

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD



## DIPLOMOVÁ PRÁCE

# Orgánová distribuce aniontových ftalocyaninových fotosensitizerů u myšího modelu nádoru

Bc. Iva Kožená

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

Konzultant: PharmDr. Jan Kollár, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2022

## **Poděkování**

Touto cestou bych velice ráda poděkovala vedoucímu své diplomové práce RNDr. Miloslavu Macháčkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky, a především za čas a trpělivost, které mi věnoval. Velké díky patří také PharmDr. Janu Kollárovi, Ph.D. za jeho pomoc při provádění části experimentů (měření na fluorimetru). Dále bych ráda poděkovala Mgr. Marii Halaškové za přípravu vzorků *in vivo* a také PharmDr. Lukášovi Lochmanovi, Ph.D. za HPLC analýzu vzorků moči. Děkuji také Grantové agentuře České republiky (projekt č. 19-14758Y) a Grantové agentuře Univerzity Karlovy (projekt č. 1620219) za finanční podporu. A v neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodině za podporu během studia.

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

V Hradci Králové 14. 5. 2022

Bc. Iva Kožená

# 1. ABSTRAKT

Protinádorová léčba se v současné době skládá především z chemoterapie, radioterapie a chirurgického zákroku. Jelikož tyto léčebné metody mají mnoho vedlejších účinků, zkoumají se další cesty léčby nádorových onemocnění. Jedním z těchto moderních přístupů, který je předmětem intenzivního výzkumu po celém světě, je neinvazivní a minimálně toxická metoda nazývaná fotodynamická terapie. Princip spočívá v aplikaci látky citlivé na světlo zvané fotosensitizer, která se selektivně hromadí v nádoru a po ozáření vhodným světelným zdrojem dochází ke vzniku fotochemické reakce, která vede k produkci reaktivních forem kyslíku. Výsledkem této reakce je oxidační stres v cílových buňkách, který způsobuje poškození těchto buněk, případně jejich smrt, cévní poškození a stimulaci imunitní odpovědi.

Díky výhodným vlastnostem patří ftalocyaniny mezi velmi slibné fotosensitizery. Obvykle jsou připravovány ve formě komplexů s centrálně vázanými kationty kovů, jako jsou např. zinek a hliník. Námi vybrané PS ze skupiny aniontových ftalocyaninů byly v minulosti v naší vědecké skupině nejdříve zkoumány na buněčné úrovni v *in vitro* podmínkách, a jelikož jejich fotodynamická aktivita dosahovala zajímavých výsledků, byly vybrány k dalším experimentům *in vivo*.

Cílem této práce je zhodnocení průběhu orgánové distribuce vybraných fotosensitizerů v myším modelu. Dále zjištění, ve kterém orgánu se tyto látky nejvíce hromadí a ve kterém čase zde dosahují maximální koncentrace. Dále byl zjišťován časový profil těchto látek v plazmě a moči.

Z výsledků experimentů na myším modelu kmene BALB/c, lze usuzovat, že amfifilní látka P44 byla v orgánech přítomna ve vyšších koncentracích než hydrofilní látka HK22. Studované fotosensitizery v plazmě dosahovaly nejvyšší koncentrace ihned po podání a poté byly postupně z plazmy eliminovány. Látka P44 se nejvíce ukládala v játrech, ale z jater nebyla během 24 h eliminována. V ostatních orgánech byla přítomna jen ve velmi nízkých koncentracích. Látku HK22 nebylo možné detekovat ve svaly, nádoru a plicích. Vzhledem k tomu, že se obě aniontové látky P44 a HK22 nedeponovaly v nádorové tkáni, nejsou z hlediska farmakokinetiky příliš vhodné pro použití ve PDT.

## 2. ABSTRACT

Cancer treatment currently consists mainly of chemotherapy, radiotherapy, and surgery. As these treatments possess certain side effects, other ways of treating cancer are being explored. One of these modern approaches, which is the subject of intensive research around the world, is a non-invasive and minimally toxic method called photodynamic therapy (PDT). The PDT is based on the application of a light-sensitive substance called a photosensitiser (PS), which accumulates selectively in the tumour and, after exposure to a light of a suitable wavelength, a photochemical reaction occurs which leads to the production of reactive oxygen species. The result of this reaction is an oxidative stress in the tumour tissue together with cellular damage with subsequent cell death accompanied with vascular damage, and even stimulation of the immune response.

Due to their advantageous properties, the phthalocyanines (Pcs) are very promising PSs. They are usually prepared in the form of complexes with centrally bound metal cations such as zinc and aluminium. Selected anionic Pcs were first examined at the cellular level under *in vitro* conditions, and as their photodynamic activity was promising, they were selected for further *in vivo* experiments.

The aim of this work is to evaluate the organ distribution of selected PSs in a mouse model. Further, to determine in which organ these compounds accumulate most and at what time they reach their respective maximal concentrations. Also, the time profile of these substances in plasma and urine was investigated.

From the results of our experiments on the BALB/c mice, it can be concluded that amphiphilic compound P44 was present in the organs at higher concentrations than hydrophilic compound HK22. The studied PSs reached the highest concentration in the plasma immediately after administration and then they were gradually eliminated from this compartment. P44 was deposited most extensively in the liver without elimination from this organ within 24 h. It was present in low concentrations in other organs. HK22 could not be detected in muscle, tumour, and lungs at all. As both anionic compounds P44 and HK22 were not deposited in tumour tissue, they are not very suitable for utilization in PDT in terms of pharmacokinetics.

### 3. OBSAH

1. ABSTRAKT .....	4
2. ABSTRACT .....	5
3. Obsah.....	6
4. ÚVOD.....	8
5. TEORETICKÁ ČÁST.....	11
5.1 Úvod do fotodynamické terapie .....	11
5.2 Historie PDT.....	12
5.3 Mechanismus PDT.....	13
5.3.1 Reakce typu I .....	14
5.3.2 Reakce typu II .....	14
5.4 Buněčná smrt .....	15
5.5 Cévní poškození.....	16
5.6 Imunitní systém.....	17
5.7 Selektivita PDT.....	18
5.8 Výhody PDT .....	18
5.9 Vedlejší účinky a omezení PDT.....	19
5.10 Zdroje světla.....	19
5.11 Fotosensitizéry .....	21
5.11.1 Dělení fotosensitizérů .....	21
5.11.2 Vybrané skupiny fotosensitizérů.....	23
5.11.2.1 Porfyriny .....	23
5.11.2.2 Chloriny .....	25
5.11.2.3 Bakteriochloriny .....	26
5.11.2.4 PS Přírodního původu.....	26
5.11.2.5 Ftalocyaniny .....	27
5.12 Využití zvířecích modelů v PDT .....	31
5.12.1 Farmakokinetika a distribuce fotosensitizérů .....	33
5.12.2 Vybrané studie orgánové distribuce na myších modelech .....	33
6. CÍLE PRÁCE.....	36

7.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	37
7.1	PRACOVNÍ POMŮCKY .....	37
7.2	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ .....	37
7.3	CHEMICKÉ LÁTKY A REAGENCIE .....	38
7.4	Použité fotosenzitizéry .....	39
7.5	Příprava vzorků .....	40
7.5.1	Experimenty <i>in vivo</i> .....	40
7.5.2	Homogenizace vzorků .....	41
7.6	Kvantifikace fotosenzitizérů pomocí fluorescenčních metod .....	42
7.6.1	Měření emisních spekter vzorků .....	42
7.6.2	Stanovení koncentrace látek P44 a HK22 v moči pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) .....	42
7.6.3	Sestrojení kalibračních křivek .....	43
7.7	Stanovení množství proteinů v plazmě .....	44
7.8	Vyhodnocení výsledků .....	44
8.	VÝSLEDKY .....	45
8.1	Vyhodnocení orgánové distribuce .....	45
8.1.1	Játra .....	45
8.1.2	Ledviny .....	47
8.1.3	Slezina .....	49
8.1.4	Plíce .....	51
8.1.5	Nádor .....	52
8.1.6	Srdce .....	53
8.1.7	Sval .....	55
8.1.8	Celkový průběh látky P44 v myším organismu .....	56
8.1.9	Celkový průběh látky HK22 v myším organismu .....	57
8.2	Časový profil látek P44 a HK22 v plazmě .....	58
8.3	Časový profil látek P44 a HK22 v moči .....	60
9.	DISKUSE .....	62
10.	ZÁVĚR .....	69
11.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	70

## 4. ÚVOD

Diplomová práce s názvem „Orgánová distribuce aniontových ftalocyaninových fotosensitizerů u myšího modelu nádoru“ se v teoretické části zabývá obecným popisem fotodynamické terapie (PDT). Dále jsou zde popsány vybrané skupiny fotosensitizerů (PS). PDT je moderní a neinvazivní metoda léčby nádorových i nenádorových onemocnění. Je založena na spolupůsobení tří základních složek, které samy o sobě nejsou toxické, a to PS, světla a kyslíku. Principem této metody je podání PS, který se hromadí v nádorových buňkách a po ozáření světlem určité vlnové délky způsobí poškození cílových buněk. Hlavní výhodou této metody je úplné zničení nádorových buněk, aniž by byly poškozeny zdravé buňky.

Na začátku práce je popsána historie této léčebné metody. Dále jsou zde podrobně rozepsané mechanismy účinku, princip poškození tkání, výhody a omezení této metody. Část teoretické práce jsem také věnovala popisu klinicky využívaných PS, ale jelikož žádná z těchto látek nemá ideální vlastnosti, probíhá stále výzkum dalších PS.

Cílem mé práce bylo celkové zhodnocení distribuce vybraných PS v organismu myšího modelu. Dále také zjistit, jak se dané látky v podmínkách *in vivo* chovají, a kde se nejvíce hromadí. Jedná se o aniontové látky ze skupiny ftalocyaninů (Pc), jejichž fotodynamická aktivita byla již dříve zkoumána v *in vitro* podmínkách. A jelikož tyto látky byly neúčinnější ve své skupině a vykazovaly nevhodnější vlastnosti a výsledky, byly proto vybrány pro další výzkum.



## SEZNAM ZKRATEK

$^1\text{O}_2$  – singletový kyslík

ALA – kyselina aminolevulová (aminolevulinic acid)

AlPc – hlinitý ftalocyanin (aluminium phthalocyanine)

(Aza)Pc – azaftalocyanin (azaphthalocyanine)

BSA – bovinní sérový albumin (bovine serum albumin)

Ce6 – chlorin E6 (chlorine E6)

FDA – Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (USA; Food and Drug Administration)

HpD – deriváty hematoporphyrinu (hematoporphyrin derivative)

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)

IL – interleukin

LDL – lipoprotein s nízkou hustotou (low density lipoprotein)

MHC – hlavní histokompatibilní komplex (Major Histocompatibility complex)

PBS – fosfátový pufr (phosphate buffer saline)

Pc – ftalocyanin (phthalocyanine)

PDT – fotodynamická terapie (photodynamic therapy)

PpIX – protoporphyrin IX (protoporphyrin IX)

PS – fotosenzitizér (photosensitizer)

ROS – reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)

VTP – fotodynamická terapie cílená na cévy (vascular-targeting PDT)

Tc – cytotoxické T-lymfocyty (cytotoxic T cells)

TEAA – triethylamoniumacetát (triethylammonium acetate)

Th – pomocné T-lymfocyty (helper T cells)

TPyPzs – tetrapyridoporphyriziny (tetrapyrizinoporphyrizine)

ZnPc – zinečnatý ftalocyanin (zinc phthalocyanine)

## 5. TEORETICKÁ ČÁST

### 5.1 Úvod do fotodynamické terapie

Fotodynamická terapie (PDT) je metoda léčby, která se rychle rozvíjí v rámci různých lékařských oborů od 60. let 20. století. Větší pozornost tento terapeutický přístup získal díky experimentům Dr. Thomase Doughertyho, který také v roce 1986 založil International Photodynamic Association (Gursoy *et al.*, 2013).

PDT se začíná jevit jako slibná, minimálně invazivní a vysoce selektivní metoda k léčbě nádorových onemocnění. Principem této metody je podání fotosenzitivní látky (fotosenzitizeru; PS) s rozdílnou afinitou k nádorové (patologické) tkáni oproti tkáni zdravé, což vede k selektivnímu zachytávání PS nádorovými buňkami. Následné ozáření nádoru světlem, většinou laserem, vede k aktivaci PS a vzniku fotodynamické reakce, což nakonec směřuje k selektivní destrukci nádorových buněk (Zhang *et al.*, 2018, Miller *et al.*, 2007).

V současné době je PDT široce používána při léčbě orofaryngeálního karcinomu (karcinomu dutiny ústní a hltanu), karcinomu jícnu a kožních nádorů. Využití PDT je však omezeno nedostatečným světelným tokem v hluboko uložených či špatně dostupných tkání. Tendence zlepšit terapeutické účinky PDT vedly ke kombinované léčbě s chemoterapií, radioterapií, imunoterapií apod. (Zhang *et al.*, 2018).

V posledních několika desetiletích bylo provedeno mnoho studií týkajících se použití PS v onkologii. I přes úspěch PDT jsou stále zkoumány nové sloučeniny a inovativní metody, které jsou potřebné pro zlepšení efektivního využití PDT v klinické onkologii. Jako příklad lze uvést využití nanomateriálů, které mohou zlepšit účinnost PDT a eliminovat její vedlejší účinky. Použití nanočástic zvyšuje lokální koncentraci PS, a tím zvyšuje selektivitu terapie (Kwiatkowski *et al.*, 2018).

PDT má však v medicíně využití nejen z terapie nádorových onemocnění. Představuje totiž velmi slibnou alternativu k překonání rezistence u bakteriálních, plísňových a virových infekcí, jelikož rozvoj rezistence na PDT je vysoce nepravděpodobný (Plotino *et al.*, 2019).

Dalších slibných výsledků dosahuje PDT v dermatologii, díky dobré snášenlivosti pacienty. Využívá se např. v léčbě povrchového nemelanomového kožního karcinomu, akné a různých dermatóz (Ozog *et al.*, 2016).

## **5.2 Historie PDT**

Světlo se používá k léčbě nemocí již od starověku, kdy bylo využíváno ve starověkém Egyptě, Indii a Číně k léčbě kožních onemocnění, jako je lupénka nebo vitiligo. Ve starověkém Řecku byla oblíbená helioterapie, tedy léčení slunečním zářením. Slavný řecký lékař Hérodotos, který byl považován za otce helioterapie, zdůrazňoval význam slunečního záření pro zdraví lidského těla (Ackroyd *et al.*, 2001).

V osmnáctém a devatenáctém století se ve Francii používalo sluneční světlo při léčbě různých onemocnění, jako jsou tuberkulóza, křivice, kurděje, revmatická onemocnění, ochrnutí, edém a svalové slabosti. Zakladatelem používání fototerapie v medicíně se stal na přelomu minulého století dánský lékař N. Finsen, který popsal úspěšnou léčbu pravých neštovic pomocí červeného světla, které zabránilo hnisání puchýřků. Poté pokračoval v používání ultrafialového světla k léčbě kožní tuberkulózy a vyvinul lampu, při jejíž konstrukci využil obloukové světlo uhlíkových elektrod k léčbě tohoto onemocnění. Za poznatky ohledně fototerapie byl oceněn Nobelovou cenou v roce 1903 (Ackroyd *et al.*, 2001, Dolmans *et al.*, 2003).

Buněčnou smrt vyvolanou interakcí světla a chemické látky poprvé provedl student medicíny z Mnichova Oscar Raab. Během experimentů s akridinovými barvivy si Raab všiml, že dochází k fluorescenci u prvoků, kteří byli ovlivněni těmito barvivy a poté ozáření. Tento jev měl toxický účinek, který vedl k úhynu prvoků. Raab předložil svá pozorování profesorovi Von Tappeinerovi, který v roce 1904 tento jev vysvětlil a popsal jako „fotodynamický efekt“. Brzy poté byl v roce 1905 proveden první účinný pokus o léčbu nádoru kůže s použitím 5% roztoku eosinu. Tato terapie se však nedostala k širšímu publiku a byla zapomenuta na celá desetiletí (Kwiatkovski *et al.*, 2018).

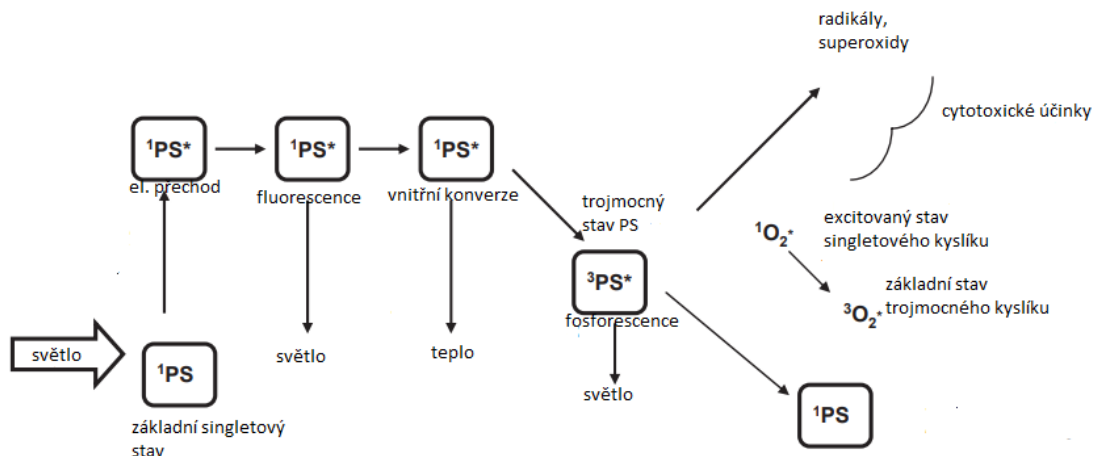
Ačkoliv je pojem PDT znám přibližně 100 let, teprve od druhé světové války se seznámil s anglicky mluvícím světem, jelikož předtím byla velká část experimentů prováděna v Evropě, a tudíž byla ranná literatura publikována v němčině, francouzštině

a dánštině. Ve druhé polovině dvacátého století se začalo využívat světlo ve významnější míře v mnoha různých oblastech medicíny např. fototerapie novorozenecké žloutenky, fototerapie ultrafialovým světlem v dermatologii, PDT a fotodetekce (Ackroyd *et al.*, 2001).

V roce 1948 F. H. J. Figge shrnul sérii studií, které ukázaly, že exogenně získané porfyriny se selektivně hromadily v nádorech u myší. Tato studie byla později rozšířena i o pacienty s nádorovým onemocněním. V návaznosti na tuto studii prokázala v 70. letech 20. století skupina Dr. Doughertyho využití hematoporphyrinu při léčbě nádorů u myší. Následovala studie prokazující úspěšnou léčbu rekurentního karcinomu prsu. Na základě terminologie původně zavedené H. von Tappeinerem byl tento terapeutický postup nazván PDT. T. Dougherty a C. J. Gomer se zabývali také biodistribucí, a zjistili, že se deriváty hematoporphyrinu (HpD) více hromadily v nádorových tkáních ve srovnání se zdravou tkání. Hlavními místy akumulace byla játra, ledviny a slezina. Další důležitý objev identifikoval singletový kyslík ( $^1\text{O}_2$ ), který je produkován vlivem světelného záření absorbovaného porfyrinu, jako hlavní cytotoxickou látku produkovanou během PDT. Doughertyho skupina pokračovala v dalších experimentech a přinesla mnoho informací ohledně HpD. Toto úsilí vedlo v roce 1995 ke schválení PDT pro léčbu rakoviny jícnu Food and Drug Administration (FDA) ve Spojených Státech (Kessel, 2019).

### **5.3 Mechanismus PDT**

Mechanismus PDT zahrnuje tři základní složky: světlo, PS a kyslík. Pacientům je podán PS nebo jeho metabolický prekurzor. Po ozáření světlem o určité vlnové délce přejde PS ze základního singletového stavu do excitovaného singletového stavu. Excitovaný PS je nestabilní, a proto se může vrátit zpět do svého základního stavu např. emisí fotonu ve formě fluorescence, nebo dojde k přechodu do excitovaného tripletového stavu. Existují dva mechanismy, kterými může PS v tripletovém stavu reagovat s molekulami ve svém okolí, viz Obr. 1 (Konopka *et al.*, 2007).



Obr. 1 Schéma fotochemického procesu excitace PS. Převzato z (Lyon *et al.* 2011)

Žádná složka není sama o sobě toxická, ale společně iniciují fotochemickou reakci, díky které vznikne vysoce reaktivní produkt zvaný  $^1\text{O}_2$ . Ten je vysoce toxický a může vyvolat buněčnou smrt, a to nejčastěji apoptózu, nekrózu či autofagii. Protinádorové účinky PDT souvisí se třemi vzájemně působícími reakcemi, a to přímé cytotoxické účinky na nádorové buňky, poškození cév uvnitř nádoru a vyvolání imunitní odpovědi. Síla těchto reakcí závisí do značné míry na typu a dávce použitého PS, době mezi podáním PS a expozicí světla, celkové dávce světla, množství kyslíku v tkáni a případně dalších dosud špatně rozpoznávaných podmínek (Agostinis, *et al.* 2011).

