

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD**



**BAKALÁRSKA PRÁCA**

**Experimentálne stanovenie fotodynamickej účinnosti derivátov  
ftalocyanínov a stanovenie bunkovej smrti**

**INGRID HLBOČANOVÁ**

**Vedúci bakalárskej práce: RNDr. MILOSLAV MACHÁČEK, Ph.D.**

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2021**

Na tomto mieste by som veľmi rada poďakovala vedúcemu svojej bakalárskej práce RNDr. Miloslavovi Macháčkovi, Ph.D. za jeho odborné vedenie, cenné rady a zručnosti, pripomienky a v neposlednej rade za čas a trpezlivosť, ktorú mi venoval. Taktiež by som rada poďakovala za spoluprácu a prípravu študovaných látok členom vedeckej skupiny prof. PharmDr. Petra Zimčíka, Ph.D. na Katedre farmaceutickej chémie a farmaceutickej analýzy. Veľká vďaka patrí aj Mgr. Monike Rohličkovej a Mgr. Márii Halaškovej za ich pomoc pri uskutočnení experimentov. Ďalej by som rada poďakovala taktiež celému kolektívu na Katedre biochemických vied za vytvorenie príjemného pracovného prostredia. Poďakovanie patrí aj mojej rodine a kamarátom za podporu v priebehu celého štúdia. V neposlednej rade by som veľmi rada poďakovala Grantovej Agentúre Českej Republiky (projekt 19-14758Y) a Grantovej Agentúre Univerzity Karlovy (projekt 1620219) za finančnú podporu.

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové dňa .....

.....

Podpis

## 1 Abstrakt

Medzi ochorenia na svete s najväčšou incidenciou patria nádorové ochorenia. Ich výskyt sa pomaly presúva z vyspelých krajín do krajín tretieho sveta, a preto predstavujú najrozšírenejšie zdravotné problémy, často končiace úmrtím pacientov. Práve kvôli rozšírenosti a úmrtnosti týchto ochorení je v dnešnej dobe venované značné úsilie výskumu a vývoju nových a efektívnych protinádorových liečiv a spôsobov liečby. Jednou z skúmaných moderných metód je fotodynamická terapia (PDT) s využitím fotosenzitizérov (PSs). Pre zabezpečenie maximálnej účinnosti, efektivity PDT a maximalizácii výsledku je potrebné dodržať tri základné parametre a to prítomnosť účinného PS, svetla a kyslíku. Tieto jednotlivé parametre pre pacienta nepredstavujú riziko, ale ich vzájomná a vhodná kombinácia prináša pozitívny efekt v rámci terapie nádorových ochorení. Princípom metódy je podanie neaktívnej formy liečiva s obsahom PS pacientovi, a jeho následnému ožiareniu svetlom o vhodnej vlnovej dĺžke. Po ožiarení dochádza k aktivácii PS a reakciou s prítomným kyslíkom spôsobuje vznik fotochemickej reakcie s tvorbou a vznikom vysoko reaktívnych foriem kyslíka (ROS). ROS pôsobí toxicky na cieľové bunky a vedie k ich zániku v postihnutom tkanive.

V rámci PDT je dôležitý vývoj PS a samotné testovanie ich účinnosti v boji proti malígnym aj nemalígnym formám nádorov. Cieľom mojej práce bolo zistenie činnosti a účinnosti dvoch nových amfifilných kationických PS na bunkovej línii HeLa v rôznych časových intervaloch od aplikácie po samotné ožiarenie (0, 4 a 12 h). Následne potom overiť účinnosť aj na ďalších malígnych bunkových líniiach (MCF-7 a HCT-116) a bunkovej línii ľudských endoteliálnych buniek EA.hy926. V práci sa taktiež zaoberám témou bunkovej smrti, ktorá je založená na detekcii apoptických procesov v bunkách formou vystavenia fosfatidylserín (PhSer) na vonkajšiu časť membrány, s využitím detekčných činidiel na hodnotenie luminiscenčného a fluorescenčného signálu.

Výsledky mojej práce preukázali najlepšiu účinnosť látky P41 s DLI = 4 h ( $EC_{50} = 0,037 \pm 0,009 \mu\text{M}$ ) na bunkovej línii HeLa s obdobne sľubnými výsledky v inkubačnom čase 12h. V porovnaní so študovanou látkou P39, ktorá má hodnoty o niečo vyššími ako P41, sa obe látky ukázali ako účinné porovnaním na bunkových líniiach MCF-7, HCT-116 a EA.hy926.

**Kľúčové slová:** fotodynamická terapia, fotosenzitizér, bunková smrť, cytotoxicita, ftalocyaníny

## 2 Abstract

Tumor diseases represent one of the largest groups of malignant illnesses in the world. Their incidence is slowly shifting from developed countries to third world countries and therefore they represent the most widespread health problems, often leading to the death of patients. Intensive research and development of new and effective anticancer drugs and treatment methods is devoted because of the spread and mortality of these diseases. One of the intensively researched modern methods is photodynamic therapy (PDT), which utilizes photosensitizers (PSs). To ensure the maximum efficiency and effectiveness of PDT and maximalization of results, it is necessary to observe three basic parameters – effective PS, light and oxygen. These individual components do not represent danger to the patients on their own, but their combination brings a positive effect in cancer treatment. The principle of the method is administration of an inactive PS to the patient with subsequent irradiation by light of suitable wavelength. PS is activated during irradiation and the reaction with oxygen leads to a photochemical reaction with the formation of highly toxic reactive oxygen species (ROS). ROS are toxic to target cells and trigger cell death in irradiated tissues.

Development of novel PSs and testing their effectiveness in the fight against malignant and non-malignant forms of tumor is important. The aim of my work was to determine the activity of two novel amphiphilic cationic PSs on HeLa cell line at different drug-light intervals (0, 4 and 12 h). Subsequently, the efficacy was also further evaluated on additional malignant cell lines (MCF-7 and HCT-116) and on the human endothelial cell line EA.hy926. Evaluation of cell death pathways was performed as well – the method is based on the continuous detection of cell death processes by exposure of phosphatidylserine (PhSer) on the outer leaflet of the membrane using luminescent and fluorescent detection reagents.

The results of my work show that compound P41 with DLI = 4 h ( $EC_{50} = 0,037 \pm 0,009 \mu\text{M}$ ) is the most effective from the studied compounds on HeLa cell line with analogous promising results at DLI = 12h. In comparison with P39 compound, with results a little bit higher than P41, both of the studied compounds shown their efficiency as well on the MCF-7, HCT-116 and EA.hy926 cell lines.

**Key words:** photodynamic therapy, photosensitizer, cell death, cytotoxicity, phthalocyanines

### 3 Obsah

1	Abstrakt.....	4
2	Abstract.....	5
3	Obsah.....	6
4	Úvod.....	9
5	TEORETICKÁ ČASŤ.....	10
5.1	Fotodynamická terapia.....	10
5.2	História.....	11
5.3	Mechanizmus.....	12
5.4	Využitie.....	13
5.5	Svetlo.....	14
5.6	Kyslík.....	16
5.7	Fotosenzitizéry.....	17
5.8	Delenie fotosenzitizérov.....	18
5.8.1	Prvá generácia.....	18
5.8.2	Druhá generácia.....	19
5.8.3	Tretia generácia.....	19
5.8.4	Ftalocyaníny.....	19
5.8.4.1	Azaftalocyaníny.....	21
5.9	Bunková smrť.....	21
5.9.1	Cesty bunkovej smrti.....	22
5.9.2	Techniky stanovenie bunkovej smrti.....	23
6	CIEĽE PRÁCE.....	25
7	EXPERIMENTÁLNA PRÁCA.....	26
7.1	Základné vybavenie pre prácu s bunčnými líniami.....	26
7.2	Prístrojové vybavenie.....	26

7.3	Chemikálie a reagensie.....	27
7.4	Bunková kultúra .....	28
7.4.1	Bunková línia HeLa .....	28
7.4.2	Kultivačné médium .....	28
7.4.3	Kultivácia buniek .....	29
7.4.4	Pasážovanie buniek .....	29
7.4.5	Stanovenie počtu životaschopných buniek .....	30
7.4.6	Nasadzovanie buniek na experiment.....	31
7.5	Použité fotosenzitizéry .....	32
7.5.1	Nasadenie látok na kultivačnú doštičku .....	33
7.5.2	Fototoxicita.....	33
7.6	Stanovenie životaschopnosti buniek pomocou neutrálnej červene .....	34
7.7	Stanovenie bunkovej smrti .....	35
7.8	Vyhodnotenie výsledkov .....	38
7.9	Subcelulárna lokalizácia študovaných látok.....	39
8	Výsledky .....	40
8.1	Cytotoxické experimenty .....	40
8.1.1	P39.....	40
8.1.1.1	HeLa .....	40
8.1.1.2	MCF-7 .....	43
8.1.1.3	HCT-116.....	44
8.1.1.4	EA.hy926.....	45
8.1.2	P41.....	47
8.1.2.1	HeLa .....	47
8.1.2.2	MCF-7 .....	50
8.1.2.3	HCT-116.....	51
8.1.2.4	EA.hy926.....	52

8.2	Subcelulárna lokalizácia .....	54
8.3	Bunková smrť .....	58
9	Diskusia.....	63
10	Závery.....	69
11	Použité skratky .....	70
12	Použitá literatúra .....	72



## 4 Úvod

V téma „Experimentálne stanovenie fotodynamickej účinnosti derivátov ftalocyanínov a stanovenie bunkovej smrti“ sa na začiatku mojej bakalárskej práce venujem podstatou vzniku fotodynamickej terapie (PDT), mechanizmu jej účinku, využitiu v praxi, ďalej sa zaoberám hlavnými zložkami PDT ako je svetlo, kyslík a fotosenzitizér (PS) a v neposlednom rade téme bunkovej smrti ako jednou z možných indikačných ciest apoptózy a nekrózy buniek.

Experimentálna časť mojej práce obsahuje stručný popis metodík v rámci prípravy jednotlivých krokov k stanoveniu PDT a bunkovej smrti spolu s výsledkami, ktoré na záver porovnávam s doposiaľ podobne vykonanými experimentálnymi stanoveniami vo vedeckých článkoch.

Tému PDT som si vybrala pre jej pozitívne uplatnenie v rámci terapie nádorových a nenádorových ochorení a jednak kvôli jej minimálnej invazívnosti a toxicite pre organizmus s minimom nežiaducich vedľajších účinkov pre pacienta. Ide o sľubnú a perspektívnu metódu využívajúcu vhodnú kombináciu svetla, kyslíku a PS vedúcich k fotochemickej reakcii v tkanive so vznikom cytotoxických produktov pôsobiacich na nádorové bunky a okolité tkanivo spolu s navodením imunitnej reakcie organizmu.

V samotnej téme a experimentálnej časti práci sa z najväčšej časti venujem PSs ako fotosenzitívnym látkam, ktoré zohrávajú jednu z primárnych úloh v PDT. Ich aplikácia k bunkám, ožiarenie svetlom vhodnej intenzity a vlnovej dĺžky v kombinácii so svetlom a kyslíkom s následným vyhodnotením umožňujú posúdenie a účinok ich toxicity na skúmaných bunkových kultúrach.

Cieľom tejto práce bolo vyhodnotenie účinku spolu s fotodynamickou aktivitou vybraných PS v podmienkach *in vitro*, posúdenie subcelulárnej lokalizácie a detekcii morfológických zmien ako odpovede buniek na rozvrat vnútorného prostredia. Využitím výsledkov zistených v tejto práci je možné rozšíriť terajšie štúdie PSs a ich aplikáciu a optimalizáciu v ďalších štúdiách.

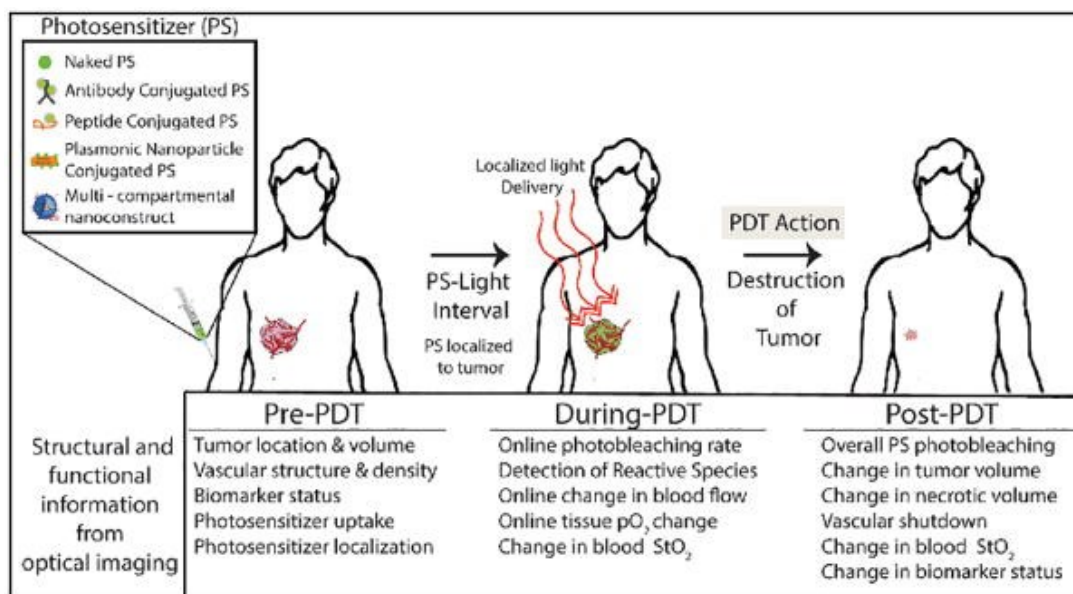
## 5 TEORETICKÁ ČASŤ

### 5.1 Fotodynamická terapia

Fotodynamická terapia (PDT) je ablačnou metódou lokalizujúcou nádor na základe cieľenej aktivácie fotosenzitizéra (PS), čo vedie k tvorbe reaktívnych foriem kyslíka (ROS) s následným usmrtením nádorových buniek. PDT má široké uplatnenie v záchyte a klinickej terapii benígnych, malígnych aj premalígnych stavov. Najväčší prelom v štúdiu PDT nastal v 20. storočí, kde v Inštitúte pre rakovinu v Roswell Parku v roku 1978 Dougherty a jeho kolegovia nezačali rozsiahli výskum a klinické série skúmajúce mnohé faktory, ktoré sú dnes považované za kritické determinanty dávky, toxicity a účinnosti PDT v liečbe nádorov. Tento prelomový výskum priniesol otázky týkajúce sa nových technológií, diagnostiky a terapie nádorových ochorení s využitím PDT v kombinácii s rádioterapiou, chemoterapiou či imunoterapiou (Cengel *et al.*, 2016, Kleinovink *et al.*, 2016).

Výhodou metódy je jej neinvazívna aplikácia a vysoká selektivita v rámci liečby nádorov so zachovaním susedného tkaniva. Podstatou metódy PDT je aktivácia vysoko bezpečného PS špecificky akumulovaného v nádorových bunkách vhodnou vlnovou dĺžkou svetla, s následným generovaním prechodných hladín ROS. Výskumom sa preukázal fotochemický účinok reakcií spôsobujúci priamé poškodenie nádorových buniek tkaniva s následnou indukciou bunkovej smrti v dôsledku pôsobenia toxického singletového kyslíka ( $^1\text{O}_2$ ) a iných ROS, spojeného s upchávaním ciev trombami po poškodení endotelu a sekundárnym zvýšením imunity pacienta (Akimoto, 2016).

Obmedzením vo využití PDT v niektorých prípadoch je, že prítomný tumor je lokalizovaný hlboko v tkanive, kde preniká nedostatočné množstvo svetla a taktiež dochádza k poškodeniu periférneho tkaniva. Preto sa ďalšie štúdie zamerali na skúmanie kombinácie fotodynamickej terapie s inými už známymi metódami ako je chemoterapia, rádioterapia, imunoterapia a iné. Kombinácie týchto metód s PDT priniesli pozitívne výsledky, kedy došlo k zvýšeniu efektivity samotnej liečby (Zhang & Li, 2018).



Obrázok 1 PDT terapia. Prevzaté z (Obaid *et al.*, 2016).

## 5.2 História

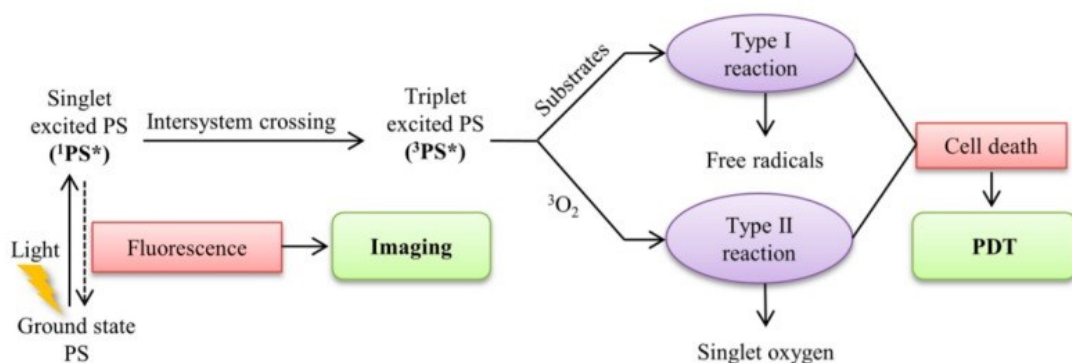
Od nepamäti sa slnečné svetlo považuje za najprístupnejší a najlacnejší zdroj liečby. Medzi najstaršie zaznamenané spôsoby liečby s využitím slnečného svetla sa pred viac ako 3000 rokmi využívala zelenina a rastliny, ktoré slúžili ako látky na vznik fotoreakcií v koži s následným terapeutickým účinkom. Liečba kožných ochorení ako psoriáza alebo vitiligo, pomocou fototerapie, bola využívaná štátom starovekého Grécka, Číny či Indie. Ranní Egypťania využívali fotodynamických účinkov aj na bielenie látok či formou celotelového vystavenia slnku označovaného ako helioterapia, podľa svojho autora, známeho Gréckeho lekára Herodota pre svoje blahodárne účinky (Rkein & Ozog, 2014, Ackroyd *et al.*, 2001, Kessel, 2015).

Základný koncept fotodynamickej terapie bol objavený pred viac ako sto rokmi, presnejšie v roku 1900 nemeckým študentom medicíny Oscarom Raabom. Náhodnou inkubáciou mikroorganizmov s akridínami po ich vystavení svetlu sa zistilo, že došlo k ich usmrteniu. Ďalším štúdiom sa zistila potreba prítomnosti kyslíku zo vzduchu, aby nastal tento smrtiaci efekt. Po tomto zistení sa prvýkrát zaviedol termín fotodynamického pôsobenia a po krátkej dobe sa začali prvé úsilie o liečbu nádorov, a to presne natieraním farby na povrch kožných nádorov s následným vystavením svetlu. Celý koncept skúmania PDT bol ale spomalený až zastavený kvôli prebiehajúcej druhej svetovej vojne (Abrahamse & Hamblin, 2016).

Objav z roku 1960 vytvoril základy dnešnej PDT, kedy Lipson *et al.* v Mayo Clinic aplikovali surové prípravky hematoporfyrínu, ktoré viedli počas chirurgických zákrokov k vizualizácii neoplastických lézií vďaka ich fluorescencii. Po úprave hematoporfyrínu kyselinou octovou a kyselinou sírovou sa získala porfyrínová zmes, ktorú označili ako derivát hematoporfyrínu (HpD) využívanú ako lokalizátor tumoru. Ďalšími úpravami HpD sa získal prípravok komerčne označovaný ako Photofrin®, čo je najbežnejšie používaný PS využívaný v klinickej PDT. Vývojom HpD sa ďalej zaoberal Dougherty *et al.*, ktorí sa venovali štúdiu kožných nádorov pomocou PDT a laseru na bázy argónového farbiva (Dougherty *et al.*, 1998, Kato, 1996).

### 5.3 Mechanizmus

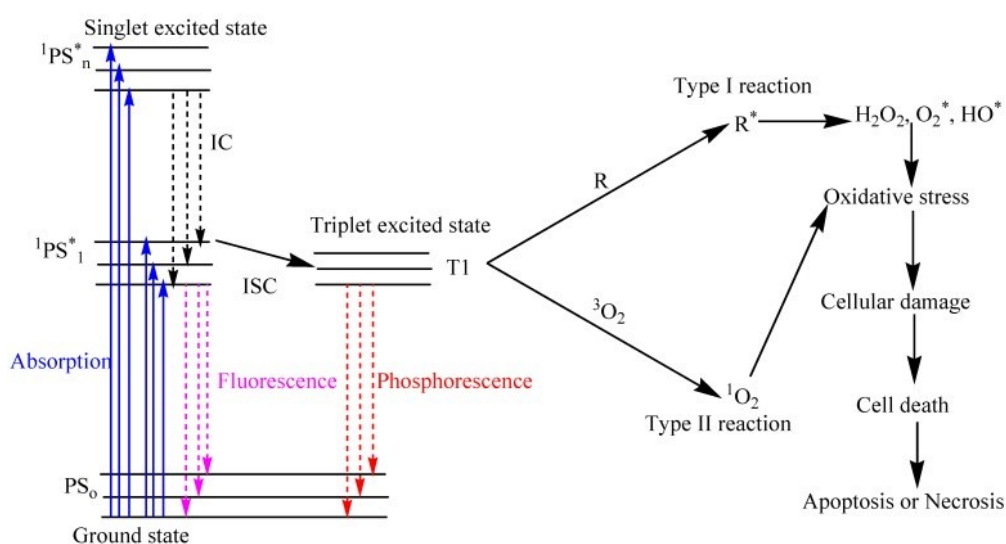
Ako už bolo spomenuté, PDT je založená na aplikovaní PS, ktorý sa lokalizuje v nádore a jeho činnosť je aktivovaná svetlom o určitej vlnovej dĺžke. Vo výsledku sa sledujú fotochemické a fotobiologické procesy spôsobujúce ireverzibilné poškodenie nádorového tkaniva. Na rozlíšenie pojmu fotodynamického pôsobenia ako fotocitlivej reakcie v biológii od fyzikálno-chemických procesov prebiehajúcich v emulziách fotografických filmov sa prijal návrh, ktorý definuje fotodynamické pôsobenie ako fotochemické reakcie, pri ktorých sa spotrebúva kyslík. Tieto reakcie sa taktiež označujú ako fotocitlivé procesy typu I a typu II vzhľadom od počiatočných krokov ako je zapojenie radikálových medziproduktov, ktoré sú zachytené kyslíkom alebo od syntézy vysoko cytotoxického  $^1\text{O}_2$  preneseného energiou z fotoexcitovaného PS (Dougherty *et al.*, 1998).



**Obrázok 2** Mechanizmus PDT. Prevzaté z (Sun *et al.*, 2018).

V základnom singletovom stave má molekula PS dva elektróny s opačným spinom, ktoré sú lokalizované na čo najvýhodnejšom energetickom orbitále. Po absorpcii fotónu svetla o príslušnej kvantovej energii (vlnovej dĺžke) dochádza k excitácii jedného z elektrónov na

orbitál s vyššou energiou vid' Obr.3. PS v takomto singletovom excitovanom stave je veľmi nestabilný a svoju prebytočnú energiu stráca buď emisiou svetla (fluorescencia) alebo výrobou tepla (vnútorná premena). Jednou z ďalších možností je prechod excitovaného singletového PS procesom označovaným ako „medzisystémový prechod“, kde vytvára stabilnejší excitovaný tripletový stav s paralelnými otáčaniami. Dlhá životnosť tripletového stavu, v porovnaní so singletovým stavom, mu umožní dostatočne dlhý čas nato, aby došlo k zrážke s molekulárnym kyslíkom ( $^3\text{O}_2$ ) a prenosu jeho energie. Prenos energie spôsobí vznik  $^1\text{O}_2$  a základného stavu PS. Tento proces vzniku  $^1\text{O}_2$  je označovaný ako fotochemická reakcia typu II. Pri fotochemickej reakcii typu I je PS v excitovanom stave a podlieha reakciám s prenosom elektrónov, ktoré vo finále tvoria ROS. ROS môže ďalej zahŕňať buď získanie alebo darovanie elektrónu. Reakciou radikálového aniónu s kyslíkom vzniká superoxidový radikálový anión ( $\cdot\text{O}_2^-$ ). Ďalšími reakciami vzniká peroxid vodíka ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a silný oxidačný hydroxylový radikál ( $\text{HO}\cdot$ ) (Abrahamse & Hamblin., 2016).



**Obrázok 3** Jablonskiho diagram zobrazujúci proces fotodynamickej terapie. Prevzaté z (Debele *et al.*, 2015).

## 5.4 Využitie

Začiatok štúdia PDT, tiež známeho ako fotoradiačná terapia či fotochemoterapia, sa začali písať približne od roku 1900 vďaka objavu študenta medicíny Raaba. Jeho objavom sa stalo toxické pôsobenie akridínu v kombinácii s viditeľným svetlom v prítomnosti kyslíka, čo malo za následok usmrtenie skúmaného mikroorganizmu (*Paramecium caudatum*). PDT sa prvýkrát využilo v roku 1904 v liečebnej terapii, kedy bola pomocou svetla indukovaná

inaktivácia buniek, mikroorganizmov a molekúl. O pár rokov neskôr sa nemeckému lekárovi Friedrichovi Meyer-Betzovi podarilo prvé klinické testovanie, vtedy nazývané ako fotoradiačná terapia (PRT) s porfyrínmi, kedy testoval účinky hematoporfyrínu-PRT na vlastnej koži (Malik *et al.*, 2010).

Vďaka prelomovému kroku Johna Totha, ktorý uznal „fotodynamický chemický účinok“ terapie pomocou klinických laserov na bázy argónových farbív a premenoval terapiu na „Fotodynamickú terapiu“ sa začali písať prvé klinické štúdie PDT. Zásluhou Thomasa Doughertyho, ktorý v Kanade v roku 1993 uskutočnil štúdium PDT vrámci prevencie recidívy rakoviny močového mechúra sa začalo klinické testovanie účinkov PDT. Nasledovali ďalšie klinické štúdie zamerané na rakovinu pľúc, žalúdka, pažeráka alebo maternice. Úrad pre kontrolu potravín a liečiv (*ang.* Food and drug Administration; FDA) schválil v roku 1999 využitie PDT ako liečby pre predrakovinové kožné lézie tváre a pokožky hlavy. Ako účinná a bezpečná terapia hradená zdravotným poistením bola schválená v Európe, Spojených štátoch či Japonsku. PDT sa čoraz vo väčšej miere využíva pri liečbe nádorov a taktiež sa jej účinky a to hlavne neinvazívna terapeutická aplikácia využíva v liečbe rôznych infekcií baktériami, hubami či vírusmi (Malik *et al.*, 2010, Akimoto, 2016).

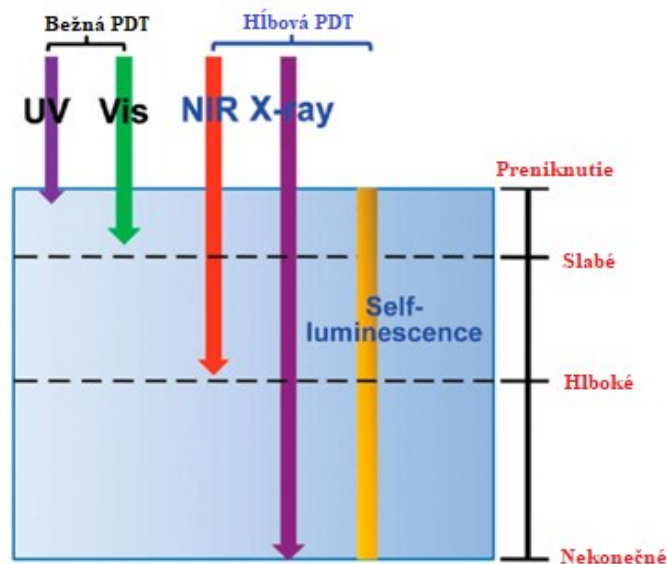
Využitie PDT ako globálne uznávanou terapiou ešte nenastalo, kvôli rôznym problémom a negatívam spojených s touto metódou. Medzi prvé patrí slabá selektívna akumulácia porfimeru sodného (Photofrin®, derivát hematoporfyrínu), nutnosť veľkého a drahého laserového systému pre excitáciu a postterapeutická ochrana pred svetlom vyžadovaná od pacientov po dobu minimálne 1 mesiaca, aby sa zabránilo fotocitlivým reakciám na pokožke. Tieto obmedzenia sú charakteristické predovšetkým pre 1. generáciu PS. Ďalším vývojom a výskumom sa vytvorila 2. a 3. generácia PS (napr. ftalocyaníny), ktoré sa zameriavajú na zlepšenie relatívneho kvantového výťažku  $^1\text{O}_2$ , fotochemických a spektrálnych vlastností spolu s fotodynamickou terapeutickou účinnosťou (Akimoto, 2016, Mfouo-Tynga & Abrahamse, 2015).

