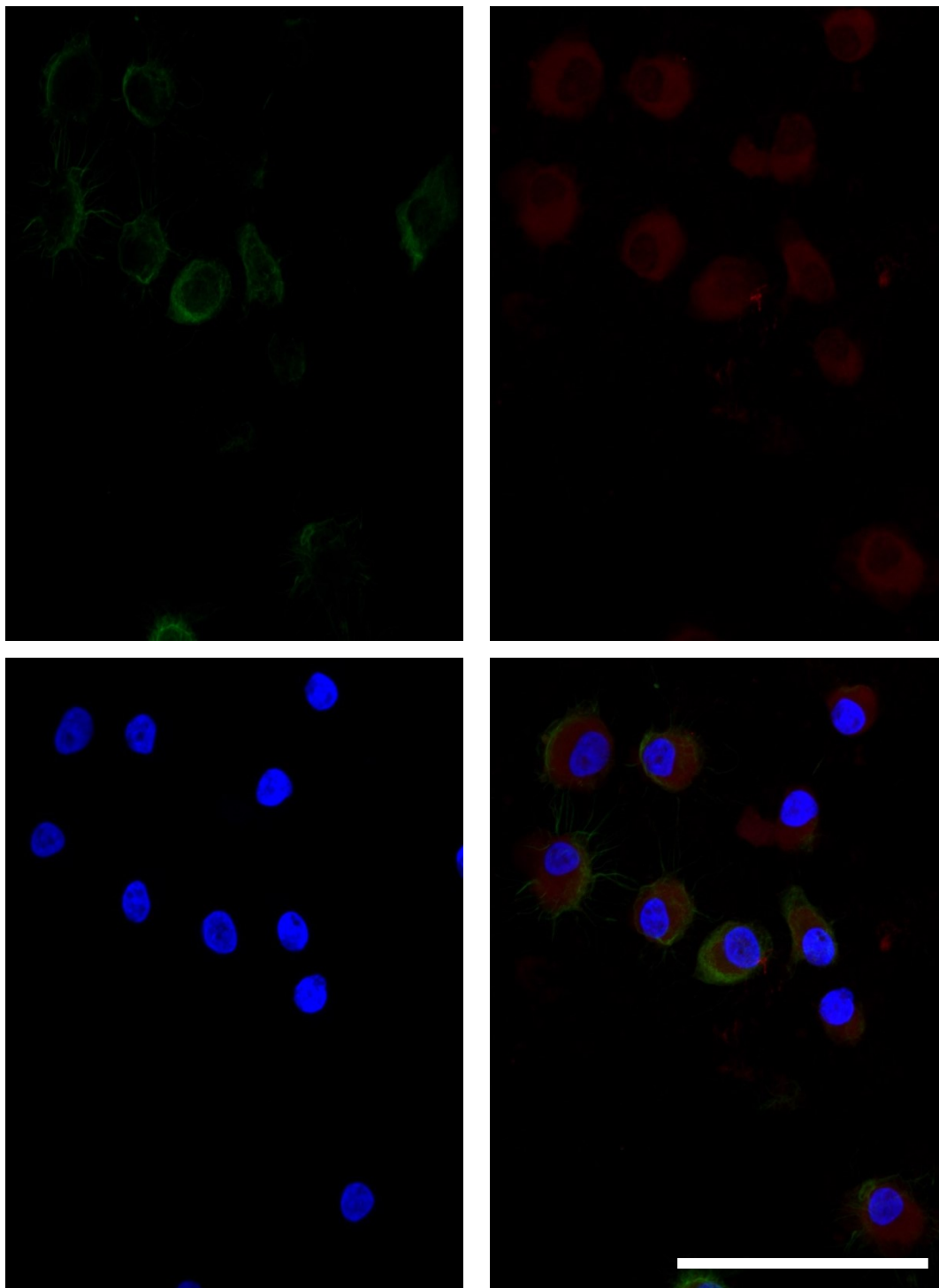
Cytotoxicitní experimenty ke sledování morfologických změn buněk byly hodnoceny u všech zkoumaných látek ve dvou koncentracích, EC_{15} a EC_{85} . Komplexní morfologické změny se projevily u nižší fotodynamické dávky zakulacením buněk, tvorbou membránových blebů a pyknózou – tedy morfologické znaky apoptózy. Mitochondrie ztrácí svůj typický tvar a postupně se stávají sférickými útvary s fragmentací a u EC_{85} koncentrací tento signál zaniká. Změny na jádře se projevují fragmentací jádra (zmíněná pyknóza, pozorováno především u EC_{15}) a kondenzací jaderného chromatinu a celého jádra (u EC_{85}). Dochází k reorganizaci aktinového cytoskeletu (nižší fotodynamická dávka) až kompletní ztrátou signálu u vyšší fotodynamické dávky. Morfologické změny buněk pro jednotlivé látky a koncentrace jsou zobrazeny na mikrofotografiích na **Obr. 19-24**.



