

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Studium účinnosti originálních amfifilních
(aza)ftalocyaninů nesoucí trvalý kladný náboj**

Bc. Monika Steklá

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

HRADEC KRÁLOVÉ, 2019

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala vedoucímu své diplomové práce RNDr. Miloslavu Macháčkovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, cenné rady, připomínky a především za čas a trpělivost, které mi věnoval. Ráda bych také poděkovala za spolupráci a přípravu studovaných látek členům vědecké skupiny prof. doc. PharmDr. Petra Zimčíka, Ph.D. Velké díky patří také Mgr. Marii Halaškové a Mgr. Janu Kollárovi za jejich pomoc při provádění experimentů. Děkuji také celému kolektivu Katedry biochemických věd za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Na závěr bych ještě ráda poděkovala své rodině a blízkým za jejich podporu během celého studia.

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

V Hradci Králové dne

.....

Podpis

1 ABSTRAKT

Nádorová onemocnění jsou v dnešní době jednou z nejčastějších příčin úmrtí ve vyspělých státech. Proto je věnována velká pozornost vývoji nových způsobů léčby těchto chorob. Jednou z takovýchto moderních metod je i fotodynamická terapie. Jedná se o vysoce selektivní, minimálně invazivní metodu s minimem nežádoucích účinků. Principem tohoto způsobu terapie je podání samostatně neaktivní látky takzvaného fotosensitizeru a jeho následné ozáření světlem s vhodnou vlnovou délkou v přítomnosti kyslíku. Fotodynamická terapie tedy potřebuje tři základní komponenty: fotosensitizer, světlo a kyslík. Všechny tyto tři látky jsou pro tělo samostatně netoxické, jejich společný výskyt však vede ke vzniku fotochemické reakce, při které vznikají velmi reaktivní formy kyslíku, především pak singletový kyslík. Tyto reaktivní molekuly následně poškozují cílové buňky, což vede k jejich zániku.

Jak už bylo řečeno, důležitou složkou PDT je fotosensitizer, což je látka schopná absorbovat záření určité vlnové délky a přeměnit ho na užitečnou energii. V dnešní době existuje několik takovýchto látek, které již byly zavedeny do klinické praxe. Cílem této práce je zhodnotit účinnost nově syntetizovaných fotosensitizerů ze skupiny ftalocyaninů a azaftalocyaninů v *in vitro* podmínkách. Všechny použité látky byly testovány na nádorové buněčné linii HeLa, odvozené z lidských buněk karcinomu děložního čípku. U použitých látek byla hodnocena jejich cytotoxicita po ozáření i toxicita ve tmě. Dále byla stanovena jejich subcelulární lokalizace po akumulaci v buňkách pomocí fluorescenční mikroskopie, časový profil prostupu do buněk a byly hodnoceny také morfologické změny, které v buňkách probíhaly po fotoaktivaci látek.

Z výsledků jednotlivých experimentů je patrné, že všechny studované látky jsou velmi účinné fotosensitizery s nízkou vlastní toxicitou. Na buňkách nádorové buněčné linie HeLa můžeme vidět výrazné morfologické změny vzniklé v důsledku působení fotosensitizerů po jejich aktivaci světlem. Tyto změny mohou vést až k buněčné smrti. Prostup látek do buněk probíhal zpočátku rychle, postupně došlo k jeho zpomalení a u látek P39 a P40 k dosažení plató fáze. Nejlepší účinnost vykazovala látka s označením P40 ($EC_{50} = 17,8 \pm 3,7$ nM).

2 ABSTRACT

The neoplastic diseases are nowadays one of the most common reason of death in developed countries. That is the reason why is a great attention dedicated to the development of new methods for the treatment these diseases. One of such modern methods is the photodynamic therapy. This is a very selective, minimally invasive method with a minimum of side effects. The principle of this type of therapy is application of separately inactive compound, called photosensitizer, followed by exposure to light with suitable wavelength in the presence of molecular oxygen. Therefore, the photodynamic therapy needs three basic components: the photosensitizer, light and oxygen. Each of those components are non-toxic, when they occur separately. However, their combination lead to the inception of the photochemical reaction in which are generated reactive oxygen species, especially singlet oxygen. These very reactive molecules damage target cells, which subsequently die *via* apoptosis or necrosis.

As has been said, the main part of the photodynamic therapy is the photosensitiser, which is the compound which can absorb the light with specific wavelength and convert it to useful energy. Nowadays exist a few of these compounds introduced to the clinical practice. The objective of this study is the evaluation of the effectiveness of the novel photosensitizers from the group of phthalocyanines and azaphthalocyanines *in vitro*. Evaluated compounds were studied on malignant human cervical cell line HeLa. Cytotoxicity after the exposure to activating light as well as dark toxicity were evaluated. Subcellular localization of tested compounds after accumulation in cells using fluorescence microscopy, cellular uptake and morphological changes after photoactivation were determined.

The results of this study show that all tested compounds are very effective photosensitisers with low intrinsic toxicity causing significant morphological changes after activation of photosensitisers by red light. Uptake of compounds to the cells initially proceeded quickly, gradually slowing down and reaching the plateau phase in the case of compounds P39 and P40. The best efficacy was shown with the compound P40 ($EC_{50} = 17.8 \pm 3.7$ nM).

3 OBSAH

| | | |
|--------|---|----|
| 1 | ABSTRAKT | 3 |
| 2 | ABSTRACT | 4 |
| 3 | OBSAH..... | 5 |
| 4 | ÚVOD | 7 |
| 5 | SEZNAM ZKRATEK..... | 8 |
| 6 | TEORETICKÁ ČÁST..... | 10 |
| 6.1 | Fotodynamická terapie..... | 10 |
| 6.2 | Historie PDT..... | 11 |
| 6.3 | Mechanismus PDT | 11 |
| 6.4 | Využití PDT..... | 13 |
| 6.5 | Světlo | 13 |
| 6.6 | Kyslík..... | 15 |
| 6.7 | Fotosensitizer | 16 |
| 6.7.1 | Dělení fotosensitizerů..... | 17 |
| 6.8 | Vybrané fotosensitizery používané v klinické praxi..... | 18 |
| 6.8.1 | Porfyrinové PS | 18 |
| 6.8.2 | Chloriny..... | 21 |
| 6.8.3 | Texafyriny | 24 |
| 6.9 | NEporfyrinové PS..... | 25 |
| 6.9.1 | Antrachinony | 25 |
| 6.9.2 | Deriváty fenothiazinu | 26 |
| 6.9.3 | Xanteny..... | 27 |
| 6.9.4 | Cyaniny | 28 |
| 6.9.5 | Kurkuminoidy | 28 |
| 6.10 | Ftalocyaniny..... | 29 |
| 6.10.1 | Ftalocyaniny rozpustné ve vodě..... | 32 |
| 6.11 | Azaftalocyaniny | 34 |
| 7 | CÍLE PRÁCE..... | 36 |
| 8 | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 37 |
| 8.1 | Vybavení pro práci s buněčnou linií | 37 |
| 8.1.1 | Pracovní pomůcky | 37 |
| 8.1.2 | Pracovní přístroje | 38 |
| 8.1.3 | Použité chemické látky a reagenty | 38 |

| | | |
|-------|--|----|
| 8.2 | Buněčná linie HeLa | 40 |
| 8.2.1 | Kultivační médium | 40 |
| 8.2.2 | Kultivace buněk | 41 |
| 8.2.3 | Pasážování buněk | 41 |
| 8.2.4 | Stanovení počtu životaschopných buněk | 42 |
| 8.2.5 | Nasazování buněk na experimenty | 43 |
| 8.3 | Studované fotosensitizéry..... | 43 |
| 8.4 | Časový profil prostupu látek do buněk..... | 45 |
| 8.4.1 | Stanovení množství bílkoviny ve vzorcích | 45 |
| 8.5 | Cytotoxické experimenty | 46 |
| 8.5.1 | Stanovení fototoxicity | 47 |
| 8.5.2 | Stanovení vlastní toxicity..... | 47 |
| 8.5.3 | Hodnocení viability buněk testem vychytávání neutrální červeně | 48 |
| 8.5.4 | Vyhodnocení výsledků..... | 49 |
| 8.5.5 | Statistické zpracování dat..... | 49 |
| 8.6 | Fotografická dokumentace..... | 50 |
| 8.6.1 | Subcelulární lokalizace a relokalizace po ozáření..... | 50 |
| 8.6.2 | Hodnocení morfologických změn | 51 |
| 9 | VÝSLEDKY | 52 |
| 9.1 | Cytotoxické experimenty | 52 |
| 9.1.1 | Fototoxicita..... | 52 |
| 9.1.2 | Dark toxicita..... | 56 |
| 9.2 | Subcelulární lokalizace a relokalizace po ozáření..... | 57 |
| 9.3 | Morfologické změny buněk..... | 70 |
| 9.4 | Časový profil prostupu látek do buněk..... | 76 |
| 10 | DISKUZE | 79 |
| 11 | ZÁVĚRY | 85 |
| 12 | POUŽITÁ LITERATURA..... | 86 |

4 ÚVOD

Téma „Studium účinnosti originálních amfifilních (aza)ftalocyaninů nesoucí trvalý kladný náboj“ jsem si vybrala proto, že fotodynamickou terapií (PDT) a jejím využitím v klinické praxi jsem se zabývala již ve své bakalářské práci a tato metoda mě velmi zaujala.

Jedná se o perspektivní klinicky schválenou metodu terapie nádorových i nenádorových onemocnění. Její výhodou je minimum vedlejších účinků a minimální invazivita tohoto terapeutického přístupu. Pro její fungování jsou nutné tři složky, které jsou samostatně zcela netoxické nebo jen minimálně toxické. Patří mezi ně světlo, kyslík a fotosensitizer (PS).

Při jejich společném výskytu dochází ke vzniku fotochemické reakce, při které vznikají cytotoxické molekuly přímo působící na nádorové buňky. Kromě toho dochází k destrukci nádorové mikrocirkulace a aktivaci systémové imunitní odpovědi. Mechanismus účinku jsem podrobněji popsala v teoretické části své práce. V této části práce jsou také zmíněny některé PS používané v klinické praxi.