### 5.3.1 Reakce typu I

Reakce typu I vedou díky přenosu vodíku nebo elektronů k tvorbě volných radikálů. Elektrony reagují s kyslíkem a produkují vysoce reaktivní formy kyslíku (ROS), které napadají buněčné cíle. Reakce typu I však nutně nevyžadují molekulární kyslík a působení volných radikálů může způsobit přímé buněčné poškození (Lyon *et al.* 2011, Plotino *et al.*, 2019).

### 5.3.2 Reakce typu II

Během přechodu PS do základního stavu se tato energie může přímo přenášet na molekulární kyslík (v základním energetickém stavu). Tímto způsobem vzniká  $^1\text{O}_2$ ,

který je charakterizován extrémně silnými oxidačními vlastnostmi. Většina organických sloučenin je v základním singletovém stavu. Nicméně, molekuly kyslíku jsou charakterizovány svým tripletovým stavem (jako základní stav) a excitací do singletového stavu. Díky tomuto faktu nepoškozují excitované PS buněčné struktury a reagují především s molekulami kyslíku rozpuštěnými v cytoplazmě.

Poměr mezi reakcemi I a II typu závisí na mnoha faktorech, a to např. na koncentraci kyslíku, tkáňové dielektrické konstantě, pH a struktuře PS. Jakmile však dochází k nedostatku kyslíku (hypoxii), začne převažovat reakce typu I (Kwiatkowski *et al.*, 2018).

## **5.4 Buněčná smrt**

Nekróza je náhodná buněčná smrt, kterou charakterizuje buněčný edém, pyknóza jádra, následná destrukce organel, postupný rozpad cytoplazmatické membrány a následné uvolnění proteinů do okolí. V okolí vzniká zánět. Nekrózu způsobuje fyzické nebo chemické poškození a rozklad buňky je zprostředkován především proteolytickou aktivitou.

Apoptóza (jeden z typů programované buněčné smrti), je charakterizovaná smrštěním buňky a tvorbou dynamických membránových blebů. Organely a plazmatická membrána si uchovávají svou celistvost po poměrně dlouhou dobu. Buňka se rozpadá na apoptická tělíška, která poté podléhají fagocytóze a nedochází k rozvoji zánětu. Apoptóza vyžaduje transkripční aktivaci specifických genů, aktivaci endonukleas a kaspas (Castano *et al.*, 2005).

Autofagie je charakterizována masivní vakuolizací cytoplazmy. Cytoplazmatická degradace vyžaduje vytvoření autofagosomu, který do sebe uzavře intracelulární složky a organely, které mají být degradovány. Splynutí autofagosomu a lyzosomu má za následek degradaci organel lyzosomálními hydrolasami. U dospělých organismů funguje autofagie jako proces samotrávení podporující přežití buněk v nepříznivém prostředí a jako mechanismus kontroly kvality odstraňováním poškozených organel, toxických metabolitů nebo intracelulárních patogenů (Agostinis *et al.*, 2011).

Díky PDT dochází k smrti nádorových buněk apoptózou, nekrotózou a/nebo autofagií. U některých nádorů se vyvinuly genetické mutace, které eliminují nebo minimalizují apoptózu. Transport PS k nádorovým buňkám je zajištěn různými mechanismy, např. fagocytózou/endocytózou zprostředkovanou receptory, vazbou na LDL-receptory, vazbou na lipidy, prostřednictvím tyrosinkinasy, receptoru epidermálního růstového faktoru a difuzí. Předpokládá se, že každý PS má pravděpodobně preferovanou metodu příjmu do nádorových buněk (Allison *et al.*, 2013).

Rozhodujícími faktory určujícími typ buněčné smrti po PDT jsou typ buňky, lokalizace PS uvnitř buňky a dávka světla aplikovaná k jeho lokální aktivaci. Nižší dávky PDT vedou spíše k apoptóze, a naopak vyšší dávky k nekrotóze. Nejdůležitějším cílem PDT v buněčných signálních drahách je aktivace proapoptotických proteinů Bcl, protože poškození Bcl-2 indukuje apoptózu v nádorových buňkách. Exprese proteinu Bcl-2 je spojována s kladnou odpovědí na PDT léčbu a může být použita k predikci celkové nádorové odpovědi na PDT. Další studie ukázaly přítomnost kaspas 3 a 9 v lysátech buněk získaných v PDT experimentech, které vedly k rozsáhlé buněčné smrti, což naznačuje jejich aktivaci v rámci drah buněčné smrti spuštěných pomocí PDT. Zřejmě apoptóza a nekrotóza sdílejí společné iniciační dráhy a na konci jsou přítomny aktivní kaspasy. Inhibice apoptózy vede u buněk k nekrotóze a z toho lze usuzovat, že buňky dostatečně poškozené po PDT jsou zničeny bez ohledu na mechanismus, který se na tom podílí (Robertson *et al.*, 2009).

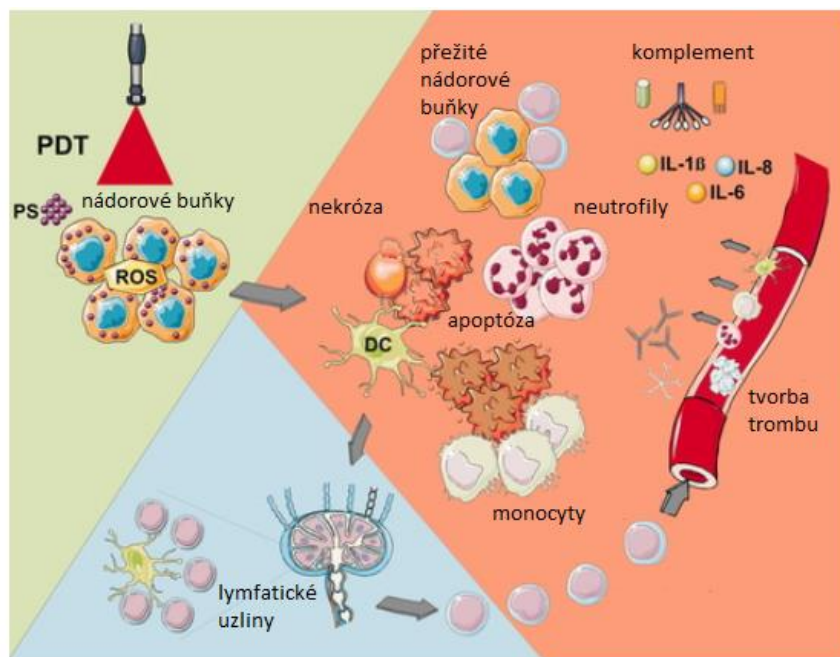
## **5.5 Cévní poškození**

Stejně jako nádorové buňky mohou i endoteliální buňky cévního systému ukládat PS. To je nejspíše způsobeno podobnými mechanismy jako u nádorových buněk. Krevní cévy v oblasti nádoru, u kterých dochází k prosakování krve díky pozměněným cévním stěnám, mohou sloužit jako další místo pro kumulaci PS v nádorové tkáni. Oproti tomu cévy ve zdravé tkáni mohou usnadnit vylučování PS. Poškozením cévních stěn neproudí do nádoru krev, a tím pádem dochází k hypoxii s následnou nekrotózou (Allison *et al.*, 2013).



## 5.6 Imunitní systém

PDT nejenže, vyvolává nekrózu nádorových buněk a poškození cév, ale spouští i silnou imunitní odpověď, viz Obr. 2. Uvolnění zánětlivých mediátorů jako jsou různé cytokiny, růstové faktory a další proteiny, stimuluje lymfocyty včetně neutrofilů a makrofágů, které se koncentrují v postižené tkáni. Makrofágy dále fagocytují poškozené nádorové buňky a prezentují proteiny z těchto buněk CD4+ pomocným T lymfocytům (Th), které pak aktivují CD8+ cytotoxické T lymfocyty (Tc). K této imunitní reakci dochází v místě působení PDT, ale může se objevit i ve vzdálenějších lymfatických tkáních. Kdykoli jsou nalezeny nádorové buňky, Tc mohou indukovat nekrózu a také apoptózu, a to i po dokončení PDT. Pacienti léčení PDT mají zvýšenou hladinu různých cytokinů (Allison *et al.*, 2013).



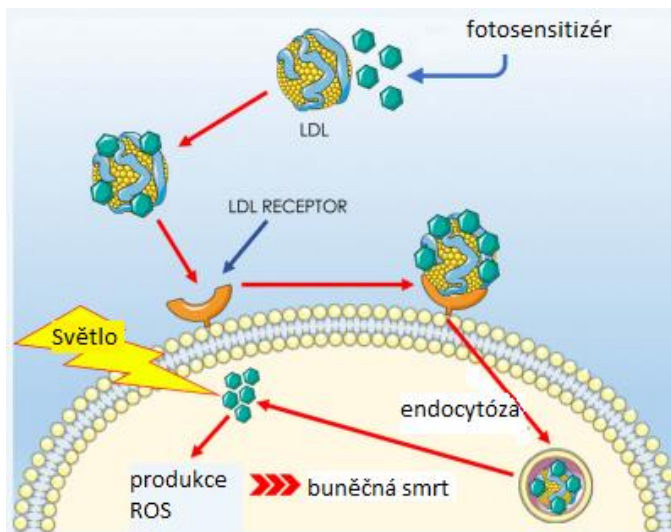
Obr. 2 Reakce imunitního systému při PDT. Převzato z (Agostinis *et al.*, 2011)

Mezi cytokiny, které hrají nejdůležitější roli v zánětlivém procesu vyvolaném PDT, se řadí interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) a interleukin 6 (IL-6). Inhibování účinků různých adhezních molekul zhoršuje odpověď organismu na PDT. Naopak inhibice protizánětlivých cytokinů, jako jsou interleukin (IL-10) a TNF- $\beta$ , může výrazně zlepšit účinky PDT (Agostinis *et al.*, 2011).

Při degranulaci neutrofilů dochází k uvolňování lyzozomálních enzymů a chemotaktických faktorů, což přispívá k destrukci nádorové tkáně. V některých případech to ale může zhoršit destrukční proces zahájený předešlým ozářením (Kwiatkowski *et al.*, 2018).

## 5.7 Selektivita PDT

PS se hromadí více v nádorových buňkách než ve zdravých buňkách. Důvodem takové distribuce je zřejmě tendence PS vázat se přednostně na lipoproteiny s nízkou hustotou (LDL). LDL přenáší cholesterol ke tkáním, kde je důležitý mj. k vytvoření membrán během dělení buněk. Nepřetržitě se dělící nádorové buňky zvýšeně vychytávají LDL. Navíc u tkání se zvýšenou mitotickou aktivitou dochází k nadměrné expresi LDL receptorů na povrch buňky. Afinita PS k lipoproteinům, zejména k LDL, hraje důležitou roli při transportu PS do nádorové tkáně, viz Obr. 3 (Kwiatkowski *et al.*, 2018).



Obr. 3 Schéma transportu PS do nádorových buněk pomocí LDL. Převzato z (Kwiatkowski *et al.*, 2018)

## 5.8 Výhody PDT

Transport PS do patologických tkání, a tím pádem cílení pouze na nádorové buňky, je hlavní výhodou PDT. Dále po léčbě není přítomné výrazné zjizvení tkáně. Může být provedena ambulantně nebo v lůžkovém provedení a v případě nutnosti

opakování ošetření ve stejném místě není nutná změna dávky. Při opakované léčbě zatím nebyla pozorována rezistence. Jedná se také o poměrně levnou a dostupnou variantu terapie (Gursoy *et al.*, 2013).

## **5.9 Vedlejší účinky a omezení PDT**

Hlavním vedlejším účinkem po použití PS je fotosenzitivita. PS, který je nahromaděný v kůži, může být aktivován denním světlem, a způsobit otoky, zarudnutí, vyrážky až puchýře, připomínající popáleniny prvního nebo druhého stupně. Proto je třeba se vyhýbat expozici světla a přímého slunečního záření, po dobu několika hodin až týdnů do vyloučení PS z těla (záleží na typu PS). Některé PS však mohou zůstat ve větších koncentracích v kůži po celé měsíce, což vyžaduje změnu životního stylu pacientů. U většiny pacientů však dochází k rychlé eliminaci PS. Další nežádoucí účinky PDT se mohou objevit dle lokalizace nádoru a bývají dočasné. Jedná se například o kašel, potíže s polykáním, bolesti žaludku, bolestivé dýchání, nebo dušnost. Vzácně se můžou vyskytnout alergické reakce, jaterní problémy a další (Konopka *et al.*, 2007).

PDT je méně účinná při léčbě velkých nádorů a omezena na nádorové tkáně, které mohou být vystaveny světlu, protože světlo nedokáže pronikat do hlubokých oblastí. Jedná se o lokální léčbu, a proto nemůže být využita při metastázách (Gursoy *et al.*, 2013).

## **5.10 Zdroje světla**

Pro úspěšnou léčbu PDT *in vivo* je nutné zajistit, aby se dostatečná dávka světla dostala do všech oblastí nádorových tkání. Z toho vyplývá, že je důležité pochopit, jak světlo prochází jednotlivými tkáněmi a jaké relativní účinky má absorpce a rozptyl. U PDT je důležité být schopen předpovídat prostorové rozložení světla v cílové tkáni. Světlo je buď rozptýleno nebo absorbováno při vstupu do tkáně a rozsah obou procesů závisí na typu tkáně a použité vlnové délce světla.

Biologická tkáň je nehomogenní a přítomnost buněčných struktur (např. makromolekuly či buněčné organely) ji činí zakalenou. Vícenásobné rozptýlení v zakaleném médiu vede ke změně šíření světelného paprsku a ztrátě směru. Absorpce je z velké části způsobena endogenními chromofory, jako jsou např. hemoglobin,

myoglobin a cytochromy. Světelný zdroj pro PDT musí vykazovat vhodné spektrální vlastnosti, které se shodují s maximálním rozsahem absorpčních vlnových délek použitých PS kvůli vytvoření dostatečného množství ROS k vyvolání cytotoxického účinku (Robertson *et al.*, 2009).

V minulosti byly k aktivaci PS využívány různé zdroje světla jako argonové lasery, KTP nebo Nd/YAG lasery, lasery s parami zlata a lasery s parami mědi. Všechny tyto typy laserů mají ale složitý a drahý provoz. Dnes se používají hlavně diodové laserové systémy. Tyto laserové systémy jsou snadno ovladatelné, přenosné (menší rozměry) a jsou relativně levné. Experimentální studie PDT ukázaly, že neexistují velké rozdíly ve výsledku při použití různých laserových systémů (Kübler, 2005).

PDT vyžaduje zdroj světla, který aktivuje PS expozicí viditelného světla o specifické vlnové délce. Červené světlo účinně proniká lidskou tkání, a proto je většina PS aktivována červeným světlem s vlnovou délkou 630 až 700 nm, což odpovídá hloubce pronikání světla od 0,5 cm (při 630 nm) do 1,5 cm (při 700 nm). Kvůli omezené hloubce pronikání světla, nemohou být větší nádory rovnoměrně osvětleny. Celková dávka světla, jednotlivé dávkování a hloubka pronikání do tkání se odlišují s různou léčenou tkání a s druhem PS. K léčbě větších nádorů se využívá nekoherentní zdroj světla, například wolframové vlákno, halogen křemíkové výbojky, xenonový oblouk a sodíkové výbojky (Konopka *et al.*, 2005).

Nejméně efektivně proniká do tkání modré světlo, zatímco červené a infračervené světlo pronikají hlouběji. Jak již bylo zmíněno, oblast mezi 620 a 850 nm je často nazývána fototerapeutickým oknem tkáně. Světlo v této oblasti může efektivně generovat  $^1\text{O}_2$ , zatímco delší vlnové délky v optickém okně tkáně (do 1300 nm) nemají dostatečnou energii k vyvolání fotodynamické reakce. Žádný zdroj světla není ideální pro všechny typy PDT, a to ani při použití stejného typu PS. Výběr zdroje světla musí být založen na absorpci PS (fluorescenční excitační spektra a absorpční spektra), druhu nádorového onemocnění, finančních nákladech a velikosti nádoru. Volba optimální kombinace PS, světelného zdroje a dalších parametrů léčby je klíčová pro úspěšnou léčbu pomocí PDT (Agostinis *et al.*, 2011).

## 5.11 Fotosensitizéry

PS jsou látky přírodního nebo syntetického původu, které absorbují světelnou energii a využívají ji k tvorbě oxidativního stresu. Vhodný PS by měl být netoxický bez ozáření, měl být hydrofilní kvůli snadné systémové aplikaci a komerčně dostupný (Allison *et al.*, 2013).

Další požadavky na ideální PS jsou vysoká chemická čistota a stabilita při pokojové teplotě. PS by se měl ukládat jen v nádorové tkáni, ze které by měl být pomalu eliminován. Naopak ze zdravých tkání by se měl vyloučit relativně rychle, aby se minimalizovaly fototoxické nežádoucí účinky terapie. Absorpční pásma by neměla překrývat absorpční pásma jiných látek v těle, včetně endogenních barviv, jako je melanin, hemoglobin nebo oxyhemoglobin (Kwiatkowski *et al.*, 2018).

Bylo prokázáno, že kratší interval mezi podáním PS a ozářením, kdy byl PS stále přítomen v cévách, vyvolal větší poškození nádoru a cév. Cévní systém v okolní tkáni nebyl poškozen, což ukazuje na selektivitu účinku PDT. Cévy uprostřed nádoru byly citlivější na působení PS než na periférii nádoru (Chen *et al.*, 2002).

Studie ukázaly, že výrazná zánětlivá reakce a odumírání nekrotických buněk po ozáření jsou důležité pro imunitně stimulační účinky PDT. Jiné naznačují, že PS, které vyvolávají především apoptózu a méně zánět, jsou vhodné pro léčbu nádorů mozku, kde je otok nežádoucí (Agostinis *et al.*, 2011).

Důležitým parametrem, který ovlivňuje farmakologické chování PS, je vazba na plazmatické proteiny a jejich distribuce v krvi. Lidský sérový albumin může přenášet amfifilní a hydrofilní PS v krevním řečišti. LDL se naopak váže na zinečnatý ftalocyanin (ZnPc) a hydrofobní PS. Vazba PS na proteiny může vést ke zlepšení účinnosti PDT, protože se zvyšuje cílené vychytávání PS v nádorových tkáních (Chen *et al.*, 2020).

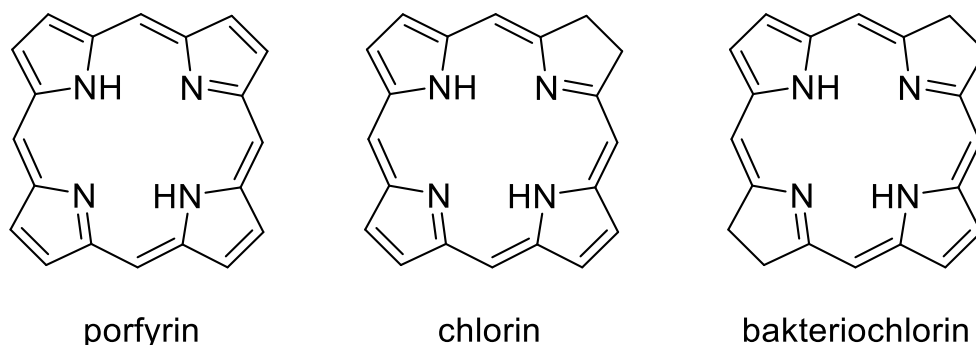
### 5.11.1 Dělení fotosensitizérů

PS jsou klasifikovány dle historického vývoje na PS první, druhé a třetí generace:

## První a druhá generace fotosensitizerů

Do první generace PS se řadí především oligomerní směs porfyrinů HpD. PS druhé generace jsou syntetické sloučeniny, které zahrnují porfyriny, bakteriochloriny, Pc, chloriny, benzoporfyriny, deriváty methylenové modři a další (Obr. 4). Jsou to čisté sloučeniny, které vykazují vysokou absorpci v blízké infračervené oblasti elektromagnetického spektra, vysokou tvorbu  $^1\text{O}_2$  a také předvídatelnější interpretaci vztahu mezi dávkou a odezvou, protože se nejedná o směsi sloučenin, jako je HpD (Mfouo-Tynga *et al.*, 2021).