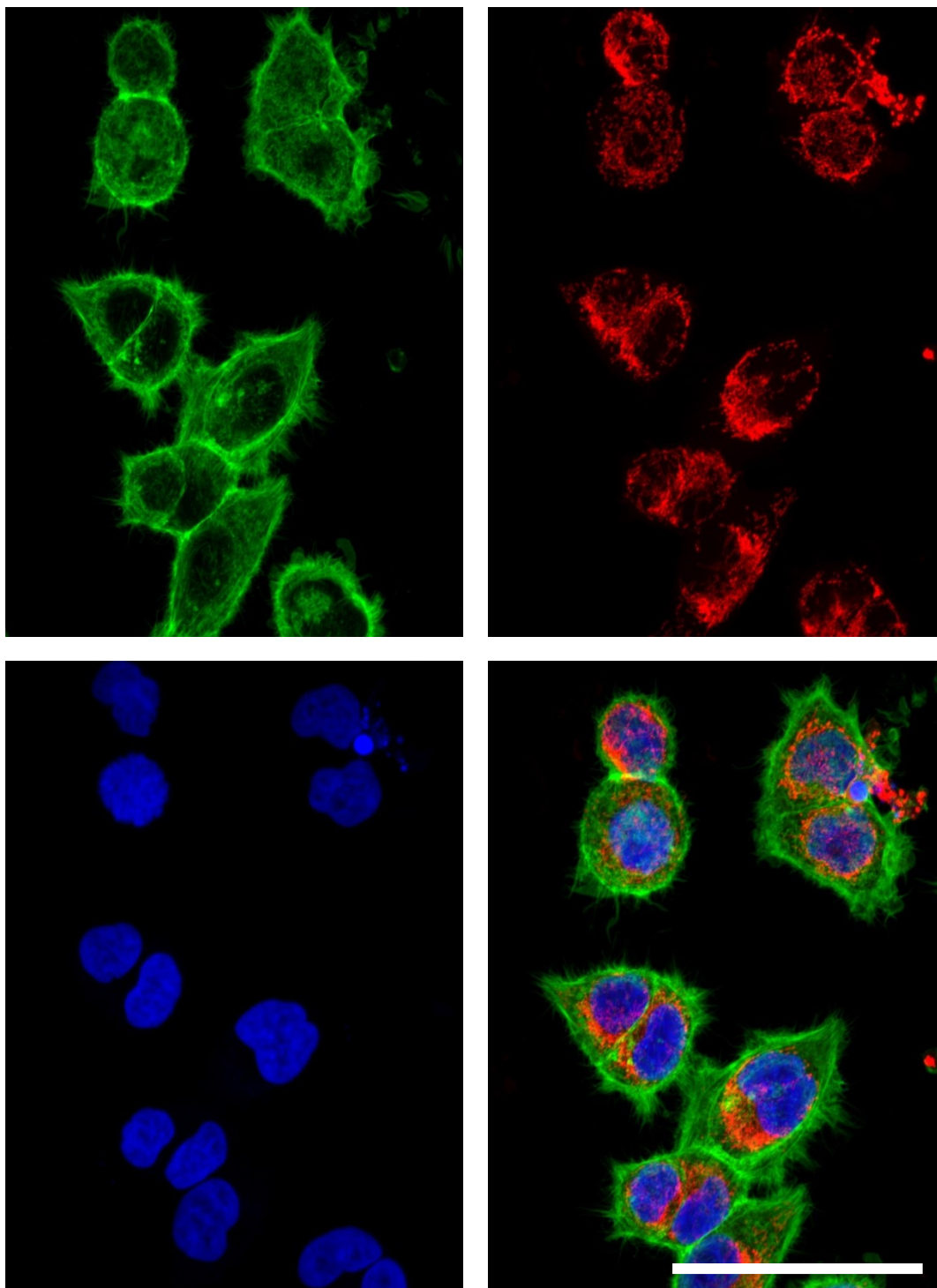
Obr. 18 HeLa buňky neovlivněné kontroly beze změn buněčných struktur. Jednotlivé snímky zobrazují: aktinový cytoskelet (zelená fluorescence, FITC); mitochondrie (červená fluorescence, Cy3); buněčná jádra (modrá fluorescence, DAPI); vpravo dole je zobrazený překryv fluorescenčních kanálů (FITC, DAPI, Cy3). Měřítka odpovídá 50 μm .



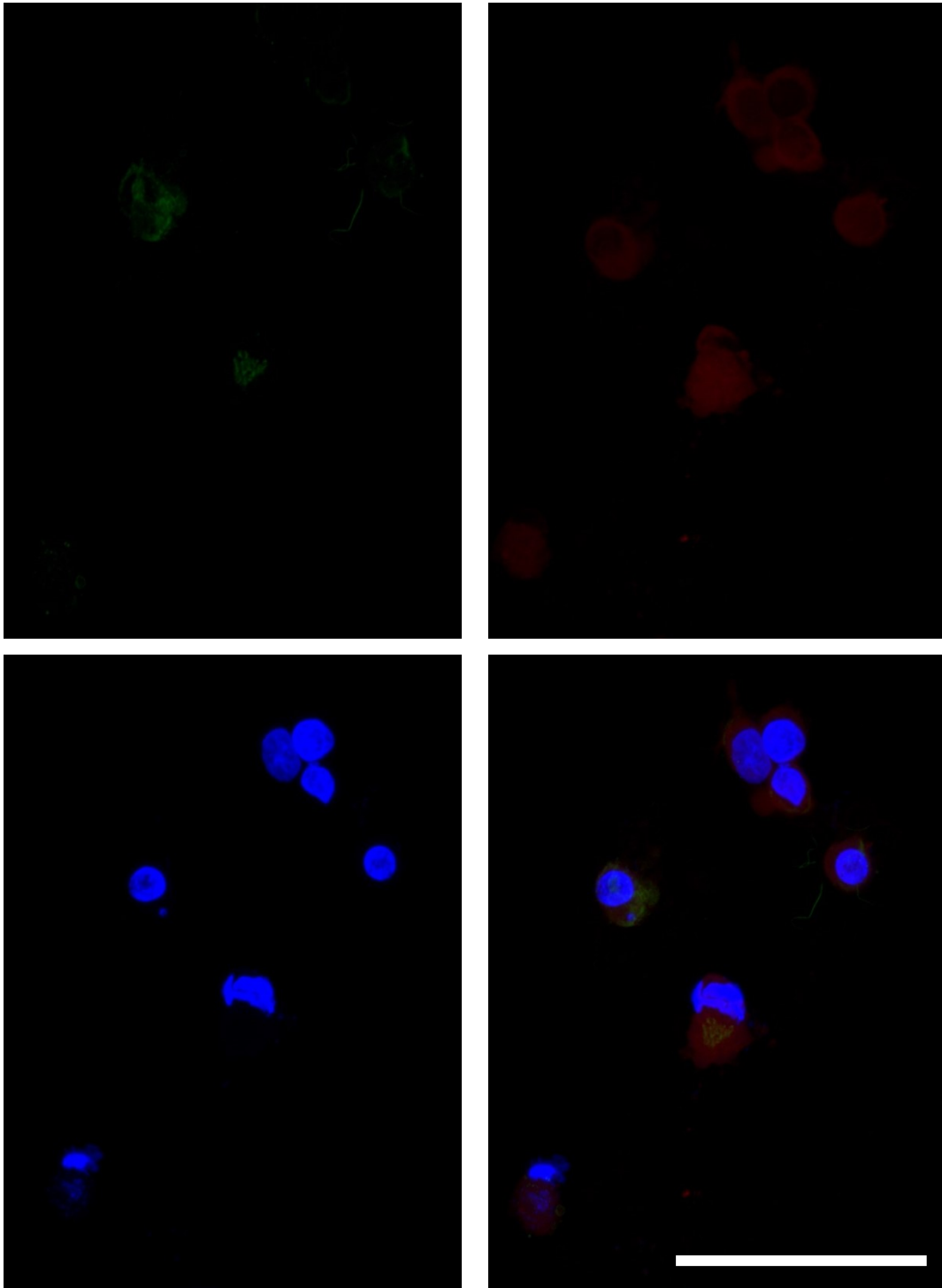
Obr. 19 Morfologické změny na HeLa buňkách způsobené aktivovaným HK18Zn-COONa v koncentraci EC_{15} . Jednotlivé snímky zobrazují: aktinový cytoskelet (zelená fluorescence, FITC); mitochondrie (červená fluorescence, Cy3); buněčná jádra (modrá fluorescence, DAPI); vpravo dole je zobrazený překryv fluorescenčních kanálů (FITC, DAPI, Cy3). Měřítka odpovídá 50 μ m.