Jelikož žádný z klinicky používaných PS nemá ideální vlastnosti, stále probíhá výzkum nových látek s potenciálním využitím v PDT. Testováním fotodynamické aktivity nově syntetizovaných PS jsem se v praktické části své diplomové práce zabývala i já.

Jak už název vypovídá, jedná se o látky kationické povahy strukturně odvozené od ftalocyaninů (Pc) a azaftalocyaninů (AzaPc). Cílem této práce bylo zhodnocení jejich fotodynamické aktivity v *in vitro* podmínkách, dále určení jejich subcelulární lokalizace a zhodnocení morfologických změn, které v buňkách vyvolávají. Výsledky této práce mohou být využity k hlubšímu studiu těchto látek, případně k *in vivo* experimentům.

5 SEZNAM ZKRATEK

ALA – aminolevulová kyselina (aminlevulic acid)

AlPc – hlinitý ftalocyanin

ATCC – Americká banka buněčných linií

AzaPc – azaftalocyanin

BCA – bichoninová kyselina

BSA – bovinní sérový albumin

DIC – diferenciální interferenční kontrast

DMEM – kultivační médium (Dulbecco's modified Eagle's medium)

EDTA – etylendiamintetraoctová kyselina

FBS – fetální bovinní sérum

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

HEPES - pufr (*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid)

HpD – deriváty hematoporfyrinu

HPV – lidský papilloma virus

LDL – lipoprotein s nízkou hustotou (low density lipoprotein)

NR – neutrální červeň

P/S – směs Penicilin/Streptomycin

PACT – fotodynamická antimikrobní terapie (Photodynamic Antimicrobial chemotherapy)

PBS - pufr (*phosphate buffered saline*)

Pc – ftalocyanin

PDT – fotodynamická terapie (photodynamic therapy)

PpIX – protoporfyrin IX

PS – fotosenzitizér (photosensitizer)

ROS – reaktivní kyslíkové formy (reactive oxygen species)

SCM – sérové médium

SFM – bezsérové médium

ÚZIS – Ústav zdravotnických informací a statistiky

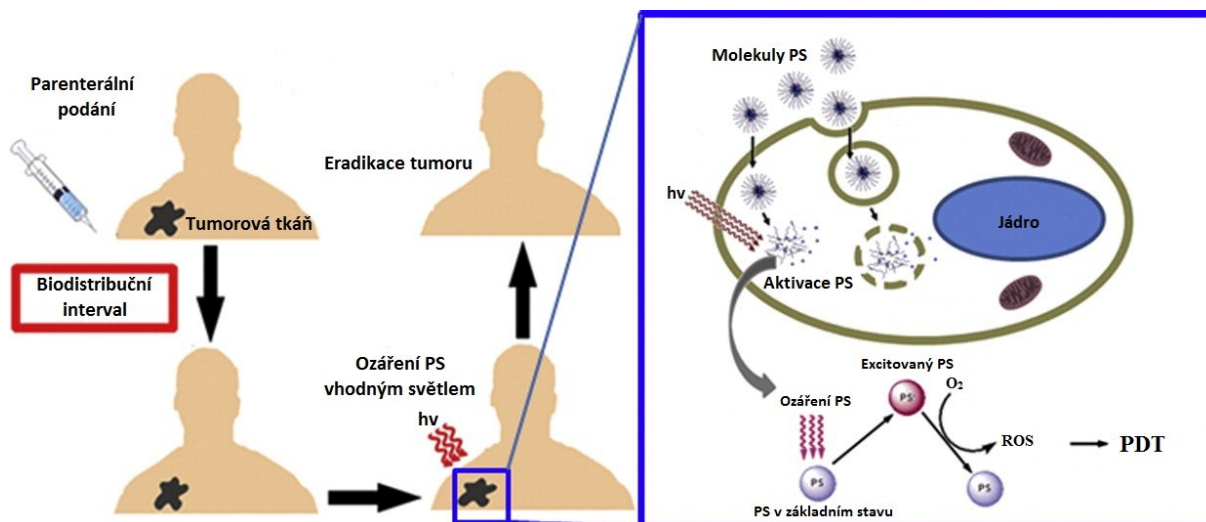
ZnPc – zinečnatý ftalocyanin

6 TEORETICKÁ ČÁST

6.1 FOTODYNAMICKÁ TERAPIE

Fotodynamická terapie (PDT) je minimálně invazivní a velmi slibná metoda pro léčbu nádorových onemocnění akceptovaná v klinické praxi, která je schopná vyvíjet selektivní cytotoxickou aktivitu na nádorové buňky. Tato metoda využívá kombinaci viditelného světla a látky citlivé na světlo, kterou v tomto případě nazýváme fotosensitizer (PS). Samostatně jsou obě tyto složky netoxické, pokud se však vyskytnou časově i místně společně s molekulárním kyslíkem ($^3\text{O}_2$), mohou produkovat letální cytotoxické molekuly, které jsou schopné zničit nádorové buňky, viz. Obr.1 (Sharman et al, 1999, Agostinis et al., 2011).

Tyto cytotoxické molekuly vznikají pouze v bezprostřední blízkosti PS absorbujícího světlo. Proto také dochází k výskytu biologické odpovědi na PS především v konkrétních oblastech tkání, které byly vystaveny záření (Dolmans et al., 2003).



Obrázek 1 Mechanismus PDT. Převzato z (Master et al., 2013).

6.2 HISTORIE PDT

PDT byla sice objevena až v minulém století, ale léčivé vlastnosti světla jsou známy už tisíce let. Již ve starověkých státech, jako je Egypt, Indie nebo Čína, používali sluneční světlo pro terapii kožních onemocnění, jako například psoriázy nebo vitiliga (Dolmans et al., 2003, Ackroyd et al., 2001).

V 18. a 19. století bylo světlo využíváno ve Francii pro terapii tuberkulózy, riketsie, kurdějí, revmatismu, paralýzy, edémů a svalových slabostí. Navíc byla na přelomu minulého století dánským vědcem Nielsem Finsenem objevena takzvaná fototerapie. Finsen popsal úspěšnou terapii planých neštovic pomocí červeného světla, která předchází hnisání pustul. Později přešel na terapii kožní formy tuberkulózy ultrafialovým světlem a objevil fototerapii karbonovým obloukem využívanou pro léčbu této choroby (Ackroyd et al., 2001).

Základy PDT byly vědecky popsány před více než 100 lety, když Oscar Raab pracoval v laboratoři Hermanna von Tapiener. Oscar Raab objevil, že u vzorků prvků, které obsahovaly akridinovou oranž nebo jí příbuzné látky, vyvolala přítomnost světla buněčnou smrt. Vznik moderní PDT následoval po objevu Schwartze a Lipsona, kteří zjistili, že směs látek dnes známá jako derivát hematoporfyrinu (HpD) má tumor lokalizující vlastnosti. V návaznosti na to bylo zjištěno, že tato směs může být aktivována červeným světlem, což má za následek klasický PDT efekt (Celli et al., 2010, Kessel, 2004).

6.3 MECHANISMUS PDT

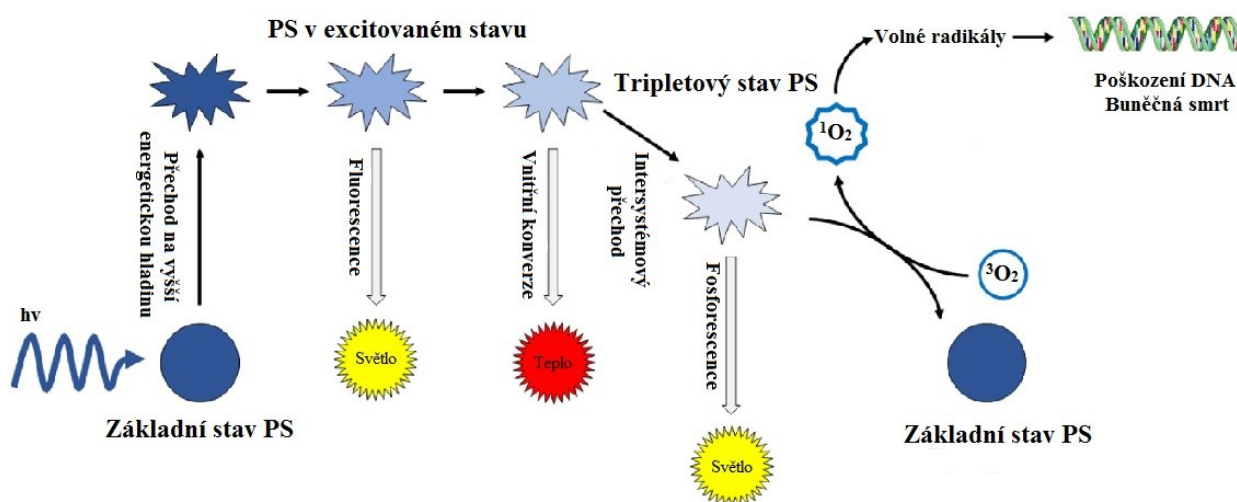
Dnes už je dobře známo, že k destrukci nádorů vlivem PDT dochází díky třem základním mechanismům. Nejprve dochází k přímému ničení nádorových buněk působením vznikajících reaktivních forem kyslíku (ROS), dále dochází také k poškození prokrvení nádorové tkáně. Tím pádem nádorové buňky postrádají kyslík a potřebné živiny, což také vede k jejich odumírání. Nakonec vlivem probíhajícího zánětu dochází i k aktivaci protinádorové imunitní odpovědi. Tyto tři mechanismy se vzájemně ovlivňují

a všechny tři jsou potřeba k dlouhodobému potlačení nádorového bujení (Dolmans et al., 2003).

Většina PS v základním stavu má dva elektrony s opačným spinem lokalizovány v energeticky nejvýhodnějším orbitalu. Absorpce světla vede k přesunu jednoho elektronu na vyšší energetickou hladinu. Takto excitovaný PS je velmi nestabilní, proto se přebytečné energie zbavuje vyzářením ve formě fluorescence a/nebo tepla. PS se také může zbavit přebytečné energie mezisystémovým přechodem na energeticky stabilnější tripletový stav obrácením spinu jednoho z elektronů, viz. Obr.2 (Agostinis et al., 2011).