Druhá generace PS se vyznačuje vyšší chemickou čistotou. Díky jejich maximální absorpci v rozmezí vlnových délek 650 až 800 nm, světlo lépe proniká do hlouběji umístěných tkání. Navíc prokazují méně vedlejších účinků, což vyplývá z vyšší selektivity pro nádorové buňky a z rychlejší eliminace PS z těla. Hlavní nevýhodou je jejich špatná rozpustnost ve vodě, která je významným limitujícím faktorem při jejich intravenózní aplikaci (Kwiatkowski *et al.*, 2018).



Obr. 4 Strukturní základy porfyrinu, chlorinu a bakteriochlorinu

## Třetí generace PS

Třetí generace PS je založena na PS s vyšší afinitou k nádorovým buňkám, aby se zlepšila akumulace PS v cílových místech a snížilo poškození zdravých okolních tkání. Pro zvýšení selektivity se využívají následující modifikace např. kombinace PS druhé generace s molekulami zaměřenými na cílový receptor, kombinace PS s LDL a konjugace PS s monoklonální protilátkou zaměřenou na specifický antigen nádorové buňky. Dále se využívají konkrétní markery, které jsou na povrchu nádoru např.

receptory růstového faktoru, receptory transferinu nebo hormony (např. inzulin) (Kwiatkowski *et al.*, 2018).

V současné době probíhají další studie PDT, které využívají kombinace s genovým inženýrstvím a nanotechnologiemi. Chlorin E6 (Ce6) je typ studovaného PS, který byl začleněn do nanočástic za vzniku iontových komplexů, aby se zvýšila tvorba ROS. Ce6 byl vyvinut také za účelem zlepšení antimikrobiálních účinků, snížení poškození zdravých tkání a lepšího pronikání světla tkáně (Kou *et al.*, 2017).

## 5.11.2 Vybrané skupiny fotosensitizerů

### 5.11.2.1 *Porfyriny*

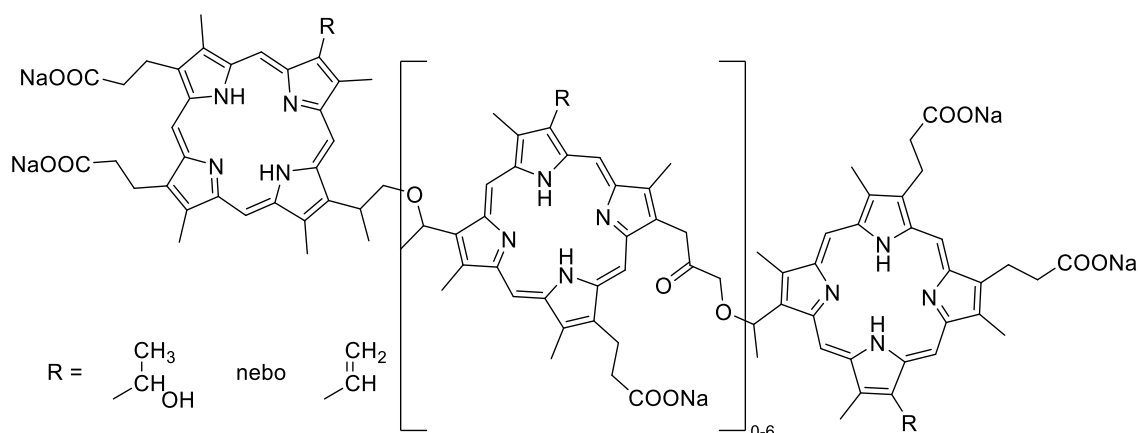
#### **Derivát hematoporfyrinu a porfimer sodný**

První systematicky studovaný PS, který byl následně i používán v klinické praxi pro léčbu pomocí PDT, byla ve vodě rozpustná směs porfyrinů nazývaná HpD. Jeho čištěná forma, porfimer sodný později známý jako Photofrin® byl v mnoha zemích jediným PS schváleným pro klinickou PDT nádorů močového měchýře, plic, jícnu, žaludku a děložního čípku. HpD a Photofrin® v klinických studiích vykazovaly relativně pomalou eliminaci z kůže, což způsobovalo kožní fotosenzitivitu přetrvávající v některých případech 8 až 10 týdnů po léčbě (De Rosa *et al.*, 2000).

HpD byl prvním komerčně dostupným PS, který v 70. letech uvedl na trh Dr. Thomas Dougherty. HpD je směs různých monomerů a polymerů hematoporfyrinu, je netoxický a po aktivaci světlem nezpůsobuje bolest, což umožňovalo snadnou a spolehlivou ambulantní léčbu (Allison *et al.*, 2013).

Porfimer sodný s komerčním názvem Photofrin® (Obr. 5) je purifikovaná frakce HpD. Jedná se o nejrozšířenější a klinicky nejpoužívanější PS, který jako první schválila FDA k léčbě nádorů močového měchýře v Kanadě v roce 1993. Později byl schválen také k PDT raného stádia karcinomu plic a pokročilého stádia ezofageálního karcinomu v Nizozemsku a Japonsku. I přes jeho účinnost vyvolává rozsáhlou a dlouhotrvající fotosenzitivitu kůže, což významně ovlivňuje život pacienta. Také jeho selektivita k nádorové tkáni je nízká (Taquet *et al.*, 2007).

Porfimer sodný byl dále schválen k léčbě karcinomu děložního čípku. Mezi jeho další nevýhody se řadí hydrofobní charakter, což je jedním z důležitých faktorů pro biologické využití (Chilakamarthi *et al.*, 2017).



Obr. 5 Chemická struktura porfimeru sodného (Photofrin®)

### Kyselina 5- aminolevulová

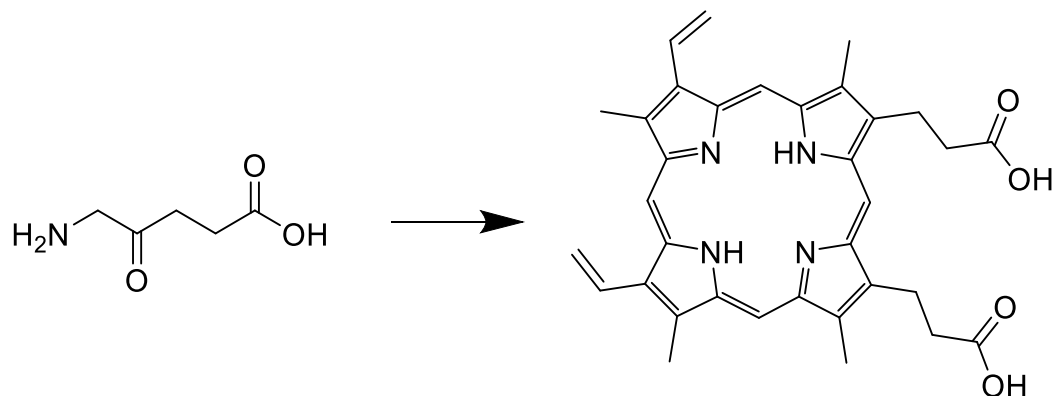
Kyselina 5-aminolevulová (ALA) je endogenní aminokyselina, která je syntetizována z glycinu a sukcinyl-CoA v mitochondriích během syntézy hemu. Po podání je ALA v nádorových buňkách metabolizována na fotosenzitivní porfyriny. Díky rozpustnosti ve vodě je ALA vhodná pro lokální a systémovou aplikaci (Abels, 2004).

Po aplikaci ALA dochází k inhibici prvního kroku syntézy porfyrinu, což vede ke kumulaci PpIX v tkáni. Vzhledem ke zhoršené pronikavosti světla tkáněmi při 635 nm je použití ALA omezeno na povrchové léze (1–2 mm). Léčba časných stádií nádorů hlavy a krku pomocí tohoto PS byla neúčinná. ALA je rychle odstraněna z tkáně a eliminována z těla do 48 h. Kožní fotosenzitivita trvá méně než 24 h. PDT se používá k léčbě premaligních a maligních lézí v dutině ústní, kde ve sliznici dochází k povrchové nekróze, zanechává málo jizev a není přítomná kumulativní toxicita (Konopka *et al.*, 2007).

Lokální podání ALA nebo jejích esterů (např. methyl-ALA) se používá při léčbě kožních malignit (např. povrchový bazocelulární karcinom) a u zánětlivých onemocněních (např. akné). Jednou z hlavních nevýhod je prodloužená doba před ozáření světlem (přibližně 4 až 24 h), která je nutná k aktivaci, protože sama ALA není



PS, ale prekurzor, který prochází biochemickou konverzí na PpIX, viz Obr. 6. Další nevýhodou je výrazné pálení a bolest během terapie, kdy je u pacientů někdy nutná celková anestezie (Miller *et al.*, 2007).



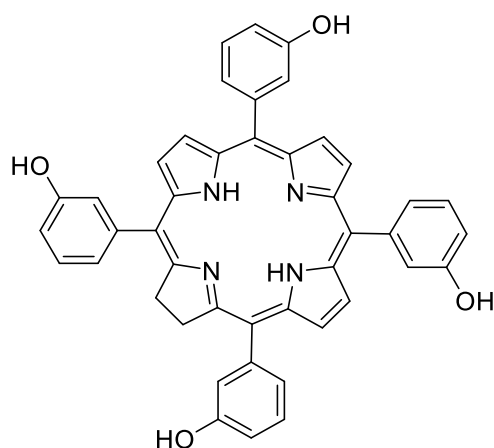
Obr. 6 ALA a její metabolit, PpIX.

### 5.11.2.2 Chloriny

Chloriny zahrnují několik nejdůležitějších klinických PS, a to temoporfin (derivát chlorinu), verteporfin (derivát benzoporphyrinu) a radachlorin (nyní bremachlorin). Chlorin je odvozen od přirozeně se vyskytujícího chlorofylu a byl používán ve formě trisodné soli nebo rozpuštěný v polyvinylpyrrolidonu. K aktivaci těchto PS se používá červené světlo v rozmezí 650 až 700 nm v závislosti na přesné struktuře (Abrahamse *et al.*, 2016).

#### Temoporfin

5,10,15,20-Tetra(*m*-hydroxyfenyl)chlorin (mTHPC, temoporfin), komerčně nazývaný Foscan® (Obr. 7), je derivát chlorinu, který rychle iniciuje fotodynamickou reakci. Doba terapie je měřena v sekundách. PS je tak aktivní, že po PDT musí pacienti ještě zůstat v tmavé místnosti po dobu 24 h. V opačném případě by mohlo dojít k aktivaci PS pokojovým světlem a způsobit těžké popáleniny. Léčba je navíc bolestivá, takže většina jedinců podstupuje ozáření v anestezii. I přesto se jedná o vysoce účinný PS, který se hojně využívá v léčbě primárních a rekurentních nádorů hlavy a krku (Allison *et al.*, 2013).



Obr. 7 Struktura temoporfinu.

### 5.11.2.3 Bakteriochloriny

Do této skupiny PS se řadí deriváty bakteriochlorinu, které obsahují palladium, a jsou známé pod názvem padoporfin (WST09, **TOOKAD**<sup>®</sup>) a padeliporfin (WST11, **TOOKAD**<sup>®</sup> Soluble), jakožto novější derivát rozpustný ve vodě. Tyto PS byly testovány v klinických studiích pro léčbu karcinomu prostaty. Další bakteriochlorinové deriváty byly studovány jako PS pro protinádorovou i antimikrobiální aplikaci. K aktivaci těchto PS se používá infračervené světlo o vlnové délce v rozmezí 700 až 800 nm, což se ukázalo jako zvláště účinné u terapie maligních melanomů (Abrahamse *et al.*, 2016).

### 5.11.2.4 PS Přírodního původu

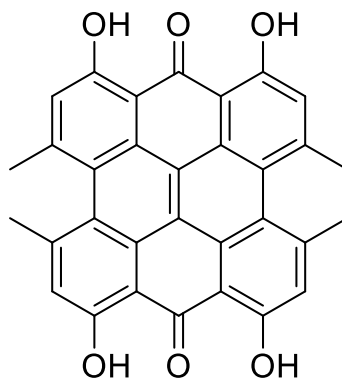
Využití přírodních látek jako PS je rozsáhle zkoumáno pro své dobré výsledky a mohlo by mít řadu výhod. V rámci studií je používán hypericin, kurkumin, riboflavin, a hypocrellin (Abrahamse *et al.*, 2016).

#### Hypericin

Hypericin (Obr. 8) je přírodní barvivo nalézané v rostlině *Hypericum perforatum* (třezalka tečkovaná). Jeho léčebné vlastnosti objevili již v dávných dobách. Dnes se využívá jako PS, který má schopnost indukovat silné fotocytotoxické účinky a je zkoumán v celé řadě preklinických a klinických studiích pro PDT. Nedávno bylo zjištěno, že má vysokou selektivitu k nádorovým buňkám. Navíc nový přístup v terapii, kombinující látku kombretastatin-A4-fosfát, která poškozují činnost cév, a radioaktivně

značený hypericin, prokázal slibnou budoucnost při léčbě solidních nádorů (Liu *et al.*, 2015).

Hypericin vykazuje maximální absorpci v oblasti ultrafialového světla (při 330 nm) a viditelného světla (při 550 až 588 nm) (De Rosa *et al.*, 2000).



Obr. 8 Hypericin

#### 5.11.2.5 *Ftalocyaniny*

Pc (Obr. 9), řadí se do skupiny PS 2. generace, jsou syntetické makromolekuly příbuzné porfyrinům, které jsou tvořeny čtyřmi isoindolovými kruhy spojenými azamethinovými můstky. Pc jsou obvykle připravovány ve formě komplexů s centrálně vázanými kationty kovů, jako jsou zinek, hliník či galium. Takové Pc se nazývají metaloftalocyaniny, jejichž fotofyzikální vlastnosti jsou ovlivněny právě přítomností a povahou centrálního iontu kovu. Jejich velkou výhodou v rámci PDT je vysoký kvantový výtěžek  $^1\text{O}_2$  právě díky přítomnosti diamagnetického kovu.

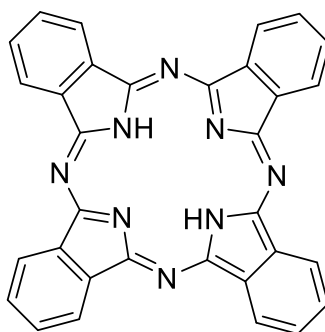
Velkou nevýhodou planárních a lipofilních Pc je nerozpustnost ve vodě, což vede ke sklonu tvořit agregáty ve vodném prostředí. Tato agregace snižuje stabilitu tripletových stavů, a to vede ke snížené schopnosti vytvářet  $^1\text{O}_2$ , což vede k zhoršení celkového účinku (Carobeli *et al.*, 2021).

Farmakokinetika Pc v těle je mnohem rychlejší než u HpD, k jejich akumulaci v nádoru dochází maximálně 1-3 h po aplikaci a jsou z těla eliminovány do 24 h, díky tomu je kožní fotosenzitivita pouze přechodná. Pc jsou často modifikovány polárními substituenty, aby se zabránilo již zmíněným problémům s rozpustností (Nyman *et al.*, 2004).

Na rozdíl od porfyrinů k absorpci světla Pc dochází v rozmezí optického okna tkáně (600-850 nm), a proto se jeví jako potencionálně slibnější PS ve PDT než porfyriny. Využití Pc ve PDT je omezené díky tomu, že jsou nerozpustné ve vodě. Jedním ze způsobů, jak zvýšit rozpustnost Pc ve vodě, je využití různého stupně sulfonace. Pc s nižším stupněm sulfonace měly slibné výsledky, ale jejich potenciální cytotoxicita byla nízká, a proto sulfonované Pc musely být ještě substituovány kovem. Po substituci Pc vykazovaly vysokou cytotoxicitu, ale také to způsobilo fotosenzitivitu kůže. Komplexy s kationty hliníku a galia s nižším stupněm sulfonace vykazovaly cytotoxicitu srovnatelnou s Photofrinem® (Chilakamarbhi *et al.*, 2017).

Pc byly jedny z prvních sloučenin studovaných v 80. a 90. letech 20. století v souvislosti s PDT. Pc jsou aktivovány červeným světlem o vlnové délce kolem 670 nm. Ke zvýšení rozpustnosti a biologické dostupnosti hydrofobních ZnPc se studuje využití liposomů jako nosičů. Kationtové Pc byly studovány pro antimikrobiální využití v klinických studiích na infikované vředy diabetické nohy (Abrahamse *et al.*, 2016).

Nedávné studie se zabývaly vývojem nového typu ZnPc s názvem Photocyanin, který je v současné době ve fázi klinického testování v Číně. Vykazuje slibné fotodynamické výsledky, má nízkou toxicitu bez ozáření a vysoký výtěžek  $^1\text{O}_2$ . V budoucnu by mohl být využívám k léčbě nádorů v rámci PDT (Chen *et al.* 2020).



Obr. 9 Struktura makrocyclického jádra ftalocyaninu

### Aniontové ftalocyaniny

Ke zvýšení rozpustnosti Pc se využívají aniontové substituenty jako jsou sulfátové, karboxylátové a fosfátové skupiny. V závislosti na počtu karboxylátových skupin a hodnotě pH prostředí jsou polykarboxylátové Pc rozpustné ve vodných

roztocích. Pro usnadnění rozpustnosti těchto Pc ve vodě jsou potřebné nejméně čtyři karboxylátové skupiny a alkalické pH (Li *et al.*, 2019).

### **Kationtové ftalocyaniny**

Kationtové Pc vznikají např. kvaternizací aminových nebo pyridinových funkčních skupin. Tato reakce, která vede k výraznému zvýšení polaritativity Pc, se provádí až na konci syntetické dráhy. Bylo prokázáno, že velké množství kationtových skupin zvyšuje rozpustnost Pc ve vodě a zabraňuje agregaci (Li *et al.*, 2019).

Studovaný kationtový ZnPc s názvem Pc13 vykazuje selektivní fototoxický účinek na lidské nádorové buňky a navozuje apoptotickou odpověď charakterizovanou zvýšením aktivity kaspasy 3 (Marino *et al.*, 2013).

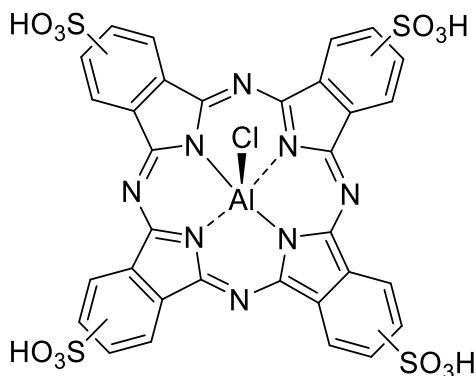
Aniontové Pc jsou obecně mnohem méně aktivní než kationtové Pc. Důvod tohoto rozdílu zůstává nejasný, i když to může být ovlivněno výběrem substituentů. Jedna ze studií naší vědecké skupiny prokázala rozdíl mezi aniontovými a kationtovými Pc z hlediska jejich fotodynamické aktivity na buněčných liniích. U aniontových hydrofilních Pc bylo prokázáno, že nižší pH v lyzozomálním kompartmentu a vazba na albumin může vést k podstatně nižší fotodynamické reakci (Kollár *et al.*, 2020).

### **Photosens<sup>®</sup>**

Sulfonovaný hydroxyhlinitý ftalocyanin známý pod komerčním názvem Photosens<sup>®</sup> (Obr. 10) byl vyvinut v Rusku. Jedná se o směs di-, tri- a tetrasulfonovaných derivátů Pc s průměrnou sulfonací 3. PS neobsahuje žádné nesulfonované Pc. V Rusku je schválený pro léčbu PDT sarkomů, nádorů choroidálního plexu, karcinomu močového měchýře a děložního čípku. Vykazuje také dobré výsledky v léčbě bazocelulárního karcinomu (Ali *et al.*, 2018).

Studie ukázaly, že přímé fotodynamické účinky na buňky byly výraznější, když doba mezi podáním Photosens<sup>®</sup> a ozáření přesahovala 24 h. Různé stupně sulfonace a amfifilní charakter významně ovlivňují selektivitu pronikání do nádorových buněk. Na druhou stranu, ozařování v krátkém časovém intervalu po podání Photosens<sup>®</sup>, kdy byla koncentrace Pc v krvi stále vysoká, vedla k výraznějšímu poškození cévního zásobení

nádoru. Také bylo zjištěno, že eliminace PS z těla byla poměrně rychlá, což je důležitá vlastnost, aby nedocházelo k rozvoji kožní fotosenzivity (Smirnova *et al.*, 2005).



Obr. 10 Photosens®

### Azaftalocyaniny

Nahrazením některého z hlavních uhlíků ve struktuře Pc dusíkem získáme azaftalocyaniny (AzaPc), a tím dojde ke specifickým změnám chemických a fyzikálně-chemických vlastností. (Aza)Pc absorbují světlo v oblasti obdobné jako Pc. Byly ale připraveny i deriváty s absorpcí až při vlnové délce kolem 750 nm, a proto mohou být vhodné k léčbě hlouběji uložených lézí. Kvaternizace periferních aminů se zdá být klíčová pro dobrou fotodynamickou aktivitu a vysoký kvantový výtěžek <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (Miletín *et al.*, 2018, Zimčík *et al.*, 2010).