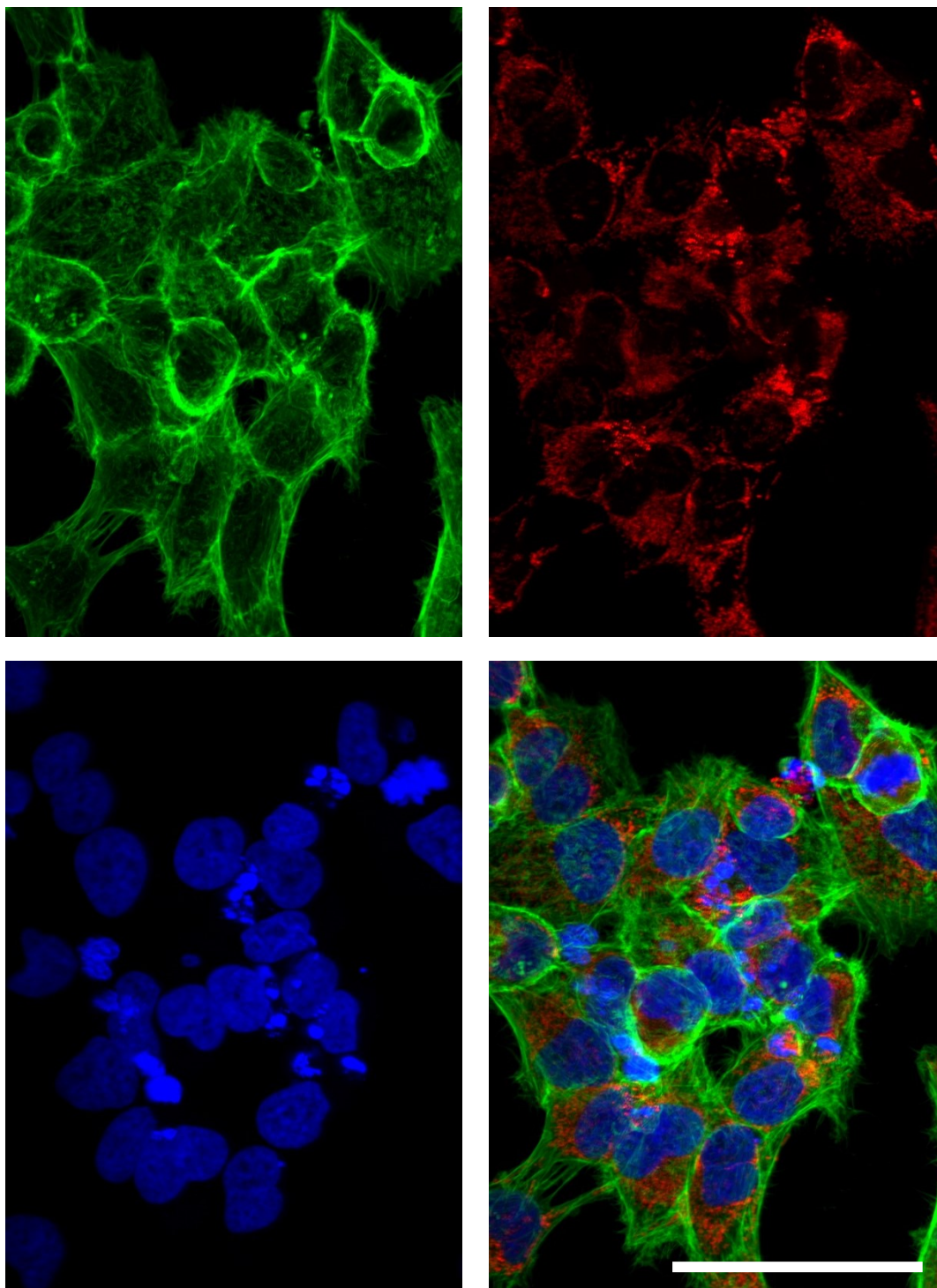
Obr. 20 Morfologické změny na HeLa buňkách způsobené aktivovaným HK18Zn-COONa v koncentraci EC_{85} . Jednotlivé snímky zobrazují: aktinový cytoskelet (zelená fluorescence, FITC); mitochondrie (červená fluorescence, Cy3); buněčná jádra (modrá fluorescence, DAPI); vpravo dole je zobrazený překryv fluorescenčních kanálů (FITC, DAPI, Cy3). Měřítka odpovídá 50 μ m.