## 5.5 Svetlo

Mechanizmus účinku PDT predstavujú tri hlavné komponenty a to svetlo,  $^3\text{O}_2$  a PS. Svetelný zdroj ako jedna z hlavných súčastí PDT terapie je dôležitým prvkom, vďaka ktorému dochádza k aktivácii PS. K jeho aktivácii je potrebné vystavenie sa viditeľnému svetlu s nízkou spotrebou energie a pri konkrétnej vlnovej dĺžke. U väčšiny fotocitlivých látok dochádza

k aktivácii pomocou červeného svetla v rozmedzí 630 až 700 nm, čo predstavuje prienik svetla tkanivom do hĺbky 0,5 až 1,5 cm. Ďalšími zdrojmi svetla využívaných v súčasnosti sú napríklad hélum-neónové lasery (633 nm), gálium-hliník-arzenidové lasery (630-690, 830 alebo 906 nm) a argónové lasery (488-514 nm). V poslednej dobe sa taktiež testuje účinok nelaserového zdroja žiarenia ako napríklad svetelné LED diódy, ktoré sú v porovnaní s tradičnými lasermi kompaktnejšie, prenosnejšie a lacnejšie (Kumar *et al.*, 2015).

Výskum sa ďalej zameriava na problematiku hĺbky prieniku svetla tkanivom, ktorý je obmedzujúci hlavne v rámci terapie nádorov vo väčšej hĺbke, preto sa terapia v súčasnosti zameriava skôr na povrchové nádory a to hlavne kože, pažeráka, sietnice či krku. Štúdiom sa zistilo, že biologické zložky tkaniva majú menšiu absorpciu v oblasti 600 – 1200 nm, čím svetlo z tejto oblasti preniká do hlbších lokalít tkaniva s lepšou fotochemickou účinnosťou. Pri konvenčnej PDT dochádza k aktivácii PS vlnovou dĺžkou svetla v rozmedzí od 600 – 700 nm, čo má za dôsledok nízku hĺbkovú penetráciu s obmedzením liečby iba povrchových nádorov. V posledných rokoch sa teda skúma použitie röntgenového zdroja svetla, dvojfotónovej excitácie (TPE) či autoluminiscencie, ktoré majú neobmedzenú hĺbku prieniku ľudským telom (Sivasubramanian *et al.*, 2019).



**Obrázok 4** Porovnanie tkaniva po prechode rôznych zdrojov žiarenia. Prevzaté z (Sivasubramanian *et al.*, 2019).

## 5.6 Kyslík

Tkanivový  $^3\text{O}_2$  spolu so svetlom a PS tvoria tri najdôležitejšie faktory účinnosti PDT vedúcej k produkcii ROS, ktorých pôsobením sú priamo ničené nádorové bunky, dochádza k poškodeniu cievneho zásobenia tkaniva a stimulácii imunitnej odpovedi tela. ROS vďaka tomu, že sú produkované po interakcii so spomínanými tromi hlavnými zložkami PDT, je najlepším ukazateľom dávky v predikcii výslednej liečby. Jeho samotné meranie je však náročné vzhľadom na jeho krátku životnosť a kvôli jeho extrémne slabému signálu (Ong *et al.*, 2020).

ROS sú chemicky reaktívne radikály alebo neradikálové molekuly kyslíka odvodené od  $^3\text{O}_2$ , vrátane  $^1\text{O}_2$ ,  $\cdot\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{HO}\cdot$ .  $^3\text{O}_2$ , obsahujúci dva nepárové elektróny s paralelným otáčaním, je reaktívny a citlivý na tvorbu radikálov. ROS sa stali neoddeliteľnou súčasťou pozemského života ako vedľajší produkt počas fotosyntézy a aeróbného dýchania rastlín a iných živočíchov. Vyskytuje sa v organelách ako sú mitochondrie, chloroplasty, peroxisomy či v cytosole buniek. Jeho prítomnosť v bunkách cicavcov je lokalizovaná v mitochondriách, kde sa generuje ako odpoveď na znížené množstvo kyslíka v tkanive (Zhou *et al.*, 2016).

A práve hypoxický stav (znížené množstvo kyslíka v tkanive) v mikroprostredí nádoru obmedzuje terapeutickú účinnosť PDT z dôvodu potreby  $^3\text{O}_2$  v rámci terapeutického procesu. PDT tkanivový kyslík využíva ako degradačného prvku spôsobujúceho zničenie vaskularity nádoru, čo vedie k zhoršeniu jeho vlastnej účinnosti pri podpore nádorového rastu. Tento stav je spôsobený rýchlym metabolizmom buniek a nedostatočným prísunom kyslíka, preto sa ďalšie štúdie zamerali práve na zvýšenie účinnosti protinádorovej liečby s využitím nanočastíc PLAG (kopolymér kyseliny maslovej a glykolovej) a enzýmu katalasy (CAT). Zistilo sa, že v nádoroch je zvýšené množstvo  $\text{H}_2\text{O}_2$  v porovnaní s normálnym tkanivom, čo predstavovalo potenciálny zdroj pre zvýšenie koncentrácie kyslíka v tkanive. S využitím CAT a prítomného  $\text{H}_2\text{O}_2$  sa efektívne generoval  $^3\text{O}_2$  a došlo k zvýšeniu jeho lokálnej koncentrácie. Nevýhodou bola ľahká deaktivácia CAT pomocou proteas *in vivo*, čo sťažovalo jeho akumuláciu vo vnútri nádorového tkaniva a samotnú produkciu  $^3\text{O}_2$ . Výskum sa ďalej zameral na využitie nanočastíc ako nosičov, ktoré zabezpečia biologickú stabilitu pre PS a CAT bez ovplyvnenia ich funkcie. Ako nosič sa testovali častice tvorené PLAG, čo je polymér schválený FDA vyznačujúci sa vynikajúcou biokompatibilitou, biologickou odbúrateľnosťou a ľahkou modifikáciou. S využitím kyseliny hyalurónovej, ktorá modifikovala povrch nanočastíc na zlepšenie schopnosti zamerania



nádorových buniek, sa inkorporovali nanočastice do nádorových buniek, kde vďaka pôsobeniu CAT došlo k produkcii  $^3\text{O}_2$  a prekonaniu hypoxie nádoru (Yang *et al.*, 2019, Hou *et al.*, 2020).

## 5.7 Fotosenzitizéry

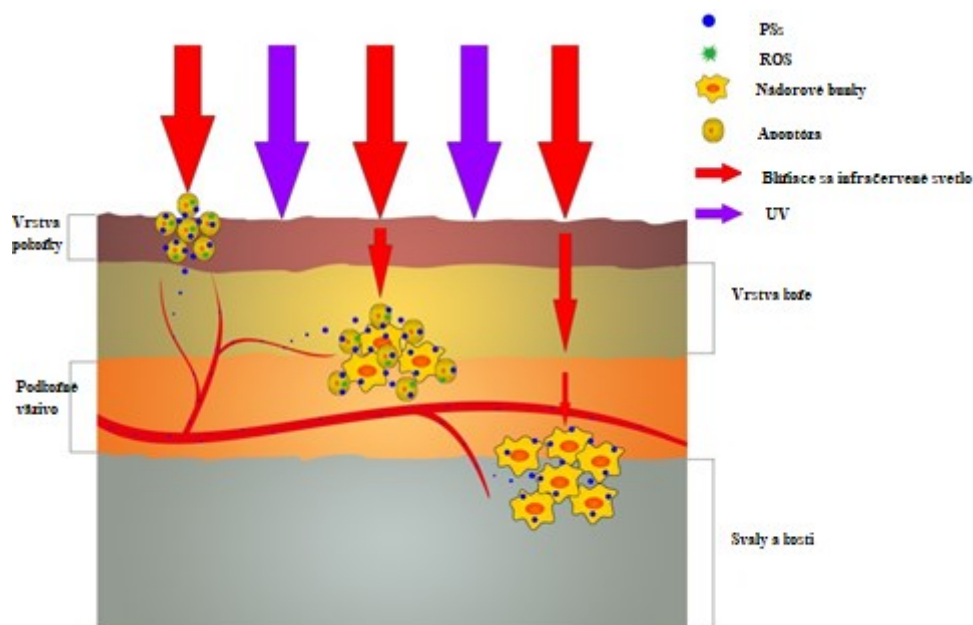
PDT využíva kombináciu netoxického PS a neškodného viditeľného svetla spolu s  $^3\text{O}_2$  ako generátora cytotoxických ROS spôsobujúcich zničenie malígnych buniek apoptickým prípadne nekrotickým dejom. Sprievodným znakom je tiež prerušenie mikrovaskulárneho zásobenia nádorového tkaniva, spolu s aktiváciou imunitného systému (akútny zápal, expresia proteínov tepelného šoku, invázia a infiltrácia leukocytmi, prezentácia antigénov nádorových buniek do T buniek) (Castano *et al.*, 2006).

Pre účinnosť PS sa zohľadňujú dve dôležité vlastnosti a to:

- A) netoxické pôsobenie na normálne tkanivo v tme
- B) spôsobujú spolu s vhodným zdrojom svetla fotopoškodenie

Tieto dve vlastnosti určujú cieľovú cytotoxicitu po ožiarení. Každý používaný PS má svoje excitačné svetlo s optimálnou vlnovou dĺžkou. Po následnom vystavení sa tomuto svetlu sa elektróny PS dostávajú zo svojho základného singletového stavu na orbitály s vyššou energiou, kde sú v excitovanom stave. Elektróny v tomto excitovanom stave majú tendenciu sa spontánne vracať do svojho základného stavu a to formou prenosu energie na inú molekulu v jej blízkosti. V procese teda nastáva transformácia svetelnej energie na energiu chemickú a to práve indukciou prostredníctvom PS (Yu *et al.*, 2017).

Veľké množstvo PS využívaných v terapii rakoviny má ako základ tetrapyrrolovú štruktúru podobnú protoporfyrínovej štruktúre obsiahnutej v hemoglobíne. PSs podliehajú požiadavkám ako napríklad čistota zlúčeniny, ktorá umožní kontrolu kvality, ďalej budú spĺňať dobrú stabilitu pri uskladnení a taktiež by mali mať vysoký absorpčný vrchol v rozmedzí od 600 do 800 nm (červená až tmavočervená časť spektra). Absorpcia fotónov vlnových dĺžok dlhších ako 800 nm vedie k nedostatočnej produkcii energie potrebnej na excitáciu  $^3\text{O}_2$  a jeho prechodu do singletového stavu. Produkcia ROS po ožiarení a penetrácia tkaniva svetlom so zvyšujúcou sa vlnovou dĺžkou je taktiež nedostatočná. Preto sa pre zlepšenie procesu PDT využívajú látky so silnou absorpciou v tmavočervenej oblasti spektra, ako sú chloríny, bakteriochloríny a ftalocyaníny (Pc), ktoré napomáhajú lepšej kontrole nádoru (Agostinis *et al.*, 2011).



**Obrázok 5** Protinádorový efekt rôznych vlnových dĺžok svetla. Prevzaté z (Yu *et al.*, 2017).

## 5.8 Delenie fotosenzitizérov

PS sú činidlá prírodného či chemického pôvodu založené na prenose svetelnej energie medzi susednými molekulami a to hlavne na rozpustený  $^3\text{O}_2$ . Ideálna PDT okrem produkcie ROS je určená aj stupňom selektivity PS k cieľovým tkanivám. Štúdiá PSs sa preto zameriavajú na ich vlastnosti s cieľom zvýšenia tkanivovej selektivity, obmedzenia vysokej toxicity ako vedľajšieho účinku či zlepšenia špecifity zamerania a v neposlednom rade taktiež ovplyvnenia koncentrácie v nádoroch a ich eliminácia z tkanív (Shi *et al.*, 2019, Dobson *et al.*, 2019)

### 5.8.1 Prvá generácia

Prvou generáciou PSs bol derivát hematoporfyrínu, známi pod obchodným názvom Photofrin®. Ide o zmes porfyrínových monomérov a oligomérov, ktoré sú čiastočne čistené a finálnym produktom je komerčne dostupný produkt, porfimer sodný. Bol schválený na liečbu včasného štádia rakoviny pľúc a Barrettovho pažeráku. Jeho klinické použitie je limitované dvoma faktormi a to: A) hlavné absorpčné pásy v nízkych vlnových dĺžkach a nižší absorpčný pás pri 630 nm a B) vedie ku kožnej precitlivelosti po dobu trvajúcu až šesť týždňov (Zhu & Finlay, 2008, Dobson *et al.*, 2019).

## 5.8.2 Druhá generácia

Vznik druhej generácie PSs bol podmienený nedostatkami prvej generácie ako malý vrchol absorpcie dlhej vlnovej dĺžky, či nedostatočne rýchle odstránenie z pokožky. Z prvých PSs bol vyvinutý derivát benzoporfyrínu (BpD) známi ako verteporfín (Visudyne®), *m*-tetra(hydroxyfenyl)chlorín (*m*-THPC) komerčne označený ako Foscan®. Z ďalších sľubných vývojov bola kyselina  $\delta$ -aminolevulová (ALA) ako preliečiva, keďže v rámci PDT nie je samostatne ako PS. Po absorpcii bunkami sa z ALA prirodzeným biosyntetickým procesom stane protoporfyrín IX (Zhu & Finlay, 2008).

## 5.8.3 Tretia generácia

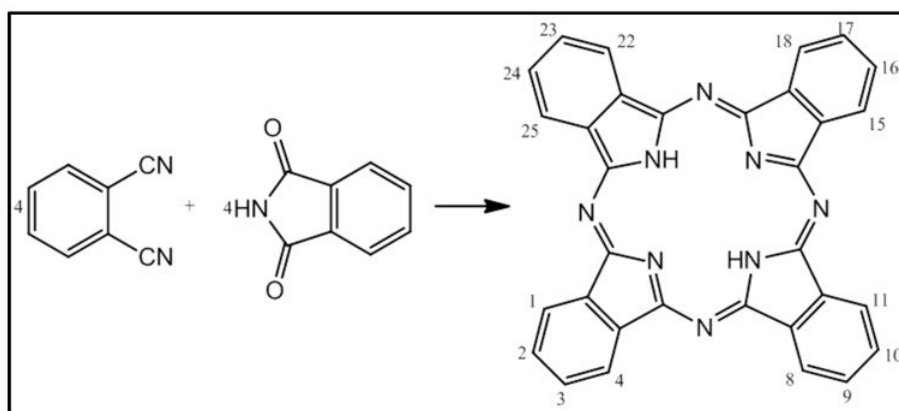
Tretia generácia PS sa zamerala na prekonanie nevýhod spojených s 1. a 2. generáciou PS. Cieľovou stratégiou týchto PS bolo zvýšenie afinity PS k nádorovému tkanivu prostredníctvom väzby s biomolekulami (LDL, protilátky apod.) či spojením molekúl PS s nosičovými systémy liečiv. Konjugáciou PS s niekoľkými aminokyselinami (zvyšky glycínu, serínu, tyrozínu a metionínu) sa zistila vysoká fotostabilita, dobrá rozpustnosť vo vodných roztokoch či vysoký príjem nádorovými bunkami. Podobným syntetickým prístupom boli pripravené konjugáty porfyrínu a ich deriváty s ľudským a bovinným sérovým albumínom preukazujúce špecifickosť voči bunkám podobným nádorovým bunkám v porovnaní s nádorovými bunkami. Spojenie PS s cieľovo špecifickými protilátkami (monoklonálne protilátky) umožňuje efektívne dodanie PS k cieľným typom buniek. Taktiež prepojenie PS s nanotechnológiami (napr. liposomy, polymérne a kovové nanočastice) by umožnili zlepšenie biodistribúcie hydrofóbných liečiv (Gomes *et al.*, 2018).

## 5.8.4 Ftalocyaníny

Tetrapyroly patria medzi jedny z najväčších a prvých predstavovaných skupín PSs. Základná tetrapyrolová štruktúra sa vyskytuje ako prirodzená súčasť niektorých životne dôležitých biomolekúl (hemoglobín, chlorofyl, bakteriochlorofyl) a vďaka jej pomerne veľkému zastúpeniu v prírode získala pomenovanie ako „pigment života“. Existuje veľké množstvo tetrapyrolových zlúčenín využívajúcich sa ako PS v PDT (chloríny, bakteriochloríny, porfyríny, ftalocyaníny), ale najčastejšie používané sú porfyríny a ftalocyaníny (Pc). Pc spolu

s inými PSs obsahujúcimi tetrapyrolovú štruktúru majú tendenciu produkovať prevažne  $^1\text{O}_2$  II.typu v porovnaní s ROS typu I. (Abrahamse & Hamblin, 2016).

Pc boli jedny z prvých študovaných zlúčenín PS v 80. a 90. rokoch. Ide o syntetické farbivá, ktorých základná štruktúra je tvorená tetrapyrolovým jadrom. Pc sa vyvinuli z porfyrínov (1.generácia PSs) kvôli ich obmedzeniam v rámci fotochemickej a fotodynamickej účinnosti. Ich neúmyselným objavom v roku 1928 pri príprave ftalimidu z anhydridu kyseliny ftalovej sa Pc a ich derivátom začala venovať väčšia pozornosť. Sú označované ako tetrabenzotetraazaporfyríny, makrocyclické štrukturované zlúčeniny s izoindolovými a dusíkovými atómami v mezopolohách s absorpčným maximom v červenej oblasti pri vlnovej dĺžke 670 nm. Predbežné štúdie viedli k zisteniu, že PDT sprostredkovaná Pc zvyšuje autofágiu, aktiváciu kaspas-3 a zvyšuje bunkovú smrť. Pozitívnymi vlastnosťami Pc v rámci PDT je nízka cytotoxicita v tme, vysoká fototoxicita pri aktivácii svetlom, vysoká špecificita a selektivita pre cieľový nádor, rýchly clearance z tela či ich dobrá stabilita za fyziologických podmienok (Ghorbani *et al.*, 2018, Abrahamse & Hamblin, 2016, Mfouo-Tynga & Abrahamse, 2015).



**Obrázok 6** Syntéza ftalocyanínov. Prevzaté z (Mfouo-Tynga & Abrahamse, 2015).

V posledných desaťročiach sa skúmali systematicky rôzne spôsoby syntézy derivátov Pc a ich modifikácie týkajúce sa fotofyzikálnych a fotobiologických vlastností. Medzi najbežnejšie úpravy makrocyklu Pc patrí zavedenie skupín rozpúšťajúcich vodu, zlepšujúcich optické vlastnosti či pripojenie jednotiek zabezpečujúcich akumuláciu v bunkách a predĺženie terapeutickú funkcie. Zmeny sa týkajú hlavne v substitúcii v periférnych alebo neperiférnych polohách či zámena centrálného atómu kovu (metalloftalocyaníny), prípadné zavedenie substituentov do axiálnych polôh (Galstyan, 2021).

### 5.8.4.1 Azaftalocyany

Pcs sú známe syntetické organické farby a pigmenty umožňujúce zámenny ich periférnych či neperiférnych substituentov, a taktiež modifikáciu centrálne viazaných uhlíkov za iné atómy. Zámena uhlíkom v Pcs za iné heteroatómy vedie k špecifickým zmenám v ich chemických alebo fyzikálno-chemických vlastnostiach. Zámenou uhlíku za dusík získame skupinu látok označovanú ako azaftalocyany (AzaPc). Podľa počtu a lokalizácie takto zamenených uhlíkov môžeme hovoriť o makroheterocykloch označovaných ako tetrapyrídonporfyríny, tetrapyrázínporfyríny (TPyzPzs), tetrapyrídazínporfyríny alebo tetrapyrimidínporfyríny (Miletin *et al.*, 2018, Kostka *et al.*, 2006).

Ide o chemicky, termicky a fotostabilné molekuly so schopnosťou produkovať  $^1\text{O}_2$  po ožiarení, čo je využívané v rámci PDT nádorov alebo vo fotoaktívnych materiáloch (fluorescenčné značky a senzory). Z ďalších veľmi sľubných vlastností Pcs a AzaPcs je ich silná absorpcia v rozmedzí od 600-800 nm, nízka toxicita za tmy či flexibilita v štrukturálnych zmenách. Ich výskum pokračuje aj naďalej, pričom hlavným zameraním sú vo vode rozpustné kationické a anionické deriváty (Novakova *et al.*, 2015, Makhseed *et al.*, 2012, Kollar *et al.*, 2020).

## 5.9 Bunková smrť

Bunková smrť zohráva dôležitú úlohu v procese udržiavania stálosti vnútorného prostredia organizmu a tkanív. Predstavuje charakteristický znak chorôb ako napríklad srdcové ochorenia, rakoviny, neurodegeneratívne ochorenia alebo autoimunitné choroby, pričom práve pri infarkte myokardu alebo mozgovej mŕtvici môže byť stupeň apoptózy a nekrózy signifikantný a spolu s posúdením mechanizmov bunkovej smrti môže poskytnúť cenné informácie týkajúce sa diagnostiky a rozsahu poškodenia tkaniva. V prípade skorého zobrazenia a reakcii nádoru na liečbu by viedlo k lepšej a efektívnejšej liečbe pacienta s minimalizáciou vedľajších účinkov liečby a znížením nákladov na zdravotnú starostlivosť. Bunkové cesty smrti (apoptóza a nekroza) a molekulárne zmeny s nimi spojené ako ciele pri zobrazovaní biomarkerov, predstavuje významnú rolu v sledovaní vývoja, rozsahu poškodenia a odpovedi na liečbu chemoterapiou, rádioterapiou či hormonálnou liečbou (Neves & Brindle, 2014).

### 5.9.1 Cesty bunkovej smrti

Apoptóza je fyziologicky naprogramovaný spôsob bunkovej smrti, ktorá zohráva dôležitú úlohu v homeostáze tkanív. V procese dochádza k biochemickým a morfológickým zmenám (kondenzácia chromatinu, nukleárna fragmentácia zmenšenie objemu buniek a tvorbe vezikúl), a to hlavne v zmene DNA buniek faktormi, ktoré ovplyvňujú jadro a nakoniec aj samotnú bunku. DNA ako hlavný regulátor bunkových dejov, predstavuje jednu z najdôležitejších biomolekúl, ovplyvňujúcej bunkový rast, bunkovú smrť, migráciu či diferenciáciu buniek. Vďaka pochopeniu základných mechanizmov odohrávajúcich sa v procese apoptózy je možné získať nové ciele terapeutickej liečby ochorení a to formou vizualizácie zmien prebiehajúcich v jadre, kde je uložená DNA, pre lepšie pochopenie patofyziológie bunkového procesu ( van Engeland *et al.*, 1998, Atale *et al.*, 2014).

Naprogramovanie bunkovej smrti je vyvolané niekoľkými signálnymi molekulami stresu a bunkovej smrti a prebieha formou dvoch hlavných dráh, a to vonkajšou alebo receptorom smrti (napríklad sprostredkovaný tumor nekrotizujúcim faktorom) a vnútornou označovanou tiež ako mitochondriálna. Obe zo spomínaných apoptických ciest sa svojimi molekulami ovplyvňujú navzájom. Iniciátorové molekuly kaspas sa štiepia v sériách proteolyticky, spúšťajúce aktiváciu iných kaspas, vedúcich k fragmentácii DNA, degradácii cytoskeletu a jadrových proteínov, čo nakoniec vedie k tvorbe apoptických teliesok (Atale *et al.*, 2014).

Bunky zomierajú aj inými mechanizmami ako je napríklad nekróza, ktorá patrí medzi neregulované, patologické a zápalové reakcie organizmu na ohromný stres spôsobený náhlou abnormálnou zmenou prostredia, nefyziologickým pH, extrémnymi teplotami alebo osmotickým tlakom, vrátane vplyvu tvrdých vonkajších fyzikálnych či chemických faktorov poškodzujúce bunky a tkanivo. Bunky v procese nekrózy na rozdiel od apoptózy odumierajú a uvoľňujú vysoko škodlivý obsah lyzozomálnych proteolytických enzýmov, ktoré pôsobia na iné bunky a spúšťajú kaskádu dejov bunkovej smrti v jej okolí (Neves & Brindle, 2014, Atale *et al.*, 2014).

Apoptóza a nekróza sa navzájom nevyučujú, ale na konci oboch dráh bunkovej smrti, ktoré sú vysoko regulované, sú navzájom prepojené. Príkladom môže byť proces, kedy apoptické bunky v neskorom štádiu nie sú odstránené imunitnými bunkami podliehajú práve sekundárnej nekróze. S pokročilým štúdiom boli identifikované ďalšie formy regulovanej

bunkovej smrti ako autofágia, nekroptóza, mitotická katastrofa či lyzosomalnesprostredkovaná naprogramovaná bunková smrť (Neves & Brindle, 2014),

### 5.9.2 Techniky stanovenie bunkovej smrti

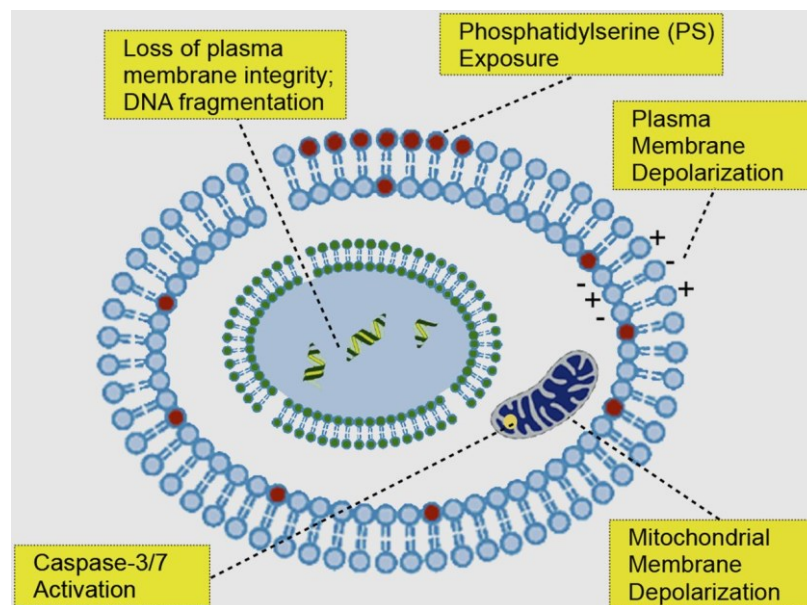
V priebehu rokov sa vyvinuli rôzne techniky umožňujúce hodnotenie zmien v DNA formou nukleárneho farbenia napríklad pomocou jodidu propidia, Hoechst 33342, DAPI, či farbenie akridínovou oranžou alebo bromidom ethídia. Z techník, ktoré nefarbia jadrá, ale napomáhajú s identifikáciou udalostí spôsobených zmenou DNA zahajujúcou apoptickú bunkovú smrť je farbenie pomocou značeného Annexínu V. Tieto techniky umožňujúce okrem rozlíšenia bunkových a jadrových fenotypov, spôsobených poškodením DNA, aj uplatnenie v procese rozlíšenia skorej a neskorej apoptózy a nekrózy spolu s identifikáciou jadrových deformácií vo vnútri bunky (Atale *et al.*, 2014).

Hlavným skúmaným procesom apoptózy je strata asymetrie plazmatickej membrány, ktorý predstavuje jeden zo skorých prejavov, vedúcich k odhaleniu a vystaveniu zvyškov fosfatidylserínu (PhSer) na vonkajšej strane plazmatickej membrány. PhSer je hlavný aniónový fosfolipid, ktorý predstavuje približne 2-10 % celkového bunkového fosfolipidu. Jeho expozícia na povrchu buniek nastáva v priebehu niekoľkých hodín po apoptickom stimule procesom aktívneho transportu (van Engeland *et al.*, 1998, Neves & Brindle, 2014).