V roce 2015 tak byl naší vědeckou skupinou poprvé publikován způsob přípravy substituovaných (Aza)Pc z podskupiny tetra(3,4-pyrido)porfyrasinů (TPyPzs) – do té doby byly známy jen obměny centrálního kovového iontu nebo kvaternizace pyridinového dusíku TPyPz jádra. Jedná se o fotodynamicky velmi aktivní sloučeniny s absorpčním maximem 712-806 nm – tedy v oblasti dosahující až blízké infračervené oblasti (Váchová *et al.*, 2015). Další *in vitro* výzkum TPyPzs substituovaných hydrofilními substituenty vedl k syntéze kationtového derivátu nesoucího kvaternizované pyridinové a imidazolylové dusíky, který se ukázal být jedním z nejúčinnějších PS, jaké byly dosud syntetizovány. Tento PS vykazoval výjimečně dobrou fotodynamickou aktivitu na řadě nádorových linií buněk, měl velmi nízkou toxicitu bez ozáření a vysokou schopnost vyvolat fotopoškození. Tento derivát má tedy

velký potenciál být využíván v rámci PDT k léčbě cílené na cévy (VTP) (Macháček *et al.*, 2016).

Další studie ukázaly, že kationtové (Aza)Pc jsou účinnější než jejich aniontové protějšky, i přes to, že jde o neagregující ve vodě rozpustné deriváty. Hlavní nevýhodou aniontových (Aza)Pc je fakt, že dochází k protonaci karboxylátových funkčních skupin v kyselém prostředí lyzozomů. Absence záporně nabitých skupin vede k vymizení odpudivých sil a k agregaci PS. Dalším faktem je vazba aniontových (Aza)Pc na sérový albumin a zhášení excitovaných stavů. (Kollár *et al.*, 2020, Macháček *et al.*, 2016)

Novější studie potvrdily, že (Aza)Pc mají velký potenciál jako PS ve PDT a je důležité je dále zkoumat (Macháček *et al.*, 2015, Kollár *et al.*, 2020).

## **5.12 Využití zvířecích modelů v PDT**

Existuje přes 400 kmenů laboratorních myší, ale nejčastěji se v preklinických PDT studiích využívá kmen BALB/c (bílé barvy), C57BL/6 (černé barvy), C3H (hnědé barvy) a DBA2 (šedé barvy). Jednotlivé kmeny laboratorních myší mají specifické kombinace hlavních histokompatibilních komplexů (MHC). Buněčná nádorová linie, která bude použita, by měla mít stejnou kombinaci MHC molekul jako daná myš, aby došlo k růstu nádoru nikoli k okamžitému odmítnutí buněk imunitním systémem. Mezi používané buněčné nádorové linie se řadí adenokarcinomy (karcinomy tlustého střeva, plic, prsu, slinivky břišní), dlaždicobuněčné karcinomy, fibrosarkom, lymfom, melanom, maligní gliom a mnoho dalších. Kromě injekčního podání nádorových buněk pod kůži (subkutánně) mohou být také injekčně podány mezi vrstvy epidermis a dermis (intradermálně) za vzniku intradermálních nádorů. Díky vysokým nákladům a náročnější manipulaci nebyly zatím větší zvířecí modely v rámci PDT příliš studovány (Silva *et al.*, 2015).

Nejčastěji používaná buněčná nádorová linie je CT-26. Jedná se o myší kolorektální karcinom, který je řazen do kategorie vysoce imunogenních nádorových buněk (Sató *et al.* 2021).

Využití potkanů v experimentech je méně, časté než používání myších modelů. Často využívané outbrední laboratorní kmeny potkanů jsou Wistar, Lewis, Sprague-Dawley a Fischer (Silva *et al.*, 2015).

Jedna ze studií, ve kterých byli jako zvířecí modely využiti potkani, se zabývala srovnáním účinků terapie samotným laserem a PDT na léčbu popálenin třetího stupně, poraněných cév a dalších vážných ran. Potkanům byly aplikovány nízké dávky PS a poraněná místa byla ozářena pomocí laseru červeným světlem o vlnové délce 632,8 až 685 nm anebo v kombinaci s infračerveným světlem o vlnové délce 1064 nm. Ve všech případech došlo ke zlepšení. Není však zřejmé, zda samotné ošetření laserem bylo provedeno s optimálními parametry pro hojení daných tkání. Obecně platí, že skupiny zvířat ozářené samotným laserem prokázaly pozitivní účinky v hojení ran, a tyto výsledky byly dále ještě zlepšeny kombinací PS a laserového světla (Peplow *et al.*, 2012).

V další studii byl využit prasečí jícen, protože myší jícen je velmi tenký a během PDT, kdy světlo proniká do hloubky 5 mm, podstatná část světla prochází dále a je absorbována až v plicích, což má za následek poškození cév v tomto životně důležitém orgánu. Při nižších dávkách nebyly plíce vážně poškozeny, avšak tyto dávky byly příliš nízké a nebyl pozorován žádný prokazatelný účinek PDT. Naproti tomu, hlavními nevýhodami prasečího modelu ve studiu PDT jsou finanční náklady. Histologie prasečí struktury jícnu je však velmi podobná jako u pacientů s Barretovým jícnem, kteří byli léčeni pomocí PDT a u kterých se vyvinulo zúžení jícnu. Výsledky těchto experimentů naznačily, že další studie by mohly ukázat, jak předejit zúžení jícnu po léčbě PDT (Perry *et al.*, 2005).

Léčba rakoviny jícnu pomocí PDT byla také studována na ovčím modelu a jako PS byl intravenózně aplikován temoporfin, který je hydrofobní a váže se na HDL a LDL částice v krvi. Farmakokinetika PS v ovčí a lidské plazmě a tkáni byla velmi podobná a také z histologického hlediska ovčí a lidský jícen vykazuje řadu shodných vlastností. Je však důležité brát v úvahu rozdílnou koncentraci lipoproteinů v ovčí a lidské krvi, což může mít vliv na farmakokinetiku. Lze ale konstatovat, že ovčí modely umožňují více realistické experimenty než při využití malých hlodavců ke studiu PDT nádorů jícnu. Dále byl ovčí model využit ve studii ke zjištění bezpečné terapeutické dávky světla, kdy



největší výhodou je možnost provedení více ozáření téhož orgánu díky délce samotného jícnu (Glanzmann *et al.*, 2009).

### **5.12.1 Farmakokinetika a distribuce fotosensitizerů**

U myšního modelu se aplikace PS nejčastěji provádí intravenózně pomocí injekční stříkačky do ocasní žíly. Další možností je podání PS do břišní dutiny (intraperitoneální) nebo přímo do nádoru (intratumorální) (Silva *et al.*, 2015).

Když je PS aplikován do krevního oběhu, musí nejdříve dosáhnout rovnováhy se složkami cirkulující krve, a to tím že se naváže na různé složky séra. Kromě toho má krev mnoho cirkulujících buněk (erytrocytů a leukocytů), které by také mohly vázat podaný PS. Cirkulující PS se také musí navázat na stěny cév a předpokládá se, že různé velikosti a vlastnosti cév v nádoru a normálních tkáních do značné míry určují, kde se bude PS hromadit a působit. Po vazbě na endotel proniká PS cévní stěnou rychlostí, která také závisí na tom, jak silná je počáteční vazba PS na tuto stěnu. U PS, který se váže silněji ke stěně cévy, bude trvat delší dobu, než projde celou stěnou cévy. Po extravazaci se PS rozptýlí po celém parenchymu cévy, orgánu nebo nádoru, do kterého byl dodán. Pokud jsou orgánem játra nebo jiný metabolicky aktivní orgán, může PS podléhat změnám díky metabolickým enzymům, ale u většiny tetrapyrrolových PS, které se běžně klinicky používají, je to nepravděpodobné. Po čase je PS vyloučen z tkáně. Ačkoli to nebylo příliš studováno, předpokládá se, že to probíhá pomocí lymfatických cest. PS se vylučuje z těla skrze játra do žluči, žlučovými cestami do střeva a z těla odchází ve stolici. Dále může být z organismu eliminován přes ledviny močí. Studování farmakokinetiky vyžaduje postupné měření koncentrace PS v tkáni, aby bylo možné sestavit časové profily. Dále analýza koncentrací PS v moči nebo ve stolici může poskytnout také konečné poločasy eliminace (Castano *et al.*, 2005).

### **5.12.2 Vybrané studie orgánové distribuce na myších modelech**

Myší modely byly použity ke studii distribuce PS v rámci PDT cílené na nádorové makrofágy, kde byl jako PS použit alginát, který je přirozeně se vyskytující aniontový polymer získaný z hnědých mořských řas. Výhodami takového PS jsou snadná rozpustnost ve vodných roztocích bez užití povrchově aktivní látky a specifická

selektivita k nádorovým buňkám, čímž dochází ke snížení nežádoucích účinků. Studie *in vivo* potvrzují velmi dobrou protinádorovou účinnost bez systémové toxicity a naznačují velký potenciál používání alginátu v rámci PDT (Tang *et al.*, 2020).

Selektivita cíleného podání PS je neustálým předmětem dalšího zkoumání nejen ve PDT. S cílem optimalizovat afinitu, selektivitu a aktivitu, byl navržen a syntetizován Pc konjugovaný s peptidy. Zvýšená selektivita byla pozorována v experimentu týkajícího se orgánové distribuce PS v myším modelu. Konjugace s peptidy zřetelně zvýšila fotodynamickou účinnost a selektivitu proti nádorovým buňkám. Vysoce hydrofilní modifikace Pc může efektivně zvýšit selektivitu PDT tím, že blokuje nespecifické interakce mezi Pc a buňkami v organismu. Další výhodou je snížená tendence Pc agregovat ve vodném prostředí, nespecifickou světlem indukovanou cytotoxicitu vůči buňkám s nízkou expresí receptorů *in vitro* (Li *et al.*, 2016).

Jedna z dalších provedených studií týkající se PDT se zabývala fluorovaným Pc a jeho nefluorovaným analogem, kdy se porovnávaly jejich spektroskopické, fotofyzikální, fotochemické a elektrochemické vlastnosti. Takováto substituce vedla ke zvýšení amfifilního charakteru Pc. Studie *in vivo* na myším modelu kmene BALB/c dále ukázala, že došlo k větší produkci ROS, což zvýšilo fototoxicitu. Dále pak vhodnější distribuci substituovaných Pc a také vyšší fotodynamickou účinnost. Potvrdilo se, že dochází k interakci mezi studovanými Pc s LDL a albuminem, což vysvětlovalo jejich příznivou distribuci v organismu. Navíc eliminace PS z nádoru byla pomalejší než ze všech ostatních tkání, což ukazuje na vyšší selektivitu PS k nádorovým buňkám. Slibné výsledky naznačují, že by tyto PS na bázi Pc mohly být užitečné ve PDT např. při léčbě karcinomu tlustého střeva (Pucelik *et al.*, 2016).

V další studii byl vyvinut PS založený na konjugaci Pc s folátovou skupinou. Takto syntetizovaný PS vykazoval zvýšenou rozpustnost ve vodě a vysokou selektivitou, protože hydrofilita glycerolových skupin může mít schopnost výrazně snížit nespecifickou afinitu Pc ke zdravým buňkám. Výsledky farmakokinetické studie v orgánech myšího modelu vykazovaly potenciál při hledání efektivnějšího postupu pro PDT s využitím Pc (Li *et al.*, 2015).

V jiné studii byla zkoumána distribuce volného hlinitého Pc (AlPc) a AlPc v kombinaci s nanočásticemi, a to s kopolymerem polyethylenglykolem-

polykaprolaktonem. Kromě zlepšení fotofyzikálních vlastností AlPc došlo ke zvýšení distribuce a vychytávání PS orgány. Fotofyzikální vlastnosti AlPc byly zlepšeny zapouzdřením AlPc do kopolymeru. Distribuce těchto PS byla sledována u myších modelů, kdy zapouzdřený AlPc vykazoval lepší cílenou aplikaci do plic, jater a sleziny. Vyvinuté kopolymerové nanočástice na bázi AlPc mají potenciál jako nanofotosenzitizéry pro PDT k řízenému zobrazování a distribuci v organismu (Asem *et al.*, 2016).

V další *in vivo* studii byla zkoumána orgánová distribuce ZnPc pro posouzení jeho možného uplatnění ve PDT. Farmakokinetické studie zjistily, že PDT může být provedena 24 h po podání PS, vzhledem k jeho vysoké koncentraci v nádoru. ZnPc nebyl v mozku nalezen, a proto je riziko toxicity v centrálním nervovém systému nepravděpodobný. Navíc se nehromadí v kůži, takže nedochází k fotosenzitivě kůže a pacient by nepotřeboval ochranu před slunečním zářením. Vysoké množství PS pozorované v duodenu naznačuje, že je z těla vylučován zejména žlučovými cestami. Tento způsob eliminace je častý pro látky rozpustné v tucích (Milla *et al.*, 2009).

## 6. CÍLE PRÁCE

- Zhodnocení celkového průběhu aniontových fotosensitizerů P44 a HK22 ze skupiny ftalocyaninů v organismu myšího modelu.
- Určení časového profilu daných PS v plazmě a moči.
- Zjištění času, ve kterém zkoumané PS dosahují maximální koncentrace v jednotlivých orgánech.
- Stanovení orgánů, ve kterých se sledované látky nejvíce hromadí.
- Celkové zhodnocení, zda jsou z hlediska farmakokinetiky vybrané PS vhodné pro použití ve PDT.

## **7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **7.1 PRACOVNÍ POMŮCKY**

- automatické pipety, různý rozsah (Eppendorf, Německo)
- sterilní plastové serologické pipety různého objemu (TPP, Švýcarsko)
- sterilní plastové špičky různého rozsahu (Eppendorf, Německo)
- Pasteurovy pipety (Brand, Německo)
- 96-jamkové mikrotitrační destičky (TPP, Švýcarsko)
- plastové sterilní centrifugační zkumavky 15 ml (TPP, Švýcarsko)
- sterilní plastové vaničky
- sterilní mikrozukavky 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml a 5 ml (Eppendorf, Německo)
- keramické kuličky z oxidu zirkonu, stabilizovaného yttriem o velikosti 1,4 až 1,6 mm (Sigmund Lindner, Německo)
- mikrozukavky se šroubovacím víčkem (SSIBio, USA)
- křemenné kyvety (Semi-Micro Cell 114F-QS LP 10x4 mm; Agilent, USA)
- stříkačkové MCE filtry 0,22 µm (Merck Millipore, USA)

### **7.2 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ**

- desková třepačka Heidolph Titramax 100 (Heidolph Instruments, Německo)
- čtečka mikrotitračních destiček Tecan Infinite M200 (Tecan Group Ltd., Švýcarsko)
- stolní centrifuga Eppendorf 5415D (Eppendorf, Německo)
- Vortex V-1 plus (Biosan, USA)
- FastPrep24 5G (MP Biomedicals, Santa Ana, Kalifornie, USA)
- FS5 Spectrofluorimeter (Edinburgh Instruments, UK)
- Prominence Liquid Chromatograph LC-20A (Shimadzu, Japonsko), který se

skládal z odplynovače (DGU-20A3), dvou čerpadel (LC-20AD), automatického dávkovače (SIL-20AC), kolonového prostoru (CTO-20AC), fluorescenčního detektoru (RF-20A) a řídicí jednotky (CBM-20A)

- chromatografický software Lab Solutions (version 5.85)

### **7.3 CHEMICKÉ LÁTKY A REAGENCIE**

- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA)
- PBS – fosfátový pufr (Sigma-Aldrich, USA)
- BSA – bovinní sérový albumin (Sigma-Aldrich, USA)
- purifikovaná ultračistá voda (MQ-voda, Millipore, USA)
- reagenty pro BCA assay (Sigma-Aldrich, USA)
- fotosenzitizer P44 (vědecká skupina prof. Zimčíka, Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy, FaF UK)
- fotosenzitizer HK22 (vědecká skupina prof. Zimčíka, Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy, FaF UK)
- rozpouštědla použita pro HPLC analýzu byla HPLC kvality a byla dodána firmou Merck (Darmstadt, Německo), Fluorochem (Velká Británie) nebo VWR (Česká republika)
- kyselina octová  $\geq 99\%$  (ReagentPlus<sup>®</sup>, Merck, Německo) a trimethylamin (Fluorochem, Velká Británie) pro přípravu triethylamonium acetátu (TEAA)

## 7.4 Použité fotosensitizéry

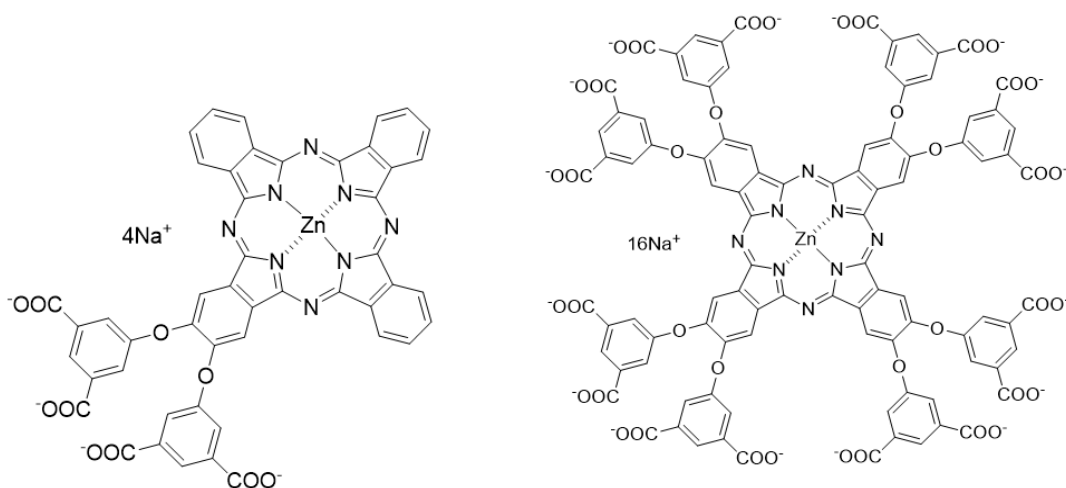
PS použité pro experimenty byly syntetizovány PharmDr. Janem Kollárem, Ph.D. na katedře Farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové ve vědecké skupině prof. PharmDr. Petra Zimčíka, Ph.D. (Azaphthalocyanine group).

### Fotosensitizér P44

P44 je nesymetrická látka amfifilního aniontového charakteru. Struktura látky obsahuje jako základ ftalocyaninové jádro s centrálně vázaným zinečnatým kationtem (Obr. 11).

### Fotosensitizér HK22

HK22 je symetrický aniontový ftalocyanin, který obsahuje centrálně vázaný zinečnatý kation a 16 karboxylátových skupin na periferii. Jedná se tedy o látku hydrofilní povahy (Obr. 11).



Obr. 11 Struktura aniontových ftalocyaninů P44 (vlevo) a HK 22 (vpravo).

## 7.5 Příprava vzorků

### 7.5.1 Experimenty *in vivo*

K provedení experimentu byly jako zvířecí modely použity myši kmene BALB/c (Charles River, USA koupené skrze Velaz, s.r.o. Česká republika), kterým byla subkutánně aplikována suspenze buněk linie kolorektálního karcinomu CT-26 (ATCC, USA). Během 7-10 dní dochází k růstu nádoru do požadované velikosti (Obr. 12).



Obr. 12 Samice BALB/c myši pod isofluranovou anestézií s nádorem vzniklým přibližně týden po inokulaci buňkami CT-26.