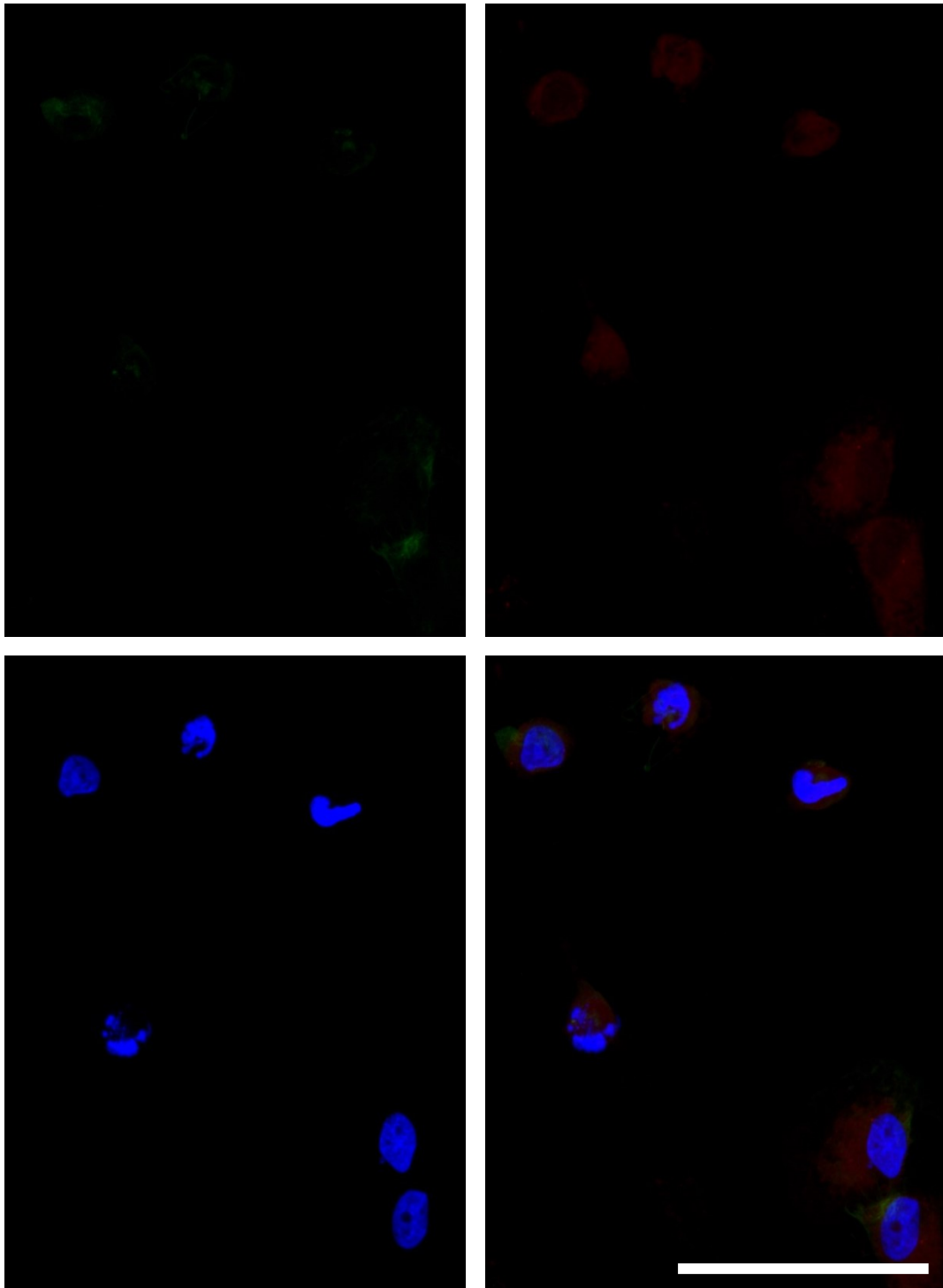
Obr. 21 Morfologické změny na HeLa buňkách způsobené aktivovaným HK22Zn-COONa v koncentraci EC_{15} . Jednotlivé snímky zobrazují: aktinový cytoskelet (zelená fluorescence, FITC); mitochondrie (červená fluorescence, Cy3); buněčná jádra (modrá fluorescence, DAPI); vpravo dole je zobrazený překryv fluorescenčních kanálů (FITC, DAPI, Cy3). Měřítka odpovídá 50 μ m.



Obr. 22 Morfologické změny na HeLa buňkách způsobené aktivovaným HK22Zn-COONa v koncentraci EC_{85} . Jednotlivé snímky zobrazují: aktinový cytoskelet (zelená fluorescence, FITC); mitochondrie (červená fluorescence, Cy3); buněčná jádra (modrá fluorescence, DAPI); vpravo dole je zobrazený překryv fluorescenčních kanálů (FITC, DAPI, Cy3). Měřítka odpovídá 50 μ m.



Obr. 23 Morfologické změny na HeLa buňkách způsobené aktivovaným ZIP82Zn-SO₃Na v koncentraci EC₁₅. Jednotlivé snímky zobrazují: aktinový cytoskelet (zelená fluorescence, FITC); mitochondrie (červená fluorescence, Cy3); buněčná jádra (modrá fluorescence, DAPI); vpravo dole je zobrazený překryv fluorescenčních kanálů (FITC, DAPI, Cy3). Měřítka odpovídá 50 μm.



Obr. 24 Morfologické změny na HeLa buňkách způsobené aktivovaným ZIP82Zn-SO₃Na v koncentraci EC₈₅. Jednotlivé snímky zobrazují: aktinový cytoskelet (zelená fluorescence, FITC); mitochondrie (červená fluorescence, Cy3); buněčná jádra (modrá fluorescence, DAPI); vpravo dole je zobrazený překryv fluorescenčních kanálů (FITC, DAPI, Cy3). Měřítka odpovídá 50 μm.

10 DISKUZE

Nádorová onemocnění patří mezi hlavní příčiny morbidit a mortality na celém světě. V roce 2012 bylo diagnostikováno přibližně 14 miliónů nových případů nádorových onemocnění a počet s nimi souvisejícími úmrtími činil 8,2 miliónů. Předpokládá se, že tyto hodnoty se v příštích dvou desetiletích zvýší asi o 70 %.

Současná klinická léčba zahrnuje chirurgické zákroky, radioterapii, chemoterapii, imunoterapii a další terapie, spolu s kombinací těchto strategií. Nicméně tyto terapie jsou často spojeny s vážnými vedlejšími účinky a vysokými náklady na léčbu. V případě selhání těchto konvenčních terapií lze tedy s výhodou použít alternativní terapie jako je PDT. Proto je důležitý zejména vývoj nových přístupů k léčbě, které jsou bezpečné, účinné a nákladově efektivní.

PDT, založená na fotoaktivaci PSs, se stala dobře studovanou léčebnou metodou pro nádorová onemocnění. Jedná se o minimálně invazivní léčebnou metodu, která zahrnuje podání PS a ozáření PS-nasyčeného tumoru laserovým světlem. Takto aktivovaný PS reaguje s molekulárním kyslíkem, což způsobí lokální produkci ROS v nádorové tkáni, včetně vysoce škodlivého $^1\text{O}_2$. V nádorové tkáni tak nastane stav oxidačního stresu vedoucí ke smrti nádorových buněk a poškození cévního systému nádoru. V důsledku toho dojde k vyčerpání kyslíku a živin z nádorové tkáně a tím vyvolání místní protinádorové imunitní odpovědi. Všechny tyto faktory přispívají k odstranění nádoru (Weijer, 2017; Zhang et al., 2017).