Annexín V je endogénny ľudský proteín s molekulovou hmotnosťou 36 kDa, bežne značený fluorescenčnými markermi na detekciu *in vitro* a kvantifikáciu apoptických buniek. Intracelulárne je exprimovaný v mnohých tkanivách, ale jeho výskyt bol zachytený aj v extracelulárnom prostredí a to hlavne v leukocytoch, lymfocytoch a monocytoch a iných bunkách imunitného systému. V štruktúre obsahuje štyri podobné domény s obsahom 70-80 aminokyselín usporiadaných do kompaktnej vo vode rozpustnej štruktúre. Má reverzibilnú na vápniku závislú afinitu k membránovému aminofosfolipidu Ps. Vyznačuje sa taktiež veľkou afinitou k apoptickým bunkám, žiadnou imunogenicitou a nespôsobuje toxicitu *in vivo*, čo z neho robí jednu z dominantných sond k detekcii a zobrazeniu apoptózy. Klinická aplikácia zobrazovania Annexínu V sa vyvíja hlavne v oblasti onkológie, pri transplantácii orgánov a kardiovaskulárnych ochoreniach (Hu *et al.*, 2012, Post *et al.*, 2002, Tait *et al.*, 2005, Bollinger *et al.*, 2020).

Mechanizmus detekcie je založený na fluorescenčne značenom Annexíne V, napríklad pomocou fluorescein isothiokyanátu (Annexin V-FITC), vďaka ktorému je možné zaznamenať a kvantifikovať množstvo apoptických buniek. Fosfatidylserín ako neoddeliteľná súčasť plazmatickej membrány, ktorý je aktívne viazaný na vnútornú membránu v zdravej bunke je v procese apoptózy translokovaný na vonkajšiu vrstvu plazmatickej membrány. Jeho hodnoty sú zaznamenávané vďaka luminiscenčne značenému konjugátu Annexín V, ktorý je preferovanou sondou pre fosfatidylserín vzhľadom na jeho vysokú afinitu ku vápniku a selektivitě k lipidom. Luminiscenčný signál je úmerný expozícii fosfatidylserínu a fluorescenčný signál je generovaný ako následok straty integrity membrány a väzby na jadrové štruktúry. Luminiscenčný signál je možno zaznamenávať na čítačke mikrotitračných doštičiek, mikroskopicky, či pomocou prietokovej cytometrie a výsledné údaje sa využívajú k sledovaniu kinetiky a rozsahu apoptickej odozvy (Tavakoli *et al.*, 2015, Kupcho *et al.*, 2019).

Z ďalších molekulárnych zmien vyskytujúce sa v umierajúcich bunkách počas apoptózy je aktivácia kaspáz (kaspáza-3 a kaspáza-7), depolarizácia plazmatickej a mitochondriálnej membrány a strate integrity plazmatickej membrány, ku ktorej dochádza počas nekrózy (Neves & Brindle, 2014).



**Obrázok 7** Ilustrácia hlavných bunkových dejov zobrazujúcich bunkovú smrť. Prevzaté z (Neves & Brindle, 2014).



## 6 CIELE PRÁCE

- Stanovenie fotodynamickej aktivity vybraných derivátov Pc na nádorovej bunkovej línii ľudských HeLa buniek po rôzne dlhej inkubačnej dobe (0, 4 a 12 h).
- Overenie fotodynamickej aktivity na ďalších bunkových líniah - MCF-7, HCT-116 a EA.hy926.
- Subcelulárna lokalizácia študovaných PS v HeLa bunkách.
- Stanovenie bunkovej smrti.
- Zhodnotenie a porovnanie účinku študovaných látok na bunkovej línii.

## 7 EXPERIMENTÁLNA PRÁCA

### 7.1 Základné vybavenie pre prácu s bunecnými líniami

- 96-jamkové mikrotitračné doštičky s plochým dnom (TPP, Švajčiarsko)
- sterilné plastové pipety rôzneho rozsahu (TPP, Švajčiarsko)
- sterilné Pasteurove pipety (Brand, Nemecko)
- sterilné plastové špičky rôzneho rozsahu (Eppendorf, Nemecko)
- sterilné plastové inkubačné nádoby T75 (TPP, Švajčiarsko)
- sterilné mikroskúmavky rôzneho objemu (Eppendorf, Nemecko)
- sterilné laboratórne sklo (Simax, Česká republika)
- sterilné plastové vaničky (Eppendorf, Nemecko)
- Petriho misky so skleneným dnom vhodné pre konfokálnu mikroskopiu (WillCo Wells B.V., Holandsko)
- Bürkerova komôrka (Brand, Nemecko)
- 96-jamková biela mikrotitračná doštička s čírym dnom na stanovení luminiscencie a fluorescence (Corning Incorporated, USA)

### 7.2 Prístrojové vybavenie

- pipetovací nadstavec Biohit Midi Plus (BioHit, Fínsko)
- automatické pipety rôzneho rozsahu (Eppendorf, Nemecko)
- 8-kanálová elektonická pipeta e-PET BioHit 50-1200  $\mu$ l (BioHit, Fínsko)
- bunkové inkubátory s termostatom a reguláciou koncentrácie CO<sub>2</sub> (Sanyo a Esco)
- boxy s laminárnym prúdením BioAir TopSafe 1.2 (EuroClone, Taliansko)
- vodný kúpeľ (Mettler, Nemecko)
- 450 W xenonová lampa Newport (Newport Corporation, USA)
- doštičková trepačka Heidolph Titramax 100 (Heidolph Instruments, Nemecko)
- čítačka mikotitračných doštičiek Tecan Infinite M200 (Tecan Group Ltd., Švajčiarsko)
- čítačka mikotitračných doštičiek Tecan SPARK (Tecan Group Ltd., Švajčiarsko)
- centrifúga Hermle Z 300 (Hermle Labor Technik, Nemecko)
- konfokálny laserový rastrovací mikroskopický systém Nikon A1+ (Nikon, Japonsko)

### 7.3 Chemikálie a reagensie

- kultivačné médium DMEM (Lonza, Belgicko)
- kultivačné médium CO<sub>2</sub> Independent Medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA)
- ultraglutamín I (Lonza, Belgicko)
- penicilín/streptomycín (P/S, Lonza, Belgicko)
- HEPES pufor (Lonza, Belgicko)
- fetálne bovinné sérum (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- fosfátový pufor, tabletky (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- trypsín/EDTA (T/E, Lonza, Belgicko)
- HAT suplement (Thermo Fisher Scientific, USA)
- trypanová modrá, 0,4% (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- roztok peroxidu vodíka, 3% (Fluka, Sigma, Nemecko)
- roztok neutrálnej červene, 3,3mg/ml (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- fixačný roztok pre neutrálnu červen (roztok 1% CaCl<sub>2</sub> v 0,5% formaldehyde)
- lyzačný roztok pre neutrálnu červen (1% roztok ľadovej kyseliny octovej v 50% etanole)
- dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich, Nemecko)
- fotosenzitizér P41-1Zn-Me (ďalej v práci uvádzaná ako „P41“; vedecká skupina prof. Zimčíka, FaF UK)
- fotosenzitizér P39-1Zn-Me (ďalej v práci uvádzaná ako „P39“; vedecká skupina prof. Zimčíka, FaF UK)
- Digitonín (EMD Millipore Corp., USA)
- FasL (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Bortezomib (EMD Millipore Corp., USA)
- RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay (Promega, USA)

## 7.4 Bunková kultúra

### 7.4.1 Bunková línia HeLa

Na experimentálne stanovenia sa použila kultúra ľudských buniek HeLa, označená podľa jej držiteľky Henrietty Lacksovej, ktorej bola diagnostikovaná rakovina krčka maternice. Po jej smrti v roku 1951 sa bunková línia stala najpoužívanejšou líniou v biomedicínskom výskume tvoriaca zlatý štandard vďaka nepretržitému deleniu jej buniek. Bunková línia HeLa bola využitá v mnohých štúdiách a výskumných prácach po celom svete a práve zásluhou tejto HeLa línie sa podarili veľké výskumy v oblasti diagnostiky ľudského papilomavírusu (HPV), rakoviny krčka maternice, vrátane vývoja vakcíny proti obrne v roku 1952 (Mittelman & Wilson, 2013).

Výskumy a experimentálne práce na bunkovej línii pokračujú aj naďalej vďaka stabilite genómu obsiahnutému v HeLa bunkách a umožňujú diagnostiku numerických a štrukturálnych chromozómových aberácií identifikovaných pomocou metód ako SKY (spectral karyotyping), CGH (comparative genomic hybridization) a FISH (fluorescence *in situ* hybridization) (Macville *et al.*, 1999).

V náväznosti na tieto metódy diagnostiky genómových aberácií v roku 2013 nadviazal Landry *et al.* výskumnou prácou zameranou na sekvenovanie DNA a RNA bunkovej línie HeLa Kyoto so zameraním na mutačné portfólio a profil génovej expície (Landry *et al.*, 2013).

V našich experimentoch sa používala bunková línia HeLa získaná od Americkej banky bunkových línií (ATTC, USA).

### 7.4.2 Kultivačné médium

Kultivačné médium používané pre HeLa bunky sa pripravilo z DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) bez fenolovej červene, do ktorého sa ďalej postupne pridal ultraglutamin I (2%), P/S (1%), HEPES pufor (1%) a FBS (10%). Médium obsahujúce FBS sa označuje tiež ako sérum obsahujúce médium (SCM, serum-containing medium) a je pripravené ku samotnej kultivácii a experimentom.

Príprava kultivačného média prebiehala v sterilných podmienkach, ktoré boli dosiahnuté v laminárnom boxe. Po pridaní jednotlivých látok bolo potrebné pripravované médium dôkladne zamiešať. Hotové médium sa skladuje v chladničke a pred jednotlivými použitiami sa nechalo vytemperovať vo vodnom kúpeli na 37°C.

Bunkové línie MCF-7 a HCT116 boli kultivované v rovnakom médiu ako HeLa. Bunky EA.hy926 potrebovali suplementovať médium ešte 2% HAT.

Na experimentálne stanovenie bunkovej smrti sa použilo médium nezávislé na CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub> independent medium) suplementované 10 % FBS, 1 % P/S a 2 % ultraglutamínom I, ktoré bolo pripravované v sterilných podmienkach, a taktiež ďalej uchovávané v chladničke a temperované vo vodnom kúpeli pred experimentálnou prácou.

### **7.4.3 Kultivácia buniek**

Kultivácia buniek prebieha vo vopred pripravenom SCM médiu konkrétne v sterilných plastových inkubačných kultivačných fľašiach T75. Všetka práca prebiehala za štandardných podmienok v sterilnom laminárnom boxe. Takto pripravené médium s bunkami bolo uchovávané v bunkovom inkubátore pri teplote 37°C, 5% CO<sub>2</sub> atmosfére a konštantnej vlhkosti.

Kultivácia HeLa buniek na stanovenie bunkovej smrti prebieha v inkubátore pri teplote 37°C v médiu, ktoré bolo nezávislé na CO<sub>2</sub> bez kontroly humidity a atmosféry. Médium v tejto kultúre bolo nutné vymieňať každý druhý deň.

### **7.4.4 Pasážovanie buniek**

K pasážovaniu buniek dochádza po dostatočnej dlhej dobe rastu v kultivačnej nádobe, teda po dobu, kedy bunky zaplnia 80-90% povrchu dna a dostávajú sa do vzájomného kontaktu. Tento proces sa kontroluje a trvá približne 3-4 dni, kedy sa mikroskopicky sleduje morfológický tvar buniek a prípadná prítomnosť kontaminácie. Tento čas bol zvolený preto, aby sa zamedzilo nežiaducim morfológickým zmenám, zmenám vlastností a životaschopnosti bunkových kultúry.

Proces samotného pasážovania, taktiež označovaný ako proces subkultivácie, je metodika prenesenia časti vykultivovaných buniek do čerstvého média v novej fľaši. Pasážovanie sa využíva hlavne kvôli udržaniu životaschopnosti bunkových kultúr pripravených v *in vitro* podmienkach a je potrebné ho vykonávať v pravidelných intervaloch.

Ako prvým krokom pri pasážovaní sa začína odobratím starého média z pôvodnej nádoby. Nasleduje oplach bunkovej kultúry roztokom sterilného nahriateho PBS pufru v poradí dvakrát za sebou. K takto pripravených bunkám sa pridáva rovnomerne 1 ml roztoku trypsínu s EDTA (T/E), ktorého hlavnou náplňou je oddelenie buniek od dna nádoby. Nádoba sa vkladá do inkubátora nahriateho na 37°C po maximálnu dobu maximálne 5 minút. V tomto časovom intervale sa kontroluje pod mikroskopom oddelenie buniek od spodku nádoby. Následne sa do nádoby pridáva 9 ml SCM, ktoré spôsobí inaktiváciu prítomného trypsínu v nádobe, aby nedošlo k značnému poškodeniu prítomných buniek.

Bunky s inaktivovaným trypsínom sú dôkladne resuspendované a opláchnuté procesom opätovného nasatia a vypustenia obsahu nádoby do pipete proti spodku nádoby, aby sa docielilo homogénnej suspenzii bez prítomnosti zhlukov buniek. Časť tejto suspenzie sa odoberie do novej sterilnej kultivačnej nádoby, do ktorej sa predtým napipetovalo 15 ml nahriateho nového čerstvého média. Množstvo odobratej suspenzie sa volí vzhľadom na ich aktuálny stav konfluencie a stavu z predchádzajúcich pasáží. Suspenzia v novej nádobe sa rovnomerne premieša a rozprestrí na spodok fľaše znovu opätovným nasatím a vypustením suspenzie. Takto pripravené bunky sa kultivujú za štandardných podmienok v inkubátore do ďalšej pasáže. Zvyšok prítomnej bunkovej suspenzie v pôvodnej starej nádobe sa použije na nasadzovanie buniek na experiment.

Bunky HeLa pripravované k stanoveniu bunkovej smrti bolo potrebné pripraviť na iné kultivačné podmienky, t.j. bez atmosféry CO<sub>2</sub>, preto pasážovanie prebiehalo v prvý deň spasážovaním buniek v pomere 1:1 do CO<sub>2</sub> independentného média a pôvodného média DMEM. Na druhý deň sa bunkám vymenilo médium za čisté CO<sub>2</sub> independentné médium, v ktorom sú ďalej uchovávané v inkubátore pri 37°C bez atmosféry CO<sub>2</sub> a zvýšenej vlhkosti.

Všetky kroky zahrňajúce pasážovanie buniek sa uskutočňujú za prísne sterilných podmienok v laminárnom boxe a jednotlivé využité roztoky sú vopred vytemperované na teplotu 37°C vo vodnom kúpeli.

#### **7.4.5 Stanovenie počtu životaschopných buniek**

Stanovenie počtu životaschopných buniek sa uskutočňovalo v Bürkerovej komôrke mikroskopicky pomocou suspenzie buniek v trypanovej modrej. Vďaka schopnosti buniek absorbovať farbivo, trypanová modrá difunduje cez membránu do vnútra bunky. V živých

bunkách dochádza k aktívnemu transportu farbiva opätovne von, kde u mŕtvych buniek je táto funkcia bunky porušená a farbivo je zadržované vo vnútri bunky. Mikroskopicky následne pozorujeme dva typy buniek a to svetlé sférické bunky, ktoré sú živé a bunky s absorbovanou modrou farbou čo sú bunky mŕtve.

Z pracovných pomôcok sme využili ako prvú mikroskúmvku, kde sme si napipetovali 0,4% roztok trypanovej modrej. V pomere 1:1 sme k tomuto roztoku pridali dostatočne premiešanú bunecnú suspenziu, ktorá nám zostala v pôvodnej nádobe z pasážovania. Mikroskúmvka s farbou a suspenziou sa následne poriadne premiešala na vortexe a nechala inkubovať pri laboratórnej teplote po dobu 5 minút. Pred aplikáciou do Bürkerovej komôrky sa zmes opätovne premiešala. Na každú polovicu komôrky sa aplikovalo 10  $\mu$ l tejto zmesi a pod mikroskopom prebiehalo hodnotenie. Hodnotil sa počet živých neofarbených buniek na každej polovici komôrky. Získaný počet životaschopných buniek sa následne prepočítal na 1 ml suspenzie.

#### **7.4.6 Nasadzovanie buniek na experiment**

Nasadzovanie buniek na samotný experiment prebiehalo za sterilných podmienok v laminárnom boxe. Ako prvé sa pripravila do sterilnej vaničky suspenzia čerstvého vopred vytemperovaného SCM média vo vodnom kúpeli s bunkovou suspenziou získanou zo starej nádoby po pasážovaní. Objem SCM a množstvo odobratej bunkovej kultúry sa získalo výpočtom výsledného počtu živých buniek v suspenzii trypanovej modrej. Požadovaná koncentrácia 75 000 buniek/ml zabezpečila konštantné podmienky pre hodnotenie výsledkov a zabezpečila taktiež ich reprodukovateľnosť v rámci série meraní.

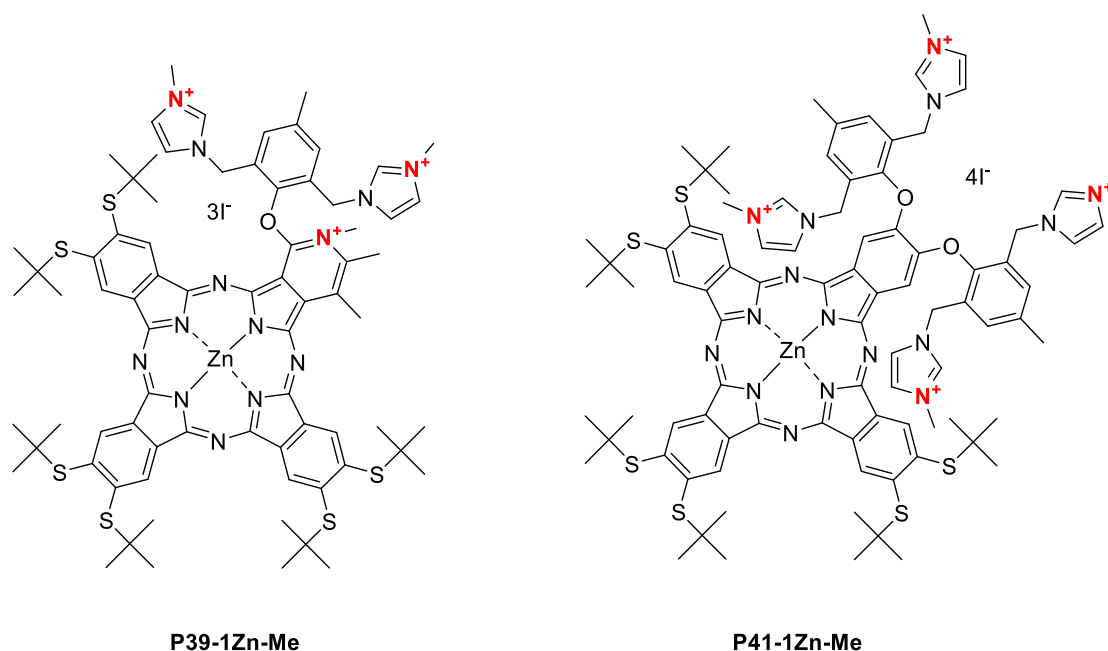
Pre nasadzovanie buniek sa použili rovnaké kultivačné nádoby a zachovávala sa rovnaká koncentrácia bunkovej suspenzie. Vo vaničke sa zmes média a bunkovej kultúry poriadne zamiešala a pomocou elektrickej multikanálovej automatickej pipety sa suspenzia aplikovala na 96-jamkovú mikrotitračnú doštičku v objeme 100  $\mu$ l na každú jamku doštičky, ktorá tak obsahuje približne 7 500 buniek. Takto pripravená doštička bola vložená na 24 hodín do bunkového inkubátora s vhodnými štandardnými podmienkami.

Pre bunkovú smrť bol zachovaný rovnaký postup práce stanovenia životaschopnosti buniek trypanovou modrou spolu s nasadením buniek (v tomto prípade sa pridával objem 200  $\mu$ l bunkovej suspenzie) na experiment do bielej 96-jamkovej doštičky s prehľadným dnom,

ktorá sa v tomto prípade líšila od bežnej doštičky používanej na stanovenie fotodynamickej toxicity. Inkubácia prebieha 24 hodín pri 37°C v prostredí bez prístupu CO<sub>2</sub> a vlhkosti.

## 7.5 Použité fotosenzitizéry

PS používané v rámci experimentálnej časti bakalárskej práce boli syntetizované na Farmaceutickej fakulte v Hradci Králové, Univerzity Karlovy, konkrétne na katedre Farmaceutickej chémie a farmaceutickej analýzy. Ich vývinom a syntézou sa zaoberala vedecká skupina pod vedením prof. PharmDr. Petra Zimčíka, Ph.D.



**Obrázok 8** Štruktúry skúmaných PS –azaftalocyanín P39 a ftalocyanín P41.

Obe zo študovaných látok obsahovali centrálné koordinovaný atóm zinku a sú taktiež nositeľom kladného náboja. Základ oboch spomínaných látok je tvorený ftalocyaninové (Pc) jadrom, ku ktorému sú ďalej naviazané rôzne substituenty. U látky P39 došlo k náhradeniu jedného z uhlíkov v štruktúre Pc za atóm dusíku, takže sa táto látka radí do dusíkatých izosterov Pc, teda do skupiny AzaPc. Obe študované látky sú amfifilnej povahy – na jednu štvrtinu molekuly je naviazaný hydrofilný (nabýty) substituent, pričom zvyšné tri štvrtiny sú substituované cez sírny mostík lipofilnými funkčnými terc-butylovými skupinami (Obr.8). Zásobné roztoky o koncentrácii 10 mM boli pripravené rozpustením PS v sterilnom DMSO.



### 7.5.1 Nasadenie látok na kultivačnú doštičku

Proces nasadzovania látok prebiehal v sterilnom prostredí laminárneho boxu a samotná manipulácia so študovanými látkami v zásobných či pracovných roztokoch prebiehala za prísnych podmienok bez prístupu svetla, vzhľadom na možnosť predčasnej fotoaktívácie použitých PSs.

Po 24 hodinách sa k narastením bunkám na doštičky pridali študované látky o rôznych koncentráciách, ktoré sa pripravovali v mikroskúmavkách nariedením SCM so sterilným zásobným roztokom látky. Jednotlivé koncentrácie boli potom nasadené do daných jamiek doštičky. Okrem buniek s prídavkom PSs sa na doštičke ponechala časť buniek, ktorá slúžila ako neovplyvnená kontrola (negatívna kontrola). K ďalšej časti buniek sa pridalo letálne množstvo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, čo slúžilo ako kontrola úmrtnosti buniek (pozitívna kontrola). Doštičky s nasadenými látkami sa následne vložili do bunkového inkubátora podľa potrebného časového intervalu buď na 12 hodín alebo 4 hodiny. S výnimkou „inkubácie“ 0 hodín, kedy došlo k okamžitému ožiareniu buniek.

Pri nasadzovaní látok na bunkovú smrť bol postup podobný s experimentálnym stanovím PDT s tým rozdielom, že stanovované látky boli pripravované v CO<sub>2</sub> independent médiu. Mikrotitračná doštička ďalej obsahovala bunky neovplyvnené, slúžiace ako kontrola, a kontrolu bez buniek, ktorá sa použila ako hodnota blanku pozadia.

### 7.5.2 Fototoxicita

Po skončení potrebného intervalu došlo v priestoroch laminárneho boxu bez prístupu svetla k výmene starého média s novým sterilným médiom. K výmene sa používala automatická multikanálová pipeta v objeme 100 µl a daný objem čerstvého vopred nahriateho média sa v doštičke vymenil dvakrát, aby sa v dostatočnom množstve odstránili zvyškové PSs, ktoré sa nedostali do buniek.

Doštička s takto vymeneným médiom sa hneď prenášala k 450 W xenónovej lampe osadenej vodným a long-pass filtrom ( $\lambda > 570$  nm; 12,4 mW/cm<sup>2</sup>), kde sa po dobu 15 minút celá doštička ožiarila (11,2 J/cm<sup>2</sup>). Vkladanie doštičky s bunkami a samotné ožiarenie prebiehalo dvoma spôsobmi vzhľadom na časový interval inkubácie s PSs. Prvým spôsobom bolo vkladanie doštičky pod zdroj žiarenia, čiže ožiarenie doštičky prebiehalo zo zhora. Tento

spôsob sa využíval pre doštičky inkubované v intervale 12 a 4 hodiny. Druhým spôsobom bolo vkladanie doštičky nad zdroj žiarenia, kedy bola doštička s bunkami ožarovaná zo spodu a tento postup bol využívaný pre bunky inkubované s PSs v intervale 0 hodín (k odvrátenie negatívneho vplyvu tzv. „inner-filter“ efektu na aktivitu študovaných látok). Po skončení doby žiarenia sa doštička vracala opäť do inkubátora, kde za štandardných podmienok bola inkubovaná ďalších 24 hodín. Nasledujúcim krokom bola stanovenie životaschopnosti buniek metódou vychytávania neutrálnej červene (NRU; z ang. Neutral Red Uptake assay).

Kultivačná doštička s látkami na stanovenie bunkovej smrti bola ožarovaná zo spodu (rovanaká vlnová dĺžka a čas ožiarovania) s použitím média CO<sub>2</sub> independent výmenou za 200 µl. Experiment ďalej prebiehal podľa postupu v časti 7.7.

## 7.6 Stanovenie životaschopnosti buniek pomocou neutrálnej červene

NRU patrí medzi testy životaschopnosti buniek, kedy sa *in vitro* kvantitatívne hodnotí počet živých buniek v kultúre po xenobioticky indukovanej cytotoxicite. Patria medzi najpoužívanéjšie testy cytotoxicity vo farmaceutickom, kozmetickom, biotechnologickom alebo tabakovom priemysle. Sú založené na schopnosti životaschopných buniek inkorporovať a viazať supravitálne farbivo neutrálnej červene (NR), slabé kationové farbivo, v lyzomoch a endosomoch buniek. Lyzomysú kyslé bunkové organely s obsahom hydrolytických enzýmov katalyzujúcich trávenie makromolekúl prípadne recykláciu bunkového materiálu, zatiaľ čo endosomy fungujú ako intracelulárny transportný systém pre endocytózu produktov lyzomálnej degradácie. Pri cytotoxických testoch sa vyjadruje koncentračne závislé zníženie absorpcie neutrálnej červene po vystavení skúmanému xenobiotiku. Vo výslednej interpretácii sa predpokladá, že množstvo absorbovaného NR farbiva bunkami je priamo úmerné celkovému počtu životaschopných buniek (Repetto *et al.*, 2008, Cudazzo *et al.*, 2019).

Princípom stanovenia je schopnosť NR ako slabého kationického farbiva prechádzať cez bunkovú membránu a difundovať do bunky v nenabitej forme a nahromadiť sa v lyzomoch. Vďaka tomu, že vo vnútri lyzomov je udržiavané kyslé pH a teda stabilný protónový gradient, ktorý vedie k protonizácii inkorporovanej NR, následne nie je možný prestup NR späť do cytoplazmy cez intaktné membrány, čo je indikáciou životaschopnosti buniek. Naopak u buniek s narušenou integritou membrány lyzomov spôsobenou xenobiotikom alebo bunkovou smrťou sa NR vyplavuje z buniek von (Fields *et al.*, 2017).

Pred pridaním pracovného roztoku NR bolo potrebné v celej doštičke pomocou multikanálovej pipety v objeme 100 µl vymeniť médium buniek dvakrát za sebou. Oplach buniek čistým predhriatym médiom slúži hlavne kvôli tomu, aby sa odstránili zvyšky PSs, ktoré by pri následnom vyhodnocovaní mohli spôsobiť falošne zvýšenú absorbanciu NR. Pracovný roztok NR sa pripravil nariadením zásobeného roztoku NR s príslušným množstvom média. Pomocou automatickej multikanálovej pipety sa do jednotlivých jamiek doštičky napipetovala 90 µl pracovného roztoku o finálnej koncentrácii 30 µg/ml. Doštička s bunkami a pridaným roztokom NR sa potom vložila do inkubátora na 2 hodiny s teplotou 37°C.