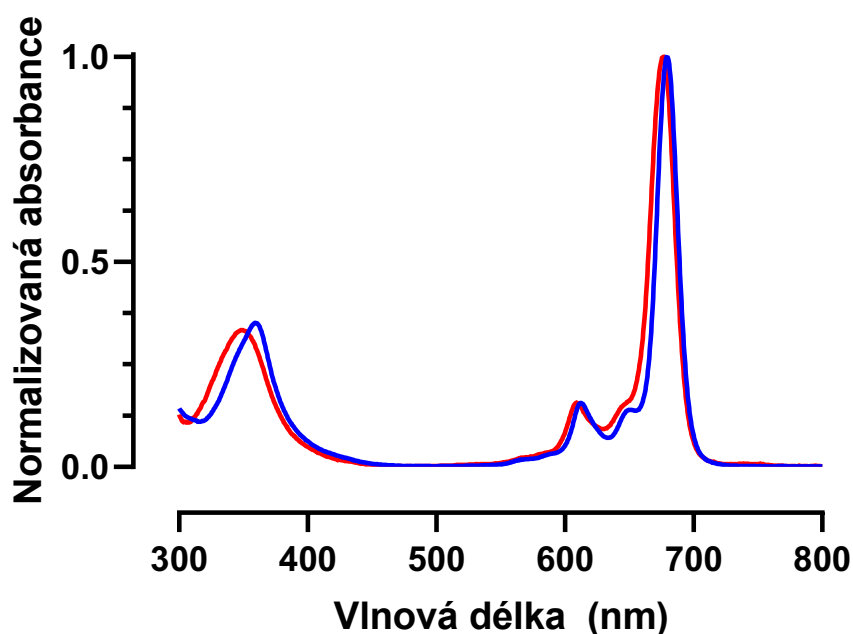
Inhalací isofluranu byla myš uvedena do celkové anestezie (4 % isofluranu pro uvedení do anestezie a 1,5 % isofluranu pro udržení anestezie) a do ocasní žíly bylo intravenózně aplikováno 50  $\mu$ l PS P44 nebo HK22 (0,1  $\mu$ mol/ kg). Po uplynutí předem stanoveného časového intervalu (30 s, 5 min, 15 min, 30 min, 1 hod, 2 hod, 4 hod, 8 hod, 12 hod a 24 hod) byla myš usmrcena zlomením vazů v celkové anestezii. Okamžitě byla odebrána moč a ze srdce byla pomocí kardiální punkce, odebrána krev do injekční stříkačky, která byla potažena heparinem. Tato krev byla při 1000 otáčkách/min po dobu 10 min stočena na centrifuze Eppendorf 5415D s rotorem F45-24-11 a následně



byla odebrána plazma. Dále byly odebrány jednotlivé orgány (ledviny, srdce, sval, slezina, játra, nádor, plíce a žlučník). K oplachu orgánů byl použit PBS. Vzorky byly umístěny do mikrozkuvek a skladovány při -80 °C až do dalšího zpracování.

### 7.5.2 Homogenizace vzorků

K jednotlivým orgánům byly přidány keramické kuličky o hmotnosti 1 g a 1000  $\mu$ l 10% Tritonu X-100 (v PBS), ve kterém mají obě studované látky monomerní spektrum (Obr. 13). Homogenizace probíhala pomocí přístroje FastPrep24 5G při rychlosti 6,5 m/s po dobu 60 s ve 3 opakováních. Po homogenizaci byly vzorky centrifugovány na centrifuze 5415D s rotorem F45-24-11 při 10 000 otáčkách/min po dobu 5 min. Ze vzniklého supernatantu bylo následně odebráno 700  $\mu$ l vzorku do nové mikrozkuvky. Takto získané vzorky byly uchovávány při teplotě -80 °C až do samotné analýzy.



Obr. 13 Spektrum P44 a HK22 v roztoku 10 % Tritonu X-100

## **7.6 Kvantifikace fotosensitizerů pomocí fluorescenčních metod**

Ke kvantifikaci látek P44 a HK22 v jednotlivých vzorcích bylo využito měření fluorescence pomocí spektrofluorimetru FS5. Emisní spektra PS byla měřena v rozsahu 650-850 nm po excitaci světlem o vlnové délce 630 nm.

### **7.6.1 Měření emisních spekter vzorků**

Do křemenné kyvety bylo pipetováno 400  $\mu$ l 10% roztoku Tritonu X-100 a 100  $\mu$ l vzorku. Poté byla kyveta třepána 2 min na vortexu a po 30 min bylo změřeno emisní spektrum. Během celého měření byla v místnosti konstantní teplota 23 °C.

Pro látku P44 byla maximální hodnota intenzity fluorescence při vlnové délce 683 nm a pro HK22 při vlnové délce 690 nm (viz Obr. 13).

### **7.6.2 Stanovení koncentrace látek P44 a HK22 v moči pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC)**

Koncentrace látek P44 a HK-22 v moči byla stanovena HPLC analýzou s fluorimetrickou detekcí P44 ( $\lambda_{exc} = 630$  nm;  $\lambda_{max} = 684$  nm) a HK22 ( $\lambda_{exc} = 630$  nm;  $\lambda_{max} = 688$  nm). Pro obě látky byla optimalizována metoda využívající kolonu Hypersil BDS C18 (100 x 4,6 mm; 2,4  $\mu$ m; Thermo Fisher Scientific) s předkolonou Guard (C18 cartridge; 4 x 2 mm ID; Phenomenex). Mobilní fáze byla složena z TEAA (50 mM, pH 6,3) (složka A) a acetonitrilu pro P44 nebo směsi acetonitril/methanol v poměru 70:30 (v/v) pro HK22 (složka B). Byla zvolena následující gradientová analýza: 1,0 min (20% B), 1,0-1,1 min (20  $\rightarrow$  60% B), 1,1-5,0 min (60  $\rightarrow$  90% B), 5,0-6,4 min (90% B), 6,4-11,0 min (20% B) pro látku P44. Pro látku HK22 byl zvolen gradient: 1,0 min (20% B), 1,0-1,1 min (20  $\rightarrow$  60% B), 1,1-4,1 min (60  $\rightarrow$  90% B), 4,1-5,5 min (90% B), 5,5-5,6 min (90  $\rightarrow$  20% B), 5,6-11,0 min (20% B). Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min, nástřik 10  $\mu$ l vzorku. Teplota kolonového prostoru byla nastavena na 50 °C.

Vzorky pro analýzu byly připraveny smícháním 20  $\mu$ l moči s 80  $\mu$ l směsi mobilní fáze A/B v poměru 1:1 (v/v) pro příslušnou látku. Vzorek byl poté zfiltrován přes injekční filtr (0,22  $\mu$ m; Millex) a nastříknut v triplikátu.

Metoda pro stanovení látky P44 a HK22 v myší moči byla částečně validována dle směrnice FDA (Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry, 2018). V rámci validace byla ověřena linearita kalibrační přímky, přesnost a správnost metody. Pro obě látky (P44 a HK22) byl stanoven spodní limit kvantifikace (LLOQ) 10 ng/ml.

### 7.6.3 Sestrojení kalibračních křivek

Pro sestrojení kalibračních křivek byly využity vzorky z myší, kterým nebyl aplikován PS. Měření bylo prováděno stejným způsobem jako měření vzorků s PS, pouze s tím rozdílem, že k daným vzorkům bylo postupně přidáván roztok příslušného PS o známé koncentraci (0,1  $\mu$ M). Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním PS v PBS. Po každém přidavku zásobního roztoku k lyzátu bylo nutné čekat 30 min, a poté byla změřena emisní spektra. U vzorků jater s látkou P44 byl použit zásobní roztok o koncentraci 1  $\mu$ M. Naměřená intenzita fluorescence v místě emisního maxima (683 nm pro P44 a 690 nm pro HK22) byla použita k sestrojení kalibračních křivek.

Pro sestrojení kalibračních křivek u plazmy byla použita plazma z krve myší, kterým byl aplikováno pouze PBS. Jako zásobní roztok byly použité 4  $\mu$ M roztoky příslušných PS. Naměřená intenzita fluorescence v místě maxima (684 nm pro P44 a 687 nm pro HK-22) byla použita k sestrojení kalibračních křivek.

Kalibrační přímka pro moč (rozsah 10-2000 ng/ml) byla složena z osmi kalibračních úrovní 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 a 2000 ng/ml. Každá kalibrační úroveň byla připravena přidavkem 2  $\mu$ l vodného zásobního roztoku stanovované látky o odpovídající koncentraci k 48  $\mu$ l vody a následně bylo přidáno 200  $\mu$ l příslušné směsi mobilní fáze A/B v poměru 1:1 (v/v). Kalibrační roztok byl poté zfiltrován přes injekční filtr (0,22  $\mu$ m; Millex) a nastříknut v triplikátu. Stejným způsobem byly připraveny vzorky pro kontrolu kvality (QC) o koncentraci 10, 25, 250 a 2000 ng/ml příslušné látky. Kalibrační křivka byla sestavena metodou lineární regrese nejmenších čtverců v programu Microsoft® Excel® (Microsoft 365 MSO). Neznámá koncentrace HK22 a P44 byla poté vypočítána dosazením průměrné plochy píku do lineární rovnice kalibrační přímky. Stanovené látkové množství látek P44 a HK22 bylo vztaženo na celkový objem získané myší moči a prezentováno ve formě pmol/zvíře.

## **7.7 Stanovení množství proteinů v plazmě**

Stanovení množství proteinů v jednotlivých vzorcích plazmy bylo provedeno metodou BCA, která využívá sodné soli kyseliny bicinchoninové, která komplexuje měďné ionty tvořené reakcí peptidové vazby s měďnatými ionty. Tato metoda byla kalibrována na standardy, a proto byla nejdříve rozpuštěním bovinního sérového albuminu (BSA) v MQ-vodě připravena koncentrační řada roztoků o koncentracích 0, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 a 2000  $\mu\text{g/ml}$ , která sloužila k sestavení kalibrační přímky. Do 96-jamkové mikrotitrační destičky bylo pipetováno vždy v triplicátu 10  $\mu\text{l}$  kalibračních roztoků a všech vzorků. Jelikož jsou vzorky v 10% roztoku Tritonu X-100 a koncentrační řada BSA je připravena v MQ-vodě, muselo být přidáno 10  $\mu\text{l}$  MQ-vody ke všem vzorkům a stejný objem 10% roztoku Tritonu X-100 ke kalibračním roztokům. Pracovní roztok BCA byl připraven smícháním 4 %  $\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  a zásobního roztoku BCA v poměru 1:50. Pipetovaný objem pracovního roztoku činil 200  $\mu\text{l}$  a byl přidán ke všem vzorkům v jamkách na mikrotitrační destičce. Vzorky byly inkubovány v buněčném inkubátoru po dobu 30 min při 37 °C. Poté byla změřena absorbance na čtečce mikrotitračních destiček Tecan Infinite M200 při 562 nm.

Kvůli vysoké absorbanci musely být všechny vzorky před měřením ředěny 20 $\times$  pomocí MQ-vody.

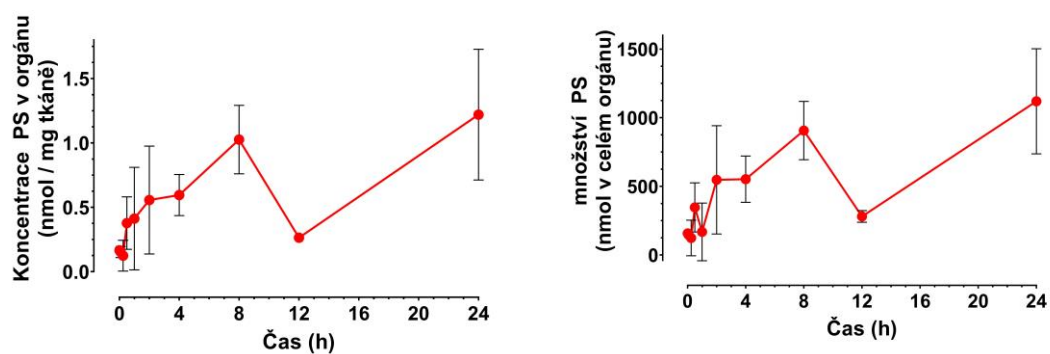
## **7.8 Vyhodnocení výsledků**

Hodnoty koncentrace PS v homogenizovaném vzorku byly odečteny z kalibračních přímek. Následně bylo vypočítáno množství látky v celém orgánu, plazmě a moči. Ze získaných výsledků byly v programu GraphPad Prism sestrojeny grafy vyjadřující závislost množství daných PS v homogenizovaném vzorku na čase. Hodnoty jsou vyneseny jako průměr tří měření  $\pm$  směrodatná odchylka (SD).

## 8. VÝSLEDKY

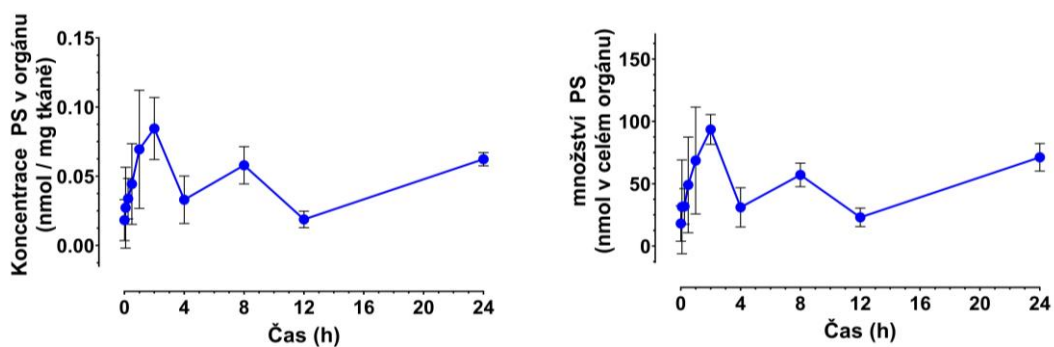
### 8.1 Vyhodnocení orgánové distribuce

#### 8.1.1 Játra



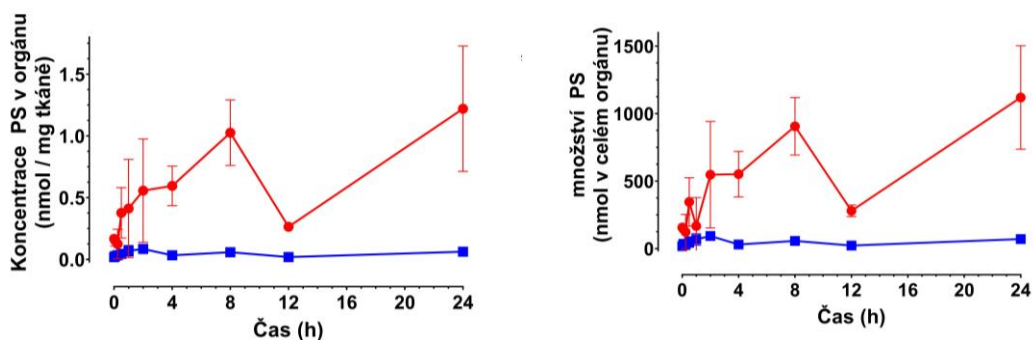
Obr. 14 Časový profil látky P44 v játrech.

Nárůst látky P44 (Obr. 14) v játrech nastal po podání a pokračoval i v následujících hodinách. Maximální koncentrace PS (1,22 nmol/mg tkáně, resp. 1,12  $\mu$ mol v celém orgánu) byla v čase 24 h. Z toho vyplývá, že látka P44 se v játrech deponuje a není z nich během 24 h od podání eliminována.



Obr. 15 Časový profil látky HK22 v játrech.

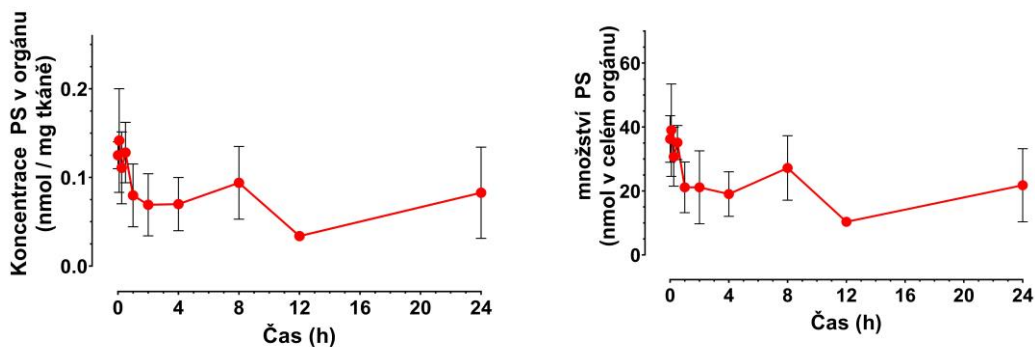
Naproti tomu, látka HK22 (Obr. 15) se v játrech téměř nedeponovala. K mírnému nárůstu docházelo v prvních dvou hodinách (84,5 pmol/mg tkáně, resp. 93,58 nmol v celém orgánu v čase 2 h).



Obr. 16 Porovnání časových profilů látek P44 (červená) a HK22 (modrá) v játrech.

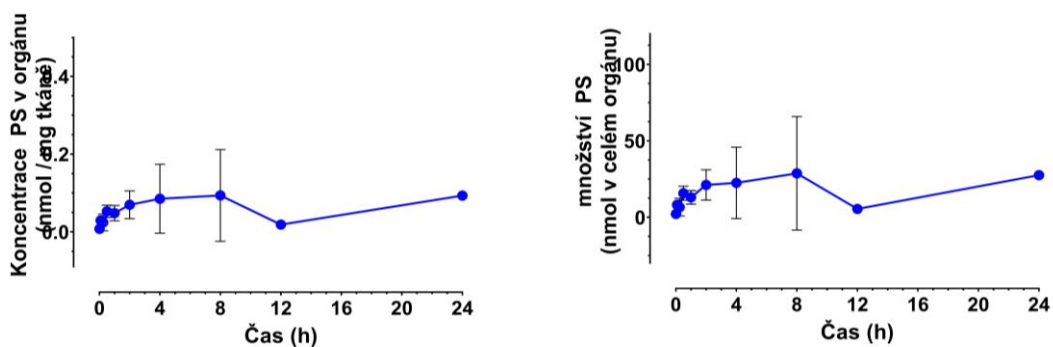
Množství látky HK22 v játrech je v porovnání s látkou P44 velmi nízké (Obr. 16).

### 8.1.2 Ledviny



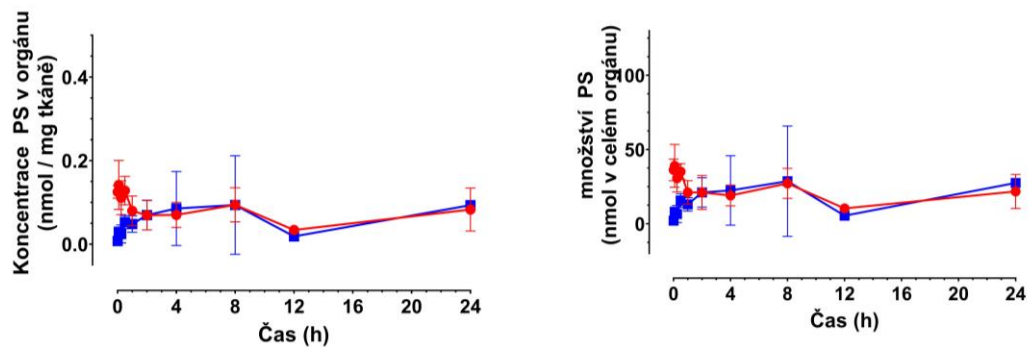
Obr. 17 Časový profil látky P44 v ledvinách.

PS P44 (Obr. 17) se v ledvinách objevila již v nejkratším čase (30 s od i.v. podání) a nejvyšší koncentrace (141,6 pmol/mg tkáně, resp. 39,01 nmol v celém orgánu) dosahovala v čase 5 min a poté se látka z ledvin postupně eliminovala.



Obr. 18 Časový profil látky HK22 v ledvinách.

U látky HK22 (Obr. 18) nárůst začal pozvolna s nízkým maximem kolem 8. h od i.v. podání látky. Koncentrace 93,6 pmol/mg tkáně (resp. 28,71 nmol v celém orgánu) byla v čase 8 h maximální. Poté dochází k postupné eliminaci z ledvin.

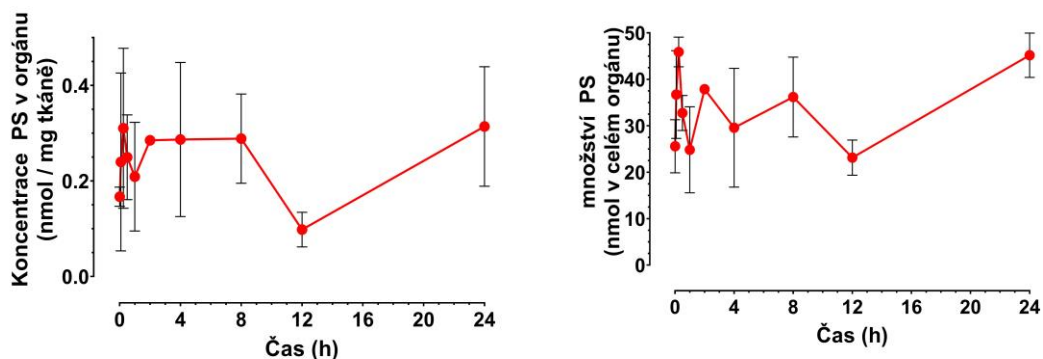


Obr. 19 Porovnání časových profilů látek P44 (červená) a HK22 (modrá) v ledvinách.

Látka P44 se v ledvinách objevila rychle po podání na rozdíl od látky HK22, která měla pomalejší nárůst koncentrace. U obou látek nedošlo k úplné eliminaci z ledvin během 24 h (Obr. 19).