PS v excitovaném tripletovém stavu může předat proton nebo elektron různým biomolekulám, jako jsou lipidy, proteiny nebo nukleové kyseliny, nebo mohou tvořit radikály, které interagují s $^3\text{O}_2$. Při této reakci vznikají ROS, jako je superoxid anion radikál ($\cdot\text{O}_2^-$), hydroxylový radikál ($\cdot\text{OH}$) a peroxid vodíku (H_2O_2) – reakce Typu I. Kromě výše popsané reakce může docházet také k převodu energie tripletového stavu přímo na $^3\text{O}_2$ v jeho základním tripletovém stavu. Při této reakci vzniká neradikálový, ale vysoce reaktivní atom singletového kyslíku ($^1\text{O}_2$) – reakce Typu II (Juaranz et al., 2008).

Převládající mechanismus reakce závisí na několika různých faktorech. Mezi ně patří genotyp, dávka PDT, hladina intracelulárního ATP, lokalizace PS apod. (Connor et al., 2009).



Obrázek 2 Aktivace PS. Převzato z (Knap et al., 2018).

6.4 VYUŽITÍ PDT

Poprvé byla PDT schválena pro použití v klinické praxi v roce 1993 v Kanadě pro terapii karcinomu močového měchýře. Jako účinná látka byl použit Photofrin[®], který je i dnes nejčastěji používaným PS v klinické praxi. Kromě léčby nádorových onemocnění se dnes PDT úspěšně používá pro terapii věkem podmíněné makulární degenerace a dalších onemocnění očí spojených s neovaskularizací (Dolmans et al., 2003).

PDT bohužel není vhodná pro terapii diseminovaných onemocnění, jelikož v současné době není možné ozařování celého těla v dostatečných dávkách k navození úspěšné terapie. Nicméně i v případě pokročilého onemocnění může PDT alespoň zlepšit kvalitu života a prodloužit dobu přežití. Naopak pro léčbu časných stádií a lokalizovaných onemocnění je PDT vhodnou volbou s mnoha výhodami oproti alternativním metodám. K rozvoji jejího použití v klinické praxi však dochází až v posledních letech přesto, že je známá už více než 25 let (Brown et al., 2004).

Přestože PDT byla původně určena pro terapii nádorových onemocnění, nachází dnes největší uplatnění v oftalmologii, kde se využívá především pro léčbu věkem podmíněné makulární degenerace. V menší míře se uplatňuje i při terapii jiných neonkologických onemocnění. Patří mezi ně psoriáza, artritida, Baretův jícen, ateroskleróza a arteriální i venózní restenóza. Z důvodu narůstající rezistence k antibiotikům se v poslední době zkoumá i její využití pro léčbu bakteriálních onemocnění (Hamblin & Hasan, 2004).

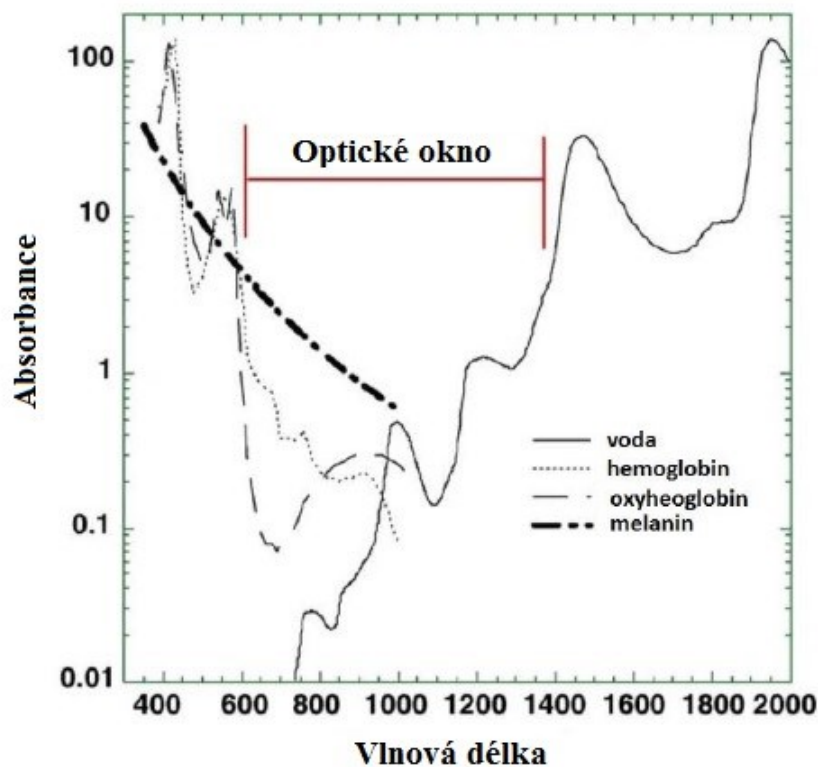
6.5 SVĚTLO

Jednou z hlavních složek nezbytných pro PDT je světlo. To je také jednou ze dvou složek určujících selektivitu PDT. Výběr vhodného světla je závislý na použitém PS, druhu onemocnění, lokalizaci lézí, jejich velikosti, přístupnosti, charakterizaci tkáně, ale v neposlední řadě také na ceně. Klinický účinek PDT záleží na dávce světla, době expozice záření, způsobu podání a také na jeho distribuci v cílové tkáni (Agostinis et al., 2011).

Při PDT je tedy důležité předvídat distribuci světla v cílové tkáni. Při kontaktu světla s tkání dochází k jeho rozptylu i absorpci. Poměr těchto dvou procesů je závislý na typu tkáně a vlnové délce dopadajícího světla. Rozptyl je obecně nejdůležitějším parametrem ovlivňujícím penetraci světla do tkáně, absorpce zde hraje jen malou roli (Castano et al., 2004).

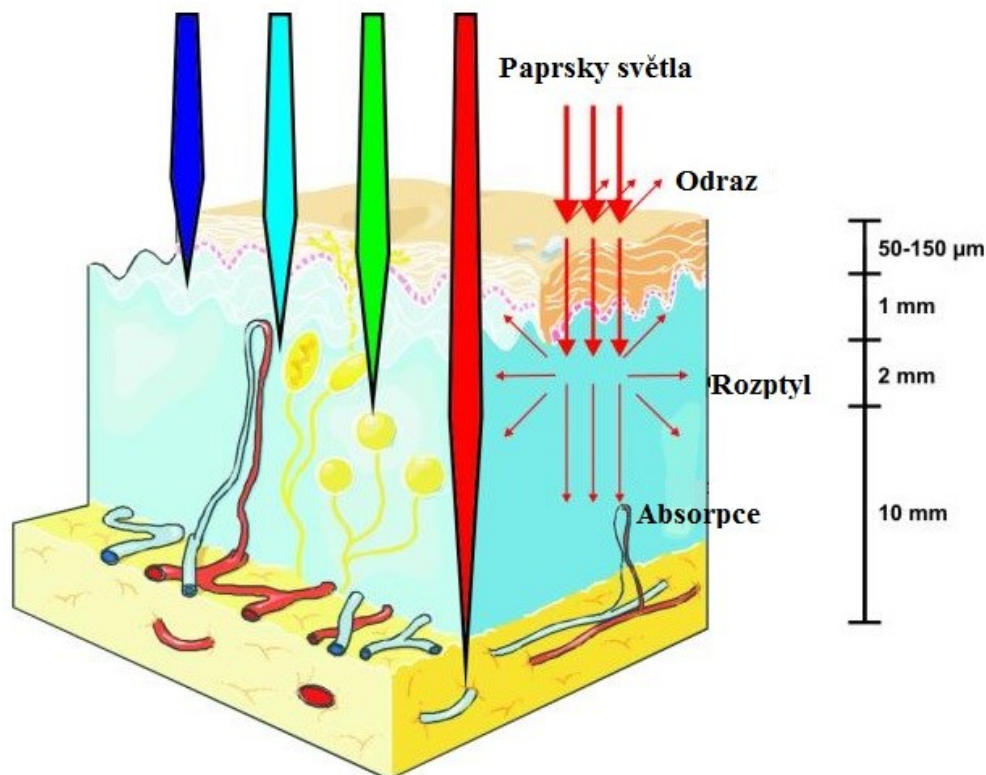
Absorpční koeficient tkáně je určen obsahem chromoforů, tedy molekul schopných absorbovat světlo. Pro vlnové délky používané při PDT jsou ve tkáních hlavními chromofory hem a voda. V některých případech mají však vliv na absorpci světla i lipidy, melanin, bilirubin nebo další pigmentové molekuly (Wilson & Patterson, 2008).

Účinnost PDT velmi úzce souvisí s vlastnostmi světla použitého k aktivaci PS. Při použití světla z oblasti kratších vlnových délek je jeho účinek limitován jeho absorpcí endogenními chromofory, jako je například hemoglobin. Vyšší vlnové délky jsou zase absorbovány vodou obsaženou ve tkáních. Tím je tedy omezen výběr optimální vlnové délky světla na oblast přibližně 600 – 1300 nm, viz. Obr.3. Tato oblast je proto často nazývána jako optické okno tkáně (Straten et al., 2017).



Obrázek 3 Optické okno tkáně. Převzato z (Castano et al., 2004).

Vzhledem k tomu, že světlo s delší vlnovou délkou proniká hlouběji do tkáně, je vhodné používat PS, které absorbují v oblasti světla s delšími vlnovými délkami, viz. Obr.4. Nicméně, vlnová délka světla souvisí také s energií světelných paprsků a světlo s vlnovou délkou > 800 nm nemá dostatečnou energii pro vyvolání fotodynamické reakce a tvorbu $^1\text{O}_2$ (Agostinis et al., 2011).



Obrázek 4 Hloubka průniku světla různých vlnových délek do tkáně. Převzato z (Agostinis et al., 2011).

6.6 KYSLÍK

Je dobře známo, že PDT využívá ROS pro zničení nádorových lézí. Tyto ROS vznikají během fotochemické reakce, při které PS aktivovaný světlem přenáší svou energii na molekuly kyslíku přítomného ve tkáních. Z toho je tedy zřejmé, že PDT je proces závislý na přítomnosti $^3\text{O}_2$ (Wan et al., 2018).