Po 2 hodinovej inkubácii sa odstránilo z doštičiek všetko médium s NR a bunky v každej jamke sa fixovali ku spodku mikrotitračnej doštičky roztokom 1% CaCl<sub>2</sub> v 0,5% formaldehide. Fixačný roztok sa do každej jamky pridával v objeme 100 µl pomocou automatickej multikanálovej pipety, a bol inkubovaný pri laboratórnej teplote po dobu 15 minút.

Po inkubácii sa fixačný roztok odstránil a jednotlivé bunky v jamkách boli dvakrát opláchnuté 100 µl PBS. Nakoniec sa do jamiek s bunkami pridalo 100 µl lyzačného roztoku (1% roztok ľadovej kyseliny octovej v 50% etanole). Doštičky sa vložili na 30 minút na doštičkovú trepačku. Bunky sa nechali lyzovať na trepačke pri laboratórnej teplote.

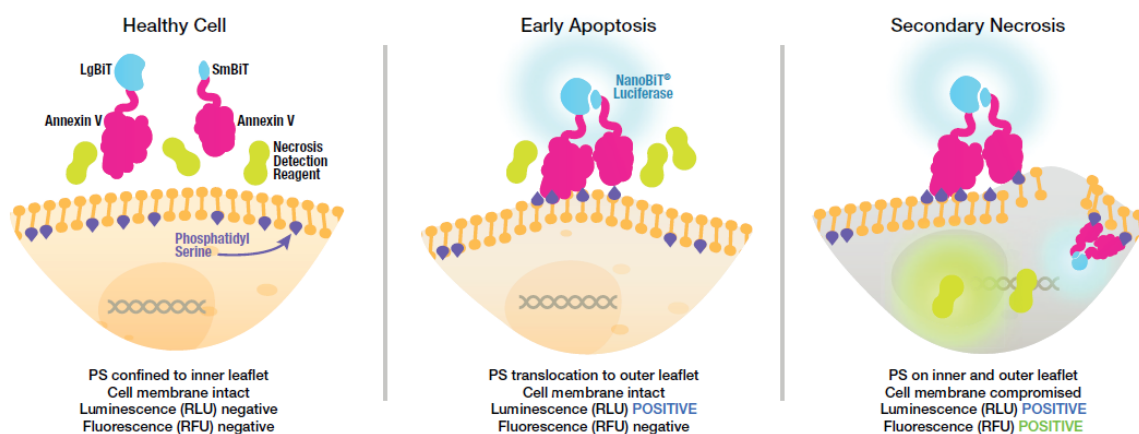
Po uplynutí 30 minút sa doštičky s lyzovanými bunkami hodnotili spektrofotometrom Tecan Infinite M200. Čítačka mikrotitračných doštičiek bola nastavená na meranie absorbie pri vlnovej dĺžke 540 nm. Výsledné hodnoty merania sa zaznamenávali v programe Microsoft Office Excel a spracované výsledky predstavovali percento pozitívnej kontroly, čiže životaschopnosť buniek na doštičke.

## **7.7 Stanovenie bunkovej smrti**

Annexin V je bežne používaný k štúdiu buniek na základe stanovenia ich životaschopnosti, apoptózy alebo nekrózy to vďaka sledovaniu rozdielov v integrite a permeabilite plazmatickej membrány. Apoptóza ako naprogramovaná, fyziologická bunková smrť spolu s nekrozou hrajú dôležitú úlohu v homeostáze tkaniva. S pochopením základných mechanizmov vedúcich k týmto dejom je možné uplatniť nové ciele terapeutickú liečby ochorení sledovaním nerovnováhy medzi proliferáciou a stratou buniek. Asymetria plazmatickej membrány, ako jedným z prvých prejavov apoptózy, s odhalením zvyškov PhSer na vonkajšej membráne, spôsobuje silné a špecifické naviazanie Annexinu V, ktoré umožňuje

detekciu straty asymetrie plazmatickej membrány pri apoptickom deji (Rieger *et al.*, 2011, van Engeland *et al.*, 1998).

Ku stanoveniu bunkovej smrti sa použil test apoptózy a nekrózy RealTime-Glo™ Annexin V (Promega Corporation, USA). Ide o test merania životaschopnosti (nelytický) buniek v reálnom čase (kinetický), založený na meraní expozície PhSer na vonkajšom povrchu plazmatickej membrány v apoptickom procese. Meraním expozície PhSer ide o veľmi spoľahlivú a validovanú metodiku na stanovenie hodnoty apoptózy. V teste RealTime-Glo™ je väzba Annexinu V detekovaná luminiscenčným signálom ako prejavom apoptózy, a pre nekrózu ide o detekciu fluorescenčného signálu. Samotné meranie signálu prebieha na čítačke mikrotitračných doštičiek.



**Obrázok 9** Bioluminiscenčná detekcia expozície fosfatidylserínu v apoptických bunkách v reálnom čase (prevzaté z RealTime-Glo Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay Technical Manual, Promega).

Detekčný reagent v RealTime-Glo™ Annexin V obsahuje ekvimolárny pomer dvoch Annexin V fúzných proteínov (Annexin V-LgBiT a Annexin V-SmBiT) obsahujúcu komplementárne podjednotky NanoBiT® luciferasy. Činidlo taktiež obsahuje časovo uvoľňovaný luciferasový substrát, ktorý je stálym zdrojom substrátu počas experimentálneho stanovenia. Luciferasové proteínové podjednotky majú veľmi slabú vzájomnú afinitu ak sú voľne v roztoku. Luminiscencia zostáva nízka, až do momentu expozície PhSer, na ktorý sa molekuly Annexinu viažu a tieto dve podjednotky sa prinesú do svojej blízkosti. Súčasťou testu je tiež test bunkovej nepriepustnosti, pomocou profluorescenčného farbiva s afinitou k DNA, ktoré umožňuje detekciu nekrózy.

Základné kroky a podmienky stanovenia bunkovej smrti na bunkovej línii HeLa procesmi pasážovania, stanovovania životaschopnosti buniek pomocou trypanovej modrej, nasadzovaním buniek na experiment a samotného nasadzovania látok na doštičku sú opísané v predchádzajúcich častiach.

Hlavným rozdielom v porovnaní s experimentálnym stanovením PDT je v použitej mikrotitačnej doštičke a kultivačnom médiom. Na experimentálne stanovenie bunkovej smrti sa používajú biele sterilné 96-jamkové mikrotitračné doštičky s priehľadným dnom, aby sa minimalizoval medziprechod fluorescencie a luminiscencie v rámci jamôčok. Ďalším dôležitým vybavením pre stanovenie je čítačka mikrotitračných doštičiek so schopnosťou merať luminiscenciu spolu s fluorescenciou. HeLa bunky museli byť navyiac pred experimentom navyknuté na špeciálne kultivačné médium nezávislé na CO<sub>2</sub>.

Samotný kit pre stanovenie bunkovej smrti sa uchováva v mrazničke v teplotnom rozmedzí od -10°C do -30°C. Pred samotným použitím sa substráty nechali rozpustiť pri laboratórnej teplote. Fúzne proteíny sa dodávajú skladované v 50% glycerole a skladujú sa pri nízkych teplotách. V prípade použitia jednotlivých komponent súpravy je odporúčané ich rozmrazenie a rozdelenie na viac objemov a nevyužité alikvoty ďalej skladovať v mraze. Takto pripravené detekčné činidlá je možné skladovať pri izbovej teplote, 4°C alebo 37°C až 18 hodín, ale je odporúčané ich okamžité využitie. Annexin V NanoBiT® substrát je rozpustný vo väčšine médií pre rast a udržanie buniek, ale jeho rozpustnosť je možné potencovať prídavkom sérových doplnkov (napr. 10% FBS či 10% konské sérum). Substrát je vhodné pridávať do vopred nahriateho média a následne hneď vortexovať do úplného rozpustenia substrátu. K zlepšeniu väzobnej interakcie medzi Annexinom V a PhSer sa odporúča prídanie Ca<sup>2+</sup> (CaCl<sub>2</sub>), na ktorom je táto väzba závislá. Pri samotnom stavení sa odporúča zaradiť v rámci stanovovania kontroly so substrátmi a bez substrátov, aby bolo možné potvrdiť znášateľnosť reagentov. Doštičky sa inkubujú pri 37°C s nasadeným vekom, aby sa predišlo teplotným rozdielom medzi testovacími bunkami a činidlami a minimalizovalo sa riziko kontaminácie.

V rámci stanovenia sa odporúčajú 3 typy kontrol:

- A. Kontroly bez buniek, ktoré budú slúžiť na detekciu generovaného luminiscenčného a fluorescenčného pozadia. Priemerné hodnoty pozadia luminiscencie a fluorescencie v kontrolách bez buniek sa odčítajú od všetkých

testovaných vzoriek na normalizáciu údajov testu. Do jamiek sa pridá 100  $\mu$ l kultivačného média a 100  $\mu$ l detekčného činidla.

- B. Kontroly bez zlúčenín (iba s bunkami), do ktorých sa pridáva 50  $\mu$ l kultivačného média a 50  $\mu$ l buniek, a následne 100  $\mu$ l detekčného činidla. Tieto kontroly budú slúžiť na porovnanie s testovanými vzorkami v priebehu merania.
- C. Pozitívne kontroly so zlúčeninou obsahujúce 50  $\mu$ l zlúčeniny indukujúcej apoptózu (prípadne nekrózu) so známymi koncentráciami, 50  $\mu$ l nasadených buniek a prídavok 100  $\mu$ l detekčného činidla. Tieto jamky budú využité pre preukázanie pozitívnej kontroly činidla a na stanovenie relatívnej veľkosti odozvy pri skúmaní neznámych zlúčenín.

Pred samotnou prípravou detekčného reagentu je potrebné substrát Annexin V NanoBit®,  $\text{CaCl}_2$  a detekčné činidlo pre nekrózu rozmraziť pri izbovej teplote a Annexin V-SmBiT spolu s Annexin V-LgBiT umiestniť na ľad. Po rozmrazení je vhodné aj krátke scentrifugovanie všetkých komponent. Po stanovení potrebného objemu detekčného reagentu sa do sterilnej plastovej skúmavky s uzáverom pridá potrebné množstvo predhriateho kultivačného média. Následne sa pridá potrebné alikvotné množstvo AnnexinNanoBit® substrátu a celý objem sa zvertexuje. V ďalších krokoch sa podobným spôsobom postupne pridá  $\text{CaCl}_2$ , nekrózu detekujúce činidlo, Annexin V-SmBiT a Annexin V-LgBiT. Po prídavku posledných dvoch substrátov je potrebné opatrné premiešanie, tak aby nevznikli bublinky.

Na pripravenú doštičku s bunkami sa podobným spôsobom ako pri nasadzovaní PSs aplikovalo detekčné činidlo v objeme 100  $\mu$ l a kultivačná doštička sa vložila na trepačku na dobu 30s pri 500-700 rpm, aby došlo ku kompletnému a rovnomernému rozloženiu látky v jamkách doštičky. Takto pripravená doštička sa inkubuje za štandardných podmienok v bunkovom inkubátore. Následne sú v 15 minútových intervaloch v priebehu 24 hodín zaznamenávané hodnoty luminiscencie a fluorescencie na čítačke mikrotitračných doštičiek Tecan SPARK.

## 7.8 Vyhodnotenie výsledkov

Výsledné hodnoty fototoxických experimentov predstavovali získané hodnoty strednej efektívnej (terapeutickej) koncentrácie ( $\text{EC}_{50}$ ) vzťahujúce sa pre každú z stanovovaných PSs látok. Každá hodnota  $\text{EC}_{50}$  pre danú študovanú látku udávala koncentráciu, ktorá po ožiarení svetlom spôsobí pokles vo životaschopnosti buniek na 50 % so zreteľom na neovplyvnené

bunky. Výsledky fototoxických testov sa spracovávali pomocou programu Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA). Pomocou programu GraphPad Prism (GraphPad Software, USA) sa z dát získaných pri experimente študovaných fototoxických látok vytvorili grafy a zistila sa hodnota EC<sub>50</sub>. Dáta sa vyhodnocovali analýzou jednofaktorového rozptylu (one-way ANOVA) s *post hoc* metódou viacnásobného porovnania podľa Bonferonniho. Výsledky experimentov, ktoré sa dali pokladať za signifikantné, boli predstavované hladinou rozptylu (p) \*p<0.05, \*\*p<0.01 a \*\*\*p<0.001. Vo výsledkoch sa uviedli dáta ako priemerné hodnoty so smerodatnou odchýlkou. Experimenty prevádzané pri cytotoxických stanoveniach sa uskutočňovali minimálne v 4 opakovaníach.

Získané dáta zo stanovenia bunkovej smrti sa zaznamenávali do programu Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA) v priebehu 24 hodinového merania hodnôt luminiscencie a fluorescencie na čítačke mikrotitračných doštičiek Tecan SPARK. Pre jednotlivú získanú veličinu sa výsledné dáta merané v 15 minútových intervaloch prepočítali na hodnoty priemerov a smerodatných odchýliek. Výsledné dáta sa spracovávali v programe GraphPad Prism (GraphPad Software, USA).

## **7.9 Subcelulárna lokalizácia študovaných látok**

K stanoveniu subcelulárnej lokalizácie sa použila bunková línia HeLa, sledovaná fluorescenčnou mikroskopiou. Bunky boli nasadené na špeciálne sterilné Petriho misky so skleneným dnom vhodné pre konfokálnu mikroskopiou o koncentrácii 10 000 buniek/ml SCM po 0,5 ml. Bunky sa inkubovali 24 hodín, následne k nim po tomto čase bol pridaný skúmaný PS s požadovanou koncentráciou vo 2 ml SCM a inkubácia prebiehala ďalej po dobu 12 hodín pri 37°C v CO<sub>2</sub> inkubátore. Po inkubácii sa bunky značili štyrmi fluorescenčnými sondami a to A) 20 min inkubácia s 0,4 μM MitoTracker<sup>TM</sup> Green FM ako mitochondriálnou sondou a 0,4 μM LysoTracker<sup>TM</sup> Blue DND-22 označujúca kyslé organely (lyzosomy) alebo B) 10 min inkubáciou s sondou 10 nM Hoechst 33342 pre značenie jadier a 1×CellMask<sup>TM</sup> Green sondou označujúcou membrány. Po oplachu došlo k samotnej detekcii fluorescencie s využitím filtrov pre kanály DAPI, FITC a Cy5 pomocou fluorescenčného mikroskopu Nikon Eclipse Ti E.

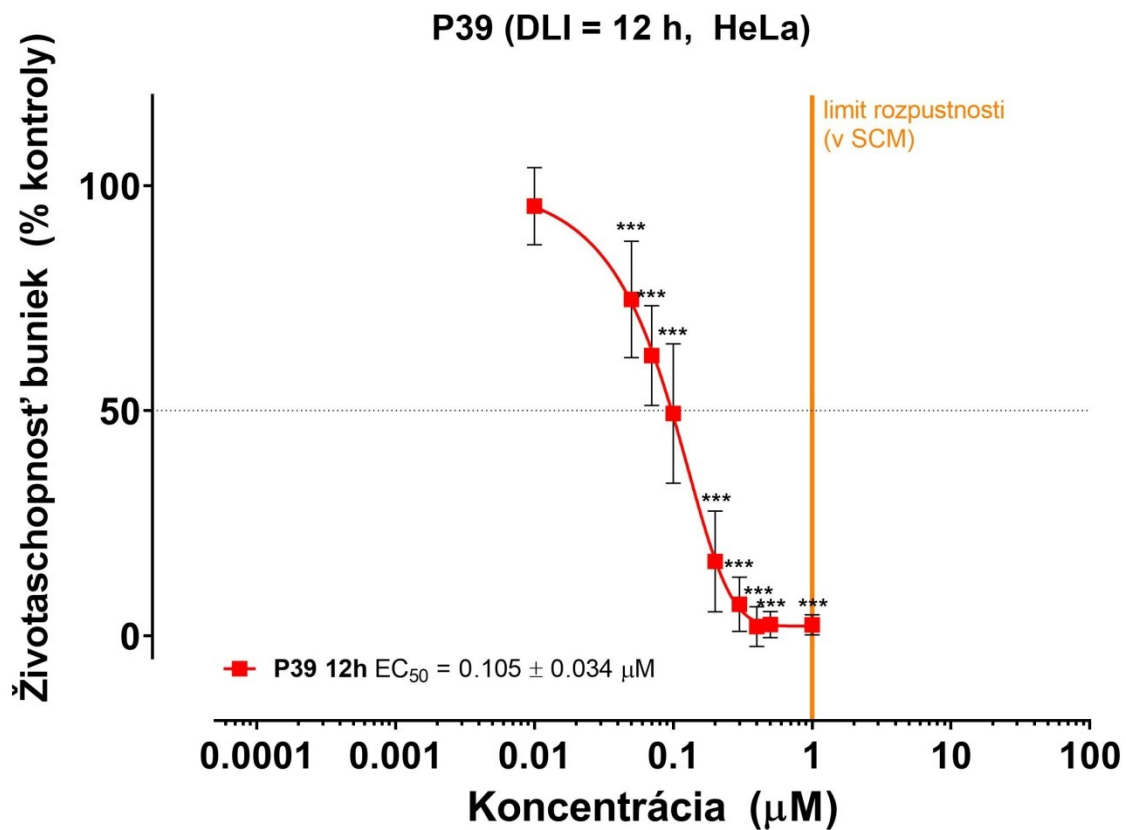
## 8 Výsledky

### 8.1 Cytotoxické experimenty

#### 8.1.1 P39

##### 8.1.1.1 HeLa

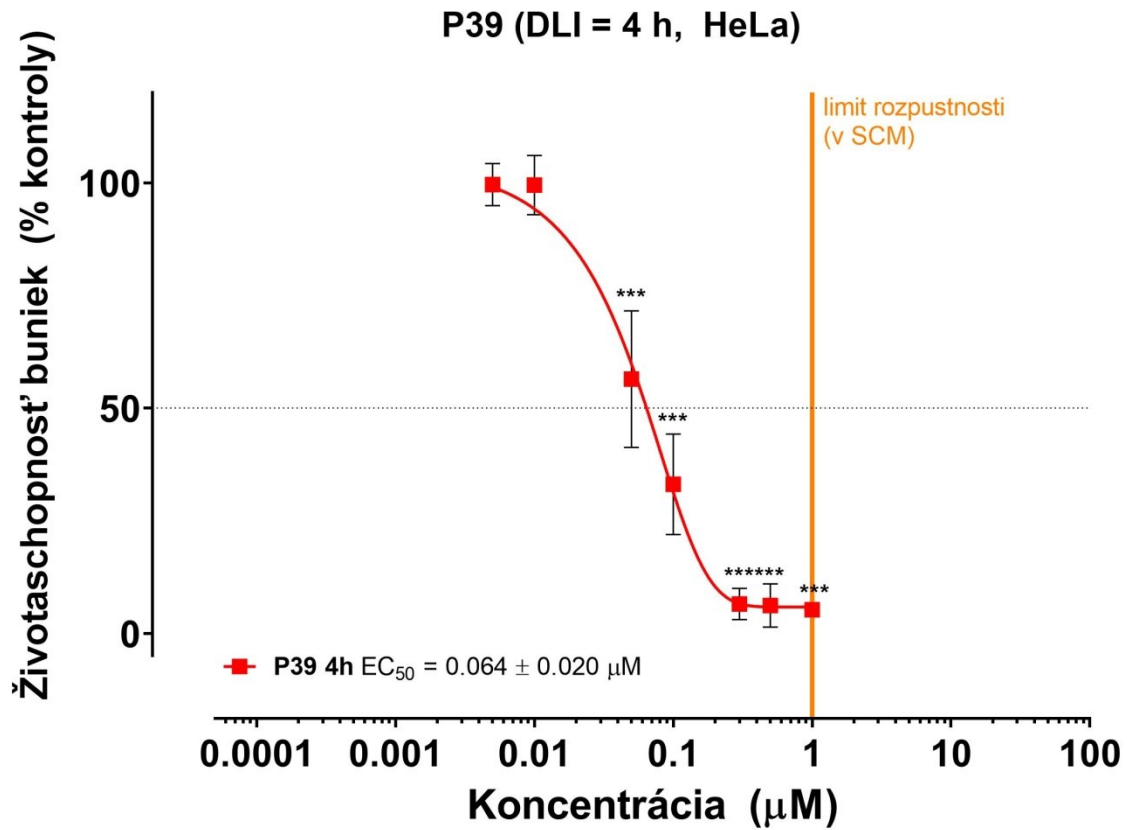
Cytotoxicita látky P39 po 12 h inkubácii pred ožiarením (DLI; z angl. drug-light interval) bola skúmaná na bunkovej línii HeLa v rozmedzí koncentrácií 0,01 – 1  $\mu\text{M}$  v SCM. Zo získaných výsledkov sa stanovila stredná efektívna koncentrácia ( $\text{EC}_{50}$ ).  $\text{EC}_{50}$  podľa získaných hodnôt zobrazených v grafe na Obrázku 10 odpovedá  $0,105 \pm 0,034 \mu\text{M}$ .



**Obrázok 10** Graf závislosti životoschopnosti buniek HeLa na koncentrácii látky P39 v SCM (DLI = 12 h).\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

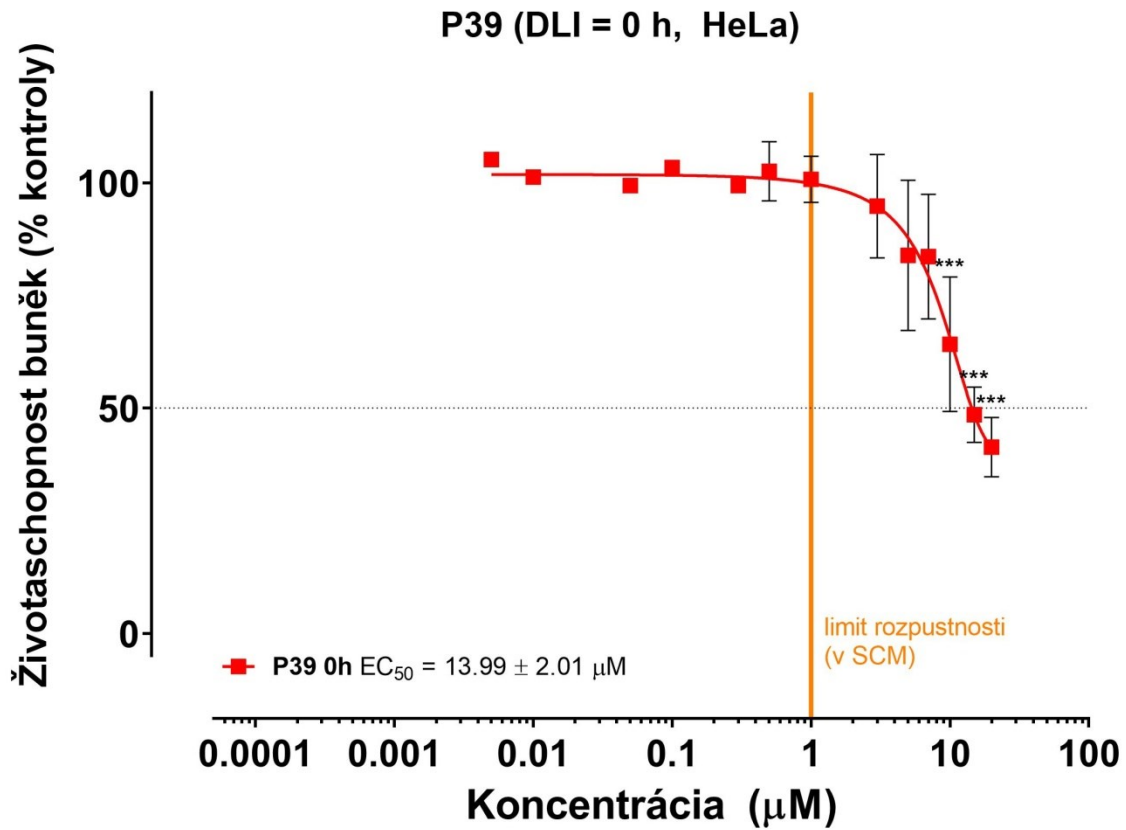


Cytotoxicita látky P39 s DLI = 4 h bola skúmaná na bunkovej línii HeLa v rozmedzí koncentrácií 0,005 – 1  $\mu\text{M}$  v SCM. Zo získaných výsledkov sa stanovila stredná efektívna koncentrácia ( $\text{EC}_{50}$ ).  $\text{EC}_{50}$  podľa získaných hodnôt zobrazených v grafe na Obrázku 11 odpovedá  $0,064 \pm 0,020 \mu\text{M}$ .



**Obrázok 11** Graf závislosti životaschopnosti buniek HeLa na koncentrácii látky P39 v SCM (DLI = 4 h).\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

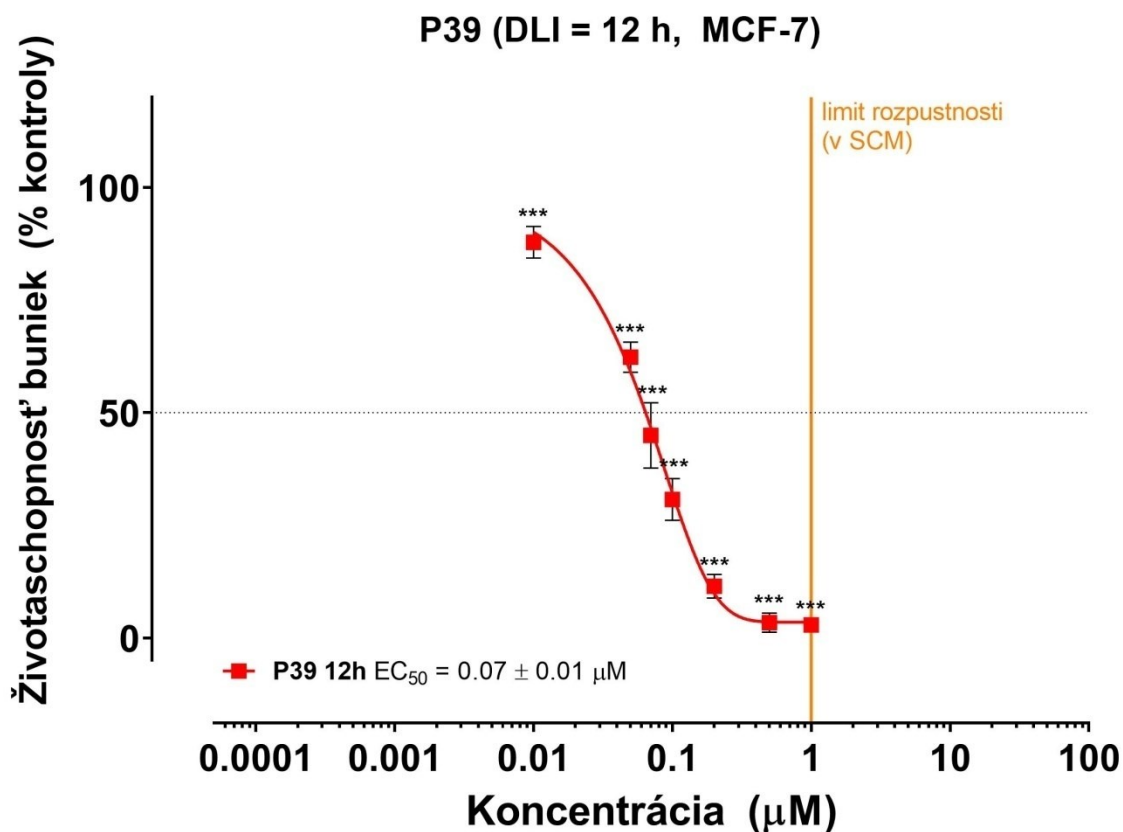
Cytotoxicita látky P39 bez predchádzajúcej inkubácie (DLI = 0 min) bola skúmaná na bunkovej línii HeLa v rozmedzí koncentrácií 0,005 – 20  $\mu\text{M}$  v SCM. Zo získaných výsledkov sa stanovila stredná efektívna koncentrácia ( $\text{EC}_{50}$ ).  $\text{EC}_{50}$  podľa získaných hodnôt zobrazených v grafe na Obrázku 12 odpovedá  $13,99 \pm 2,01 \mu\text{M}$ .