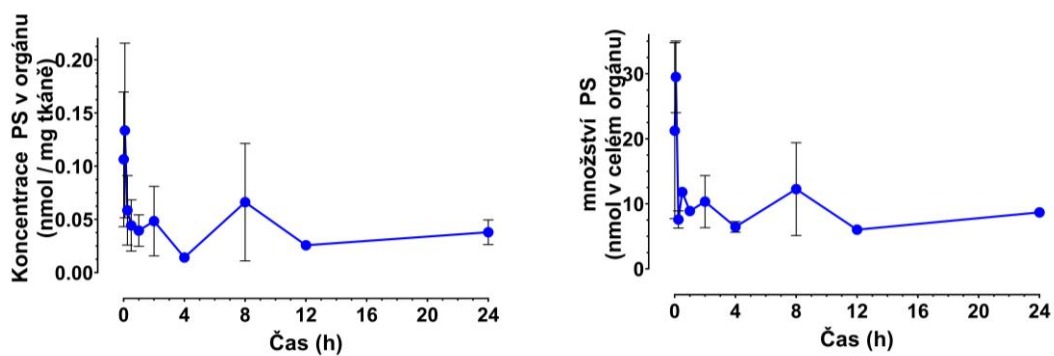


### 8.1.3 Slezina



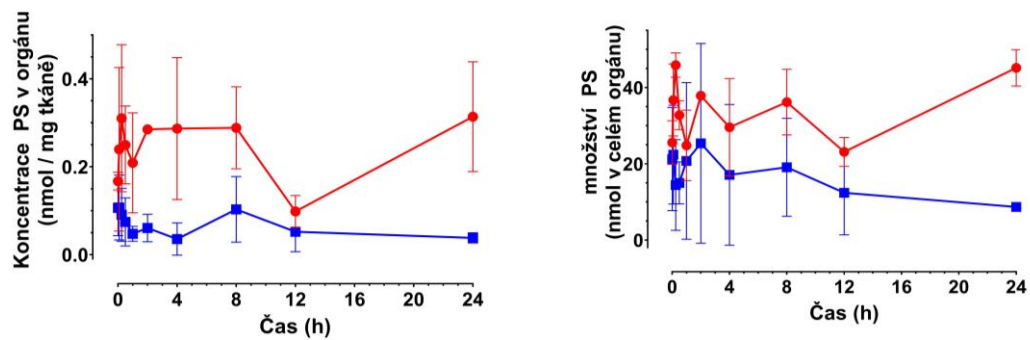
Obr. 20 Časový profil látky P44 ve slezině.

Množství PS P44 (Obr. 20) ve slezině narůstalo od podání látky prvních 15 min s následným ustálením koncentrace ve tkáni. Nejvyšší koncentrace dosáhla 24 h od i.v. podání (313,9 pmol/mg tkáně, resp. 45,18 nmol v celém orgánu), což je v porovnání s množstvím v 15 min zanedbatelný rozdíl (310,3 pmol/mg tkáně, resp. 45,89 nmol v celém orgánu).



Obr. 21 Časový profil látky HK22 ve slezině.

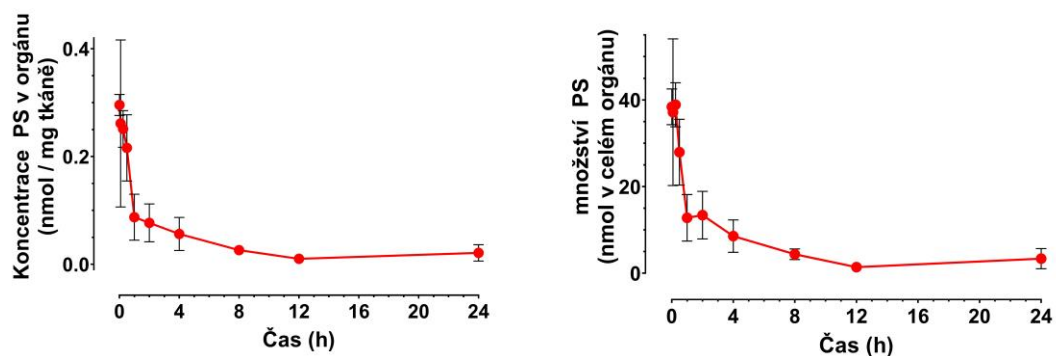
Nárůst látky HK22 (Obr. 21) nastal ihned po podání. Maximální koncentrace PS (133,5 pmol/mg tkáně, resp. 29,51 nmol v celém orgánu) byla v čase 5 min a pak dochází k postupné eliminaci.



Obr. 22 Porovnání časových profilů látek P44 (červená) a HK22 (modrá) ve slezině.

Z grafů (Obr. 22) vyplývá, že látka P44 nebyla ze sleziny během 24 h eliminována, zatímco látka HK22 ano.

### 8.1.4 Plíce

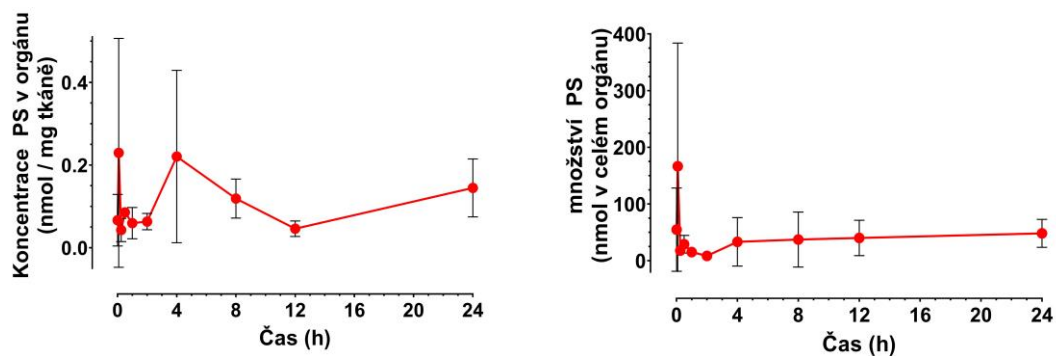


Obr. 23 Časový profil látky P44 v plicích.

Látka P44 (Obr. 23) se v plicích objevila během 30 s od podání a v tomto čase také koncentrace látky (295,7 pmol/ mg tkáně, 38,41 nmol v celém orgánu) dosahovala maxima. Poté se rychle eliminovala plic.

Koncentrace látky HK22 v lyzátu tkáně byla pod limitem detekce.

### 8.1.5 Nádor

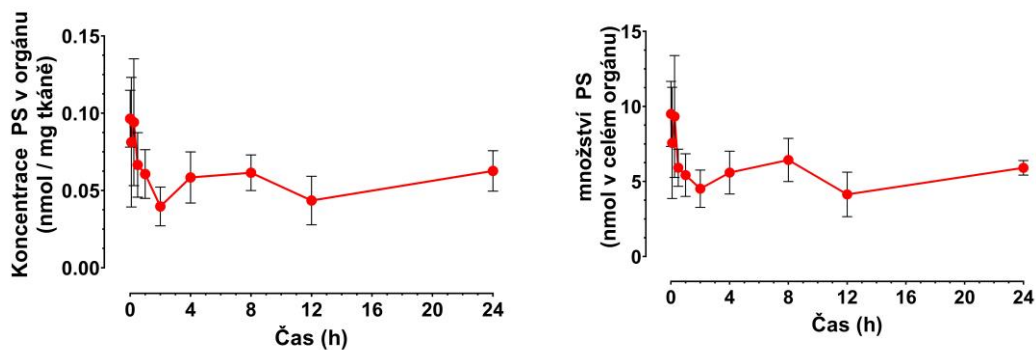


Obr. 24 Časový profil látky P44 v nádoru.

Nárůst PS P44 (Obr. 24) byl zaznamenán již během prvních 30 s po podání. V čase 5 min dosahovala koncentrace látky maxima (229,4 nmol/ mg tkáně, resp. 166,55 nmol v celém orgánu). Poté nastala postupná eliminace, takže nedochází k ukládání tohoto PS do nádorové tkáně.

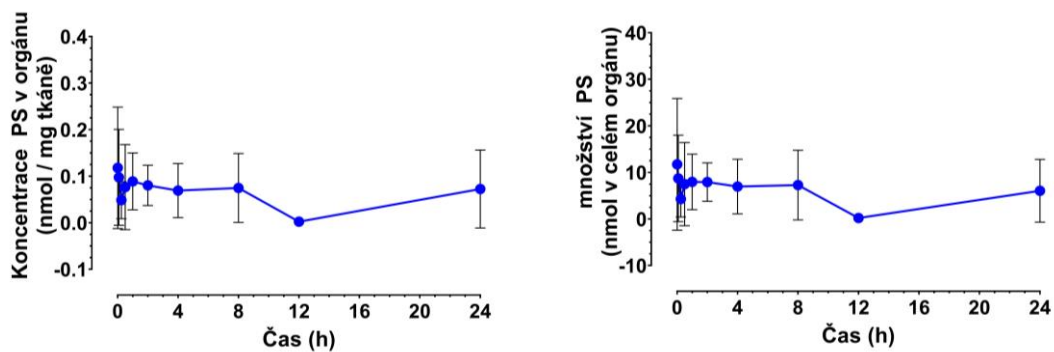
Koncentrace látky HK22 byla pod limitem detekce.

### 8.1.6 Srdce



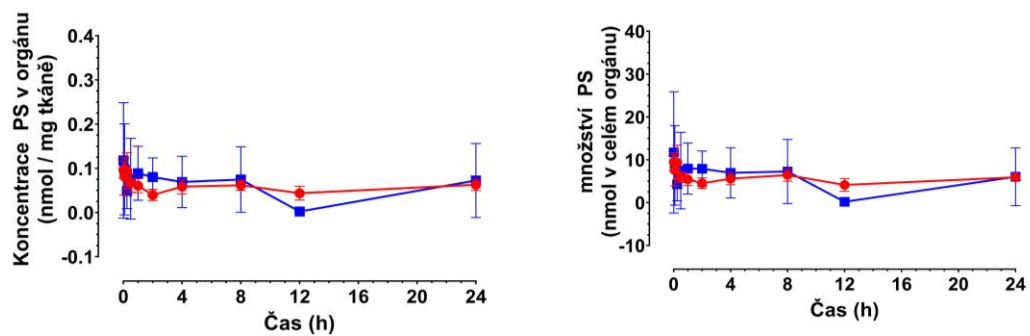
Obr. 25 Časový profil látky P44 v srdci.

Nárůst látky P44 (Obr. 25) byl okamžitý a maximální koncentrace (96,5 pmol/mg tkáně, 9,52 nmol v celém orgánu) byla již v čase 30 s. Poté došlo k postupné eliminaci.



Obr. 26 Časový profil látky HK22 v srdci.

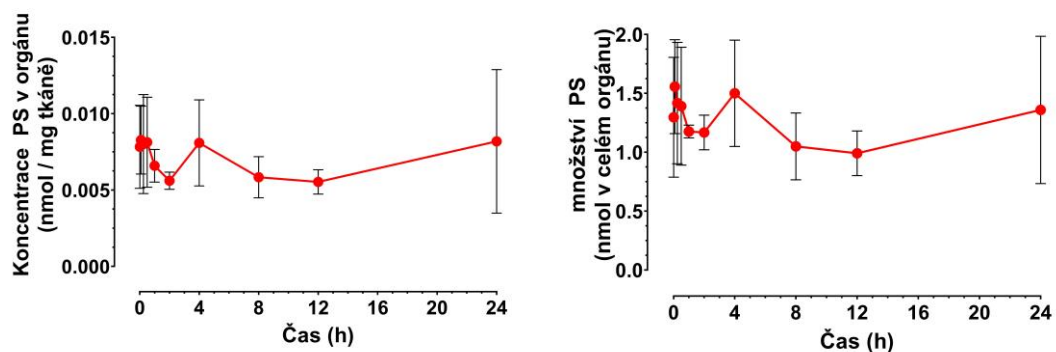
Časový profil PS HK22 (Obr. 26) v srdci byl obdobný jako u látky P44 s maximem také v prvních 30 s od podání (117,9 pmol/mg tkáně, 11,72 nmol v celém orgánu) s následnou eliminací.



Obr. 27 Porovnání časových profilů látek P44 (červená) a HK22 (modrá) v srdci.

Průběh a množství obou látek byl v srdci velmi podobný (Obr. 27).

### 8.1.7 Sval



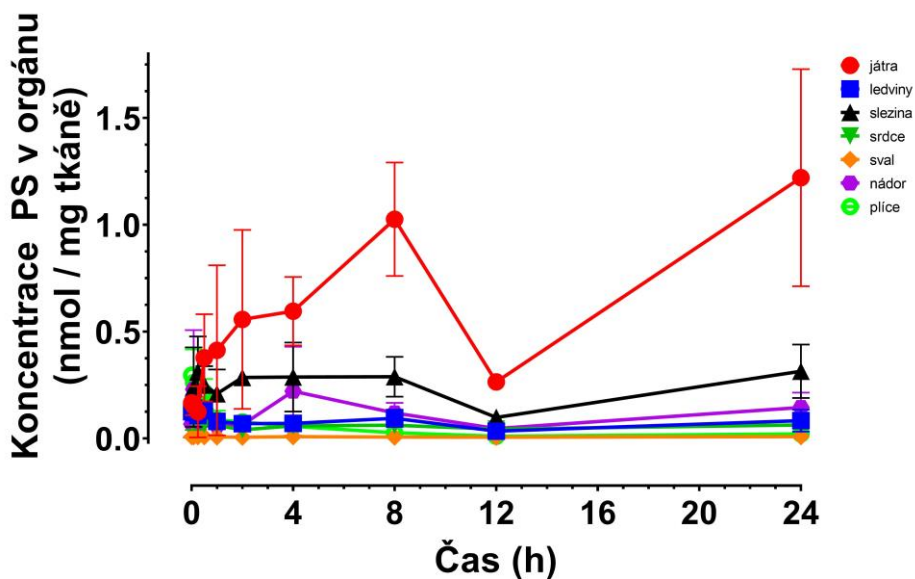
Obr. 28 Časový profil látky P44 ve svalu.

Látka P44 (Obr. 28) se v srdci objevila v minimální koncentraci. Nejvyšší koncentrace (8,3 pmol/mg tkáňe, 1,56 nmol v celém orgánu) látka dosahovala v čase 5 min. Tato látka se ve svalu neukládá.

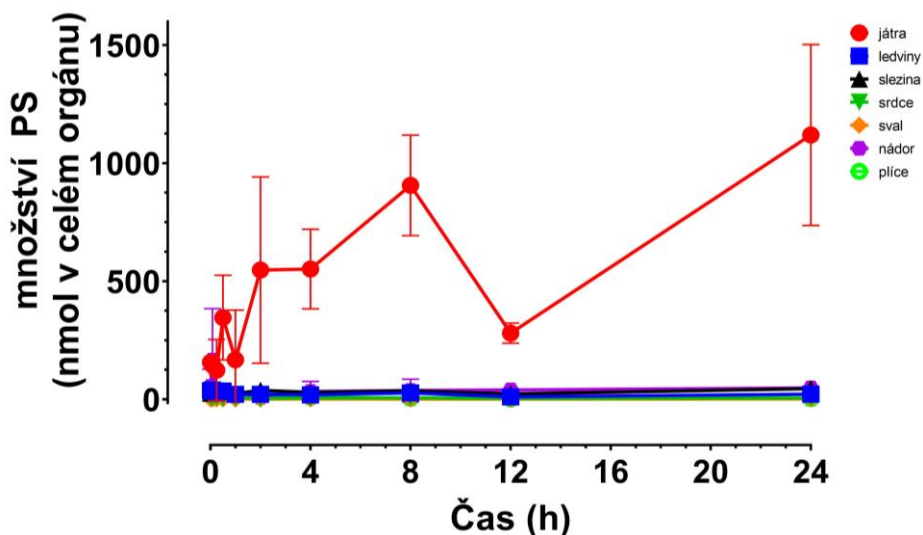
Koncentrace látky HK22 byla pod limitem detekce.

### 8.1.8 Celkový průběh látky P44 v myším organismu

Látka P44 (Obr. 29 a 30) se nejvíce deponuje v játrech a není z nich během 24 h vyloučena. V ostatních orgánech byla detekována ve velmi nízkém množství, přičemž v případě tkáně šlo o nejnižší hladiny.



Obr. 29 Celkový průběh látky P44 v myším organismu.

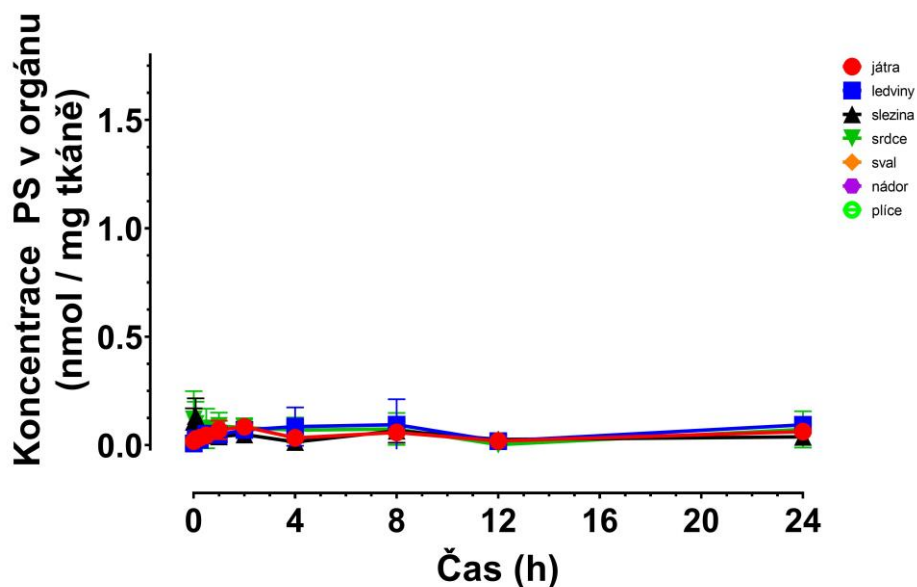


Obr. 30 Celkový průběh látky P44 v myším organismu (vztaženo na celý orgán)

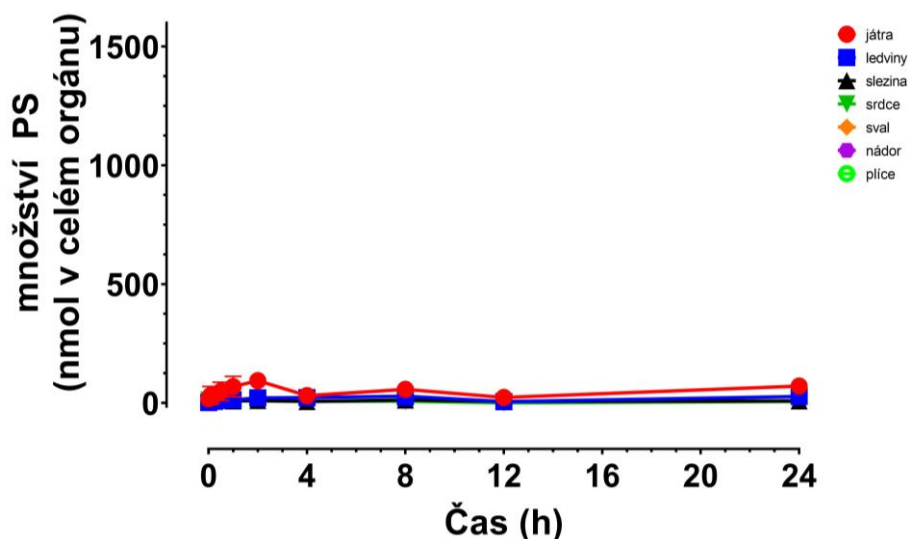


### 8.1.9 Celkový průběh látky HK22 v myším organismu

Látka HK22 (Obr. 31 a 32) byla detekována ve většině orgánů ve velmi nízkém množství. V lyzátu svalů, nádoru a plicích byla koncentrace látky tak nízká, že ji vůbec nebylo možné pomocí této metody detekovat.

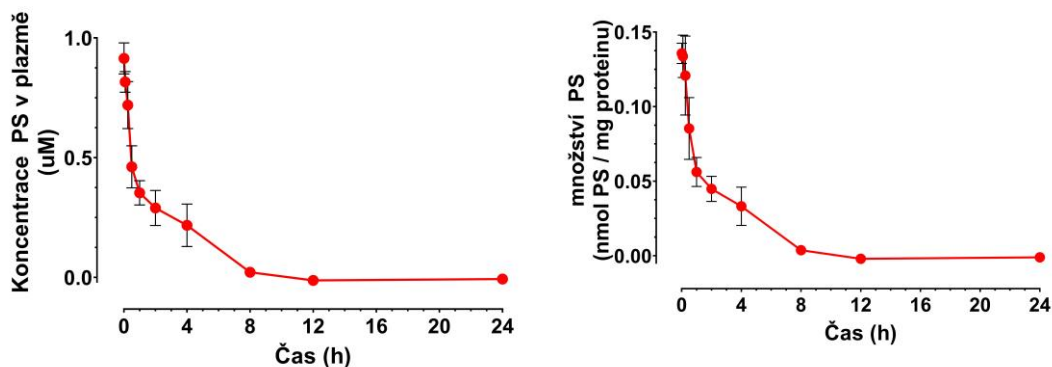


Obr. 31 Celkový průběh látky HK22 v myším organismu.