To je však často problém v nádorové tkáni, kde bývá nerovnováha mezi dodávkou a spotřebou $^3\text{O}_2$ nádorovými buňkami. Hypoxie je charakteristická pro mnoho solidních nádorů, což omezuje tvorbu ROS během PDT, přestože je přítomný PS i světlo

v dostatečném množství. Navíc PDT sama o sobě zvyšuje hypoxii, jelikož zvyšuje spotřebu $^3\text{O}_2$ a navíc poškozuje cévy. Nedostatek $^3\text{O}_2$ tak může omezit účinek PDT. Ideální tedy je, pokud je při PDT do nádorového ložiska kromě PS dodáván i $^3\text{O}_2$ (Yuan et al., 2018).

ROS způsobují smrt nádorových buněk vlivem oxidačního stresu. Během PDT vznikají ROS radikálové i neradikálové povahy. Nejčastěji se jedná o $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$, H_2O_2 a $^1\text{O}_2$. Jak bylo popsáno výše, který z nich bude při fotochemické reakci především vznikat, závisí na převažujícím typu reakčního mechanismu (Juarranz et al., 2008).

6.7 FOTOSENSITIZÉR

Jak už bylo řečeno, důležitou složkou PDT je PS. Jedná se o látku, která je lokalizována v cílových buňkách nebo tkáních a zde je aktivována světlem o vhodné vlnové délce. PS poté přenáší energii světla na $^3\text{O}_2$, což vede ke vzniku ROS (Dolmans et al., 2003).

Ideální PS by měl mít několik základních vlastností. Měl by mít známé chemické složení a být dostupný v čisté formě. Je také vhodné, aby byl snadno připravitelný z dostupných prekurzorů ve velkém množství. Měl by být schopen efektivně produkovat $^1\text{O}_2$ a zároveň být málo toxický v absenci záření. Také by se měl co nejefektivněji hromadit v nádorové tkáni a absorbovat světlo s co nejdélší vlnovou délkou, které je schopno pronikat hlouběji do tkání. Důležité je, aby byl z těla rychle a účinně eliminován a měl tak co nejmenší vedlejší účinky například v podobě kožní fototoxicity (Nyman & Hynninen, 2004, Ormond & Freeman, 2013).

V klinické praxi se vyskytují PS ze tří skupin. Jedná se o porfyriny, struktury odvozené od porfyrinu a barviva. Všechny klinicky úspěšné PS mají schopnost cílení na specifické tkáně. Pro funkční terapii musí být každý PS aktivován světlem s vhodnou vlnovou délkou. Navíc mají některé z nich schopnost fluorescence, což napomáhá vizualizaci tumoru a lze toho využít v diagnostice (Allison et al., 2004, Straten et al., 2017).

Většina PS používaných v PDT vychází z tetrapyrolové struktury. Jsou to například porfyriny, ftalocyaniny (Pc), chloriny nebo bakteriochloriny. Kromě toho

existují ale i jiné PS, které mají také své místo v klinickém využití. Patří mezi ně methylenová modř, hypericin, bengálská růžová či hypocrelin (Li et al., 2019).

6.7.1 DĚLENÍ FOTOSENSITIZÉRŮ

PS jsou obvykle klasifikovány jako porfyrinové a neporfyrinové. Porfyrinové PS se dále dělí do tří generací. První generace zahrnuje deriváty hematoporfyrinu (HpD) resp. Photofrin[®]. Tyto PS však mají několik nedostatků, na jejichž základě se vyvinula druhá generace, do které patří například i Pc. Třetí generace PS vznikla navázáním PS druhé generace na přenašeče (protilátky, liposomy, apod.), což zvyšuje selektivitu hromadění PS v nádorových tkáních (Connor et al., 2009).

6.7.1.1 První generace fotosensitizerů

Do této generace PS patří HpD spolu s jeho komerčními analogy, jako je Photofrin[®], Photosan, Photogem[®] nebo Photocarcinorin. Tyto látky hrají důležitou roli ve vývoji fotodynamické terapie. Jedná se o první PS používané v klinické praxi pro terapii nádorových onemocnění (Bonnnett, 1995).

Mají však některé vlastnosti, které jejich využití komplikují. Vzhledem k absorpci při nízkých vlnových délkách je třeba při terapii podávat vysoké dávky PS i světla. Se vzrůstající dávkou PS se ale zvyšuje také riziko vedlejších účinků terapie. Ty se většinou projevují zvýšenou kožní fotosenzitivitou trvající i několik týdnů po aplikaci terapie (Nyman & Hynninen, 2004).

6.7.1.2 Druhá generace fotosensitizerů

Nevýhody spojené s první generací PS vedly k rozsáhlému výzkumu zlepšení účinnosti PS molekul prostřednictvím modifikace porfyrinových molekul. Kromě toho se rozvíjel i výzkum neporfyrinových molekul. PS druhé generace jsou většinou chemicky

čisté látky absorbující světlo při vlnové délce 650 nm nebo delší. Tyto látky nevyvolávají kožní fotosenzitivitu nebo ji v závislosti na dávce vyvolávají v mnohem menší míře (Zhang et al., 2018).

Absorpce při vlnových délkách v oblasti červeného nebo v blízké infračervené oblasti světla umožňuje průnik do tkáně až do hloubky 20 mm (v oblasti kolem 630 nm je to pouze do hloubky 5-10 mm). Kromě toho PS absorbující v této části spektra mohou být použity i pro terapii silně pigmentovaných nádorů, jako jsou například melanomové metastázy, na které jsou PS absorbující ve viditelném a UV spektru neúčinné. Nevýhodou většiny PS druhé generace je jejich omezená rozpustnost ve vodě, což limituje možnost jejich intravenózního podání a nutí vědce hledat nové možnosti způsobu podání (Calzavara-pinton et al., 2007, Knap et al., 2018).

6.7.1.3 Třetí generace fotosensitizerů

Vývoj PS třetí generace je založen na syntéze látek s vyšší afinitou k nádorové tkáni, což by mělo zredukovat poškození okolních zdravých tkání. Pro zvýšení selektivity PS jsou používány následující techniky: kombinace PS druhé generace s molekulami zacílenými na žádaný receptor, kombinace PS druhé generace s LDL lipoproteiny (proliferující tkáň totiž potřebuje více cholesterolu pro syntézu buněčných membrán) nebo konjugace PS s monoklonální protilátkou proti specifickému antigenu nádorových buněk. Tyto úpravy vedou ke zvýšení selektivity a vyšší akumulaci PS v cílové tkáni, což umožňuje snížení dávky PS pro účinnou terapii (Knap et al., 2018).

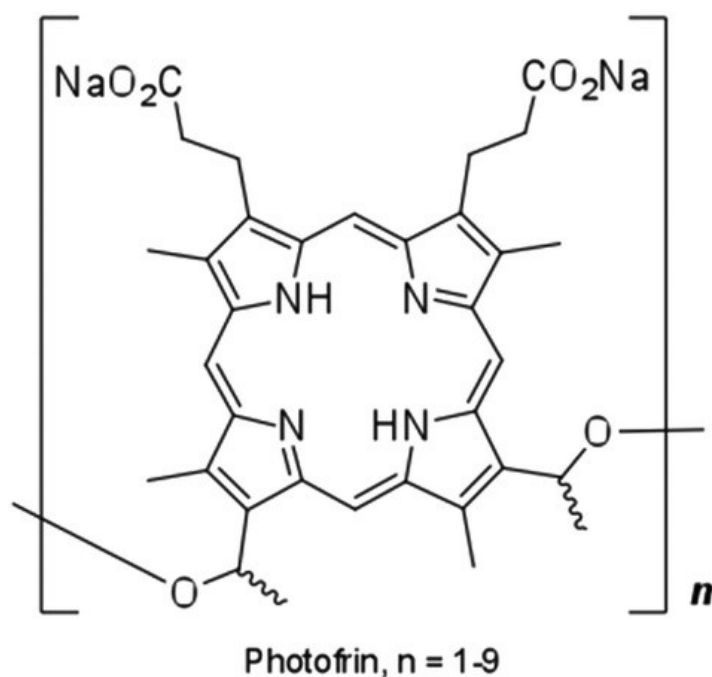
6.8 VYBRANÉ FOTOSENSITIZÉRY POUŽÍVANÉ V KLINICKÉ PRAXI

6.8.1 PORFYRINOVÉ PS

6.8.1.1 Photofrin[®]

Photofrin[®] je dodnes nejpoužívanějším PS v klinické praxi. Jeho využití má však několik limitací. Jelikož se skládá asi ze šedesáti různých složek, je velice obtížné reprodukovat jeho složení. Jeho absorpční maximum je při 630 nm, což se zdá být výhodné, ovšem jeho molární absorpční koeficient při této vlnové délce je nízký, proto je třeba podávat vysoké dávky PS i světla. Navíc není příliš selektivní pro nádorovou tkáň a způsobuje dlouhotrvající fotosenzibilizaci pacientů. Ta se projevuje vznikem edému, erytému a kožních lézí. Pacienti po terapii Photofrinem se tedy musí 4-6 týdnů vyhýbat slunečnímu záření (Dolmans et al., 2003, Nyman & Hynninen, 2004).

Photofrin[®] je v podstatě přečištěnou směsí hematoporfyrinových oligomerů o různé délce spojených různými typy vazeb (C-C, etherové, esterové), viz. Obr.5. Původně se začal používat v Kanadě, dnes jsou jeho komerční varianty dostupné v mnoha dalších státech. V klinické praxi je využíván pro terapii nádorů jícnu, děložního čípku, plic nebo superficiálního karcinomu močového měchýře (Gomes et al, 2018).



Obrázek 5 Photofrin.