**Obrázok 12** Graf závislosti životaschopnosti buniek HeLa na koncentrácii látky P39 v SCM (DLI = 0 h).\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

### 8.1.1.2 MCF-7

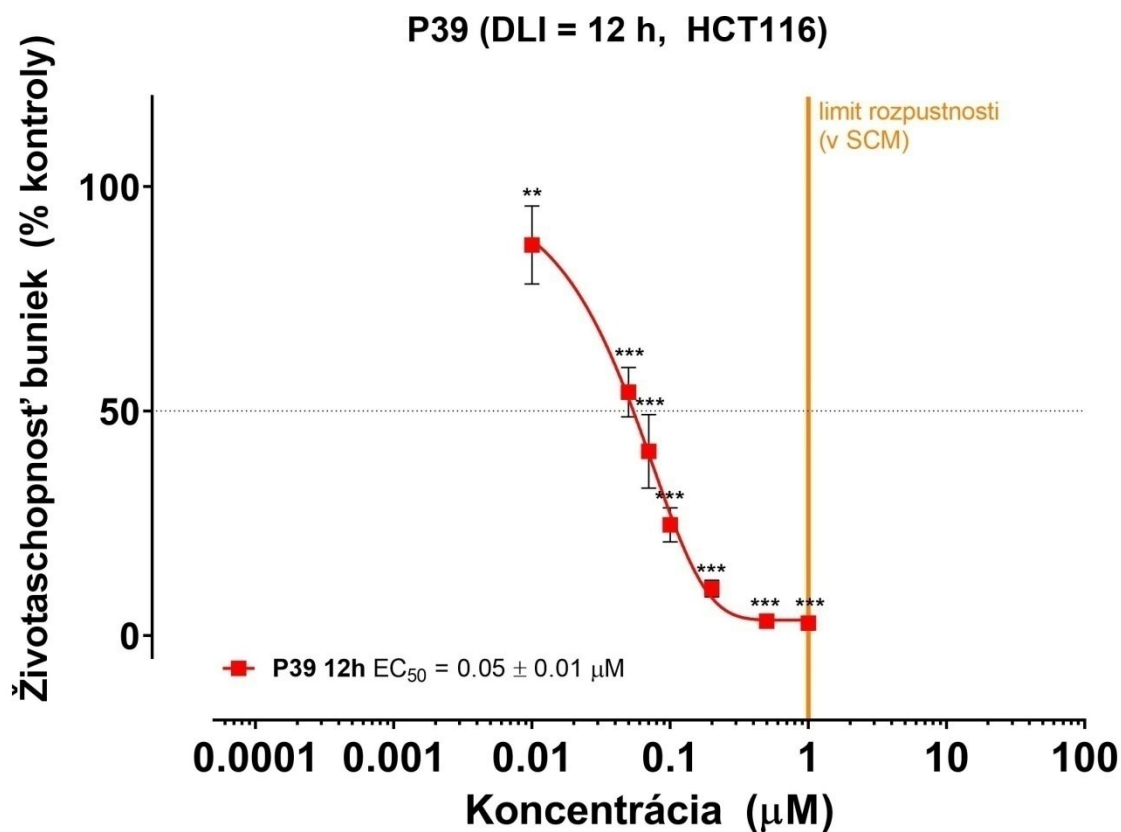
Cytotoxicita látky P39 s DLI = 12 h bola skúmaná na bunkovej línii MCF-7 v rozmedzí koncentrácií 0,01 – 1  $\mu\text{M}$  v SCM. Zo získaných výsledkov sa stanovila stredná efektívna koncentrácia ( $\text{EC}_{50}$ ).  $\text{EC}_{50}$  podľa získaných hodnôt zobrazených v grafe na Obrázku 13 odpovedá  $0,07 \pm 0,01 \mu\text{M}$ .



**Obrázok 13** Graf závislosti životoschopnosti buniek MCF-7 na koncentrácii látky P39 v SCM (DLI = 12 h).\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

### 8.1.1.3 HCT-116

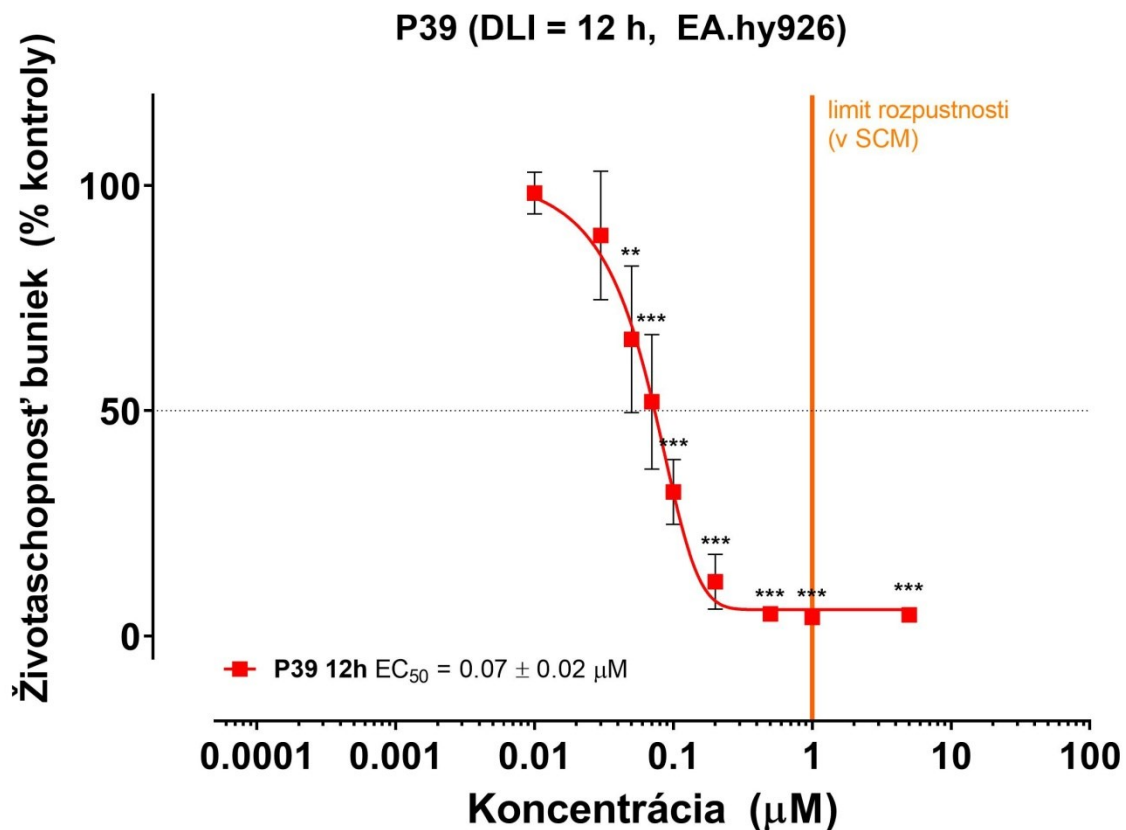
Cytotoxicita látky P39 s DLI = 12 h bola skúmaná na bunkovej línii HCT-116 v rozmedzí koncentrácií 0,01 – 1  $\mu\text{M}$  v SCM. Zo získaných výsledkov sa stanovila stredná efektívna koncentrácia ( $\text{EC}_{50}$ ).  $\text{EC}_{50}$  podľa získaných hodnôt zobrazených v grafe na Obrázku 14 odpovedá  $0,05 \pm 0,01 \mu\text{M}$ .



**Obrázok 14** Graf závislosti životaschopnosti buniek HCT-116 na koncentrácii látky P39 v SCM (DLI = 12 h).\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

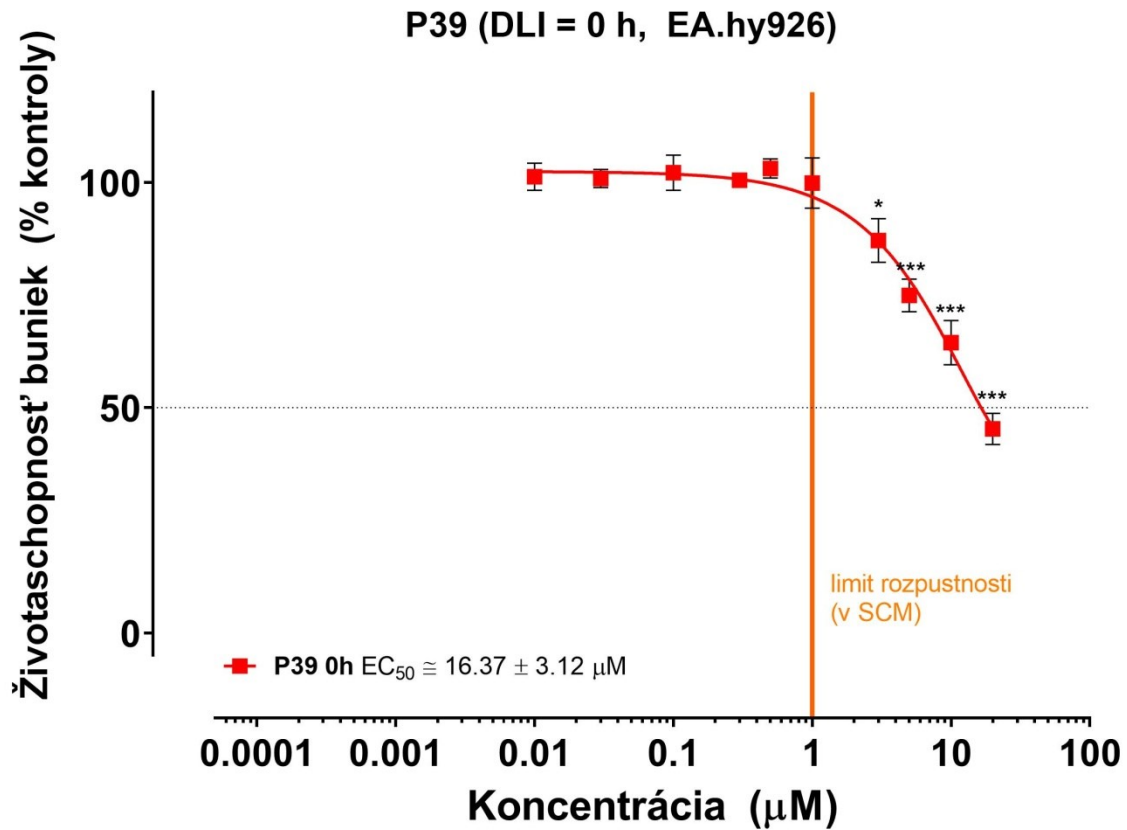
#### 8.1.1.4 EA.hy926

Cytotoxicita látky P39 v DLI = 12 h bola skúmaná na bunkovej línii EA.hy926 v rozmedzí koncentrácií 0,01 – 1  $\mu\text{M}$  v SCM. Zo získaných výsledkov sa stanovila stredná efektívna koncentrácia ( $\text{EC}_{50}$ ).  $\text{EC}_{50}$  podľa získaných hodnôt zobrazených v grafe na Obrázku 15 odpovedá  $0,07 \pm 0,02 \mu\text{M}$ .



**Obrázok15** Graf závislosti životašchopnosti buniek EA.hy926 na koncentrácii látky P39 v SCM (DLI = 12 h).\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

Cytotoxicita látky P39 bez predchádzajúcej inkubácie (DLI = 0 h) bola skúmaná na bunkovej línii EA.hy926 v rozmedzí koncentrácií 0,01 – 20  $\mu\text{M}$  v SCM. Zo získaných výsledkov sa stanovila stredná efektívna koncentrácia ( $\text{EC}_{50}$ ).  $\text{EC}_{50}$  podľa získaných hodnôt zobrazených v grafe na Obrázku 16 odpovedá  $16,37 \pm 3,12 \mu\text{M}$ .

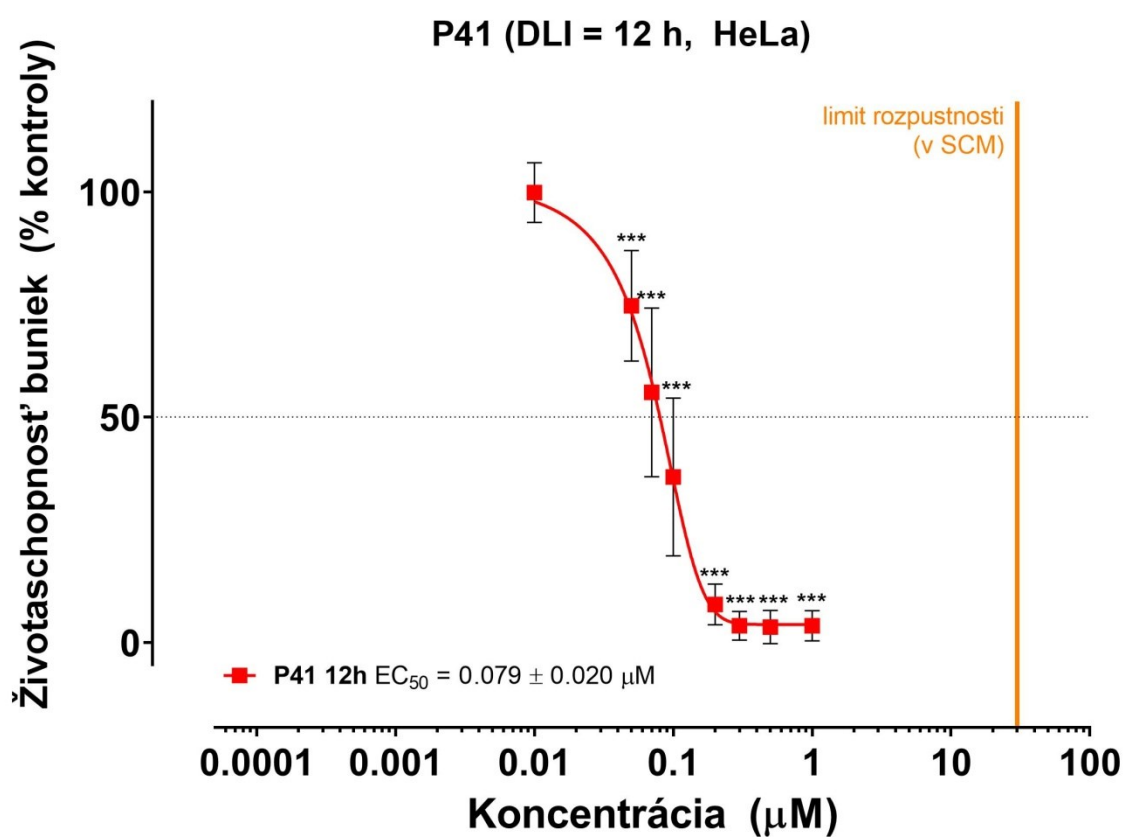


**Obrázok 16** Graf závislosti životaschopnosti buniek EA.hy926 na koncentracii látky P39 v SCM (DLI = 0 h).\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

## 8.1.2 P41

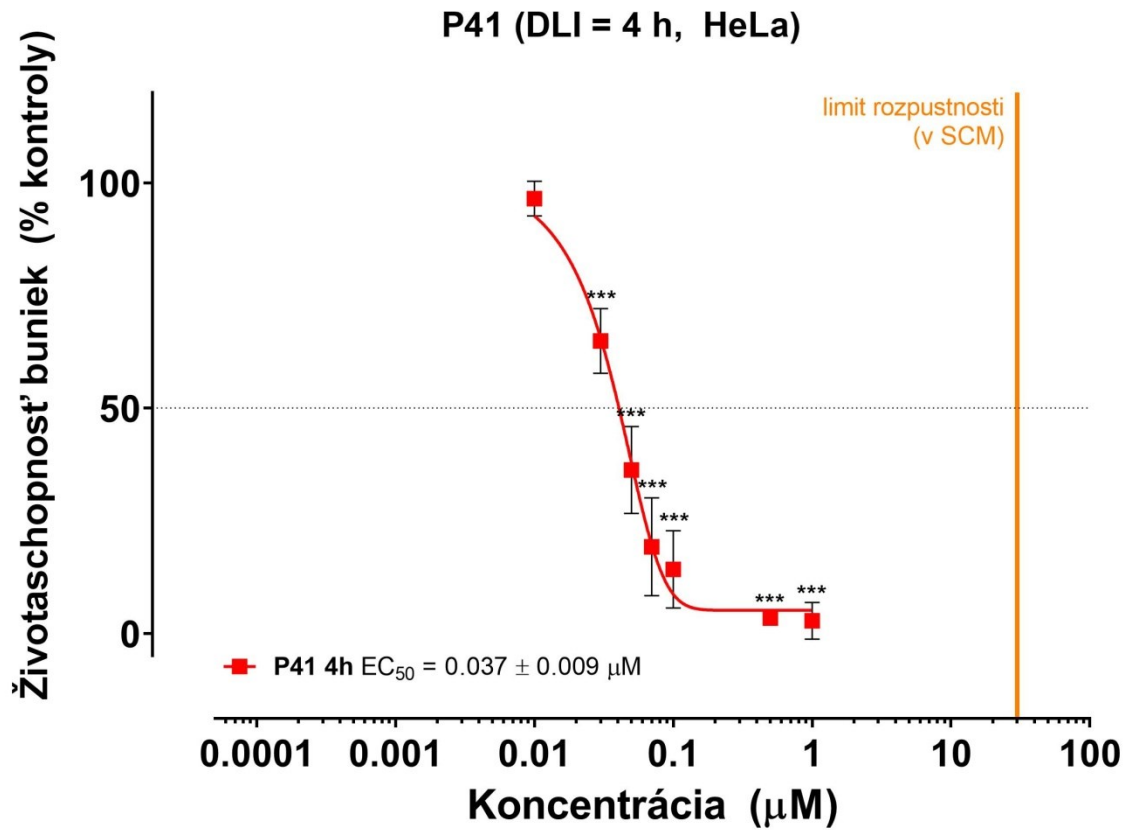
### 8.1.2.1 HeLa

Cytotoxicita látky P41 s DLI = 12 h bola skúmaná na bunkovej línii HeLa v rozmedzí koncentrácií 0,01 – 1  $\mu\text{M}$  v SCM. Zo získaných výsledkov sa stanovila stredná efektívna koncentrácia ( $\text{EC}_{50}$ ).  $\text{EC}_{50}$  podľa získaných hodnôt zobrazených v grafe na Obrázku 17 odpovedá  $0,079 \pm 0,020 \mu\text{M}$ .



**Obrázok 17** Graf závislosti životaschopnosti buniek HeLa na koncentrácii látky P41 v SCM (DLI = 12 h).\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

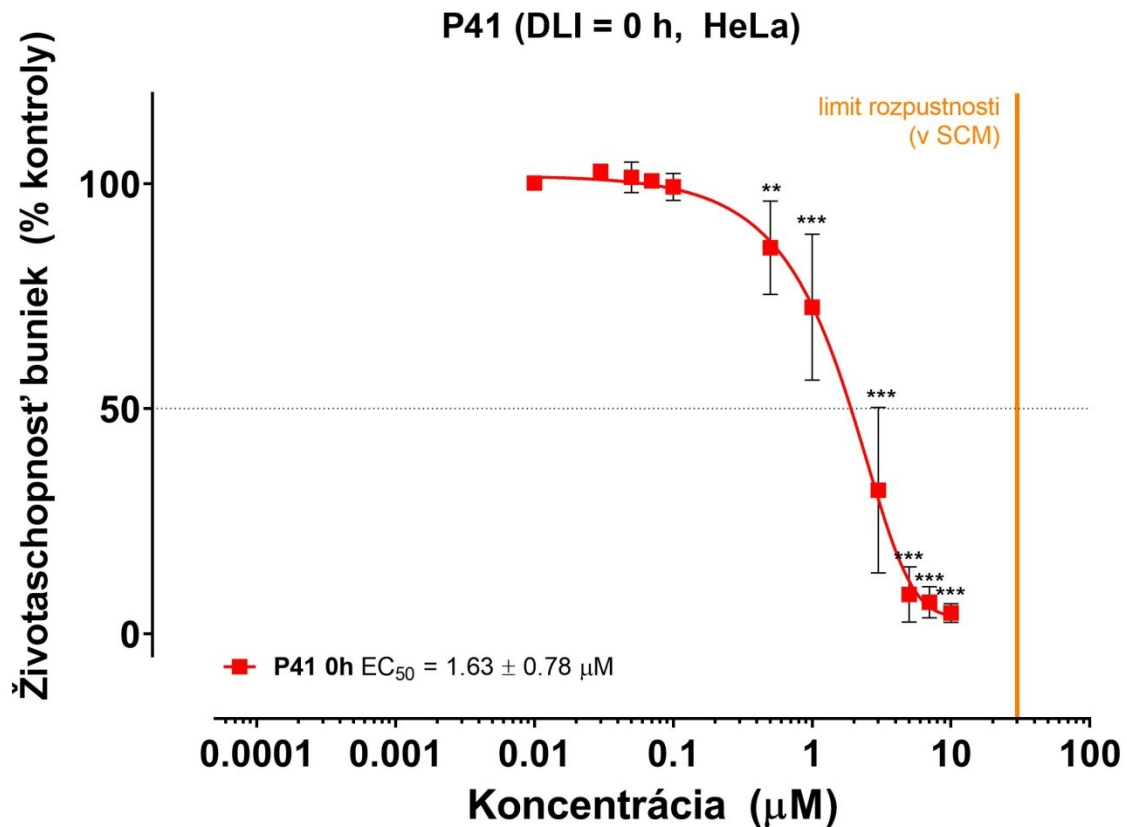
Cytotoxicita látky P41 s DLI = 4 h bola skúmaná na bunkovej línii HeLa v rozmedzí koncentrácií 0,01 – 1  $\mu\text{M}$  v SCM. Zo získaných výsledkov sa stanovila stredná efektívna koncentrácia ( $\text{EC}_{50}$ ).  $\text{EC}_{50}$  podľa získaných hodnôt zobrazených v grafe na Obrázku 18 odpovedá  $0,037 \pm 0,009 \mu\text{M}$ .



**Obrázok 18** Graf závislosti životaschopnosti buniek HeLa na koncentrácii látky P41 v SCM (DLI = 4 h).\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .



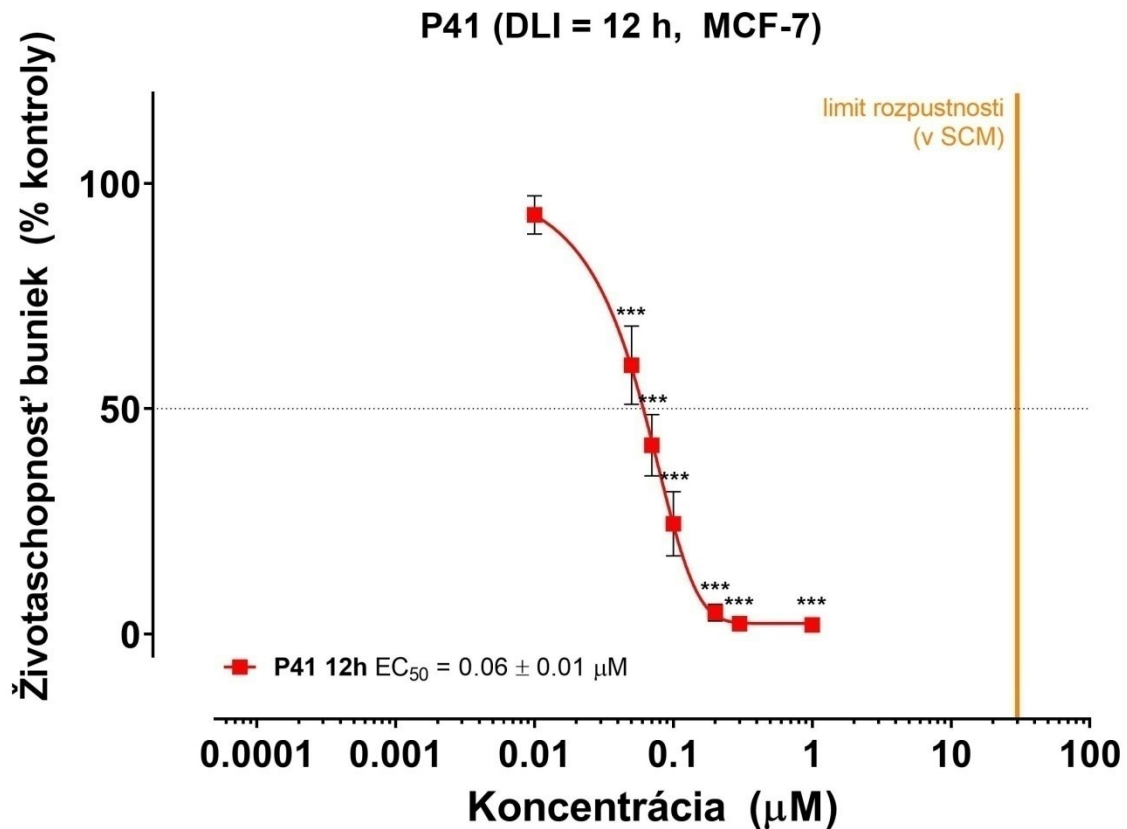
Cytotoxicita látky P41 s DLI = 0 h bola skúmaná na bunkovej línii HeLa v rozmedzí koncentrácií 0,01 – 10 $\mu$ M v SCM. Zo získaných výsledkov sa stanovila stredná efektívna koncentrácia (EC<sub>50</sub>). EC<sub>50</sub> podľa získaných hodnôt zobrazených v grafe na Obrázku 19 odpovedá 1,63  $\pm$  0,78  $\mu$ M.



**Obrázok 19** Graf závislosti životaschopnosti buniek HeLa na koncentrácii látky P41 v SCM (DLI = 0 h).\*, p < 0.05; \*\*, p < 0.01; \*\*\*, p < 0.001.

### 8.1.2.2 MCF-7

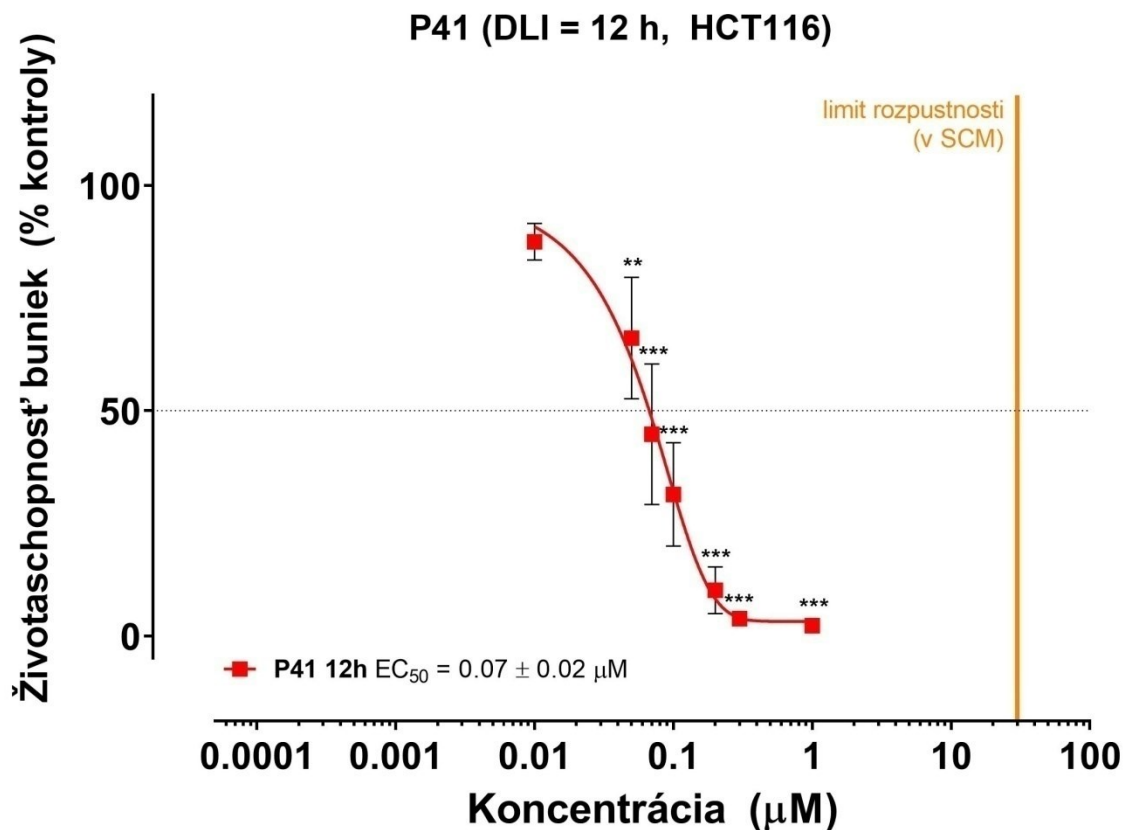
Cytotoxicita látky P41 s DLI = 12 h bola skúmaná na bunkovej línii MCF-7 v rozmedzí koncentrácií 0,01 – 1  $\mu\text{M}$  v SCM. Zo získaných výsledkov sa stanovila stredná efektívna koncentrácia ( $\text{EC}_{50}$ ).  $\text{EC}_{50}$  podľa získaných hodnôt zobrazených v grafe na Obrázku 20 odpovedá  $0,06 \pm 0,01 \mu\text{M}$ .