Na rozdíl od chirurgických zákroků či radioterapie nemá PDT vliv na okolní extracelulární matrix a jen zřídka způsobuje jizvy. Toto, v kombinaci se snadnou světelnou aplikací, dělá PDT populární terapeutickou metodou pro nádorové a prekancerózní stavy u lidí. Navíc, protože fotosenzitivní barviva jsou fluoreskující a selektivně se akumulují v nádorových tkáních, mohou být dodatečně použity k vizualizaci a rozlišování nádorů od normálních tkání, čímž se zlepší přesnost nádorové chirurgie (Dobson et al., 2018).

Photofrin[®], patřící do první generace PS, je stále široce používán pro léčbu různých druhů nádorových onemocnění. Má však několik nevýhod, které významně omezují jeho obecné klinické použití. V důsledku toho byl proveden rozsáhlý výzkum návrhu nových molekul PS s optimalizovanými farmaceutickými vlastnostmi a s cílem

překonat nevýhody tradičních PS, jako jsou špatná chemická čistota, dlouhý biologický poločas, nadměrná akumulace v kůži a nízké absorpční koeficienty.

Pc patří do velmi slibné rodiny PSs s vysokou produkcí $^1\text{O}_2$, silnou absorpcí nad 680 nm a širokou variabilitou možných substitucí, které mohou definitivně nastavit požadované fotofyzikální a fyzikálně-chemické vlastnosti (Macháček et al., 2016a). Jejich bližší klinickou aplikaci ovšem omezují jejich nízká rozpustnost a π - π vazby v molekulách. Strategie k překonání těchto nevýhod mohou zahrnovat inkorporaci kationických nebo anionických skupin, peptidů, β -cyklodextrinů, makrocyclických polyeterů, glycerin a tak dále (Zhang et al., 2017).

ZnPc splňují většinu fotofyzikálních kritérií včetně velmi vysokého Φ_{Δ} . Na druhé straně jsou však špatně rozpustné ve vodě a mají silnou agregaci v tomto polárním médiu, což činí molekuly Pc fotodynamicky neaktivní. Z toho důvodu je neustále přezkoumáváno několik syntetických pokusů o zvýšení rozpustnosti ve vodě pomocí vhodné periferní substituce. Agregace ZnPc ve vodě bez přídavku povrchově aktivních látek nebo organických rozpouštědel nebyla ve většině případů doposud uspokojivě vyřešena (Makhseed et al., 2013).

Tato práce se zabývala studiem fotodynamické aktivity dvou nově syntetizovaných PS ze skupiny (aza)ftalocyaninů a jedné již dříve publikované látky na lidské nádorové buněčné linii HeLa. Všechny zkoumané PSs byly syntetizovány na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty v Hradci Králové vědeckou skupinou doc. PharmDr. Petra Zimčíka, Ph.D. Uvedené PSs jsou silně anionické povahy, rozpustné ve vodě a nesou centrální atom zinku. Jedinou dříve publikovanou látkou ze zde studovaných byla HK22Zn-COONa, která je záporně nabitým ftalocyaninem obsahujícím 16 karboxylových substituentů (Choi et al., 2004). PSs HK18Zn-COONa a ZIP82Zn-SO₃Na byly zcela nově navržené a testované v *in vitro* podmínkách. Aktivita látek se zkoušela v SCM i SFM médiích, z nichž mnohonásobně lepších výsledků bylo dosaženo s použitím SFM.

V roce 2016 byly publikovány výsledky *in vitro* studovaného a ve vodě rozpustného anionického hexadekakarboxylového tetrapyrazinoporfyrinu (TPyzPzs). TPyzPzs jsou velmi slibnými aza-analogy Pc (AzaPc), které získaly svou pozornost hned v několika aplikacích. Příkladem je využití jako fluorescenční senzory nebo zhášecí fluorescence u DNA hybridizačních sond, a samozřejmě jejich použití v PDT.

Tento anionický zinečnatý TPyzPzs nesoucí osm 3,5-dikarboxylatofenylovými substituentů na periférii (tedy 16 nábojů) byl vytvořen k dosažení úplné inhibice agregace ve vodě prostřednictvím elektrostatických odpudivých sil. Toto uspořádání v nedávné studii prokázalo úplné zablokování agregace planárního hydrofobního jádra TPyzPzs ve vodě nebo pufru o $\text{pH} > 5,7$. Látka vykazovala na HeLa buňkách fotodynamickou aktivitu *in vitro* s hodnotami $\text{EC}_{50} = 5,7 \pm 1,1 \mu\text{M}$ a $0,55 \pm 0,09 \mu\text{M}$ (v SCM a SFM médiu) a nízkou vlastní toxicitu ($\text{TC}_{50} = 154 \pm 8,5 \mu\text{M}$), což vykazuje terapeutický poměr $\text{TC}_{50}/\text{EC}_{50} > 27$ (Macháček et al., 2016b). Ve srovnání s látkami zkoumanými v této práci však vykazuje srovnatelnou fotodynamickou účinnost v SFM. V přítomnosti séra je aktivita této látky srovnatelná s fototoxicitou látky HK22Zn-COONa ($\text{EC}_{50} = 5,402 \pm 1,417 \mu\text{M}$). Bohužel, HK18ZnCOONa má poloviční aktivitu ($\text{EC}_{50} = 10,31 \pm 1,02 \mu\text{M}$) a ZIP82ZnSO₃Na dokonce o řád nižší ($\text{EC}_{50} = 99,80 \pm 23,47 \mu\text{M}$).

Látka s naším označením HK22Zn-COONa byla již dříve publikována a autoři porovnávali její fotodynamickou aktivitu s jejím bezkovovým analogem. Zinečnatý PS v této studii vykazoval vysokou a selektivní fototoxicitu proti buňkám makrofágového původu J774 prostřednictvím receptorem-zprostředkované endocytózy bez potřeby jakékoliv biokonjugace. Obě látky jsou účinnými generátory ¹O₂, avšak Φ_{Δ} zinečnatého analogu projevil významně vyšší hodnotou (0,40 v DMF) než u jeho protějšku bez centrálního atomu kovu (0,27). Fotodynamická aktivita byla studována na dvou různých buněčných liniích (myší makrofágová J774 a buňky lidského hepatocelulárního karcinomu HepG2), kdy HepG2 byla odolná vůči fototoxickému efektu obou látek v koncentraci pod 4 μM , zatímco J774 byla velmi citlivá. Fotodynamická aktivita bezkovového analogu s hodnotou EC_{50} asi 4 μM byla nižší než u ZnPc, kde byla pozorována EC_{50} již kolem 1 μM (Choi et al., 2004).