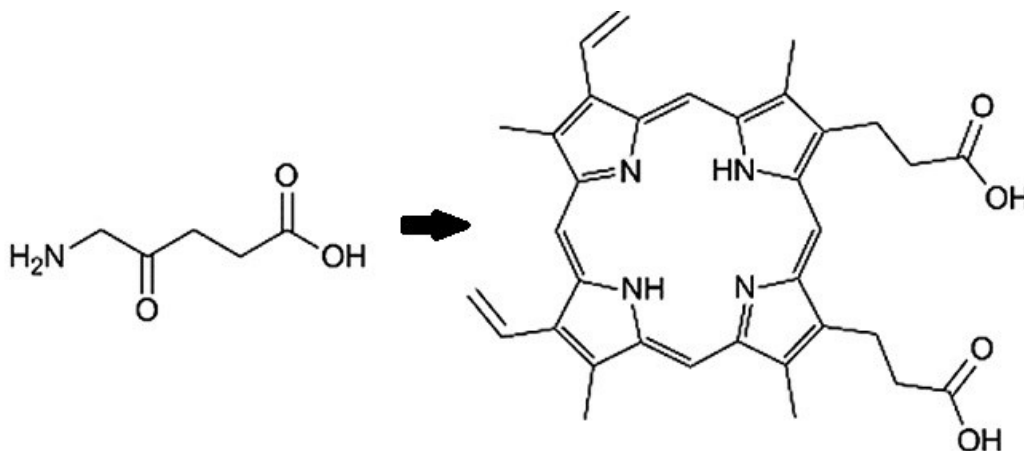
6.8.1.2 5-aminolevulová kyselina

5-aminolevulová kyselina (ALA) je přirozenou aminokyselinou v lidském těle. *In vivo* je syntetizována enzymem 5-ALA-synthasou při tvorbě hemu. Pokud je ALA

přijímána normálními buňkami dochází k její metabolizaci za vzniku protoporfyrinu IX (PpIX; Obr.6), ze kterého následně vzniká hem, který je odbouráván v podobě bilirubinu. V nádorových buňkách je syntéza PpIX umocněna, a navíc je potlačeno jeho odbourávání vlivem zvýšené aktivity transferinového receptoru a snížené aktivity ferochelatózy. Dochází tak k akumulaci PpIX v nádorových buňkách. Ten zde funguje jako PS, který je navíc po ozáření vhodným světlem schopný fluoreskovat, což lze velmi výhodně využít k lokalizaci nádoru (Namikawa et al., 2018).

ALA tedy sama o sobě není PS, proto ji můžeme považovat za proléčivo využitelné v PDT i fotodiagnostice. Při fyziologickém pH se však vyskytuje ve formě zwitteriontu, jehož hydrofilní povaha znesnadňuje vstup látky do cílových buněk. To vedlo k dalšímu výzkumu možností podání ALA a k vývoji jejích derivátů používaných v praxi (Tewari & Eggleston, 2018).

Její vlastnosti jsou vhodné pro využití v terapii kožních onemocnění. Komerčně je dostupná pod názvem Levulan[®] a v praxi se nejčastěji využívá pro léčbu aktinické keratózy a kožních malignit (Gomes et al., 2018).



Obrázek 6 ALA a její aktivní metabolit PpIX.

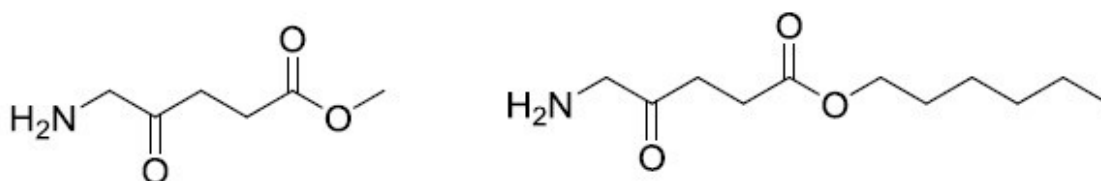
6.8.1.3 Deriváty ALA

ALA estery díky své lipofilitě vykazují vyšší biologickou dostupnost než ALA samotná. Jejich účinek je obdobný, jelikož jsou v buňkách a ve tkáních následně deesterifikovány esterázami a poté podléhají dalšímu metabolismu ALA. Mezi tyto

deriváty patří methylester ALA (komerčně dostupný pod názvem Metvix[®]) a hexylester ALA (dostupný pod názvem Hexvix[®]) (Allison et al., 2004, Warloe et al., 1997).

Metvix[®] (Obr.7, vlevo) je obvykle podáván topicky a je používán v mnoha evropských zemích pro terapii aktinické keratózy a bozocelárního karcinomu s vynikajícími výsledky. Jeho podání je však často spojeno s bolestivou reakcí. Hexvix[®] (Obr.7, vpravo) se používá především pro diagnostiku. Největší uplatnění má v urologii při detekci abnormálních lézí v močovém měchýři. Obvykle je podáván ve formě infuze (Allison et al., 2004).

Kromě výše zmíněných derivátů ALA, které jsou již používány v klinické praxi, jsou zkoumány i další lineární alifatické estery ALA pro potenciální využití v PDT. Navíc jsou zkoumány i estery s jiným než lineárním alifatickým řetězcem. Jsou to například estery s non-lineárním alifatickým řetězcem (např. isopropylester ALA), ethylenglykolové estery (např. O-ethylenglykolmonomethylester), estery s cyklickým řetězcem (např. benzylester) nebo halogensubstituované benzylestery (např. 4-fluorbenzyl ester) (Tewari & Eggleston, 2018).



Obrázek 7 Zleva methylester ALA a hexylester ALA.

6.8.2 CHLORINY

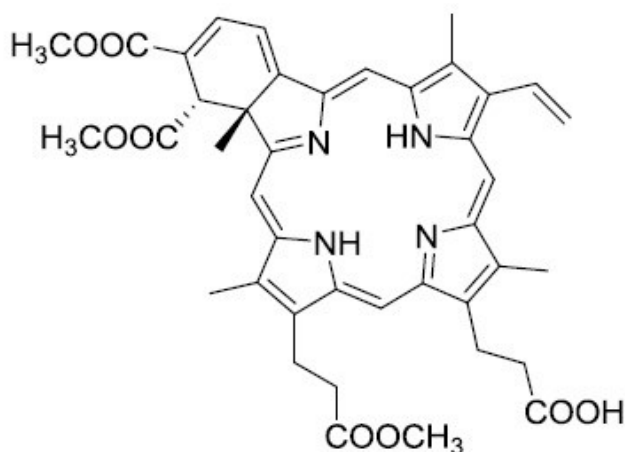
Několik PS pochází také ze skupiny chlorinů. Do této skupiny patří několik důležitých látek, jako jsou verteporfin, Foscan[®], rostoporfin a talaporfin. V porovnání s porfyrinem má jejich struktura navíc dva atomy vodíku na jednom z pyrolových kruhů (Obr.8). Tato strukturální změna vede k bathochromnímu posunu absorpčního pásu ze 640 nm na 700 nm (Ormond & Freeman, 2013).



Obrázek 8 Strukturní základy porfyrinů, chlorinů a bakteriochlorinů.

6.8.2.1 Verteporfin

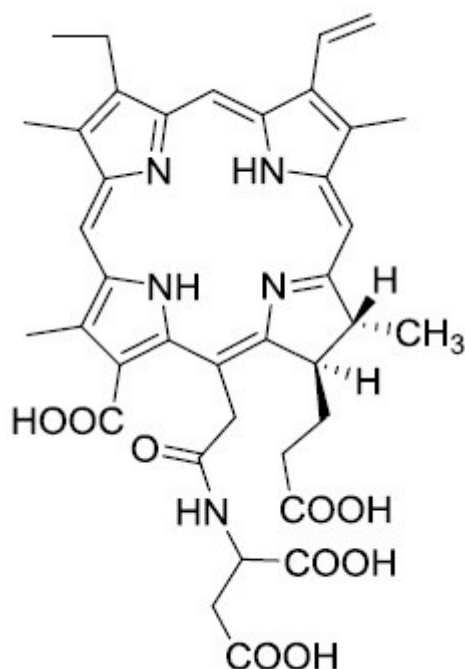
Verteporfin (Obr.9) je komerčně dostupný pod názvem Visudyne[®], což je směs dvou izomerů verteporfinu v přípravku pro injekční podání. Tento PS je aktivován světlem o vlnové délce 690 nm a díky rychlé eliminaci z těla vyvolává pouze krátkodobou kožní fotosenzitizaci. Ve vodných roztocích agreguje, proto je podáván v liposomální formulaci. V klinické praxi je využíván především v oftalmologii pro léčbu věkem podmíněné makulární degenerace (Gomes et al., 2018, Kamkaew et al., 2013).



Obrázek 9 Struktura Verteporfinu.

6.8.2.2 Talaporfin

Talaporfin (Obr.10) neboli mono-L-aspartylchlorin e6 (NPe6, LS11) je ve vodě rozpustný PS druhé generace s velmi rychlou akumulací v nádorové tkáni. Díky rychlé eliminaci a velmi omezené akumulaci v kůži se při jeho použití nevyskytuje zvýšená kožní fotosenzitivita. Komerčně je dostupný pod názvem Laserphyrin[®]. V klinické praxi se používá pro terapii časných stádií rakoviny plic a v klinickém testování je i jeho další využití, například pro terapii nádorů jater nebo rekurentních nádorů krku a hlavy (Yano et al., 2011).

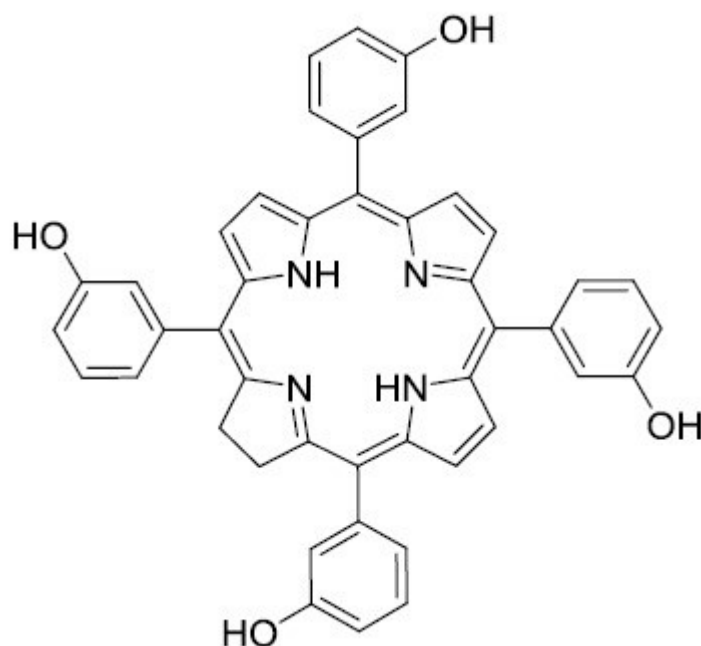


Obrázek 10 Struktura Talaporfinu.