**Obrázok 20** Graf závislosti životaschopnosti buniek MCF-7 na koncentrácii látky P41 v SCM (DLI = 12 h). \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

### 8.1.2.3 HCT-116

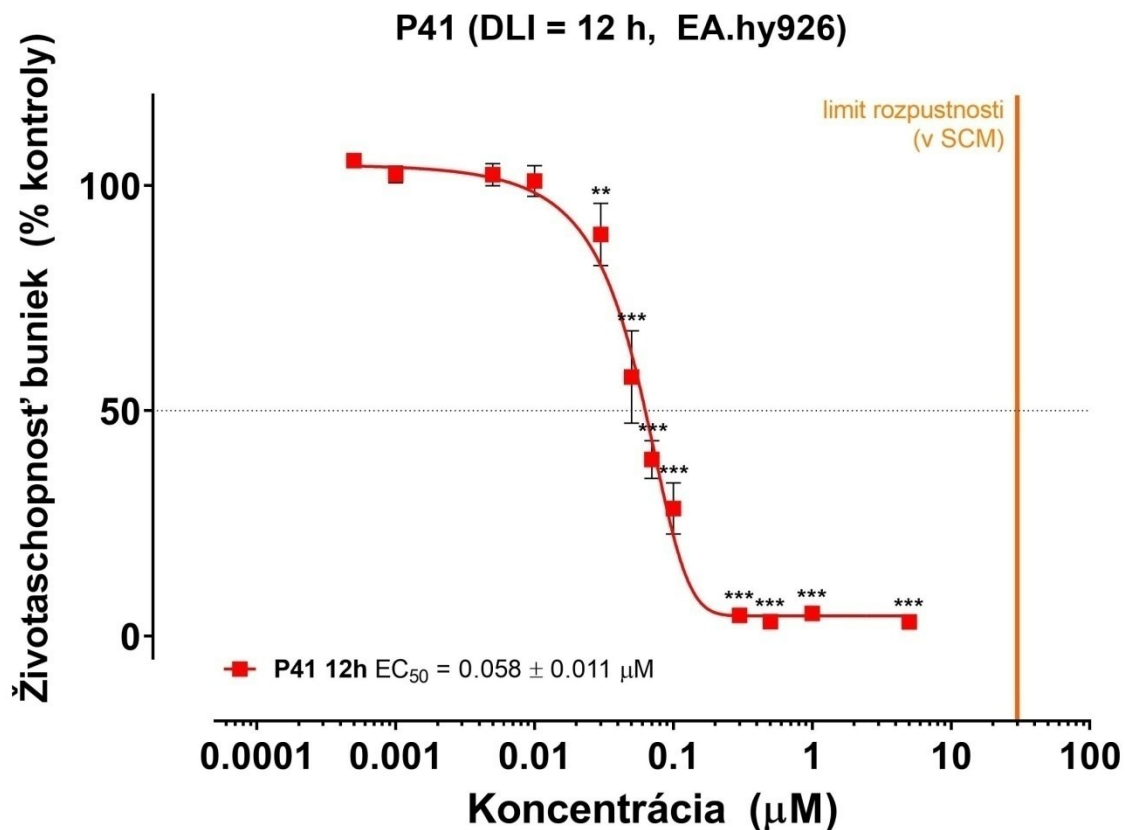
Cytotoxicita látky P41 s DLI = 12 h bola skúmaná na bunkovej línii HCT-116 v rozmedzí koncentrácií 0,01 – 1  $\mu\text{M}$  v SCM. Zo získaných výsledkov sa stanovila stredná efektívna koncentrácia ( $\text{EC}_{50}$ ).  $\text{EC}_{50}$  podľa získaných hodnôt zobrazených v grafe na Obrázku 21 odpovedá  $0,07 \pm 0,02 \mu\text{M}$ .



**Obrázok 21** Graf závislosti životaschopnosti buniek HCT-116 na koncentrácii látky P41 v SCM (DLI = 12 h).\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

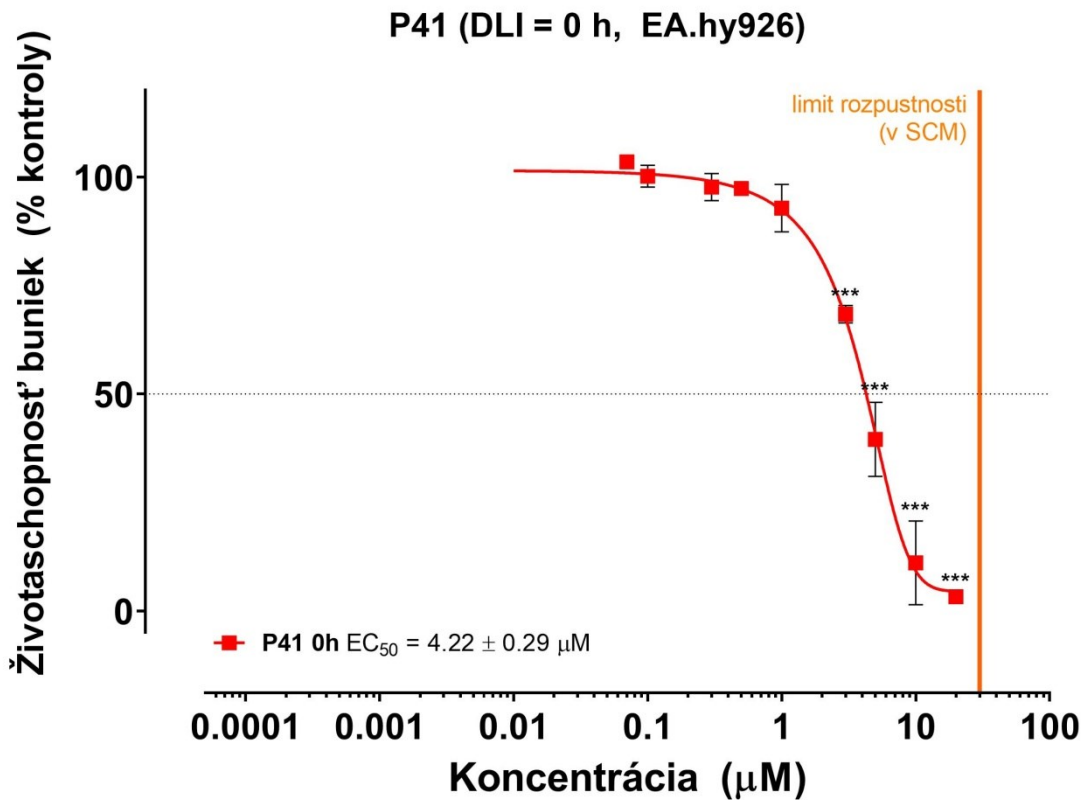
### 8.1.2.4 EA.hy926

Cytotoxicita látky P41 s DLI = 12 h bola skúmaná na bunkovej línii EA.hy926 v rozmedzí koncentrácií 0,0005 – 7 $\mu$ M v SCM. Zo získaných výsledkov sa stanovila stredná efektívna koncentrácia ( $EC_{50}$ ).  $EC_{50}$  podľa získaných hodnôt zobrazených v grafe na Obrázku 22 odpovedá  $0,058 \pm 0,011\mu$ M.



**Obrázok 22** Graf závislosti životaschopnosti buniek EA.hy926 na koncentrácii látky P41 v SCM (DLI = 12 h).\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

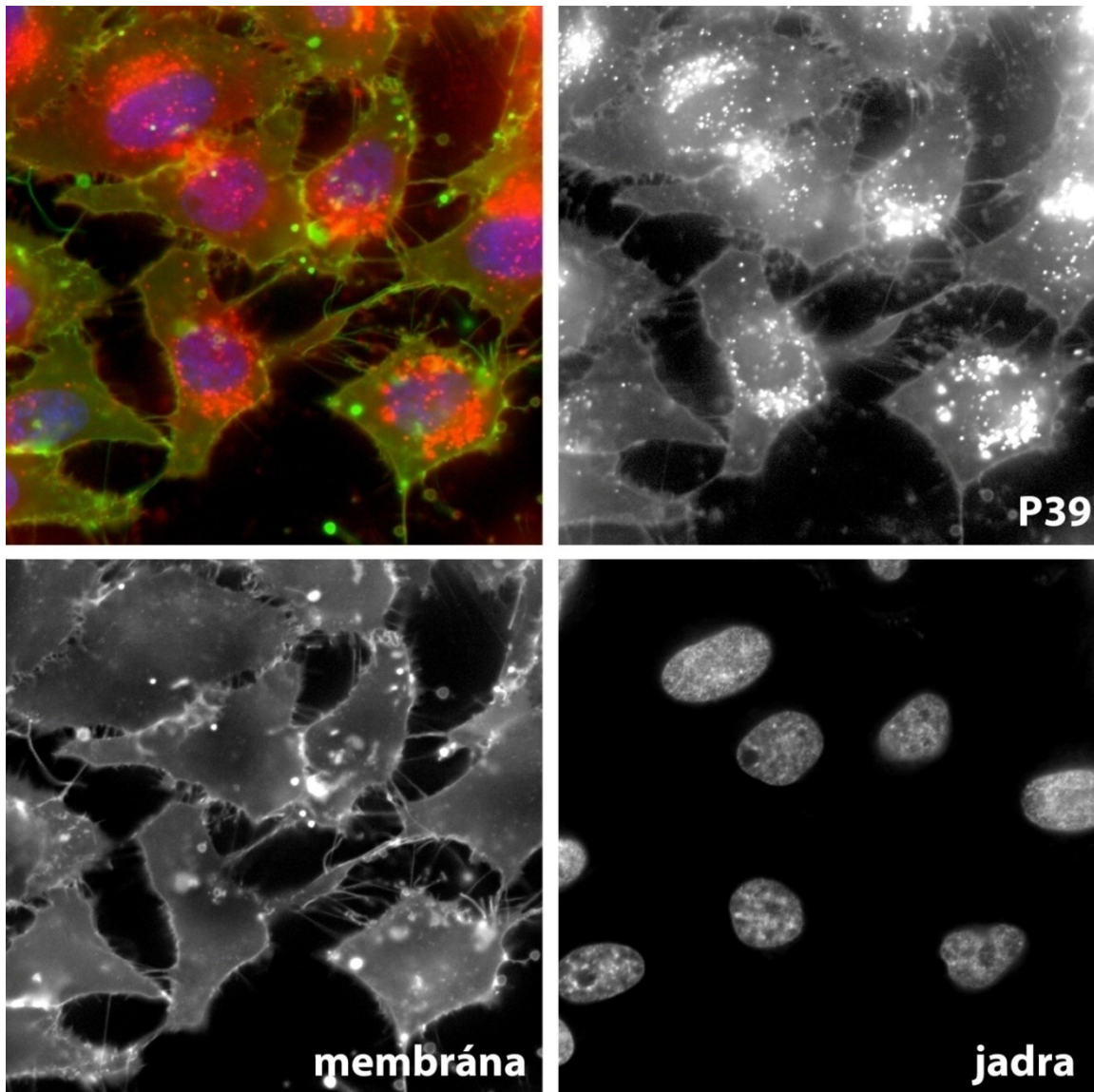
Cytotoxicita látky P41 s DLI = 0 h bola skúmaná na bunkovej línii EA.hy926 v rozmedzí koncentrácií 0,07 – 20  $\mu\text{M}$  v SCM. Zo získaných výsledkov sa stanovila stredná efektívna koncentrácia ( $\text{EC}_{50}$ ).  $\text{EC}_{50}$  podľa získaných hodnôt zobrazených v grafe na Obrázku 23 odpovedá  $4,22 \pm 0,29 \mu\text{M}$ .



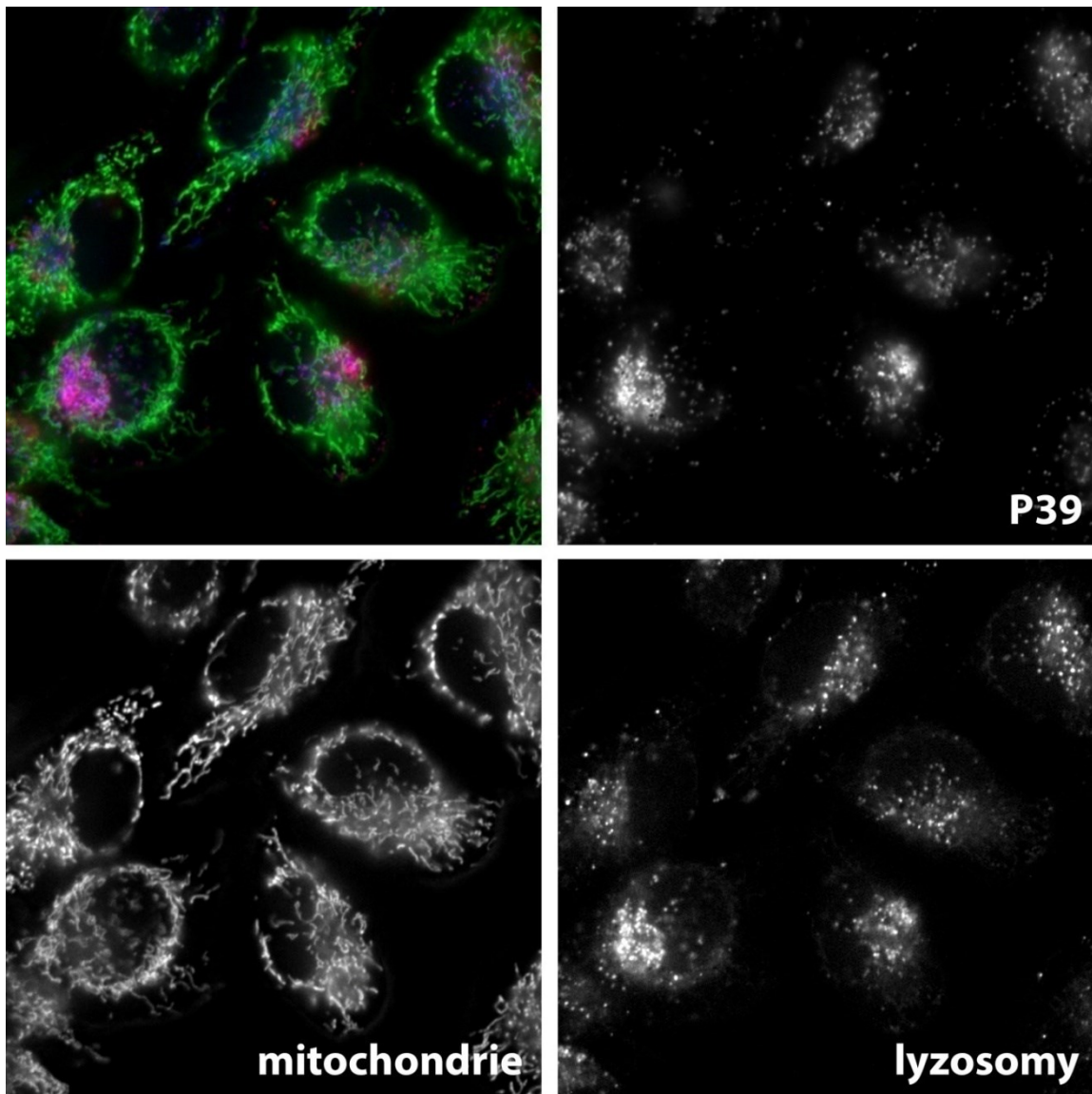
**Obrázok23** Graf závislosti životaschopnosti buniek EA.hy926 na koncentrácii látky P41 v SCM (DLI = 0 h).\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

## 8.2 Subcelulárna lokalizácia

K získaniu fotografickej dokumentácie bol použitý invertovaný fluorescenčný mikroskop Nikon Eclipse Ti-E (Nikon, Japonsko) s chladenou s CMOS kamerou Andor Zyla 5.5 (Andor Technology, Spojené Kráľovstvo) a LED fluorescenčným zdrojom (CoolLed pE-300 white, CoolLed Ltd., Spojené Kráľovstvo).

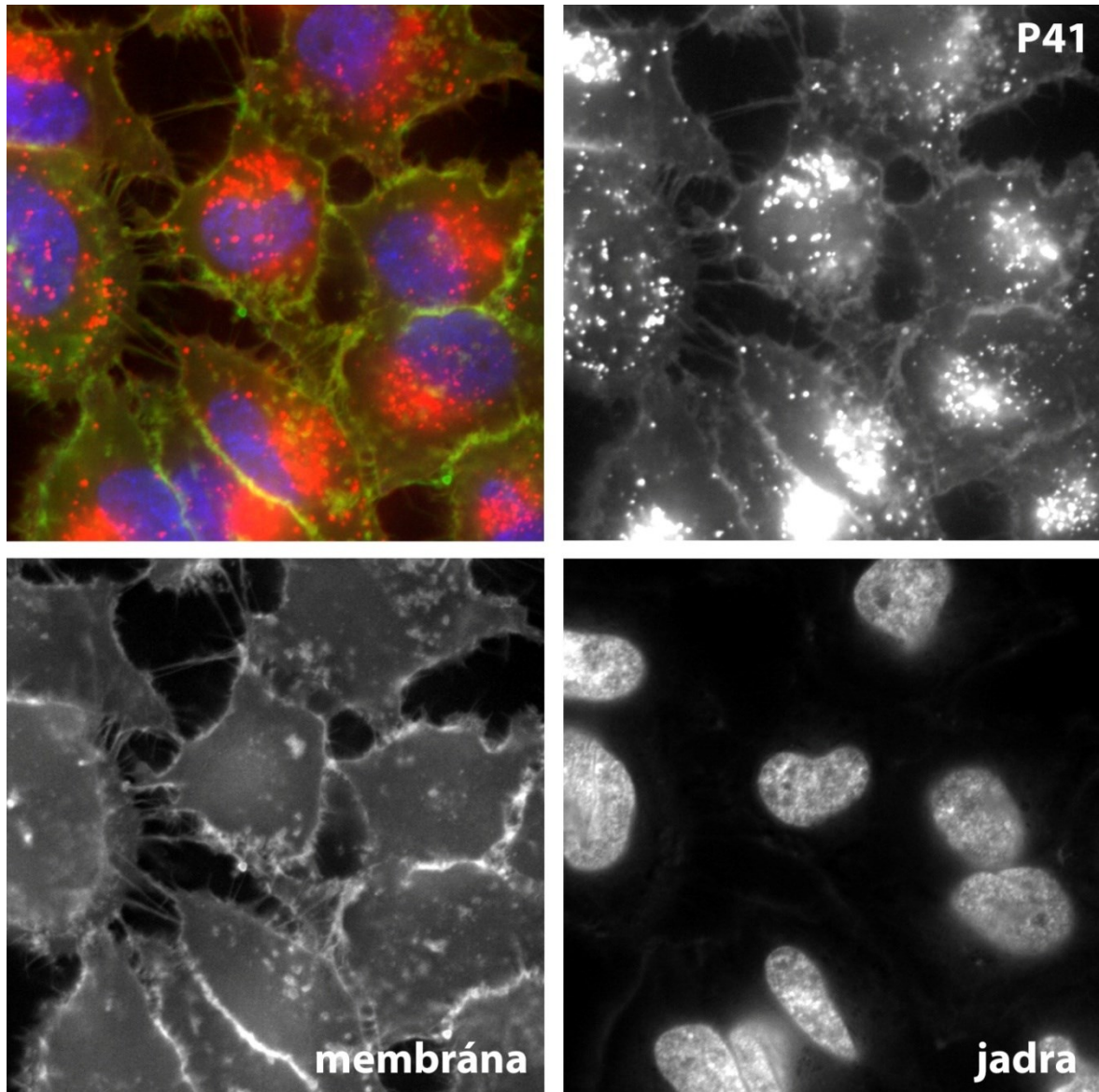


**Obrázok 24** Subcelulárna lokalizácia látky P39 (červená) v bunkách HeLa. Jadrá farbené Hoechst 33342 (modrá) a membrána CellMask Green (zelená). Prekryv fluorescenčných kanálov (v ľavo hore), vlastná fluorescencia P39 s použitím kanálu Cy5 (v pravo hore), membrána zobrazená FITC kanálom (v ľavo dole), jadrá zobrazená kanálom DAPI (v pravo dole).



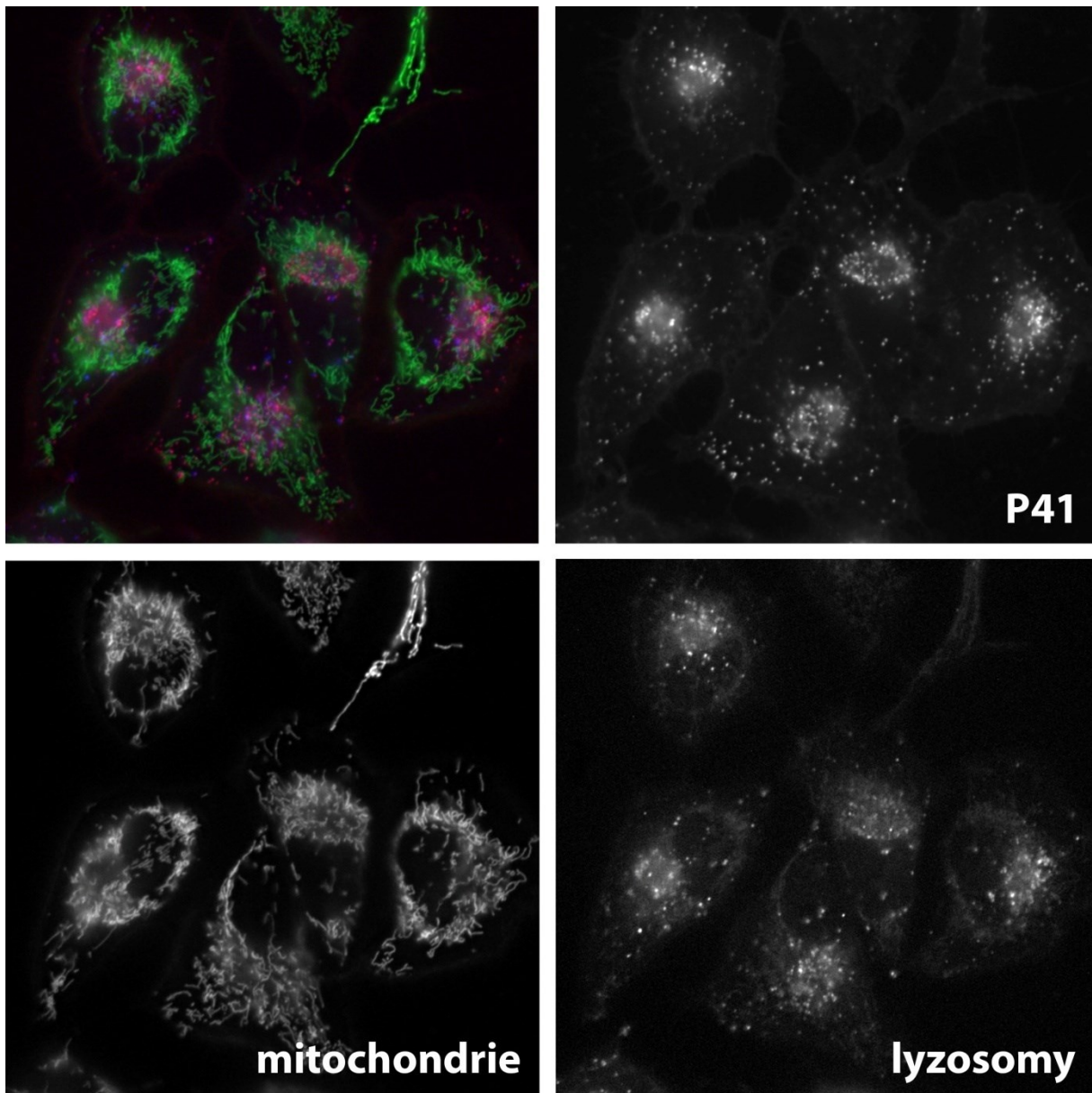
**Obrázok 25** Subcelulárna lokalizácia látky P39 (červená) v bunkách HeLa, mitochondrie farbené MitoTracker Green (zelená) a lyzosomy LysoTracker Blue DND-22 (modrá). Prekryv fluorescenčných kanálov (v ľavo hore), vlastná fluorescencia P39 s použitím kanálu Cy5 (v pravo hore), mitochondrie zobrazené FITC kanálom (v ľavo dole), lyzosomy zobrazená kanálom DAPI (v pravo dole).





**Obrázok 26** Subcelulárna lokalizácia látky P41 (červená) v bunkách HeLa, jadrá farbené Hoechst 33342 (modrá) a membrána CellMask Green (zelená). Prekryv fluorescenčných kanálov (v ľavo hore), vlastná fluorescencia P41 s použitím kanálu Cy5 (v pravo hore), membrána zobrazená FITC kanálom (v ľavo dole), jadrá zobrazená kanálom DAPI (v pravo dole).