Jednou z dalších látek z řad zinečnatých Pcs nesoucích záporný náboj je amfifilní zinečnatý tetrakarboxyoktafluorofthalocyanin. Jeho fotodynamická aktivita byla experimentálně hodnocena na buněčné linii HeLa a srovnávána s hydrofobním zinečnatým hexadecafluorofthalocyaninem a hydrofilním zinečnatým nefluorovaným oktakarboxyftalocyaninem. Tento amfifilní PS dosáhl nejvyšší aktivity ($\text{EC}_{50} \sim 0,5 \mu\text{M}$) v rámci této studie. Tento efekt je způsoben zjevně tím, že PS je akumulován převážně v hydrofobní lipidové membráně a v HeLa buňkách se vyskytuje ve své fotoaktivní monomerní formě (Oda et al., 2000).

U anionických PS proběhlo také *in vitro* hodnocení toxicity bez přítomnosti aktivujícího světla na nádorové buněčné linii HeLa. Všechny anionické a ve vodě rozpustné látky vykazovaly velmi nízkou vlastní toxicitu. Látky ZIP82Zn-SO₃Na a HK22Zn-COONa byly téměř netoxické s hodnotou TC₅₀ > 1000 μM. Vlastní toxicita HK18Zn-COONa byla také velmi nízká TC₅₀ = 1043 ± 169 μM. V porovnání s anionickým hexadekakarboxylovým tetrapyrazinoporfyrinem je u zde studovaných PSs tato toxicita výrazně nižší.

Výsledky této diplomové práce vypovídají o tom, že všichni tři zástupci studovaných anionických (Aza)Pcs nejsou příliš nadějnými PSs pro PDT nádorových onemocnění přes to, že poměr TC₅₀/EC₅₀ pro nejnadějnější látku HK22Zn-COONa je 3268. Tato hodnota je však stanovena za použití média neobsahujícího sérum. V přítomnosti séra tento poměr klesl na hodnotu 185. Zvláště v kontextu extrémně vysoké aktivity neagregujících kationických derivátů je tato hodnota velmi nízká (Ghazal et al., 2017; Macháček et al., 2016a). Klíčovou roli zde pravděpodobně hraje vazba na bílkoviny séra, jako tomu bylo u publikovaného anionického PSs (Macháček et al., 2016b). V budoucnu by měla být věnována pozornost přípravě dalších anionických derivátů schopných předcházet interakci s proteiny a zároveň si zachovat monomerní stav při nízkém pH.

Zkoumané anionické (Aza)Pcs vykazovaly účinné fotodynamické aktivity na nádorové buněčné linii HeLa s efektivními výslednými hodnotami EC₅₀ pod 1 μM pouze v SFM. Tyto výsledky byly lepší než hodnoty EC₅₀ získané pro klinicky schválený (Rusko od roku 2001) PS trisulfonovaný hydroxyhlinitý Pc (Photosens®). Photosens® byl hodnocen za stejných experimentálních podmínek kolegy z naší vědecké skupiny. Fotodynamická aktivita Photosens® byla EC₅₀ = 2,07 ± 0,29 μM v SCM a vlastní toxicita vykazovala hodnoty TC₅₀ = 127 ± 7,8 μM. Z poměru těchto hodnot tedy vyplývá, že index TC₅₀/EC₅₀ u látky Photosens® je řádově podobný (TC₅₀/EC₅₀ = 60) jako u látek podrobených experimentům v této práci (Macháček et al., 2016a).

Časový prostup všech zkoumaných anionických derivátů Pc do buněk z nádorové linie HeLa byl zpočátku v prvních dvou hodinách velmi rychlý s dosažením plató fáze kolem 12 hodin ve finálním množství do 0,40 nmol/mg proteinu (SFM) resp. 0,2 nmol/mg proteinu (SCM; u látky HK22Zn-COONa dokonce pod 0,03 nmol/mg

proteinu). Ve srovnání s některými agregujícími kationickými Pc je prostup anionických Pc přibližně 2,5 násobně nižší (Macháček et al., 2016b). Bylo prokázáno, že relativní uptake ftalocyaninových sloučenin v kultivovaných buňkách je významně ovlivněn polaritou makrocyclických substituentů, povahou centrálně chelatovaného iontu kovu popř. axiálními ligandy (W. Liu et al., 2005).

Místem subcelulární lokalizace studovaných látek byl určen endolyzosomální kompartment, což se předpokládalo vzhledem k nabitému anionickému charakteru těchto sloučenin a jejich velké molekulové hmotnosti. Nicméně po společné inkubaci PS s fluorescenční sondou LysoTracker nebyl viditelný žádný signál této sondy. Toto zjištění lze vysvětlit obdobným chováním hexadekakarboxylovým TPyzPz – bazická a v lyzosomech protonovaná sonda LysoTracker vytváří komplexy v základním stavu s anionickým PS, což vede ke vzájemnému statickému zhášení fluorescence. Což je potvrzeno změnami absorpčních spekter a intenzit fluorescence, které byly pozorovány při smíchání obou látek. Pro vizualizaci anionických Pc uvnitř těchto organel tedy nemusí být vhodné použití takových bazických sond pro lyzosity, ale jiných přístupů jako je např. transfekce buněk fluorescenčními proteiny specifickými pro endolyzosomální cestu (Macháček et al., 2016b). Vzhledem k fotodynamickému působení látek probíhajících po jejich aktivaci světlem byly u všech studovaných anionických zástupců pozorovány komplexní morfologické změny buněk – struktury jader, mitochondrií, plazmatických membrán i celého aktinového cytoskeletu poukazovali na proběhlé buněčné smrti. U nízkých fotodynamických dávek došlo k nárůstu množství apoptotických buněk (zakulacené, pyknotické jádro, membránové bleby), ale vysoké dávky vedly pravděpodobně k nekrotické buněčné smrti (kondenzovaný chromatin a zmenšené jádro, vymizelý signál mitochondrií a aktinu, buněčná torsa).