6.8.2.3 Temoporfin

Temoporfin (Obr.11) známý spíše pod komerčním názvem Foscan[®] je dalším z chlorinových PS. Jeho výhodou je, že pro účinnou terapii stačí nízké dávky světla i PS, přesto mohou pacienti pociťovat zvýšenou fotosenzitivitu až po 20 dní. FDA byl schválen pro terapii nádorů hlavy a krku. Dále se testuje jeho využití pro léčbu nádorů žaludku,

pankreatu nebo pro sterilizaci a zabránění růstu ATB rezistentních bakterií (Josefsen & Boyle, 2012, Master et al, 2013).

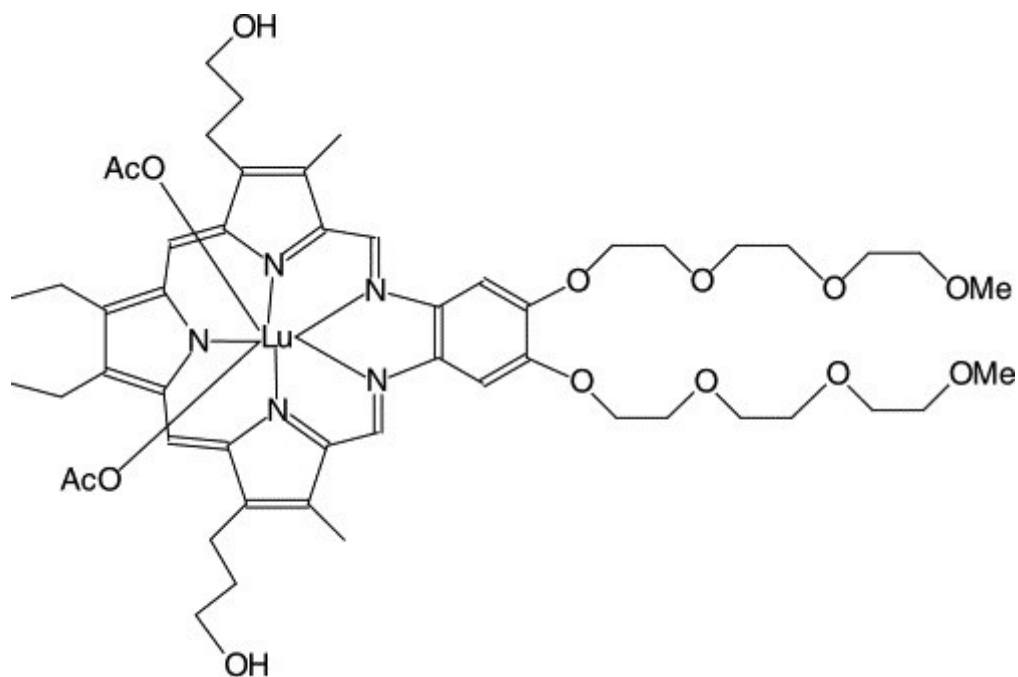


Obrázek 11 Struktura Temoporfinu.

6.8.3 TEXAFYRINY

Další skupinou molekul odvozených od porfyrinu jsou texafyriny. Tyto sloučeniny mají původní porfyrinové jádro rozšířené o jeden atom dusíku, obsahují tedy pět atomů dusíku v rozšířeném jádře. Mohou tak vázat kovy s velkými iontovými poloměry, jako je lutecium nebo gadolinium. Tyto texafyriny obsahující kov mají neobvyklé biologické vlastnosti, což je činí zajímavými pro využití v PDT (Detty et al, 2004).

Hlavní výhodou využití texafyrinů v PDT je jejich silná absorpance při dlouhých vlnových délkách (732 nm). Díky tomu jsou účinné i při terapii větších nádorů nebo hlouběji uložených lézí. Většina těchto látek je v různých fázích klinického testování. Například LutrinTM (luthenium texafyrin; Obr.12), byl testován pro terapii nádorů prsu, jeho další derivát AntrinTM byl testován pro využití u onemocnění kardiovaskulárního systému. Výsledky klinických studií zatím úspěch nepřinesly a tyto látky stále nejsou schváleny pro využití v klinické praxi (Sharman et al., 1999, Keca & Zheng, 2019).



Obrázek 12 Lutetium texafyrin.

6.9 NEPORFYRINOVÉ PS

V posledních letech se mnoho výzkumných týmů zaměřovalo především na tetrapyrrolové PS, jejich konjugáty a další analoga. V důsledku nevýhod těchto látek (kožní fotosenzitizace, absorpce při nízkých vlnových délkách, vyšší toxicita bez ozáření, omezená rozpustnost ve vodě apod.) je však nutné objevovat nové skupiny PS. Komplexní struktura porfyrinu znesnadňuje vývoj derivátů, což je jeden z důvodů, který vedl k vývoji nové skupiny PS, které ve své struktuře neobsahují tetrapyrrolové jádro – neporfyrinové PS (Salerno et al., 2017).

6.9.1 ANTRACHINONY

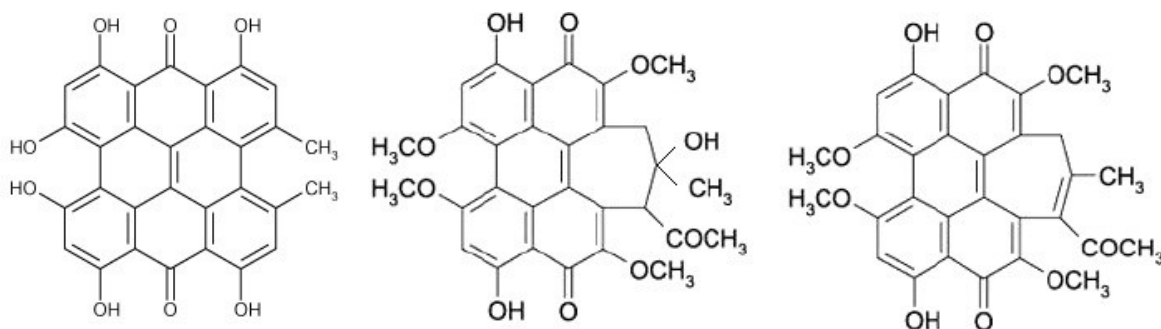
6.9.1.1 Hypericin

Hypericin (Obr.13) je sekundárním metabolitem rostlin izolovaný z čeledi třezalkovitých, jehož fotodynamická aktivita byla poprvé pozorována u dobytka, kde se

projevovala zvýšenou kožní fotosenzitivitou po pozření většího množství těchto rostlin. Hypericin je pravděpodobně nejúčinnějším přirozeně se vyskytujícím PS. Pro jeho použití v praxi je důležité vědět, že jeho fotodynamická aktivita je silně závislá na přítomnosti kyslíku. Klinické studie potvrdily jeho potenciál pro léčbu recidivujícího mezoteliomu, bazocelulárního karcinomu a dlaždicobuněčného karcinomu. Ve formě pro topické použití dosáhl výborných výsledků v první fázi klinického testování pro terapii psoriázy, bradavic a rakoviny kůže. Velmi slibné jsou i výsledky druhé fáze klinického testování této látky (Agostinis et al, 2002, Rook et al., 2010).

6.9.1.2 Deriváty hypocrelinu

Hypocrellin A a B (Obr.13) patří do stejné strukturní skupiny jako hypericin. Tyto látky jsou také přírodního původu a také probíhá jejich studium pro terapii nádorových onemocnění. Je možné je izolovat z parazitické houby *Hypocrella bambuase* nebo *Shiraia bambusicola*. Pro použití v PDT je výhodné, pokud se podávají enkapsulované v liposomech (Abrahamse et al, 2017).



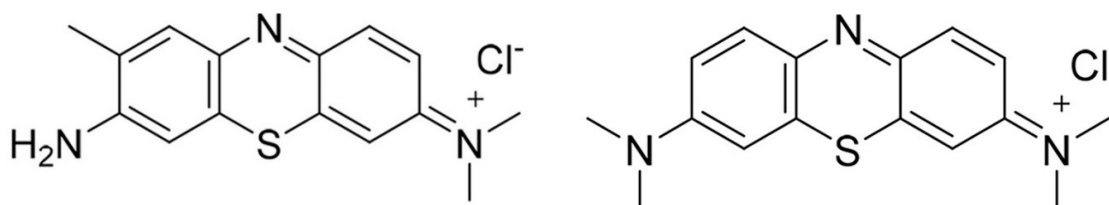
Obrázek 13 Zleva hyperycin, hypocrellin A a hypocrellin B.

6.9.2 DERIVÁTY FENOTHIAZINU

Tyto látky jsou intenzivně studovány pro využití v antimikrobiální PDT. Nejpopulárnější fenothiazinová barviva jsou methylenová modř a toluidinová modř. Obě tyto látky jsou charakterizovány přímou buněčnou toxicitou, vysokým molárním

extinkčním koeficientem, absorpčním maximem v oblasti více než 600 nm (Salerno et al., 2017).

Methylenová modř (Obr.14) je klinicky testována na pacientech pro využití v terapii malignit, jako je bazocelulární karcinom v chirurgicky těžko přístupných lokalitách, Kaposiho sarkom a maligní melanom. V klinických studiích pro léčbu bazocelulárního karcinomu dosáhla velmi dobrých výsledků. Kromě toho se klinicky testuje i využití pro léčbu nenádorových onemocnění, jako je onychomykóza. V současné době je využívána k dezinfekci prostředí po kontaminaci krevními produkty. Toluidinová modř (Obr.14) je spolu s methylenovou modří testována i pro využití v zubním lékařství. Zde se její účinek testuje na pacientech trpících periodontitidou (Del et al., 2005, Meisel & Kocher, 2005, Samy et al., 2015).