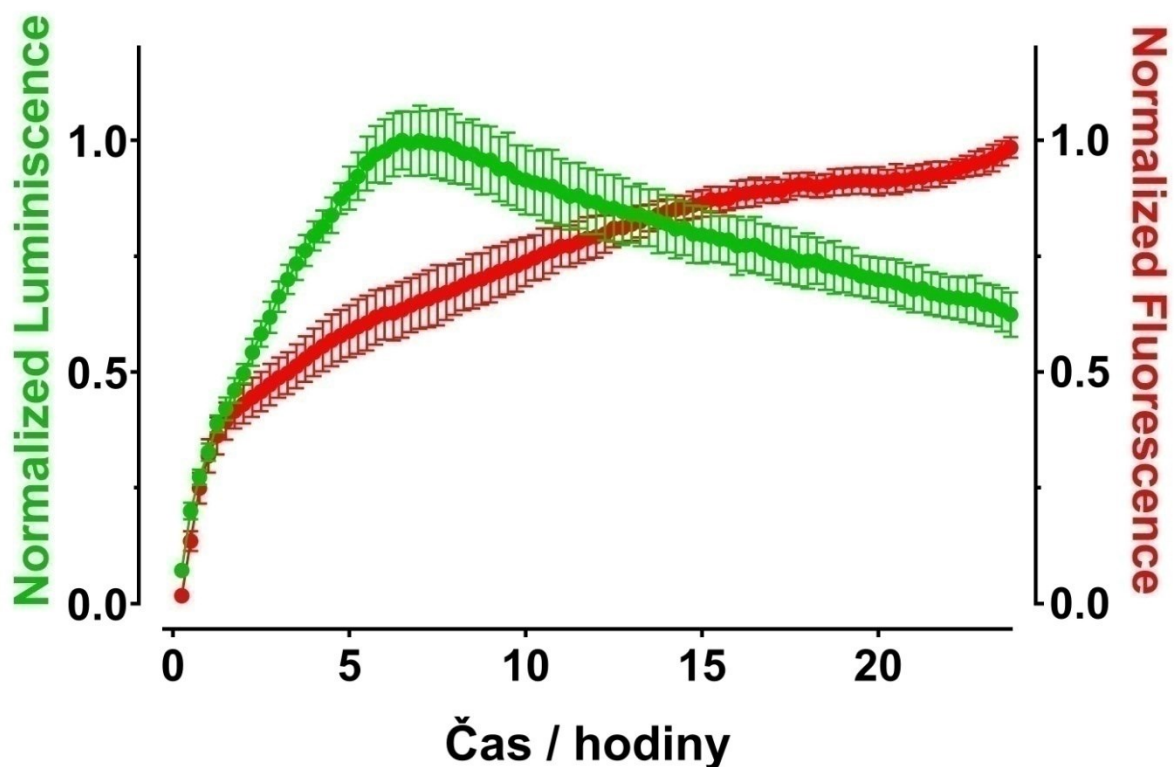




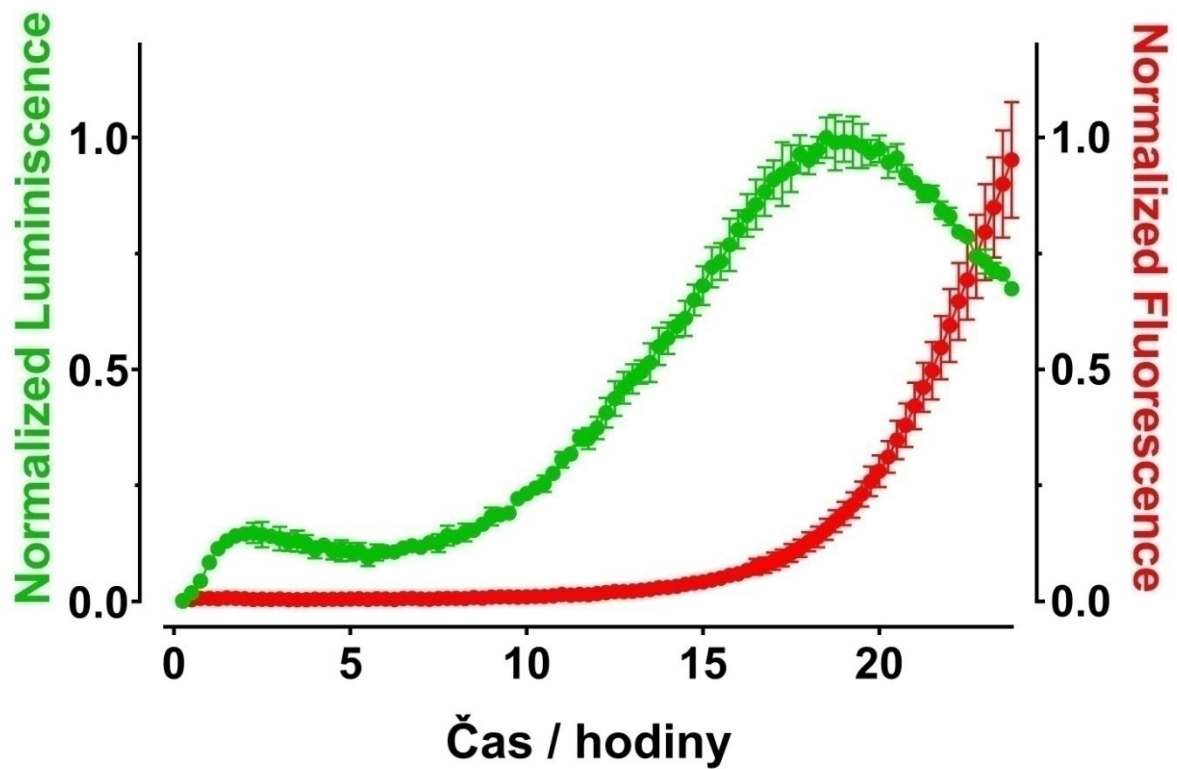
**Obrázok 27** Subcelulárna lokalizácia látky P41 (červená) v bunkách HeLa, mitochondrie farbené MitoTracker Green (zelená) a lyzosomy LysoTracker Blue DND-22 (modrá). Prekryv fluorescenčných kanálov (v ľavo hore), vlastná fluorescencia P39 s použitím kanálu Cy5 (v pravo hore), mitochondrie zobrazené FITC kanálom (v ľavo dole), lyzosomy zobrazená kanálom DAPI (v pravo dole).

### 8.3 Bunková smrť

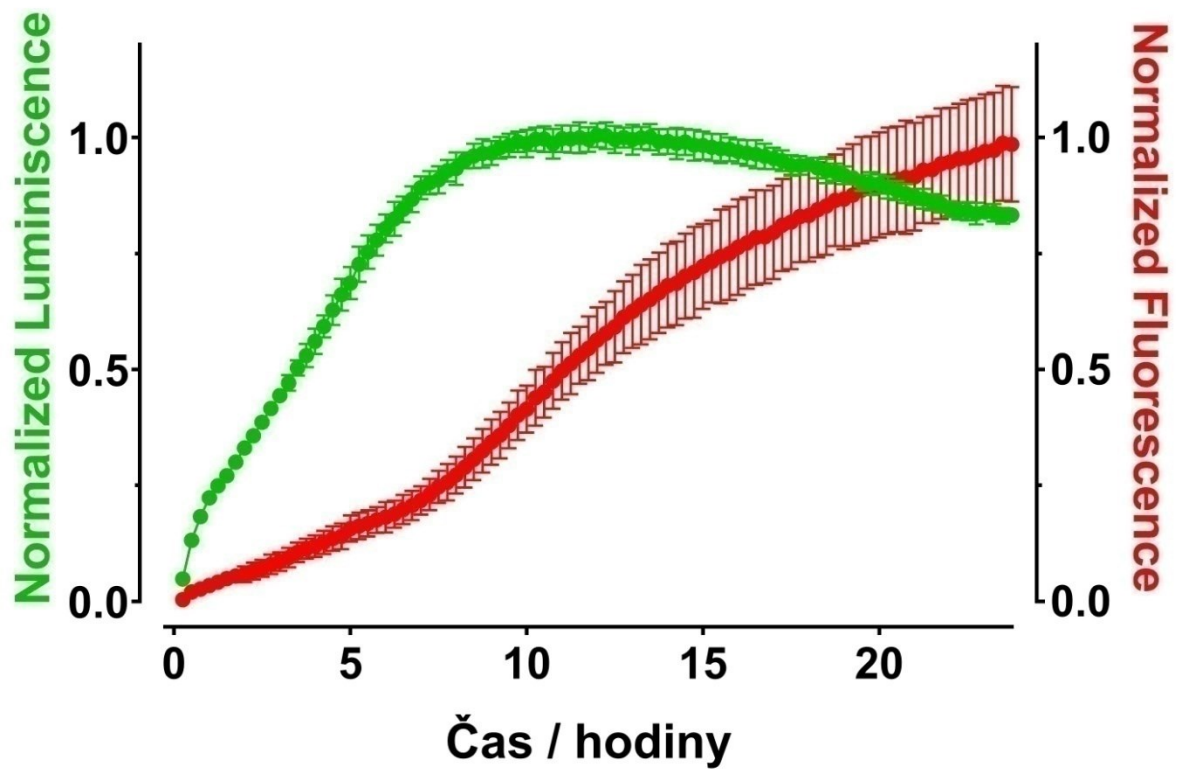
Hodnoty luminiscencie odpovedajúce väzbe PS a Annexínu V a hodnoty fluorescencie, ktoré sú ukazateľom zmien v integrite membrány a následnou väzbou sondy na jadrovú DNA sa sledujú v čase. Zatiaľ čo počas nekrózy (primárna nekróza) dochádza k nárastu oboch signálov súčasne, počas apoptózy dôjde najskôr k nárastu luminiscencie a s časovým odstupom je detekovaná sekundárna nekróza pomocou nárastu fluorescencie. Ako pozitívne kontroly boli pre apoptózu použité FasL (induktor vonkajšie cesty apoptózy) a bortezomib (induktor vnútorná cesty apoptózy). Pre nekrózu bol použitý ako pozitívna kontrola digitonin.



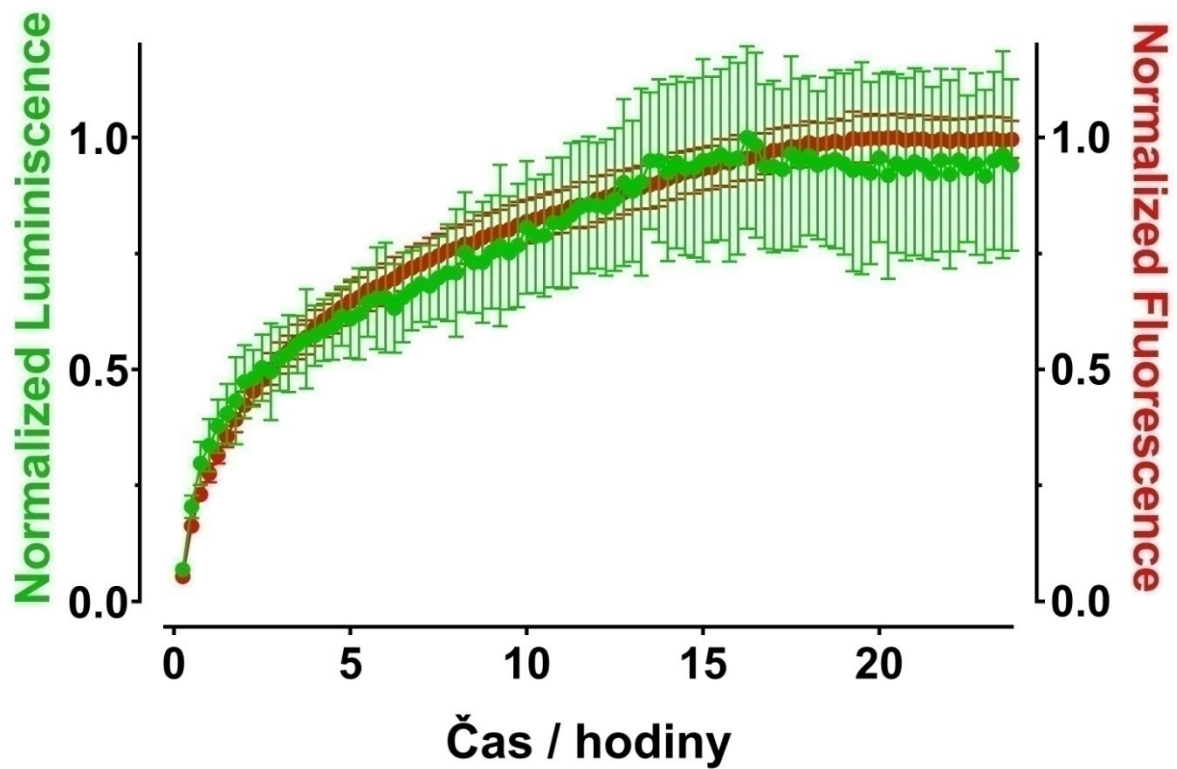
**Obrázok 28** Stanovenie bunkovej smrti indukované pomocí pozitívny kontroly pre primárnu nekrózu –digitonin s koncentráciou 25  $\mu\text{g/ml}$ . Sledovanie bunkovej smrti v čase využívajúcich Annexin V (zelený; hodnota luminiscencie) a DNA viazajúcu sondu (červená; hodnota fluorescencie). Medzi výrazným nárastom oboch signálov nie je žiadne oneskorenie.



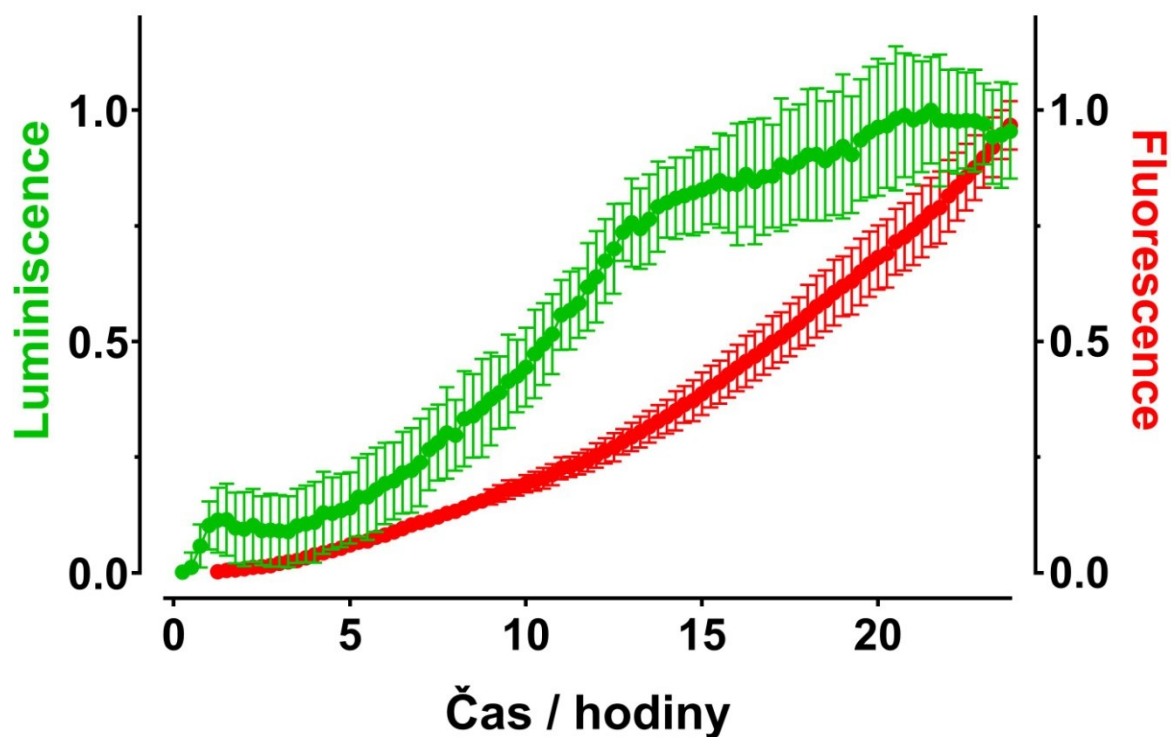
**Obrázok 29** Stanovenie bunkovej smrti indukované pomocí pozitívny kontroly pre apoptózu – bortezomib s koncentráciou 7  $\mu\text{M}$ . Sledovanie bunkovej smrti v čase využívajúcich Annexin V (zelený; hodnota luminiscencie) a DNA viazajúcu sondu (červená; hodnota fluorescencie). Medzi výrazným nárastom oboch signálov je časové oneskorenie  $\sim 6$  h.



**Obrázok 30** Stanovenie bunkovej smrti indukované pomocí pozitívny kontroly pre apoptózu – FasLs koncentráciou 400 ng/ml. Sledovanie bunkovej smrti v čase využívajúcich Annexin V (zelený; hodnota luminiscencie) a DNA viazajúcu sondu (červená; hodnota fluorescencie). Medzi výrazným nárastom oboch signálov je časové oneskorenie ~ 7 h.



**Obrázok 31** Stanovenie typu bunkovej smrti pre látku P39s koncentráciou 0,2  $\mu$ M. Sledovanie bunkovej smrti v čase využívajúcich Annexin V (zelený; hodnota luminiscencie) a DNA viazajúcu sondu (červená; hodnota fluorescence). Medzi výrazným nárastom oboch signálov nie je žiadne oneskorenie, čo poukazuje na nekrotickú bunkovú smrť.



**Obrázok 32** Stanovenie typu bunkovej smrti pre látku P41s koncentráciou 0,1  $\mu$ M. Sledovanie bunkovej smrti v čase využívajúcich Annexin V (zelený; hodnota luminiscencie) a DNA viazajúcu sondu (červená; hodnota fluorescencie). Medzi výrazným nárastom oboch signálov nie je žiadne oneskorenie, čo poukazuje na nekrotickú bunkovú smrť.

## 9 Diskusia

Fenomenálny základ dnes označovanej fotodynamickej terapie (PDT) bol založený v Mníchove v roku 1900 Oscarom Raabom, študentom medicíny spolupracujúcim s profesorom Hermanom von Tappeinerom. Ich spoločným objavom bolo zistenie účinkov akridínových farbív spolu s pôsobením svetla na prvoky (*Paramecium spp.*), vedúce k ich usmrteniu. Ďalším štúdiom cytotoxického efektu bol preukázaný prenos energie zo svetla na chemickú látku a nevyhnutná prítomnosť kyslíku a bola prvýkrát prehodnotená potencionálna aplikácia fluoescenčných látok v medicíne (Hamblin, 2020).

Výskum v priebehu rokov pokračoval ďalej štúdiom vlastností porfyrínov a derivátov porfyrínov, za vzniku látky známej ako derivát hematoporfyrínu (HpD). HpD sa vyznačoval lepšou fototoxicitou a lokalizáciou v nádore pri terapii tumorov prsníka a nádorov močového mechúra. V roku 1978 Dougherty *et al.* začali jedny z prvých klinickým testovaní kožných a podkožných nádorov pomocou prvého klinicky schváleného PS, známeho pod obchodným názvom Photofrin® (Lee *et al.*, 2020).

PDT je schválenou terapiou FAD a EMA. Napriek tomu, že fotodynamický efekt bol založený v oblasti mikrobiológie využívanej na liečbu mikrobiálnych infekcií, uplatňuje sa taktiež v rámci terapie predrakovinových lézií a solídnych nádorov, využíva sa ako paliatívna liečba pokročilých malignít a taktiež na liečbu neinfekčných chorôb ako vitiligo, psoriáza či makulárna degenerácia. PDT sa vyznačuje minimálnou invazívnosťou a vysokou špecifickosťou v rámci pôsobenia na nádorové tkanovo (Falk-Mahapatra & Gollnick, 2020, Calixto *et al.*, 2016).

Pre účinnosť PDT je potrebné zahrnutie troch komponent a to adekvátneho a účinného fotocitlivého liečiva (fotosenzitizér; PS), svetla o vhodnej vlnovej dĺžke a kyslíku. PS je možné aplikovať topicky alebo systémovo, s jeho následným ožiarením svetlom, kedy dochádza k excitácii použitého PS. Energia z takto excitovaného PS je následne prevádzaná z  $^3\text{O}_2$ , ktorý je prítomný v nádorovom tkanive, na ROS. ROS pôsobia priamo cytotoxicky na bunky v mikroprostredí nádoru, čo vedie k smrti nádorových buniek a deštrukcii vaskularity nádoru. Strata vaskularity vedie k vyčerpaniu dôležitých látok (kyslík a výživa) využívaných nádorovým prostredím. V predklinických štúdiách bola preukázaná spojitosť PDT a imunitného systému, kedy PDT indukovala oxidatívny stres pôsobiaci na nádorové tkanivo, čo viedlo

k aktivácii akútneho zápalového procesu potrebného k odstráneniu zvyšného tkaniva a navodeniu homeostázy (Falk-Mahapatra & Gollnick, 2020).

PS je synteticky alebo chemicky vyrobená zlúčenina v kojugácii s chromoforovou skupinou vyznačujúcou sa absorpciou viditeľného svetla a so silnou chemickou absorpciou. V PDT je veľmi podstatný výber správneho PS pre úspešný výsledok terapie. Vhodný PS sa vyznačuje vlastnosťami ako čistotou, prítomnosťou tetrapyrrolej stabilnej štruktúry, so schopnosťou iniciácie fotodynamickéj reakcie pri vlnovej dĺžke 600-800 nm a nemal by spôsobovať toxicitu v tme (Muniyandi *et al.*, 2020).

V súčasnej dobe bolo identifikovaných už viac ako 300 chemických zlúčenín s potencionálnymi vlastnosťami, ktoré by predstavovali vhodný PS. Niektoré z týchto látok boli schválené na klinické použitie v rámci terapie PDT, iné boli lekárske vyhodnotené, zatiaľčo iné ešte prechádzajú radou stanovení. Prvým klinicky používaným PS bol Photofrin®, patriaci k prvej generácii PSs. Prvá generácia bola spojená s veľkými obmedzeniami, ktoré sa týkali hlavne krátkej vlnovej dĺžky a fotosenzitivity po aplikácii. Na základe týchto obmedzení bol podmienený vývoj druhej generácie. Z najznámejších látok používaných od nádorov pečene, pľúc, kože, prostaty a iných nádorových ochorení patria ALA (Levulan®), Foscan®, chloríny, benzoporfiríny (Visudyne®), ftalocyaníny (Photosens®) a purpuríny. Tretia generácia sa skôr zaoberá ovplyvnením väzby PS k nádorovému tkanivu prostredníctvom biomolekúl.

Spomedzi prvých schválených syntetických PS využívaných v PDT ako sú chloríny, bakteriochloríny či fenotiazíny patria aj Pc. Pc sa vyznačujú silnou absorpciou v červenej prípadne blízkej infračervenej časti spektra, väčšinou v oblasti okolo 660 nm, kde tkanivo je najpriepustnejšie a nedochádza k veľkému lomu svetla a súčasnej produkcii  $^1\text{O}_2$  a ďalších ROS produktov ovplyvňujúcich nádorové bunky a okolné tkanivo. Negatívami v ich využívaní ale je slabá rozpustnosť vo vode spolu je nežiadúcou tendenciou tvoriť agregáty. Vzhľadom na tieto obmedzenia sa pokračuje vo výskume Pc a vývoji analógov, ktoré sa budú vyznačovať lepšími spektrálnymi a fotofyzikálnymi vlastnosťami, a taktiež lepšou rozpustnosťou vo vodných médiách s prevenciou tvorby nežiaducich agregátov (Miletin *et al.*, 2018).

PDT spolu s imunoterapiou, génovou terapiou či fototerapiou predstavujú alternatívne metódy liečby nádorových a nenádorových ochorení. Nádorové ochorenia patria medzi jedny z najviac ohrozujúcich chorôb s lokalizáciou v rôznych častiach tela (pľúca, mozog, prsia). Jej pokladom môže byť genetická predispozícia, ale často krát aj dôsledok životného štýlu (fajčenie



tabaku, pitie alkoholu, toxíny v prostredí). Najčastejším spôsobom liečby je chirurgické odstránenie nádorového tkaniva, chemoteria či rádioterapia. Všetky zo spomenutých terapeutických postupov so sebou prinášajú veľa nevýhod ako napríklad invazívnosť zákroku potrebného na odstránenie solídnych nádorov, recidívy a zisk rezistencie na nasadenú liečbu, kozmetické zákroky či vysoké náklady spojené s terapeutickými metódami (Fakayode *et al.*, 2018).

Snahou bolo teda nájsť alternatívnu metódu, ktorá by minimalizovala prípadne úplne eliminovala nevýhody spojené so štandardnými metódami. PDT ako jedna z mála prináša výhodnejšie alternatívy spojené s liečbou, napríklad jednoduchým neinvazívnym postup aplikácie, je nákladovo výhodnejšia, podávaný PS buď intravenózne či topicky s následným použitím netoxického svetla (UV, VIS) prenikajúce do hĺbších štruktúr tkanív.

Mechanizmus bunkovej smrti nádorových buniek pri PDT terapii začína po aplikácii vhodného PS a jeho aktivácii špecifickou vlnovou dĺžkou svetla. Ide o tri hlavné cesty aktivácie smrti a to apoptóza, nekróza a autofágia. Jej úroveň je možné ovplyvniť napríklad fyzikálne-chemickými vlastnosťami PS, k koncentrácii tkanivového kyslíku, biologickou dostupnosťou Ps či pomocou subcelulárnej lokalizácie. Po strete PS s absorbujúcim svetlom dochádza k produkcii ROS, ktoré môžu byť induktorom týchto ciest bunkovej smrti (Muniyandi *et al.*, 2020).

V tejto práci sa venujem experimentálnemu štúdiu dvoch PS, patriacich do skupiny Pc, pričom pri jednej z látok ide konkrétne o derivát Pc označovaných ako AzaPc. Obe štruktúry majú obdobný základ odvodený od Pc jadras centrálne viazaným atómom zinku, vyznačujú sa amfifílnou molekulou a kationickou povahou. Spomínané látky boli syntetizované na Katedre farmaceutickej chémie a farmaceutickej analýzy Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové vedeckou skupinou prof. PharmDr. Petra Zimčíka, Ph.D.

Experimentálne stanovenia sa uskutočňovali na ľudských nádorových bunkách HeLa v štandardnom SCM médiu. Stanovenie prebiehalo časových intervaloch (12,4 a 0 hodín). V rámci stanovenia PDT aktivity bola taktiež stanovená aj subcelulárna lokalizácia daných látok v bunkách a bunková smrť.

Cytotoxicitné experimenty preukázali, že látka P39 ožarovaná bez predchádzajúcej inkubácie (DLI = 0 h) má nízky účinok ( $EC_{50} = 13,99 \pm 2,01 \mu\text{M}$ ). Naopak, P39 ožarovaná v čase 4 a 12 hodín od aplikácie PS mala podstatne lepšie výsledky ( $EC_{50} = 0,064 \pm 0,020 \mu\text{M}$

a  $0,105 \pm 0,034 \mu\text{M}$ ). V porovnaní so stanovením na iných nádorových líniách v DLI = 12 h sa ukázala oveľa lepšia toxicita látky (MCF-7  $EC_{50} = 0,07 \pm 0,01 \mu\text{M}$ ; HCT-116  $EC_{50} = 0,05 \pm 0,01 \mu\text{M}$ ). Hodnoty v porovnaní s endotelovými bunkami Ea.hy926 stanovanými v intervale 12 hodín ( $EC_{50} = 0,07 \pm 0,02 \mu\text{M}$ ) mali hodnoty zhodné s hodnotami porovnávaných nádorových buniek, naopak hodnoty v DLI = 0 h sa preukázali ako neúčinné a zhodné so stanovením na bunkovej línii HeLa v rovnakom intervale ( $EC_{50} = 16,37 \pm 3,12 \mu\text{M}$ ), čo môže poukazovať na nižšiu účinnosť v protokole na cievy zameranej PDT.

Druhá z dvojice stanovovaných látok, látka P41, sa v stanoveniach na bunkách HeLa v DLI = 12 h ukázala ako účinnejšia s hodnotou  $EC_{50} = 0,079 \pm 0,020 \mu\text{M}$  nižšou ako pri stanovení látky P39 za rovnakých podmienok. Hodnota stanovenia v DLI = 0 h ( $EC_{50} = 1,63 \pm 0,78 \mu\text{M}$ ), taktiež dosiahla oveľa lepších hodnôt s rádovo nižšími hodnotami ako jej obdobné stanovenie na línii HeLa. Tak isto tomu bolo aj pri stanovení pri DLI = 4 h ( $EC_{50} = 0,037 \pm 0,009 \mu\text{M}$ ). Pri porovnaní s MCF-7 ( $EC_{50} = 0,06 \pm 0,01 \mu\text{M}$ ) a HCT-116 bunkami ( $EC_{50} = 0,07 \pm 0,02 \mu\text{M}$ ) sa hodnoty takmer zhodujú so stanovením pri látke P39. Hodnoty  $EC_{50} = 0,058 \pm 0,011 \mu\text{M}$  a  $4,22 \pm 0,29 \mu\text{M}$  získané pri stanovení na bunkách Ea.hy926 v DLI = 12 a 0 h sú nižšie ako pri rovnakom stanovení pri látke P39.

Vo svojej štúdií sa Makhseed *et al.*, 2012 venoval Pcs a ich aza-analógom so zámerom zlepšenia rozpustnosti v polárnych rozpúšťadlách, zabráneniu agregácie pomocou periférnych substitučných skupín a skúmaniu ich fotofyzikálnych a fotochemických vlastností. Výsledkom bolo zistenie, že všetky z jeho študovaných látok (1-10) indikovali veľmi dobré množstvo  $^1\text{O}_2$  a plne spĺňali potenciál aplikácie v rámci PDT a vo väčšine ním skúmaných organických rozpúšťadiel nedošlo k tvorbe agregátov. S využitím informácií so svojho predchádzajúceho článku nadviazal Makhseed *et al.*, 2013 na testovanie zinočnatých ftalocyanínov pomocou fotodynamickéj aktivity. S najlepšimi výsledkami vyšla látka číslo 5. Išlo o kationický zinočnatý komplex látky s hydrofóbnym jadrom (obdobný našim testovaným látkam), ktorý preukázal veľmi účinnú koncentráciu pri stanovení PDT na HeLa bunkách hodnotu  $EC_{50} = 36,7 \text{ nM}$ , čo je hodnota zhodná ako pre látku P41 s DLI = 4 h..

Fotodynamickou účinnosťou sa taktiež vo svojej práci zaoberal Machacek *et al.*, 2016, kde porovnával účinnosť kationických hydrofilných derivátov Pc, látky podobné našim študovaným, s účinnosťou klinicky schválenými PS. Z výsledkov vyplýva, že látky 3 až 5 mali veľmi sľubné výsledky aj v porovnaní s už klinicky využívanými PS. Najefektívnejšia zo

študovaných látok bola látka číslo 6, ktorej hodnoty ( $EC_{50} = 3,8 \pm 0,2$  nM) viedli k veľmi vysokej PDT účinnosti aj v porovnaní s už spomínanými klinicky užívanými liečivami.