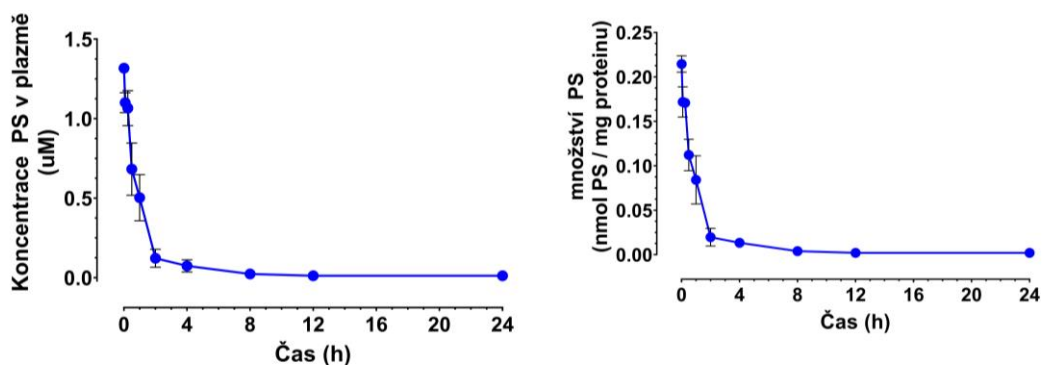
Obr. 32 Celkový průběh látky HK22 v myším organismu (vztaženo na celý orgán).

## 8.2 Časový profil látek P44 a HK22 v plazmě



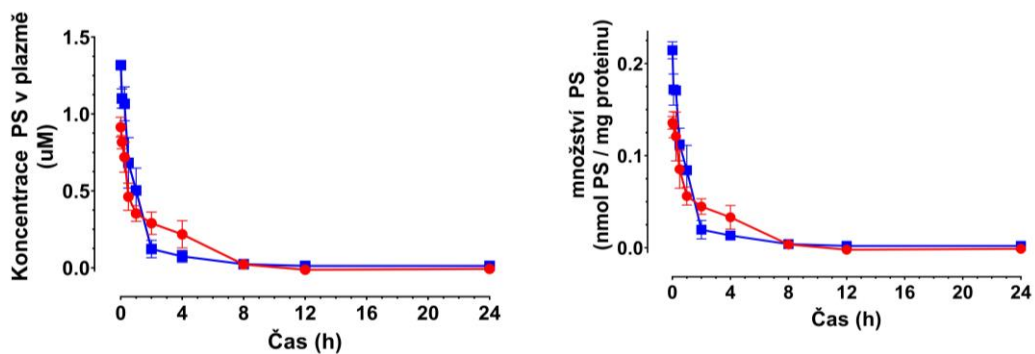
Obr. 33 Časový profil látky P44 v plazmě.

Látka P44 (Obr. 33) dosahuje nejvyšší koncentrace ihned po podání (nejkratší čas 30 s od i.v. podání), a poté dochází k její postupné eliminaci z tohoto kompartmentu. V čase 12 h byla koncentrace PS v plazmě pod limitem detekce.



Obr. 34 Časový profil látky HK22 v plazmě.

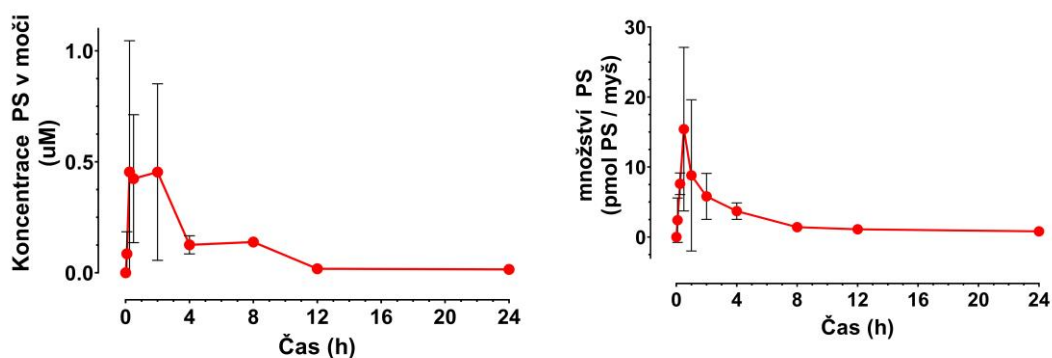
Průběh látky HK22 (Obr. 34) byl obdobný jako v případě látky P44. I zde byla koncentrace PS v plazmě v čase 12 h pod limitem detekce.



Obr. 35 Porovnání časových profilů látek P44 (červená) a HK22 (modrá) v plazmě.

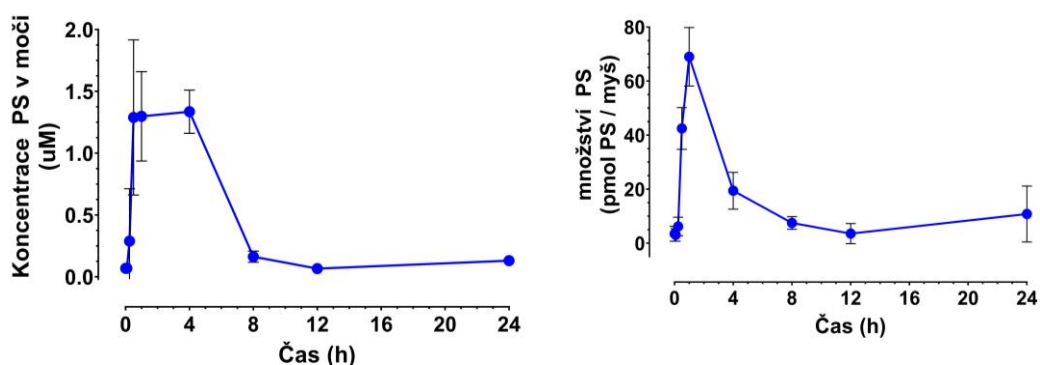
Ve 30 s od i.v. podání (nejkratší interval odběru vzorků) měla látka HK22 v plazmě vyšší maximální koncentraci než látka P44. U obou látek došlo k rychlé eliminaci z plazmy (Obr. 35), která byla úplná během 12 h, přesto k ní docházelo u amfifilní P44 pomaleji než u hydrofilní HK22.

### 8.3 Časový profil látek P44 a HK22 v moči



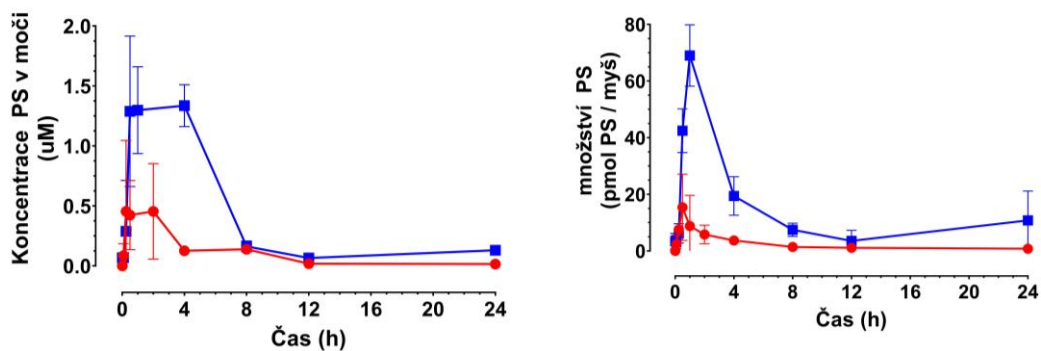
Obr. 36 Časový profil látky P44 v moči.

Látka P44 (Obr. 36) dosáhla nejvyšší koncentrace v časech mezi 30 min a 2 h od podání, a poté došlo k postupnému snížení během následujících osmi hodin.



Obr. 37 Časový profil látky HK22 v moči.

Látka HK22 (Obr. 37) se v moči objevila ve vyšších koncentracích (v porovnání s P44), přičemž maximálních hodnot dosahovala v časech 1 až 4 h od i.v. podání.



Obr. 38 Porovnání časových profilů látek P44 (červená) a HK22 (modrá) v moči.

V případě obou látek (Obr. 38) došlo k rychlému nárůstu koncentrace v moči po i.v. podání s maximem v prvních hodinách a následným snížením. Maximální koncentrace P44 v moči byla v porovnání s HK22 nižší.

## 9. DISKUSE

Nádorová onemocnění jsou v České republice druhou nejčastější příčinou úmrtí. Ročně na nádorová onemocnění umře více než 27 tisíc pacientů (SZÚ, 2007). V evropském srovnání stojí Česká republika v incidenci zhoubných nádorů na 16.–17. místě, u řady nádorových diagnóz obsazujeme přední místa evropských statistik (např. u zhoubných nádorů ledvin 2. místo, u zhoubných nádorů slinivky břišní 3. místo, u zhoubných nádorů žlučníku a žlučových cest 3.–5. místo a u zhoubných nádorů prostaty 8. míst) (ÚZIS ČR, 2021).

PDT je vedle chemoterapie, radioterapie a imunoterapie jednou z dalších možností léčby nádorových onemocnění. Jedná se o moderní a minimálně invazivní formu léčby různých typů nádorů, která vykazuje velmi dobré léčebné výsledky a možnost souběžného využití PDT s jinými léčebnými metodami. PDT byla úspěšně použita v dermatologii, onkologii, gynekologii, urologii a dalších oborech. PDT je založena na lokální nebo systémové aplikaci PS, který se selektivně hromadí v nádorových buňkách (Kwiatkowski *et al.*, 2018).

Po ozáření nádoru světlem o vhodné vlnové délce, většinou laserem, dojde k aktivaci PS a dochází ke vzniku fotochemické reakce, při které jsou tvořeny ROS, a to především  $^1\text{O}_2$ . Tyto vysoce toxické molekuly mají schopnost vyvolat buněčnou smrt, která se projeví odumíráním ozářené tkáně (Gursoy *et al.*, 2013).

PS jsou přírodní nebo syntetické látky, které absorbují světelnou energii. V klinické praxi má vhodný PS řadu vlastností, jako je komerční dostupnost, absence toxického působení až do své aktivace, hydrofilní charakter pro snadnou systémovou aplikaci a dostatečná produkce ROS. PS by se měl ukládat jen v nádorové tkáni, ze které by měl být jen pomalu eliminován. Naopak ze zdravých tkání by měl být eliminován relativně rychle. Jelikož zatím žádný klinicky využívaný PS nemá ideální vlastnosti, probíhá neustálý výzkum nových typů PS (Allison *et al.*, 2013, Kwiatkowski *et al.*, 2018).

Hlavním nežádoucím účinkem v kontextu PDT může být kožní fotosenzitivita. PS, který je nahromaděný v kůži, je aktivován denním světlem, a může způsobit otoky, zarudnutí, vyrážky až puchýře. Proto je třeba se vyhýbat expozici světla a přímého

slunečního záření po dobu několika hodin až týdnů do vyloučení PS z těla (záleží na typu PS). U většiny pacientů však dochází k relativně rychlé eliminaci PS z těla (Konopka *et al.*, 2007).

Díky dobrým výsledkům ve PDT byla řada PS zavedena do klinické praxe. Mezi komerčně dostupné PS řadíme porfimer sodný (komerčně dostupný jako Photofrin®). Jedná se o nejrozšířenější a klinicky nejpoužívanější PS, který jako první schválila FDA k léčbě nádorů močového měchýře v Kanadě v roce 1993 (Taquet *et al.*, 2007).

V Rusku je schválený pro léčbu PDT sulfonovaný hydroxyhlinitý ftalocyanin známý pod komerčním názvem Photosens®. Jedná se o směs di-, tri – a tetrasulfonovaných derivátů Pc (Ali *et al.*, 2018).

Další PS, které mají slibné výsledky, jsou deriváty bakteriochlorinu, které obsahují palladium, a jsou známe pod názvem padoporfin (WST09, TOOKAD®) a padeliporfin (WST11, TOOKAD® Soluble), jakožto novější derivát rozpustný ve vodě. Tyto PS byly testovány v klinických studiích pro léčbu karcinomu prostaty a dosahovaly velmi slibných výsledků (Abrahamse *et al.*, 2016). A proto v roce 2017 byly tyto PS schváleny pro VTP nádorů prostaty (EMA, 2017).

Pc jsou syntetické makromolekuly odvozené od porfyriu, které jsou tvořeny čtyřmi isoindolovými kruhy spojenými azamethinovými můstky a jsou řazeny do skupiny PS 2. generace. Pc se obvykle připravují ve formě komplexů s kationty kovů, jako jsou např. zinek, hliník a gallium, koordinovaných do středu makrocyclu. Fotofyzikální vlastnosti Pc jsou silně ovlivněny přítomností a povahou centrálního kovového iontu. Pc jsou intenzivně studovány jako PS ve PDT díky svým dobrým vlastnostem, mezi něž patří chemická stabilita za fyziologických podmínek, selektivita k nádorovým buňkám, rychlá eliminace z těla, nízká cytotoxicita bez ozáření a vysoká produkce ROS (Carobeli *et al.*, 2021). Pc se jeví jako potenciálně slibnější PS ve PDT než porfyryny, protože na rozdíl od porfyriu absorbují světlo v rozmezí optického okna tkáně (Chilakamarbhi *et al.*, 2017).

Velkou nevýhodou planárních a lipofilních Pc je jejich nízká rozpustnost ve vodě. Ve vodném prostředí mají tendenci agregovat, což snižuje stabilitu tripletových stavů, a to vede ke snížené schopnosti produkovat  $^1\text{O}_2$  a ke snížení celkové účinnosti

PDT. Proto jsou neustále zkoumány nově substituované Pc (Carobeli *et al.*, 2021). Ke zvýšení rozpustnosti Pc se například využívají aniontové substituenty, jako jsou sulfátové, karboxylátové a fosfátové skupiny. V závislosti na počtu karboxylátových skupin a hodnotě pH prostředí jsou polykarboxylátové Pc dobře rozpustné ve vodných roztocích (Li *et al.*, 2019).

Tato práce se zabývala celkovým zhodnocením průběhu orgánové distribuce vybraných PS v myším modelu. PS použité pro naše experimenty byly syntetizovány PharmDr. Janem Kollárem, Ph.D. na katedře Farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové ve vědecké skupině prof. PharmDr. Petra Zimčíka, Ph.D. (Azaphthalocyanine group).

Vybrané PS ze skupiny aniontových Pc byly v minulosti v naší vědecké skupině nejdříve zkoumány na buněčné úrovni v *in vitro* podmínkách, a jelikož v těchto podmínkách byly účinné a aktivní při nízkých dávkách, byly vybrány k dalším experimentům *in vivo*. Látka P44 je amfifilního aniontového charakteru a látka HK22 je hydrofilního aniontového charakteru. Obě látky obsahují jako základ ftalocyaninové jádro s centrálně vázaným zinečnatým kationtem.

Experimenty byly prováděny na myším modelu kmene BALB/c (bílé barvy), který byl subkutánně naočkován buněčnou nádorovou linií CT-26 (myší kolorektální karcinom). Celkový průběh aniontových PS P44 a HK22 byl sledován v časech 30 s, 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h a 24 h po i.v. podání do ocasní žíly myši.

Studium distribuce PS je důležitým parametrem jak pro zvýšení účinnosti PDT, tak pro snížení vedlejších účinků, včetně toxicity. Farmakokinetika, která představuje kinetický aspekt distribuce, je rovněž důležitá pro zvážení účinnosti PDT.

V další studii, zabývající se distribucí PS v rámci PDT cílené na nádorové makrofágy, byl jako PS použit alginát, který je přirozeně se vyskytující aniontový polymer získaný z hnědých mořských řas. Experiment byl proveden pomocí optického emisního spektrometru. *In vivo* a *ex vivo* fluorescenční metoda ukázala, že se PS objevily hlavně v místě nádoru po 1 h od podání a poté se distribuoval po celém těle až do 4 h od aplikace. Poté fluorescenční signály PS v těle progresivně klesaly a po 24 h došlo k eliminaci z orgánů kromě nádoru, kde v čase 8 h koncentrace PS dosáhla



maxima a poté klesala. I po 24 h si ale místo nádoru stále udržovalo silný fluorescenční signál. Rychlé vylučování z jiných částí těla, selektivní akumulace a prodloužená retence v místě nádoru jednoznačně prokazuje vhodnost použitého PS. U dalších orgánů (srdce, játra, slezina, plíce a ledviny) přitom nebylo pozorováno žádné znatelné poškození, což naznačuje, že použitý PS nemá toxické vedlejší účinky (Tang *et al.*, 2020).

V další publikované studii byly navrženy a syntetizovány Pc konjugované s peptidy. Tato modifikace vedla k výraznému zvýšení hydrofility Pc. Studie distribuce ukázala, že takto modifikované Pc se v čase 6 h po podání nejvíce hromadily uvnitř nádoru a jater, postupem času došlo k eliminaci z jater, a naopak ke zvýšení koncentrace v nádoru. Po 18 h byl nárůst PS pouze u nádoru a z ostatních orgánů byl eliminován. Konjugace s peptidy zřetelně zvýšila fotodynamickou účinnost a selektivitu proti nádorovým buňkám (Li *et al.*, 2016).

Jedna z dalších provedených studií porovnávala fluorovaný Pc a jeho nefluorovaný analog. Takováto substituce vedla ke zvýšení amfifilního charakteru Pc. Koncentrace Pc byly stanoveny v nádoru, svalu, kůži, játrech, srdci, slezině, ledvinách a střevech v časech 15 min a 3 h. Fluorovaný analog vykazoval zvýšenou akumulaci v nádoru. V intervalu 15 min i 3 h byla hladina fluorovaného PC v kůži nižší než u hydrofobnější látky. Výsledky ukazují, že amfifilní charakter Pc zlepšil jeho vlastnosti pro využití ve PDT (Pucelik *et al.*, 2016).

V další studii byly vyvinuty PS založené na konjugaci Pc s folátovou skupinou. Byly porovnávány dva deriváty, kdy jeden v orgánové distribuci vykazoval lepší výsledky než druhý, protože v čase 3 h po podání byla koncentrace v nádoru velmi vysoká, zatímco koncentrace v jiných orgánech (včetně jater, sleziny, srdce, ledvin a plic) byla rychle snížena. Po 7 h od podání byl PS nahromaděn jen v nádoru a z ostatních orgánů byl eliminován. Takto syntetizovaný PS vykazoval zvýšenou rozpustnost ve vodě s vysokou selektivitou, protože hydrofilita glycerolových skupin může mít schopnost výrazně snížit nescifickou afinitu Pc ke zdravým buňkám (Li *et al.*, 2015).

V roce 2016 byla publikována studie porovnávající distribuci volného hlinitého Pc (AlPc) a AlPc v kombinaci s nanočásticemi, a to s kopolymerem polyethylenglykol-

polykaprolaktonem. Tato studie však byla omezena pouze na distribuci PS u zdravých myší. *Ex vivo* vyšetření orgánů ukázalo zvýšenou koncentraci u AIPc v kombinaci s nanočásticemi v plicích, játrech a slezině v porovnání s volným AIPc. Celkové zhodnocení distribuce ukázalo, že se modifikovaný AIPc nejvíce hromadil v plicích. Další zkoumání *in vivo* navíc ukázalo, že lék byl schopen projít hematoencefalickou bariérou a dostat se v menší míře až do mozku (Asem *et al.*, 2016).

Farmakokinetika nové lipozomální formy Photosens® na bázi hlinitých sulfoftalocyaninových solí byla studována ve srovnání s nemodifikovaným Photosens®. Ze studie vyplynulo, že kumulace PS v kůži byla pro oba typy PS po dobu trvání léčby podobná. Ve všech časech byla koncentrace modifikovaného PS v těle významně vyšší, také selektivita kumulace modifikovaného Photosens® byla v nádoru výrazně lepší. Photosens® se převážně kumuluje v játrech a slezině bez ohledu na lékovou formu (Smirnova *et al.*, 2005).