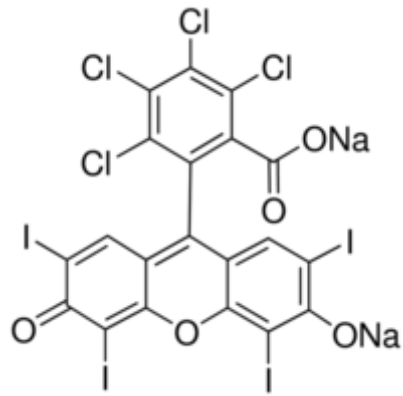


Obrázek 14 Zleva toluidinová modř a methylenová modř.

6.9.3 XANTENY

6.9.3.1 Bengálská růžová

Bengálská růžová (Obr.15) patří do skupiny xantenových fluorescenčních barviv (do stejné skupiny látek patří také fluorescein). Zavedení těžkých halogenových atomů do molekuly usnadňuje přechod molekul do tripletového stavu a zvyšuje tak výtěžek fotochemické reakce. Tato látka má za sebou dlouhou historii jako fotoaktivní barvivo a je zkoumáno její využití pro PDT nádorových onemocnění, ale i pro fotodynamickou antimikrobní terapii (Abrahamse et al., 2017).

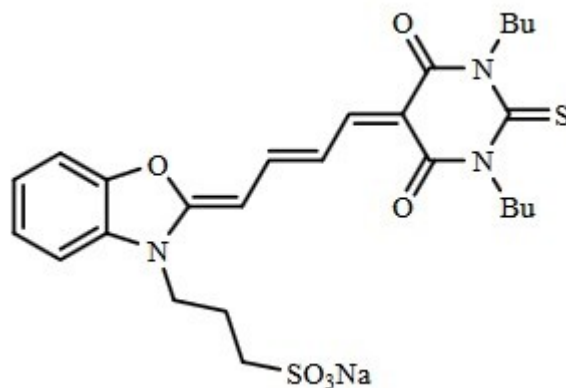


Obrázek 15 Bengálská růžová.

6.9.4 CYANINY

6.9.4.1 Merocyanin

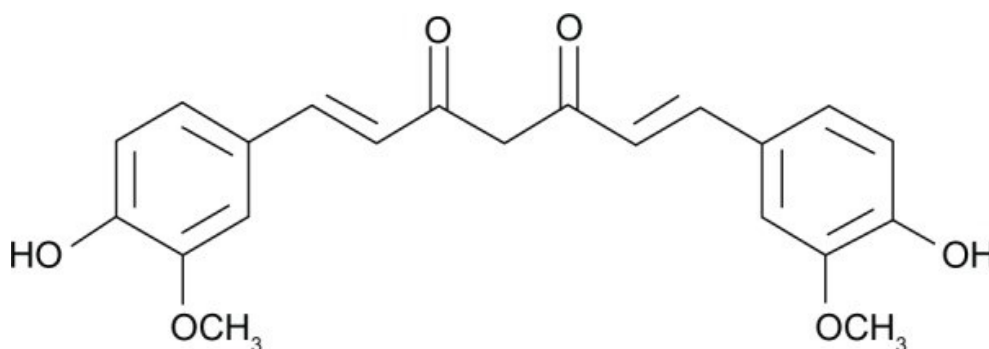
Merocyanin (Obr.16) je nenabitě barvivo s absorpčním maximem 555 nm a schopností cílit na leukemické a lymfomové buňky. Tato látka je v první fázi klinického testování pro *ex vivo* přečištění autologních štěpů kostní dřeně kontaminovaných leukemií nebo lymfomem. Kromě toho byly také popsány jeho účinky na multirezistentní buňky, bohužel jeho absorpční maximum v nízkých vlnových délkách limituje možnosti jeho použití *in vivo* (Detty et al., 2004, Ormond & Freeman, 2013).



Obrázek 16 Merocyanin.

6.9.5 KURKUMINOIDY

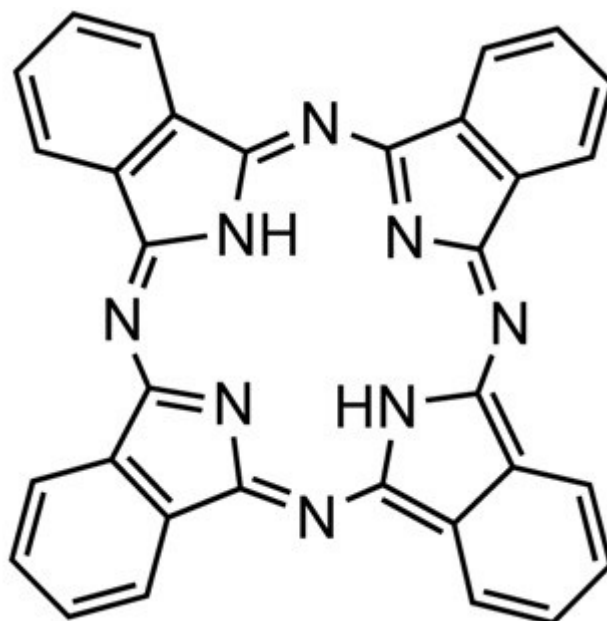
Kurkumin (Obr.17) je přírodní žlutý pigment izolovaný z kořene rostliny *Curcuma longa*. Tato látka má široké spektrum farmakologických účinků – protizánětlivý, antikancerogenní, protiinfekční. Kurkumin absorbuje světlo v modré oblasti spektra, proto se používá zvláště v topickém podání pro léčbu povrchových lézí. Mezi jeho výhody patří cenová dostupnost, snadná manipulace a výborná efektivita, jeho nevýhodou je naopak omezená rozpustnost ve vodě. Největší uplatnění našel v antimikrobiální fotochemoterapii (PACT) a to především v zubním lékařství pro eradikaci orálních patogenů (Abrahamse et al., 2017, Oniszczyk et al, 2016).



Obrázek 17 Kurkumin.

6.10 FTALOCYANINY

Pc jsou planární aromatické heterocykly, které jsou tvořeny čtyřmi isoindolovými kruhy spojenými atomy dusíku (Obr.18). Jakožto PS druhé generace mají mnoho výhod pro použití v PDT díky své absorpci při vyšších vlnových délkách ($> 670 \text{ nm}$) a vysokému extinkčnímu koeficientu ($\epsilon_{\text{max}} > 1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Jelikož silně absorbují v PDT okně tkání, vykazují nižší absorpci v oblasti 400-600 nm, což je oblast spektra, kde je sluneční záření nejintenzivnější. Díky tomu nevyvolávají téměř žádné zvýšení fotosenzitivity na denní světlo (Li et al., 2019, Ragoussi & Ince, 2013).



Obrázek 18 Struktura ftalocyaninového makrocyclického jádra.

Sloučeniny Pc s kovy, především jejich komplexy s mědí, mají velký význam jako komerční pigmenty již od roku 1930. V minulých letech zaznamenaly tyto látky a jim příbuzné sloučeniny velký úspěch v elektronickém průmyslu, kde se využívají například při fotokopírování nebo při výrobě CD. S rozvojem PDT bylo zjištěno, že komplexy Pc s různými nepřechodnými prvky, jako je zinek, hliník nebo křemík, mají fotobiologickou aktivitu proti nádorům (Bonnett, 1995).

Pc jsou látky velmi blízké příbuzné s porfyriny. Stejně jako porfyriny jsou to intenzivně barevné symetrické aromatické makrocycly. Tvoří koordinační komplexy s celou řadou kovů. Tyto komplexy bývají obvykle výrazně zelené nebo modré barvy, proto se široce používají jako barviva (Josefsen & Boyle, 2012).

Přítomnost centrálně umístěného diamagnetického kovu, jako je Zn^{2+} a Al^{3+} , v molekule zlepšuje stabilitu tripletového stavu PS i jeho výtěžnost a zvyšuje také výtěžek singletového kyslíku. Přítomnost kovu v molekule však není pro fotodynamickou aktivitu Pc nezbytná (Sekkat, 2012).

Vzhledem ke své vnitřní struktuře jsou nesubstituované Pc nerozpustné téměř ve všech používaných rozpouštědlech. Pro jejich využití v terapii je tedy třeba připravit jejich rozpustné deriváty. Z tohoto důvodu se k jejich molekule přidávají různé substituenty zvyšující rozpustnost. Mohou to být fenoxi- či alkoxy- skupiny, alkylové

řetězce, sulfonové skupiny, jednotky na bázi fosforu nebo skupiny nesoucí kvarterizovaný dusík (Ertem et al., 2018).

Nevhodnou vlastností Pc je jejich agregace, která snižuje rozpustnost a přináší problémy s purifikací. Agregace navíc snižuje stabilitu tripletového stavu a snižuje výtěžek $^1\text{O}_2$. Ve vodném prostředí se silně zvyšuje poměr dimer/monomer Pc a barvivo se zde nachází téměř výhradně v agregované formě. Toto chování může být potlačeno vhodnou substitucí (Kostka et al., 2006).

V porovnání se strukturou porfyrinových PS mají Pc několik změn v molekule. Jsou to *meso* atomy dusíku a přikondenzovaná benzenová jádra. Fotofyzikální vlastnosti Pc jsou silně závislé na centrálním atomu. Jejich výhodou oproti porfyrinům je jejich schopnost absorbovat záření z červené oblasti viditelného světla, které dokáže pronikat hlouběji do tkání (Ishii, 2012).