Študované amfifilné kationické deriváty 9 a 10 v práci Kollar *et al.*, 2020 preukázali pri PDT na HeLa bunkách  $EC_{50} = 38$  nM, s podobnými hodnotami stanovenými na bunkách MCF-7 a HCT-116 v čase 12 h. V porovnaní s našimi derivátmi sa ukázala látka P41 ako účinnejšia, aj keď dosahovala hodnoty vyššie.

Sharman & van Lier, 2005 vo svojej práci skúmajú účinky amfifilnýchzinočnatých derivátov PC s asymetrickou substitúciou v rámci fotodynamickej aktivity. Z výsledok ich práce vyplýva fakt, že nesymetrické deriváty Pc 5a, 5b a 5g (analogicky nami študovaných látok) majú vyššiu fototoxicitu v porovnaní s ich symetrickými analógmi a vplyv substituentov (v tomto prípade terc-butyl pre látku 5b a dve dodecyl skupiny pre látku 5g) výrazne zlepšujú fotocytotoxicitu po 1 – 24 hodinovej inkubácii.

Vo všeobecnosti sú asymetrické amfifilné deriváty AzaPc oveľa menej študovanými látkami v porovnaní s ich symetrickými hydrofilnými derivátmi (zložitejšie čistenie po syntéze). V práci sa Göksel, 2016 venuje práve skúmaniu vlastností týchto asymetrických derivátov a to formou väzby s rôznymi substituentami na zlepšenie rozpustnosti, biodistribúcie a väzby k biomolekulám. V prípade skúmanej látky číslo 2 (väzba s amino skupinou) došlo k nižšej cytotoxicite na skúmaných bunkových línii ako v porovnaní s látkou číslo 3 (väzba s biotínom).

Látky P39 a P41 boli s využitím fluorescenčných sond (Hoechst 33342, CellMask Green, Blue DND-22, MitoTracker Green FM a LysoTracker) subcelulárne lokalizované a zaznamenané pomocou fluorescenčnej mikroskopie.

Obe zo študovaných látok sa hromadili v endolizosomálnych kompartmentoch a ich prítomnosť bola zachytená aj na bunkových membránach. Vzhľadom k amfifilnej kationickej molekule látok P39 aj 41 ich prítomnosť bola detekovaná v lyzosomoch a membránach, čo odpovedá aj informáciám publikovaným v štúdiu Kollar *et al.*, 2020. S využitím Cy5 kanála bola zachytená fluorescencia látok a kombináciou s FITC kanálov (zobrazujúcim membrány) a kanálom DAPI (zobrazenie jadier buniek) sa získala komplexná štruktúra buniek s lokalizáciou nami študovaných látok.

Stanovenie bunkovej smrti je založené na sledovaní a potvrdení bunkovej smrti v reálnom čase a to monitorovaním expozície PhSer na vonkajšie časť cytoplazmatickej membrány po väzbe s Annexin V substrátom predstavované zvyšujúcou sa hodnotou luminiscencie. Zvyšovanie fluorescenčného signálu je odrazom straty celistvosti membrány buniek po väzbe sondy DNA k jadrovým štruktúram. Obe študovanej látky indukujú po ožiarení nekrotické bunkovú smrť, čo bolo preukázané aj u niektorých hydrofilných kationických Pc (Machacek *et al.*, 2015, Ghazal *et al.*, 2017).

## 10 Závěry

- Stanovenie látok P39 a P41 s inkubačnou dobou 0,4 a 12 h prebiehalo na HeLa bunkách. Najvhodnejšia inkubačná doba bola 4 h, kedy boli dosiahnuté nasľubnejšie koncentrácie pri stanovovaní fotodynamickej aktivity. Toto zistenie bolo zhodné pre obe látky.
- Aktivita oboch študovaných látok v porovnaní na bunkových líniiach MCF-7, HCT-116 a EA.hy926 bola obdobne účinná, pre látku P41 boli hodnoty  $EC_{50}$  o niečo optimálnejšie.
- Subcelulárna lokalizácia látok P39 a P41 na HeLa bunkových líniiach bola potvrdená v endolizosomálnom kompartmente a detekovaná bola aj na membránach buniek.
- V rámci stanovenia bunkovej smrti obe zo študovaných látok preukázali nekrotický účinok na HeLa bunkách.
- Obe z testovaných derivátov Pc preukázali účinnú fotodynamickú aktivitu na bunkovej línii HeLa. Ako najefektívnejších bola látky P41 s inkubačnou dobou 4 hodín, ktorej  $EC_{50}$  odpovedá hodnota  $0,037 \pm 0,009 \mu\text{M}$ .

## 11 Použité skratky

**ALA** – 5-aminolevulová kyselina ( aminolevulic acid )

**ATCC** – Americká banka bunkových linií

**AzaPc** – azaftalocyanín

**BpD** – derivát benzoporfyrínu

**CAT**– katalasa

**CGH** – comparative genomic hybridization

**DLI** – inkubačná doba pred ožiarením (drug-light interval)

**DMEM** – kultivačné médium (Dulbecco's modified Eagle's medium)

**DMSO** – dimetylsulfoxid

**EC<sub>50</sub>** – stredná efektívna koncentrácia

**EDTA** – etyléndiaminotetraoctová kyselina

**EMA** – Európska lieková agentúra (European Medicines Agency)

**FBS** – fetálne bovinné sérum (fetal bovin serum)

**FDA** – Úrad pre kontrolu potravín a liečiv (USA, Food and Drug Administration)

**FISH** – fluorescenčná *in situ* hybridizácia (fluorescent *in situ* hybridization)

**HEPES** – pufor (*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid)

**HeLa** – kultúra ľudských buniek podľa Henrietty Lacksovej

**HpD** – deriváty hematoporfyrínu

**HPV** – ľudský papilomavírus (Human papillomavirus)

**LED** – svetlo emitujúca dioda (light emitting diode)

**(*m*-THPC)** – *m*-tetra(hydroxyfenyl)chlorín

**NR** – neutrálna červeň (neutral red)

**NRU** – neutral red uptake

**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>** – singletový kyslík

**<sup>3</sup>O<sub>2</sub>** – molekulárny kyslík

**·O<sub>2</sub><sup>-</sup>** – superoxidanion radikál

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – peroxid vodíku

**HO·** – hydroxylový radikál

**P/S** – zmes Penicilín/Streptomycín

**PBS** – pufor (phosphate buffered saline)

**Pc** - ftalocyanín (phtalocyanine)

**PLAG** - kopolymér kyseliny maslovej a glykolovej

**PDT** – fotodynamická terapia (photodynamic therapy)

**PRT** – fotoradiačná terapia

**PS** – fotosenzitizér (photosensitizer)

**PhSer** – fosfatidylserín (phosphatidylserin)

**ROS** – reaktívne formy kyslíku ( reactive oxygen species)

**SCM** – kultivační médium obsahující sérum (serum containing medium)

**SKY** – spectral karyotyping

**T/E** – zmes trypsín s EDTA

**TPE** – dvojfotónová excitácia (two-photon excitation)

**UV** – ultrafialová oblasť spektra

**VIS** – viditeľná oblasť spektra

## 12 Použitá literatura

Abrahamse, H., Hamblin, MR.: *New photosensitizers for photodynamic therapy*. *Biochem J*. 2016 Feb 15;473(4):347-64. doi: 10.1042/BJ20150942. PMID: 26862179; PMCID: PMC4811612

Ackroyd, R., Kelty, C., Brown, N., Reed, M.: *The history of photodetection and photodynamic therapy*. *PhotochemPhotobiol*. 2001 Nov;74(5):656-69. doi: 10.1562/0031-8655(2001)074<0656:thopap>2.0.co;2. PMID: 11723793

Agostinis, P., Berg, K., Cengel, KA., Foster, TH., Girotti, AW., Gollnick, SO., Hahn, SM., Hamblin, MR., Juzeniene, A., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J., Mroz, P., Nowis, D., Piette, J., Wilson, BC., Golab, J.: *Photodynamic therapy of cancer: an update*. *CA Cancer J Clin*. 2011 Jul-Aug;61(4):250-81. doi: 10.3322/caac.20114. Epub 2011 May 26. PMID: 21617154; PMCID: PMC3209659

Akimoto, J.: *Photodynamic Therapy for Malignant Brain Tumors*. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2016;56(4):151-7. doi: 10.2176/nmc.ra.2015-0296. Epub 2016 Feb 16. PMID: 26888042; PMCID: PMC4831940

Atale, N., Gupta, S., Yadav, UC., Rani V.: *Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques*. *J Microsc*. 2014 Jul;255(1):7-19. doi: 10.1111/jmi.12133. Epub 2014 May 15. PMID: 24831993

Bollinger, AL., Bollinger, T., Rupp, J., Shima, K., Gross, N., Padayachy, L., Chicheportiche, R., PugaYung, GL., Seebach, JD.: *Annexin V expression on CD4<sup>+</sup> T cells with regulatory function*. *Immunology*. 2020 Feb;159(2):205-220. doi: 10.1111/imm.13140. Epub 2019 Nov 20. PMID: 31642515; PMCID: PMC6954731

Calixto, GM., Bernegossi, J., de Freitas, LM., Fontana, CR., Chorilli, M.: *Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review*. *Molecules*. 2016 Mar 11;21(3):342. doi: 10.3390/molecules21030342. PMID: 26978341; PMCID: PMC6274468

Castano, AP., Mroz, P., Hamblin, MR.: *Photodynamic therapy and anti-tumour immunity*. *Nat Rev Cancer*. 2006 Jul;6(7):535-45. doi: 10.1038/nrc1894. PMID: 16794636; PMCID: PMC2933780



Cengel, KA., Simone, CB. 2nd, Glatstein, E.:*PDT: What's Past Is Prologue*. Cancer Res. 2016 May 1;76(9):2497-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0927. PMID: 27197260; PMCID: PMC5568068

Cudazzo, G., Smart, DJ., McHugh, D., Vanscheeuwijck, P.:*Lysosomotropic-related limitations of the BALB/c 3T3 cell-based neutral red uptake assay and an alternative testing approach for assessing e-liquid cytotoxicity*. Toxicol In Vitro. 2019 Dec;61:104647. doi: 10.1016/j.tiv.2019.104647. Epub 2019 Sep 10. PMID: 31518669

Debele, TA., Peng, S., Tsai, HC.:*Drug Carrier for Photodynamic Cancer Therapy*. Int J Mol Sci. 2015 Sep 14;16(9):22094-136. doi: 10.3390/ijms160922094. PMID: 26389879; PMCID: PMC4613299

Dobson, J., de Queiroz, GF., Golding, JP.:*Photodynamic therapy and diagnosis: Principles and comparative aspects*. Vet J. 2018 Mar;233:8-18. doi: 10.1016/j.tvjl.2017.11.012. Epub 2017 Nov 24. PMID: 29486883

Dougherty, TJ., Gomer, CJ., Henderson, BW., Jori, G., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J., Peng, Q.:*Photodynamic therapy*. J Natl Cancer Inst. 1998 Jun 17;90(12):889-905. doi: 10.1093/jnci/90.12.889. PMID: 9637138; PMCID: PMC4592754

Fakayode, OJ., Tsolekile, N., Songca, SP., Oluwafemi, OS.:*Applications of functionalized nanomaterials in photodynamic therapy*. Biophys Rev. 2018 Feb;10(1):49-67. doi: 10.1007/s12551-017-0383-2. Epub 2018 Jan 2. PMID: 29294258; PMCID: PMC5803176

Falk-Mahapatra, R., Gollnick, SO.:*Photodynamic Therapy and Immunity: An Update*. Photochem Photobiol. 2020 May;96(3):550-559. doi: 10.1111/php.13253. Epub 2020 Apr 23. PMID: 32128821; PMCID: PMC7293553

Fields, W., Fowler, K., Hargreaves, V., Reeve, L., Bombick, B.:*Development, qualification, validation and application of the neutral red uptake assay in Chinese Hamster Ovary (CHO) cell using a VITROCELL® VC10® smoke exposure system*. Toxicol In Vitro. 2017 Apr;40:144-152. doi: 10.1016/j.tiv.2017.01.001. Epub 2017 Jan 3. PMID: 28062357

Galstyan, A.:*Turning Photons into Drugs: Phthalocyanine-Based Photosensitizers as Efficient Photoantimicrobials*. Chemistry. 2021 Jan 26;27(6):1903-1920. doi: 10.1002/chem.202002703. Epub 2020 Nov 23. PMID: 32677718; PMCID: PMC7894475

Ghazal, B., Machacek, M., Shalaby, MA., Novakova, V., Zimcik, P., Makhseed, S.: *Phthalocyanines and Tetrapyrazinoporphyrazines with Two Cationic Donuts: High Photodynamic Activity as a Result of Rigid Spatial Arrangement of Peripheral Substituents*. J Med Chem. 2017 Jul 27;60(14):6060-6076. doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b00272. Epub 2017 Jun 14. PMID: 28558213

Ghorbani, J., Rahban, D., Aghamiri, S., Teymouri, A., Bahador, A.: *Photosensitizers in antibacterial photodynamic therapy: an overview*. Laser Ther. 2018 Dec 31;27(4):293-302. doi: 10.5978/islsm.27\_18-RA-01. PMID: 31182904; PMCID: PMC6513767

Göksel, M.: *Synthesis of asymmetric zinc(II) phthalocyanines with two different functional groups & spectroscopic properties and photodynamic activity for photodynamic therapy*. Bioorg Med Chem. 2016 Sep 15;24(18):4152-4164. doi: 10.1016/j.bmc.2016.07.003. Epub 2016 Jul 5. PMID: 27423301

Gomes, ATPC., Neves, MGPMS., Cavaleiro, JAS.: *Cancer, Photodynamic Therapy and Porphyrin-Type Derivatives*. An Acad Bras Cienc. 2018;90(1 Suppl 2):993-1026. doi: 10.1590/0001-3765201820170811. PMID: 29873666

Hamblin, MR.: *Photodynamic Therapy for Cancer: What's Past is Prologue*. Photochem Photobiol. 2020 May;96(3):506-516. doi: 10.1111/php.13190. Epub 2020 Jan 7. PMID: 31820824; PMCID: PMC7282978

Hou, X., Tao, Y., Li, X., Pang, Y., Yang, C., Jiang, G., Liu, Y.: *CD44-Targeting Oxygen Self-Sufficient Nanoparticles for Enhanced Photodynamic Therapy Against Malignant Melanoma*. Int J Nanomedicine. 2020 Dec 22;15:10401-10416. doi: 10.2147/IJN.S283515. PMID: 33376328; PMCID: PMC7764953

Hu, S., Kiesewetter, DO., Zhu, L., Guo, N., Gao, H., Liu, G., Hida, N., Lang, L., Niu, G., Chen, X.: *Longitudinal PET imaging of doxorubicin-induced cell death with <sup>18</sup>F-Annexin V*. Mol Imaging Biol. 2012 Dec;14(6):762-70. doi: 10.1007/s11307-012-0551-5. PMID: 22392643; PMCID: PMC3387344

Kato, H.: *[History of photodynamic therapy--past, present and future]*. Gan To Kagaku Ryoho. 1996 Jan;23(1):8-15. Japanese. PMID: 8546474

Kessel, D.: *More Adventures in Photodynamic Therapy*. Int J Mol Sci. 2015 Jul 3;16(7):15188-93. doi: 10.3390/ijms160715188. PMID: 26151850; PMCID: PMC4519894

Kleinovink, JW., van Driel, PB., Snoeks, TJ., Prokopi, N., Fransen, MF., Cruz, LJ., Mezzanotte, L., Chan, A., Löwik, CW., Ossendorp, F.: *Combination of Photodynamic Therapy and Specific Immunotherapy Efficiently Eradicates Established Tumors*. ClinCancerRes. 2016 Mar 15;22(6):1459-68. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0515. Epub 2015 Nov 6. PMID: 26546617

Kollar, J., Machacek, M., Halaskova, M., Lenco, J., Kucera, R., Demuth, J., Rohlickova, M., Hasonova, K., Miletin, M., Novakova, V., Zimcik, P.: *Cationic Versus Anionic Phthalocyanines for Photodynamic Therapy: What a Difference the Charge Makes*. J Med Chem. 2020 Jul 23;63(14):7616-7632. doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c00481. Epub 2020 Jul 14. PMID: 32618190

Kostka, M., Zimcik, P., Miletin, M., Klemera, P., Kopecky, K., Musil, Z.: *Comparison of aggregation properties and photodynamic activity of phthalocyanines and azaphthalocyanines*. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, Volume 178, Issue 1, 2006, Pages 16-25, ISSN 1010-6030, <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2005.06.014>.

Kumar, V., Sinha, J., Verma, N., Nayan, K., Saimbi, CS., Tripathi, AK.: *Scope of photodynamic therapy in periodontics*. Indian J DentRes. 2015 Jul-Aug;26(4):439-42. doi: 10.4103/0970-9290.167636. PMID: 26481895

Kupcho, K., Shultz, J., Hurst, R., Hartnett, J., Zhou, W., Machleidt, T., Grailer, J., Worzella, T., Riss, T., Lazar, D., Cali, JJ., Niles, A.: *A real-time, bioluminescent annexin V assay for the assessment of apoptosis*. Apoptosis. 2019 Feb;24(1-2):184-197. doi: 10.1007/s10495-018-1502-7. PMID: 30498998; PMCID: PMC6373262

Landry, J., Pyl, PT., Rausch, T., Zichner, T., Tekkedil, MM., Stütz, AM., Jauch, A., Aiyar, RS., Pau, G., Delhomme, N., Gagneur, J., Korbel, JO., Huber, W., Steinmetz, LM.: *The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line*. G3 (Bethesda). 2013 Aug 7;3(8):1213-24. doi: 10.1534/g3.113.005777. PMID: 23550136; PMCID: PMC3737162

Lee, CN., Hsu, R., Chen, H., Wong, TW.: *Daylight Photodynamic Therapy: An Update*. Molecules. 2020 Nov 8;25(21):5195. doi: 10.3390/molecules25215195. PMID: 33171665; PMCID: PMC7664668

Macville, M., Schröck, E., Padilla-Nash, H., Keck, C., Ghadimi, BM., Zimonjic, D., Popescu, N., Ried, T.: *Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping*. CancerRes. 1999 Jan 1;59(1):141-50. PMID: 9892199

Machacek, M., Cidlina, A., Novakova, V., Svec, J., Rudolf, E., Miletin, M., Kučera, R., Simunek, T., Zimcik, P.: *Far-red-absorbing cationic phthalocyanine photosensitizers: synthesis and evaluation of the photodynamic anticancer activity and the mode of cell death induction*. J Med Chem. 2015 Feb 26;58(4):1736-49. doi: 10.1021/jm5014852. Epub 2015 Feb 4. PMID: 25599409

Machacek, M., Demuth, J., Cermak, P., Vavreckova, M., Hrubá, L., Jedlickova, A., Kubat, P., Simunek, T., Novakova, V., Zimcik, P.: *Tetra(3,4-pyrido)porphyrazines Caught in the Cationic Cage: Toward Nanomolar Active Photosensitizers*. J Med Chem. 2016 Oct 27;59(20):9443-9456. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b01140. Epub 2016 Oct 5. PMID: 27682881

Macháček, M., Carter, KA., Kostelanský, F., Miranda, D., Seffouh, A., Ortega, J., Šimůnek, T., Zimčík, P., Lovell, JF.: *Binding of an amphiphilic phthalocyanine to pre-formed liposomes confers light-triggered cargo release*. J Mater Chem B. 2018 Nov 28;6(44):7298-7305. doi: 10.1039/C8TB01602J. Epub 2018 Aug 22. PMID: 30984399; PMCID: PMC6456075

Makhseed, S., Machacek, M., Alfadly, W., Tuhl, A., Vinodh, M., Simunek, T., Novakova, V., Kubat, P., Rudolf, E., Zimcik, P.: *Water-soluble non-aggregating zinc phthalocyanine and in vitro studies for photodynamic therapy*. ChemCommun (Camb). 2013 Dec 11;49(95):11149-51. doi: 10.1039/c3cc44609c. PMID: 24040651

Makhseed, S., Tuhl, A., Samuel, J., Zimcik, P., Al-Awadi, N., Novakova V.: *New highly soluble phenoxy-substituted phthalocyanine and azaphthalocyanine derivatives: Synthesis, photochemical and photophysical studies and atypical aggregation behavior*. Dyes and Pigments. Volume 95. Issue 2, 2012. Pages 351-357. ISSN 0143-7208. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2012.03.023>

Malik, R., Manocha, A., Suresh, DK.: *Photodynamic therapy--a strategic review*. Indian J DentRes. 2010 Apr-Jun;21(2):285-91. doi: 10.4103/0970-9290.66659. PMID: 20657102

Mfouo-Tynga, I., Abrahamse, H.: *Cell death pathways and phthalocyanine as an efficient agent for photodynamic cancer therapy*. Int J Mol Sci. 2015 May 6;16(5):10228-41. doi: 10.3390/ijms160510228. PMID: 25955645; PMCID: PMC4463643

- Miletin, M., Zimcik, P., Novakova, V.: *Photodynamic properties of aza-analogues of phthalocyanines*. *PhotochemPhotobiolSci.* 2018 Nov 1;17(11):1749-1766. doi: 10.1039/c8pp00106e. Epub 2018 May 30. PMID: 29846368
- Mittelman, D., Wilson, J.H.: *The fractured genome of HeLa cells*. *GenomeBiol* 14, 111 (2013). <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-4-111>
- Muniyandi, K., George, B., Parimelazhagan, T., Abrahamse, H.: *Role of Photoactive Phytocompounds in Photodynamic Therapy of Cancer*. *Molecules.* 2020 Sep 8;25(18):4102. doi: 10.3390/molecules25184102. PMID: 32911753; PMCID: PMC7570746
- Neves, AA., Brindle, KM.: *Imaging cell death*. *J Nucl Med.* 2014 Jan;55(1):1-4. doi: 10.2967/jnumed.112.114264. PMID: 24385310
- Novakova, V., Reimerova, P., Svec, J., Suchan, D., Miletin, M., Rhoda, HM., Nemykin, VN., Zimcik, P.: *Systematic investigation of phthalocyanines, naphthalocyanines, and their aza-analogues. Effect of the isosteric aza-replacement in the core*. *Dalton Trans.* 2015 Aug 7;44(29):13220-33. doi: 10.1039/c5dt01863c. PMID: 26119587
- Obaid, G., Broekgaarden, M., Bulin, AL., Huang, HC., Kuriakose, J., Liu, J., Hasan, T.: *Photonano medicine: a convergence of photodynamic therapy and nanotechnology*. *Nanoscale.* 2016 Jul 7;8(25):12471-503. doi: 10.1039/c5nr08691d. Epub 2016 Jun 20. PMID: 27328309; PMCID: PMC4956486
- Ong, YH., Dimofte, A., Kim, MM., Finlay, JC., Sheng, T., Singhal, S., Cengel, KA., Yodh, AG., Busch, TM., Zhu, TC.: *Reactive Oxygen Species Explicit Dosimetry for Photofrin-mediated Pleural Photodynamic Therapy*. *PhotochemPhotobiol.* 2020 Mar;96(2):340-348. doi: 10.1111/php.13176. Epub 2019 Dec 6. PMID: 31729774; PMCID: PMC7299188
- Post, AM., Katsikis, PD., Tait, JF., Geaghan, SM., Strauss, HW., Blankenberg, FG.: *Imaging cell death with radiolabeled annexin V in an experimental model of rheumatoid arthritis*. *J Nucl Med.* 2002 Oct;43(10):1359-65. PMID: 12368374
- Repetto, G., del Peso, A., Zurita, JL.: *Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity*. *NatProtoc.* 2008;3(7):1125-31. doi: 10.1038/nprot.2008.75. PMID: 18600217

Rieger, AM., Nelson, KL., Konowalchuk, JD., Barreda, DR.:*Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death.* J Vis Exp. 2011 Apr 24;(50):2597. doi: 10.3791/2597. PMID: 21540825; PMCID: PMC3169266

Rkein, AM., Ozog, DM.:*Photodynamic therapy.* DermatolClin. 2014 Jul;32(3):415-25, x. doi: 10.1016/j.det.2014.03.009. PMID: 24891062

Sharman, WM., van Lier, JE.:*Synthesis and photodynamic activity of novel asymmetrically substituted fluorinated phthalocyanines.* BioconjugChem. 2005 Sep-Oct;16(5):1166-75. doi: 10.1021/bc0500241. PMID: 16173794

Shi, X., Zhang, CY., Gao, J., Wang, Z.:*Recent advances in photodynamic therapy for cancer and infectious diseases.* WileyInterdiscip Rev NanomedNanobiotechnol. 2019 Sep;11(5):e1560. doi: 10.1002/wnan.1560. Epub 2019 May 6. PMID: 31058443; PMCID: PMC6697192

Sivasubramanian, M., Chuang, YC., Lo, LW.:*Evolution of Nanoparticle-Mediated Photodynamic Therapy: From Superficial to Deep-Seated Cancers.* Molecules. 2019 Jan 31;24(3):520. doi: 10.3390/molecules24030520. PMID: 30709030; PMCID: PMC6385004

Sun, J., Kormakov, S., Liu, Y., Huang, Y., Wu, D., Yang, Z.:*Recent Progress in Metal-Based Nanoparticles Mediated Photodynamic Therapy.* Molecules. 2018 Jul 12;23(7):1704. doi: 10.3390/molecules23071704. PMID: 30002333; PMCID: PMC6099795

Tait, JF., Smith, C., Blankenberg, FG.:*Structural requirements for in vivo detection of cell death with <sup>99m</sup>Tc-annexin V.* J Nucl Med. 2005 May;46(5):807-15. PMID: 15872355; PMCID: PMC1201384

Tavakoli, MB., Kheirollahi, M., Kiani, A., Kazemi, M., Javanmard, SH., Mohebat, L.:*Annexin V FITC conjugated as a radiation toxicity indicator in lymphocytes following radiation overexposure in radiotherapy programs.* AdvBiomedRes. 2015 Jun 4;4:119. doi: 10.4103/2277-9175.158025. PMID: 26261821; PMCID: PMC4513310

van Engeland, M., Nieland, LJ., Ramaekers, FC., Schutte, B., Reutelingsperger, CP.:*Annexin V-affinity assay: a review on anapoptosis detection system based on phosphatidylserin exposure.* Cytometry. 1998 Jan 1;31(1):1-9. doi: 10.1002/(sici)1097-0320(19980101)31:1<1::aid-cyto1>3.0.co;2-r. PMID: 9450519

Yang, Z., Wang, J., Ai, S., Sun, J., Mai, X., Guan, W.: *Self-generating oxygen enhanced mitochondrion-targeted photodynamic therapy for tumor treatment with hypoxia scavenging*. *Theranostics*. 2019 Sep 20;9(23):6809-6823. doi: 10.7150/thno.36988. PMID: 31660070; PMCID: PMC6815961

Yu, W., Zhu, J., Wang, Y., Wang, J., Fang, W., Xia, K., Shao, J., Wu, M., Liu, B., Liang, C., Ye, C., Tao, H.: *A review and outlook in the treatment of osteosarcoma and other deep tumors with photodynamic therapy: from basic to deep*. *Oncotarget*. 2017 Jun 13;8(24):39833-39848. doi: 10.18632/oncotarget.16243. PMID: 28418855; PMCID: PMC5503657

Zhang, Q., Li, L.: *Photodynamic combinational therapy in cancer treatment*. *J BUON*. 2018 May-Jun;23(3):561-567. PMID: 30003719

Zhou, Z., Song, J., Nie, L., Chen, X.: *Reactive oxygen species generating systems meeting challenges of photodynamic cancer therapy*. *Chem Soc Rev*. 2016 Nov 21;45(23):6597-6626. doi: 10.1039/c6cs00271d. PMID: 27722328; PMCID: PMC5118097

Zhu, TC., Finlay, JC.: *The role of photodynamic therapy (PDT) physics*. *Med Phys*. 2008 Jul;35(7):3127-36. doi: 10.1118/1.2937440. PMID: 18697538; PMCID: PMC2673560