Amfifilní anionické PSs pro PDT zkoumané v této studii projevily velmi dobrou fotodynamickou aktivitu i výhodné vlastnosti, které byly experimentálně hodnoceny na nádorové buněčné linii HeLa v *in vitro* podmínkách. Experimentálně získané výsledky by určitě měly být do budoucna důvodem k hlubším *in vitro*, popřípadě později také *in vivo*, studiím těchto látek. Účinky látky HK22Zn-COONa byly již dříve hodnoceny a publikovány. Bylo zjištěno, že tato ve vodě rozpustná sloučenina vykazuje vůči fibroblastům V79 křečků a lidským HEp2 velmi nízkou vlastní toxicitu a je fototoxická již po vystavení nízké dávce světla (1 J/cm^2) s hodnotou $EC_{50} = 4,5 \text{ } \mu\text{M}$. (W. Liu et al.,

2005), což je v souladu s námi získaným výsledkem ($EC_{50} = 5,402 \pm 1,417 \mu\text{M}$) na HeLa buňkách. Nově navržené a syntetizované látky HK18Zn-COONa a ZIP82Zn-SO₃Na byly studovány poprvé a jejich výsledky budou součástí další připravované publikace.

11 ZÁVĚRY

- Experimentálně hodnocené anionické (Aza)Pcs HK18Zn-COONa, HK22Zn-COONa a ZIP82Zn-SO₃Na dosáhly po aktivaci světlem na buněčné linii HeLa dobrých výsledků fotodynamické aktivity. Nejlepší účinnost prokázala látka **HK22Zn-COONa** v SFM s $EC_{50} = 0,306 \pm 0,180 \mu\text{M}$.
- Dark toxicita bez aktivace světlem byla u všech anionických derivátů velmi nízká s $TC_{50} > 1000 \mu\text{M}$.
- Časový prostup jednotlivých anionických zástupců do buněk byl rychlý krátce po podání s dosažením plató fáze během 12 hodin. Výjimkou byl pouze AzaPc ZIP82Zn-SO₃Na, jehož množství v buňkách dle průběhu grafu s časem stále mírně narůstá.
- Cílovou strukturou zkoumaných látek v HeLa buňkách byly lyzosomy.
- Fotodynamický účinek látek způsobil výrazné morfologické změny buněčných struktur. Byly pozorovány změny tvaru i struktury celých buněk, mitochondrií, jader, dále poškození membrán a reorganizace aktinového cytoskeletu. Tyto změny naznačují, že při nízkých koncentracích dochází k apoptóze, kdežto při vysokých pravděpodobně k nekróze.
- Typ buněčné smrti nemohl být stanoven z důvodu dlouhodobé nefunkčnosti průtokového cytometru.
- Testované anionické látky ukázaly velmi výhodné vlastnosti, což je důvodem k jejich podrobnějšímu studiu. Nejvýhodnějších vlastností z hodnocených látek dosáhl Pc **HK22Zn-COONa** ($TC_{50}/EC_{50} = 3268$) převážně díky jeho velmi dobré účinnosti po ozáření a zároveň nízké vlastní toxicitě.

12 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 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. (2011). Photodynamic Therapy of Cancer : An Update. *American Cancer Society*, 61(4), 250–281. <http://doi.org/10.3322/caac.20114>
- Allison, R. R., & Moghissi, K. (2013). Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clinical Endoscopy*, 46, 24–29. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.5946/ce.2013.46.1.24>
- Anderson, R. R., & Parrish, J. A. (1981). The Optics of Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 77(1), 13–19. <http://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12479191>
- Banerjee, S. M., MacRobert, A. J., Mosse, C. A., Periera, B., Bown, S. G., & Keshtgar, M. R. S. (2017). Photodynamic therapy : Inception to application in breast cancer. *The Breast*, 31, 105–113. <http://doi.org/10.1016/j.breast.2016.09.016>
- Dobson, J., Fernandes, G., Queiroz, D., & Golding, J. P. (2018). Photodynamic therapy and diagnosis : Principles and comparative aspects. *The Veterinary Journal*, 233, 8–18. <http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.11.012>
- Dolmans, D. E. J. G. J., Fukumura, D., & Jain, R. K. (2003). Photodynamic therapy for cancer. *Nature Publishing Group*, 3, 380–387. <http://doi.org/10.1038/nrc1070>
- Dougherty, T. J., Gomer, C. J., Henderson, B. W., Jori, G., Kessel, D., Korbelik, M., Moan J., Peng, Q. (1998). Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 90(12), 889–905. <http://doi.org/10.1093/jnci/90.12.889>
- Fields, W., Fowler, K., Hargreaves, V., Reeve, L., & Bombick, B. (2017). Development, qualification, validation and application of the neutral red uptake assay in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells using a VITROCELL® VC10® smoke exposure system. *Toxicology in Vitro*, 40, 144–152. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.01.001>
- Ghazal, B., Macháček, M., Shalaby, M. A., Nováková, V., Zimčík, P., & Makhseed, S.