Publikovaná studie, zabývající se derivátem bakteriochlorinu, který je známý pod názvem padoporfin (WST09, TOOKAD®), ukázala, že se tento PS nehromadí v kůži, svalech, ani v nádoru v žádném čase. Výsledky ukázaly, že je tento PS vhodné využívat v rámci VTP. Navíc by se mělo, vzhledem k rychlé eliminaci z plazmy, ozařování provádět bezprostředně po i.v. aplikaci, aby bylo možné využít maximální intravaskulární koncentrace PS. Zpočátku jsou vysoké hladiny PS přítomny v játrech, kde dochází k následné postupné eliminaci. Tato afinita k retikuloendotelovému systému je typická pro lipofilní PS. Koncentrace TOOKAD® byla v ledvinách podstatně nižší než u jater, což ukazuje, že je z těla přednostně eliminován žlučovými cestami. Relativně rychlá eliminace z jater a ledvin snižuje riziko systémové toxicity (Brun *et al.*, 2004).

Další látkou, která se využívá v rámci VTP, je také derivát bakteriochlorinu zvaný padeliporfin (WST11, TOOKAD® Soluble). Díky své rozpustnosti ve vodě vykazuje mnohem lepší výsledky než TOOKAD®. Dále bylo prokázáno, že ke zvýšení účinnosti VTP je vhodná jeho souběžná kombinace s dalšími metodami (Kawczyk-Krupka *et al.*, 2015).

Z našich provedených experimentů vyplývá, že se látka P44 nejvíce kumuluje v játrech a ve slezině. Tato skutečnost odpovídá studii Smirnové *et al.* (2005), kde byl

studován Photosens<sup>®</sup>, který má podobné vlastnosti jako námi studované látky. Na druhou stranu, náš PS nebyl z jater eliminován během 24 h, což může naznačovat, že byl játry vylučován. Takováto kumulace PS v játrech by také mohla být pro organismus toxická. Již dříve publikované studie na myších a potkanech ukazují, že nejnižší koncentrace PS byly v orgánech, jako jsou srdce, kosterní svalstvo, oko a mozek. Naopak, nejvyšší koncentrace PS byla většinou zjištěna v játrech (Castano *et al.*, 2005), což se potvrdilo také v našich experimentech. V nádoru, plicích a svalu byly dokonce hodnoty HK22 pod limitem detekce. Ani P44 se v nádoru neukládala ve větších koncentracích. Selektivní ukládávání v nádoru je hlavním předpokladem pro úspěšný PS, a proto tyto látky pravděpodobně nebudou moci být v rámci PDT využívány. Na druhou stranu, studie provedené s TOOKAD<sup>®</sup> a TOOKAD<sup>®</sup> Soluble dávají naději, že by námi předpokládané využití látek P44 a HK22 ve VTP mohlo být úspěšné.

Časový profil v plazmě ukázal, že obě sledované látky dosahují maximální koncentrace ihned po aplikaci, což lze předpokládat vzhledem k faktu, že jde o i.v. podání látky. Poté dochází k jejich eliminaci z krevního řečiště během následných osmi hodin. Měření koncentrace PS v moči je důležité k zhodnocení celkové možnosti toxického působení látky na organismus, protože čím rychleji odcházejí PS z organismu, tím rychleji se může snížit toxicita pro ostatní orgány. Z časového profilu v moči, lze usuzovat, že po 8 h od podání nebyly oba PS v moči téměř přítomny. Celková koncentrace PS v moči byla však nízká, takže je pravděpodobné, že látky byly z těla vylučovány jinou cestou. A ani v ledvinách nebyly naše látky přítomny ve vyšších koncentracích. Další cestou vylučování PS je skrze játra do žluči a žlučovými cestami do střeva s následným odstraněním z těla stolicí. Proto by mohlo být přínosné měření koncentrace PS nejen v moči, ale i ve stolici.

I když oba PS vykazovaly v rámci PDT slibnou účinnost v *in vitro* podmínkách (především P44) (Kollár *et al.*, 2020), tak v *in vivo* podmínkách tomu tak být nemusí. Z výsledků experimentů vyplývá, že ve vodě rozpustné aniontové látky P44 a HK22 nejsou z hlediska farmakokinetiky příliš vhodné pro použití ve PDT, a to především díky faktu, že se ani jedna látka se nedeponovala ve vyšších koncentracích v nádoru (v případě HK22 ji nebylo ani možné detekovat). Studované PS ale díky svým vlastnostem

mají potenciál být využívány ve VTP, což také potvrzují dosud nepublikované výsledky z *in vivo* experimentů prováděných naší vědeckou skupinou.

## 10. ZÁVĚR

- Celkový průběh aniontových fotosensitizerů P44 a HK22 ze skupiny ftalocyaninů byl sledován v myším modelu kmene BALB/c v časech 30 s, 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h a 24 h po i.v. podání. Látka P44 byla přítomna v jednotlivých orgánech ve větších koncentracích než látka HK22.
- Sledované látky v plazmě dosahovaly maximální koncentrace ihned po podání (v čase 30 s – nejkratší interval odběru). Poté byly postupně z plazmy eliminovány. Průběh P44 a HK22 byl v plazmě podobný. V moči došlo k rychlému nárůstu koncentrace u obou látek po i.v. podání s maximem v prvních hodinách a následným snížením. Maximální koncentrace P44 v moči byla v porovnání s HK22 nižší.
- Z časových profilů látek v jednotlivých orgánech bylo možné zjistit, v jaké době byly látky detekovány v nejvyšších koncentracích. Tyto časy se v rámci orgánů i látek lišily.
- Látka P44 se nejvíce ukládala v játrech a poté ve slezině. Z jater nebyla během 24 h eliminována, což naznačuje, že by se zde látka P44 mohla akumulovat. V ostatních orgánech byla přítomna v nízkých koncentracích. HK22 se nejvíce deponoval také v játrech – v porovnání s P44 však v minimálním množství. Ve svaly, nádoru a plicích byly hodnoty koncentrace HK22 pod limitem detekce.
- Studované aniontové látky P44 a HK22 nejsou zřejmě z hlediska farmakokinetiky příliš vhodné pro použití ve PDT, protože se P44 minimálně deponoval v nádoru a hodnoty HK22 zde byly pod limitem detekce. Mají, ale potenciál být dále zkoumány v rámci VTP.

## 11. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Abels Ch. (2004). Targeting of the vascular system of solid tumours by photodynamic therapy (PDT) Given as a lecture for the Young Scientist Award at the 10th ESP meeting, Vienna. Dedicated to Rolf-Markus Szeimies on occasion of his 40th birthday. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 3(8), ISSN 1474-905X. <https://doi.org/10.1039/b314241h>

Abrahamse H., Hamblin M. R. (2016). New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochemical Journal*. 473(4), 347-364, ISSN 0264-6021. <https://doi.org/10.1042/BJ20150942>

Ackroyd R., Kelty C., Brown N., Reed M. (2001). The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*. 74(5), 656-669, ISSN 00318655. [https://doi.org/10.1562/00318655\(2001\)0740656THOPAP2.0.CO2](https://doi.org/10.1562/00318655(2001)0740656THOPAP2.0.CO2)

Agostinis P., Berg K., Cengel K. A., *et al.* (2011). Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 61(4), 250-28, ISSN 00079235. <https://doi.org/10.3322/caac.20114>

Ali S., Muhammad S., Khurshid A., Ikram M., Maqsood M., Fisher C., Cathcart J., Lilje I. (2018). Effective phthalocyanines mediated photodynamic therapy with doxorubicin or methotrexate combination therapy at sub-micromolar concentrations in vitro. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 22, 51-64, ISSN 15721000. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.02.010>

Allisson R. R., Moghissi K. (2013). Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clinical Endoscopy*. 46(1), ISSN 2234-2400. <https://doi.org/10.5946/ce.2013.46.1.24>

Asem H., El-Fattah A. A., Nafee N., Zhao Y., Khalil L., Muhammed M., Hassan M., Kandil S. (2016). Development and biodistribution of a theranostic aluminum phthalocyanine nanophotosensitizer. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 13, 48-57, ISSN 15721000. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2015.12.005>

Brun P. H., Degroot J. L., Gudgin Dickson E. F., Farahani M., Pottier R. H. (2004). Determination of the in vivo pharmacokinetics of palladium-bacteriopheophorbide (WST09) in EMT6 tumour-bearing Balb/c mice using graphite furnace atomic absorption spectroscopy. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 3(11-12), ISSN 1474-905X. <https://doi.org/10.1039/b403534h>

Carobeli L. R., Meirelles L. E., Damke G. M. Z. F. *et al.* (2021). Phthalocyanine and Its Formulations: A Promising Photosensitizer for Cervical Cancer Phototherapy. *Pharmaceutics*. 13(12). ISSN 1999-4923. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13122057>

Castano A. P., Demidova T. N., Hamblin M. R. (2005). Mechanisms in photodynamic therapy: part two—cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2(1), 1-23, ISSN 15721000. [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00030-X](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00030-X)

Castano A. P., Demidova T. N., Hamblin M. R. (2005). Mechanisms in photodynamic therapy: Part three—Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2(2), 91-106, ISSN 15721000, [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00060-8](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00060-8)

De Rosa F. S., Bentley M. V. L. B. (2000). Photodynamic therapy of skin cancers: sensitizers, clinical studies and future directives. *Pharmaceutical Research*. 17(12), 1447-1455, ISSN 07248741. <https://doi.org/10.1023/A:1007612905378>

Dolmans D. E., Fukumura D., Jain R. K. (2003). Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer*. 3(5), 380-387, ISSN 1474-175X. <https://doi.org/10.1038/nrc1071>

EMA. Tookad. *European Medicines Agency* [online]. ©2017, [cit.2022-05-14]. <https://ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/tookad>

FDA. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. *U.S. Food and Drug Administration* [online]. ©2018, [cit.2022-05-14]. <https://fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>

Glanzmann T. M., Zellweger M. P.E., Borle F., *et al.* (2009). Assessment of a sheep animal model to optimise photodynamic therapy in the oesophagus. *Lasers in Surgery and Medicine*. 41(9), 643-652, ISSN 01968092. <https://doi.org/10.1002/lsm.20844>

Gursoy H., Ozcakil-Tomruk C., Tanalp J., Yilmaz S. (2013). Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. *Clinical Oral Investigations*. 17(4), 1113-1125, ISSN 1432-6981. <https://doi.org/10.1007/s00784-012-0845-7>

Chen B., Roskams T., Witte P. A. M. (2002). Antivascular Tumor Eradication by Hypericin-mediated Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*. 76(5), 509-513, ISSN 00318655. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2002\)0760509ATEBHM2.0.CO2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2002)0760509ATEBHM2.0.CO2)

Chen J., Hou L., Zheng K., Wang J., Chen J., Huang J., Wu M., Xue J. (2020). Blood distribution and plasma protein binding of PHOTOCYANINE: a promising phthalocyanine photosensitizer in phase II clinical trials. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 153, ISSN 09280987. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105491>

Chilakamarthi U., Giribabu L. (2017). Photodynamic Therapy: Past, Present and Future. *The Chemical Record*. 17(8), 775-802, ISSN 15278999. <https://doi.org/10.1002/tcr.201600121>

Kawczyk-Krupka A., Wawrzyniec K., Musiol S. K., Potempa M., Bugaj A.M., Sieron A. (2015). Treatment of localized prostate cancer using WST-09 and WST-11 mediated vascular targeted photodynamic therapy—A review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 12(4), 567-574, ISSN 15721000. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2015.10.001>

Kessel D. (2019). Photodynamic Therapy: A Brief History. *Journal of Clinical Medicine*. 8(10), ISSN 2077-0383. <https://doi.org/10.3390/jcm8101581>

Kollar J., Machacek M., Halasková M. *et al.* (2020). Cationic Versus Anionic Phthalocyanines for Photodynamic Therapy: What a Difference the Charge



- Makes. *Journal of Medicinal Chemistry*. 63(14), 7616-7632, ISSN 0022-2623.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00481>
- Konopka K., Goslincki T. (2007). Photodynamic Therapy in Dentistry. *Journal of Dental Research*. 86(8), 694-707, ISSN 0022-0345.  
<https://doi.org/10.1177/154405910708600803>
- Kou J., Dou D., Yang L. (2017). Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications. *Oncotarget*. 8(46), 81591-81603, ISSN 1949-2553.  
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.20189>
- Kübler A. C. (2005). Photodynamic therapy. *Medical Laser Application*. 20(1), 37-45, ISSN 16151615. <https://doi.org/10.1016/j.mla.2005.02.001>
- Kwiatkowski S., Knap B., Przystupski D., et al. (2018). Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 106, 1098-1107, ISSN 07533322.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.049>
- Li F., Liu Q., Liang Z., Wang J., Pang M., Huang W., Wu W., Hong Z. (2016). Synthesis and biological evaluation of peptide-conjugated phthalocyanine photosensitizers with highly hydrophilic modifications. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 14(13), 3409-3422, ISSN 1477-0520. <https://doi.org/10.1039/C6OB00122J>
- Li X., Zheng B., Peng X., Li S., Ying J., Zhao Y., Huang J., Yoon J. (2019). Phthalocyanines as medicinal photosensitizers: Developments in the last five years. *Coordination Chemistry Reviews*. 379, 147-160, ISSN 00108545.  
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.08.003>
- Li Y., Wang J., Zhang X. et al. (2015). Highly water-soluble and tumor-targeted photosensitizers for photodynamic therapy. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 13(28), 7681-7694, ISSN 1477-0520. <https://doi.org/10.1039/C5OB01035G>
- Liu X., Jiang C., Li Y., et al. (2015). Evaluation of Hypericin: Effect of Aggregation on Targeting Biodistribution. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 104(1), 215-222, ISSN 00223549. <https://doi.org/10.1002/jps.24230>

Lyon J. L., Moreira L. M., Guranho de Moraes P. C., Dos Santos F. V., Resende M. A. de. (2011). Photodynamic therapy for pathogenic fungi. *Mycoses*. 54(5), e265-e271, ISSN 09337407. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2010.01966.x>

Machacek M., Cidlina A., Novakova V., Svec J., Rudolf E., Miletin M., Kučera R., Simunek T., Zimcik P. (2015). Far-red absorbing cationic phthalocyanine photosensitizers: Synthesis and evaluation of the photodynamic anti-cancer activity and the mode of cell death induction. *Journal of Medicinal Chemistry*. 58(4), 1736–1749, ISSN 0022-2623. <https://doi.org/10.1021/jm5014852>

Machacek M., Demuth J., Cermak P., Vavreckova M., Hrubá L., Jedlickova A., Kubat P., Simunek T., Novakova V., Zimcik P. (2016). Tetra(3,4-pyrido)porphyrazines caught in the cationic cage: toward nanomolar active photosensitizers. *Journal of Medicinal Chemistry*. 59(20), 9443–9456, ISSN 0022-2623 <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01140>

Machacek M., Kollar J., Miletin M., Kucera R., Kubat P., Simunek T., Novakova V., Zimcik P. (2016). Anionic hexadeca-carboxylate tetrapyrazinoporphyrazine: synthesis and in vitro photodynamic studies of water-soluble non-aggregating photosensitizer. *RSC Advances*. 6:10064-10077, ISSN 2046-2069. <https://doi.org/10.1039/C5RA25881B>

Marino J., García Vior M. C., Furmento V. A., Blank V. C., Awruch J., Roguin L. P. (2013). Lysosomal and mitochondrial permeabilization mediates zinc(II) cationic phthalocyanine phototoxicity. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 45(11), 2553-2562, ISSN 13572725. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.08.012>

Mfouo – Tynga I. S., Dias L. D., Inada N. M., Kurachi C. (2021). Features of third generation photosensitizers used in anticancer photodynamic therapy: Review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 34, ISSN 15721000. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102091>

Miletin M., Zimcik P., Novakova V. (2018). Photodynamic properties of aza-analogues of phthalocyanines. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 17(11), 1749-1766, ISSN 1474-905X. <https://doi.org/10.1039/C8PP00106E>

Milla L. N., Yslas E. I., Cabral A., Durantini E. N., Romanini S., Rivarola V., Bertuzzi M. (2009). Pharmacokinetic, toxicological and phototherapeutic studies of phthalocyanine ZnPcCF3. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 63(3), 209-215, ISSN 07533322. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2008.01.019>

Miller J., Baron E., Scull H., *et al.* (2007). Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4: The case experience with preclinical mechanistic and early clinical–translational studies. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 224(3), 290-299, ISSN 0041008X. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.01.025>

Nyman E. S., Hynninen P. H. (2004). Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 73(1-2), 1-28, ISSN 10111344. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2003.10.002>

Ozog D. M., Rkein A. M., Fabi S. G., Gold M. H., Goldman M. P., Lowe N. J., Martin G. M., Munavalli G. S. (2016). Photodynamic Therapy: A Clinical Consensus Guide. *Dermatologic Surgery*. 42(7), 804-827, ISSN 1076-0512. <https://doi.org/10.1097/DSS.0000000000000800>

Peplow P. V., Chung T., Baxter G. D. (2012). Photodynamic Modulation of Wound Healing: A Review of Human and Animal Studies. *Photomedicine and Laser Surgery*. 30(3), 118-148, ISSN 1549-5418. <https://doi.org/10.1089/pho.2011.3142>

Perry Y., Epperly M. W., Fernando H. C., Klein E., Finkelstein S., Greenberger J. S., Luketich J. D. (2005). Photodynamic therapy induced esophageal stricture—an animal model: From mouse to pig. *Journal of Surgical Research*. 123(1), 67-74, ISSN 00224804. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2004.05.006>

Plotino G., Grande N. M., Mercade M. (2019). Photodynamic therapy in endodontics. *International Endodontic Journal*. 52(6), 760-774, ISSN 0143-2885. <https://doi.org/10.1111/iej.13057>

Pucelik B., Gürol I., Ahsen V., Dumoulin F., Dąbrowski J. M. (2016). Fluorination of phthalocyanine substituents: Improved photoproperties and enhanced photodynamic efficacy after optimal micellar formulations. *European Journal of Medicinal*

*Chemistry*. 124, 284-298, ISSN 02235234.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.08.035>

Robertson C. A., Evans D. H., Abrahamse H. (2009). Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 96(1), 1-8, ISSN 10111344.  
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2009.04.001>

Sato Y., Fu Y., Liu H., Lee rM. Y., Shaw M. H. (2021) Tumor-immune profiling of CT-26 and Colon 26 syngeneic mouse models reveals mechanism of anti-PD-1 response. *BMC Cancer*. 21(1), ISSN 1471-2407. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08974-3>

Silva Z. S., Bussadorri, S. K., Fernandes K. P. S., Huang Y., Hamblin M. R.. (2015). Animal models for photodynamic therapy (PDT). *Bioscience Reports* 35, ISSN 0144-8463.  
<https://doi.org/10.1042/BSR20150188>

Smirnova Z. S., Oborotova N. A., Makarova O. A. *et al.* (2005). Efficiency and Pharmacokinetics of Photosense: A New Liposomal Photosensitizer Formulation Based on Aluminum Sulfophthalocyanine. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 39(7), 341-344, ISSN 0091-150X. <https://doi.org/10.1007/s11094-005-0150-8>

SZÚ. Nádorová onemocnění. *Státní zdravotní ústav* [online]. ©2007, [cit.2022-05-14].  
<http://szu.cz/tema/prevence/nadorova-onemocneni>

Tang F., Xie W., Li S., Hu Q., Zheng B., Ke M., Huang J. (2020) Alginate-zinc (II) phthalocyanine conjugates: Synthesis, characterization and tumor-associated macrophages-targeted photodynamic therapy. *Carbohydrate Polymers*. 240, ISSN 01448617. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116239>

Taquet J., Frochot C., Manneville V., Barberi-Heyob M. (2007). Phthalocyanines Covalently Bound to Biomolecules for a Targeted Photodynamic Therapy. *Current Medicinal Chemistry*. 14(15), 1673-1687, ISSN 09298673.  
<https://doi.org/10.2174/092986707780830970>

ÚZIS ČR. Den boje proti rakovině a statistiky. *Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR* [online]. ©2021, [cit.2022-05-14].  
<https://uzis.cz/index.php?pg=aktuality&aid=8466>

Vachova L., Machacek M., Kucera R., Demuth J., Cermak P., Kopecky K., Miletin M., Jedlickova A., Simunek T., Novakova V., Zimcik P. (2015). Heteroatom-substituted tetra(3,4-pyrido)-porphyrazines: a stride toward near-infrared-absorbing macrocycles.

*Organic & Biomolecular Chemistry*. 13(20), 5608-5612, ISSN 1477-0520. <https://doi.org/10.1039/c5ob00651a>

Zhang Q., Li L. (2018). Photodynamic combinational therapy in cancer treatment. *J Buon*. 23(3), 561-567, ISSN: 2241-6293. <https://www.jbuon.com/archive/23-3-561.pdf>

Zimcik P., Miletin M., Radilová H., Novakova V., Kopecky V., Svec J., Rudolf E. (2010). Synthesis, Properties and In Vitro Photodynamic Activity of Water-soluble Azaphthalocyanines and Azanaphthalocyanines. *Photochemistry and Photobiology*. 86(1), 168-17, ISSN 00318655. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2009.00647.x>