- (2017). Phthalocyanines and Tetrapyrazinoporphyrazines with Two Cationic Donuts: High Photodynamic Activity as a Result of Rigid Spatial Arrangement of Peripheral Substituents. *Journal of Medicinal Chemistry*, *60*, 6060–6076. <http://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00272>
- Glasauer, A., & Chandel, N. S. (2013). ROS. *Curent Biology*, *23*(3), 100–102. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2012.12.011>
- Griffin, L. L., & Lear, J. T. (2016). Photodynamic Therapy and Non-Melanoma Skin Cancer. *Cancers*, *8*(98). <http://doi.org/10.3390/cancers8100098>
- Henderson, B. W., Busch, T. M., & Snyder, J. W. (2006). Fluence Rate as a Modulator of PDT Mechanisms. *Lasers in Surgery and Medicine*, *38*, 489–493. <http://doi.org/10.1002/lsm.20327>
- Choi, C., Tsang, P., Huang, J., Chan, E. Y. M., Ko, W., Fong, W., & Ng, D. K. P. (2004). Synthesis and in vitro photodynamic activity of new hexadeca-carboxy phthalocyanines. *Chemical Communications*, 2236–2237. <http://doi.org/10.1039/B405868B>, 2236-2237
- Jarrett, S. G., & Boulton, M. E. (2012). Consequences of oxidative stress in age-related macular degeneration. *Molecular Aspects of Medicine*, *33*(4), 399–417. <http://doi.org/10.1016/j.mam.2012.03.009>
- Khandge, N. V., Pradhan, S., Doshi, Y., Kulkarni, A., & Dhruva, I. (2013). Photodynamic Therapy (Part 1 : Applications in Dentistry). *International Journal of Laser Dentistry*, *3*(1), 7–13. <http://doi.org/10.5005/jp-journals-10022-1029>
- Kuimova, M. K., Yahioglu, G., & Ogilby, P. R. (2009). Singlet Oxygen in a Cell : Spatially-Dependent Lifetimes and Quenching Rate Constants. *J. Am. Chem. Soc.*, *131*(1), 332–340. <http://doi.org/10.1021/ja807484b>
- Landry, J. J. M., Pyl, P. T., Rausch, T., Zichner, T., Tekkedil, M. M., Stütz, A. M., Jauch A., Aiyar R. S., Pau G., Delhomme N., Gagneur J., Korbel J. O., Huber W., Steinmetz, L. M. (2013). The Genomic and Transcriptomic Landscape of a HeLa Cell Line. *G3: GENES, GENOMES, GENETICS*, *3*, 1213–1224. <http://doi.org/10.1534/g3.113.005777>

- Liu, W., Jensen, T. J., Fronczek, F. R., Hammer, R. P., Smith, K. M., Grac, M., & Vicente, H. (2005). Synthesis and Cellular Studies of Nonaggregated Water-Soluble Phthalocyanines. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(4), 1033–1041. <http://doi.org/10.1021/jm049375b>
- Liu, Y., Meng, X., & Bu, W. (2017). Upconversion-based photodynamic cancer therapy. *Coordination Chemistry Reviews*. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.09.006>
- Lushchak, V. I. (2014). Free radicals , reactive oxygen species , oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224, 164–175. <http://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016>
- Macháček, M., Demuth, J., Čermák, P., Vavřečková, M., Hrubá, L., Jedličková, A., Kubát P., Šimůnek T., Nováková V., Zimčík, P. (2016a). Tetra(3,4-pyrido)porphyrazines Caught in the Cationic Cage: Toward Nanomolar Active Photosensitizers. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(20), 9443–9456. <http://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01140>
- Macháček, M., Kollár, J., Miletín, M., Kučera, R., Kubát, P., Šimůnek, T., Nováková V., Zimčík, P. (2016b). Anionic hexadeca-carboxylate tetrapyrazinoporphyrazine: synthesis and in vitro photodynamic studies of a water-soluble, non-aggregating photosensitizer. *Royal Society of Chemistry*, 6, 10064–10077. <http://doi.org/10.1039/C5RA25881B>
- Makhseed, S., Macháček, M., Alfadly, W., Tuhl, A., Vinodh, M., Šimůnek, T., Nováková V., Kubát P., Rudolf E., Zimčík, P. (2013). Water-soluble non-aggregating zinc phthalocyanine and in vitro studies for photodynamic therapy. *Chemical Communications*, 49(95), 11149–51. <http://doi.org/10.1039/c3cc44609c>
- Mittler, R. (2017). ROS Are Good. *Trends in Plant Science*, 22(1), 11–19. <http://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>
- Mitton, D., & Ackroyd, R. (2008). A brief overview of photodynamic therapy in Europe. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 5(2), 103–111. <http://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2008.04.004>
- Moan, J., & Berg, K. (1991). The Photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochemistry and Photobiology*, 53(4),

549–553. <http://doi.org/0031-8655/91> \$03.00 +O.W

- Oda, K., Ogura, S., & Okura, I. (2000). Preparation of a water-soluble fluorinated zinc phthalocyanine and its effect for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, *59*, 20–25. [http://doi.org/S1011-1344\(00\)00129-9](http://doi.org/S1011-1344(00)00129-9)
- Oleinick, N. L., Morris, R. L., & Belichenko, I. (2002). The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochemical and Photobiological Sciences*, *1*, 1–21. <http://doi.org/10.1039/B108586G>
- Oniszczyk, A., Wojtunik-Kulesza, K. A., Oniszczyk, T., & Kasprzak, K. (2016). The potential of photodynamic therapy (PDT) — Experimental investigations and clinical use. *Biomedicine et Pharmacotherapy*, *83*, 912–929. <http://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.07.058>
- Ormond, A. B., & Freeman, H. S. (2013). Dye sensitizers for photodynamic therapy. *Materials*, *6*(3), 817–840. <http://doi.org/10.3390/ma6030817>
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress : A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *97*, 55–74. <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Robertson, C. A., Evans, D. H., & Abrahamse, H. (2009). Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, *96*(1), 1–8. <http://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2009.04.001>
- Savoia, P., Deboli, T., Previgliano, A., & Broganelli, P. (2015). Usefulness of Photodynamic Therapy as a Possible Therapeutic Alternative in the Treatment of Basal Cell Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*, 23300–23317. <http://doi.org/10.3390/ijms161023300>
- Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curent Biology*, *24*(10), R453–R462. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
- Triesscheijn, M., Baas, P., Schellens, J. H. M., & Stewart, F. A. (2006). Photodynamic Therapy in Oncology. *The Oncologist*, *11*, 1034–1044.

<http://doi.org/10.1634/theoncologist.11-9-1034>

Weijer, R. (2017). *Enhancing photodynamic therapy of refractory solid cancers*. ISBN: 9789462335349

Wen, X., Li, Y., & Hamblin, M. R. (2017). Photodynamic therapy in dermatology beyond non-melanoma cancer: An update. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 19, 140–152. <http://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.06.010>

Yano, S., Hirohara, S., Obata, M., Hagiya, Y., Ogura, S., Ikeda, A., Kataoka H., Tanaka M., Joh, T. (2011). Current states and future views in photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 12(1), 46–67. <http://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2011.06.001>

Yoon, I., Li, J. Z., & Shim, Y. K. (2013). Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. *Clinical Endoscopy*, 46(1), 7–23. <http://doi.org/10.5946/ce.2013.46.1.7>

Zhang, J., Jiang, C., Longo, J. P. F., Azevedo, R. B., Zhang, H., & Muehlmann, L. A. (2017). An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. <http://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.09.003>