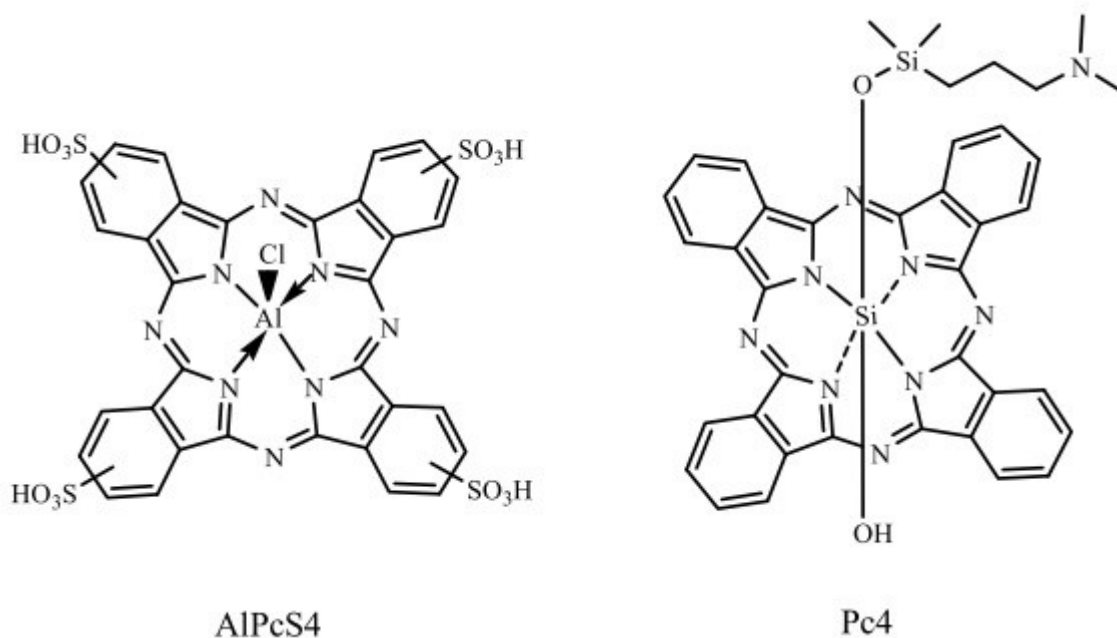
Díky silné absorpci při vyšších vlnových délkách stačí pro efektivní terapii podávat velmi nízké dávky. Dostačující dávky se pohybují v rozmezí 0,2 – 0,5 mg/kg, u Photofrinu[®] je účinná dávka 1-5 mg/kg. Navíc je jejich farmakokinetika v těle mnohem rychlejší v porovnání s HpD. Jejich akumulace v nádorové tkáni probíhá do 1-3 h po injekčním podání a z těla jsou eliminovány do 24 h (Nyman & Hynninen, 2004).

Systémově podávaný zinečnatý ftalocyanin, měďnatý ftalocyanin a chloraluminium ftalocyanin jsou nyní testovány pro terapii nemelanomového nádoru kůže. Topicky podávaný amfifilní ZnPc vykazuje vysokou fotosenzitivní aktivitu na bakteriální (včetně gramnegativních bakterií a multirezistentních kmenů *Staphylococcus aureus*), a houbové (*Candida albicans* a *Trychophyton rubrum*) patogeny na lidské kůži bez poškození keratinocytů (Calzavara-pinton et al, 2007b).

Sulfonovaný hydroxyhlinitý ftalocyanin (Obr.19), známý pod svým komerčním názvem Photosens[®], je směs AlPcs nesoucích dvě až čtyři sulfonové skupiny (nejčastěji tři). Photosens[®] absorbuje při 675 nm a má nejvyšší molární absorpční koeficient z celé skupiny PS druhé generace. PDT procedura probíhá stejně jako při použití Photofrinu[®], jen se podávají mnohem nižší dávky PS i světla (Yano et al., 2011).

Photosens[®] je komerčně dostupný a schválený pro terapii v Rusku. Může být podáván intravenózně, injekcí přímo do místa léze nebo ve formě aerosolu. Má rozsáhlé využití pro terapii nádorových i infekčních onemocnění. Výborné výsledky vyukazuje

pro léčbu nádorů hlavy a krku. Patří mezi ně nádory rtu, hrtanu, hltanu a jazyka. Kromě toho se používá i pro terapii nádorů plic nebo jícnu (Allison et al., 2004, Allison & Sibata, 2010).



Obrázek 19 Photosens a Pc4.

Křemičitý ftalocyanin Pc4 (Obr.19), PS absorbující při 675 nm, dokončil první fázi klinického testování pro léčbu aktinické keratózy, Bowenovy nemoci a rakoviny kůže. Další ftalocyanin s velmi slibnými výsledky je zinečnatý ftalocyanin, který je ve Švýcarsku ve třetí fázi klinického testování pro terapii spinocelulárního karcinomu (Ormond & Freeman, 2013, Yano et al., 2011).

6.10.1 FTALOCYANINY ROZPUSTNÉ VE VODĚ

Vzhledem k tomu, že rozpustnost ve vodném prostředí je velmi výhodná v biologickém systému, je tato vlastnost hlavním kritériem při navrhování nových Pc. Pro zvýšení rozpustnosti ve vodě se běžně používají dvě hlavní strategie. První možností je začlenit do molekuly Pc iontové substituenty. Může se jednat o substituenty anionické,

kationické i zwitterionty. Ve druhém případě je molekula substituována neiontovými, ale vysoce hydrofilními skupinami například na bázi polyethylenglykolu nebo sacharidů (Li et al., 2019).

Ještě výhodnější je, pokud je Pc amfifilní. Jak již bylo zmíněno, rozpustnost ve vodě je výhodná pro transport Pc v biologickém prostředí. Jeho lipofilita je oproti tomu výhodná pro prostup Pc do buňky. Bylo zjištěno, že amfifilní Pc jsou v zabíjení buněk pomocí PDT aktivnější než hydrofilní nebo lipofilní formy (Wei et al., 2006, Zimcik et al., 2006).

6.10.1.1 Anionické ftalocyaniny rozpustné ve vodě

Anionické substituenty běžně užívané pro zvýšení rozpustnosti Pc ve vodě jsou sulfonát, karboxylát nebo funkční skupiny na bázi fosforu. Mohou být připojeny přímo na Pc jádro nebo konjugovány přes různé spojky. Jejich rozpustnost je však silně závislá na pH. Pc obvykle nesou pouze jednu z těchto funkčních skupin. Výjimkou je pouze jeden Pc, který nese současně sulfonovou i karboxylovou skupinu (Dumoulin et al., 2010).

6.10.1.2 Kationické ftalocyaniny

V poslední době je velká pozornost věnována pozitivně nabitým Pc a jejich využití v PDT a PACT. Zavedení kladně nabitých periferních substituentů do molekuly Pc zlepšuje jejich fotofyzikální vlastnosti a také zvyšuje jejich afinitu k buněčným membránám. Kvaternizace periferních atomů dusíku navíc zvyšuje rozpustnost Pc a chrání je před agregací (Lipatova et al., 2018).

Kvaternizace se provádí na konci syntetické dráhy Pc. Atom dusíku, který bude kvaternizován, je přítomen při vzniku Pc ve formě aminu, derivátu pyridinu nebo může být i součástí samotného makrocyklu. Pozice substituentů na ftalocyaninovém jádře a typ centrálního atomu výrazně ovlivňují fotofyzikální vlastnosti Pc (Dumoulin et al., 2010, Machacek et al., 2015).

Kationické Pc se ukázaly jako velmi účinné PS pro inaktivaci široké škály mikrobiálních patogenů. Ve studiích zaměřených na ve vodě rozpustné Pc, tedy anionické, kationické a neutrální, bylo prokázáno, že kationické Pc jsou z nich nejúčinnější. Kladný náboj Pc také zlepšuje prostup do buněk. Navíc se většina kationických Pc hromadí v mitochondriích, což je jeden z nejdůležitějších cílů v PDT, jehož poškození vyvolá apoptózu (Fabris et al., 2006, Zimcik et al., 2006).

6.11 AZAFTALOCYANINY

Kromě běžných periferních či neperiferních substitucí Pc můžeme také ve strutuře Pc nahradit některý z hlavních uhlíků jiným atomem. Taková změna vede k výrazným změnám chemických a fotochemických vlastností. Nejběžnějším takto používaným heteroatomem je dusík. Výsledná struktura je pak nazývána azaftalocyanin (AzaPc). Tyto látky obvykle absorbují v oblasti kolem 750 nm. Díky tomu mohou být použity pro terapii hlouběji se nacházejících lézí (Miletin et al., 2018, Zimcik et al., 2010).

Stejně jako Pc jsou i AzaPc planární makrocyclické sloučeniny, které mají sklon agregovat, což také vede k problémům s rozpustností, purifikací, charakterizací a ztrátou efektivity. Pro zamezení jejich agregace jsou opět využívány různé objemné substituenty nebo nabitě substituenty (Zimcik et al., 2006).

Jelikož jsou AzaPc strukturálně velmi podobné Pc, používají se také v podobných aplikacích. Substituované AzaPc jsou obecně lépe rozpustné než jejich Pc analogy. Proto jsou také lépe využitelné v technologii. Používají se například jako barviva, pro kontrolu růstu mikroorganismů, jako katalyzátory při redukci kyslíku, jako materiály pro elektrochromní displeje a jako média pro optické ukládání dat. Kromě toho se také využívají v experimentální PDT (Kobak & Gül, 2009).

Pro využití v PDT se ukázaly výhodnější kationické deriváty AzaPc. U AzaPc bez těchto substituentů dochází ve velké míře k jejich agregaci, a tím i ke ztrátě schopnosti účinně produkovat $^1\text{O}_2$. V současné době je studováno velké množství různých AzaPc potenciálně využitelných v PDT (Miletin et al., 2018).

Bylo zjištěno, že podoba absorpčního spektra AzaPc závisí na poloze heteroatomu v benzenovém kruhu. Nejlepším prekurzorem pro syntézu AzaPc jsou dinitrily heterocyklických O-dikarboxylových kyselin (Kudrevich & Van Lier, 1996).

7 CÍLE PRÁCE

- Stanovení časového profilu prostupu látek do buněk
- Určení subcelulární lokalizace hodnocených PS
- Stanovení fotodynamické aktivity u vybraných ftalocyaninových a azaftalocyaninových fotosenzitizerů na lidské nádorové buněčné linii HeLa.
- Stanovení vlastní toxicity vybraných látek bez přítomnosti světla (dark toxicita)
- Fotografická dokumentace a hodnocení morfologických změn v buňkách vlivem PS aktivovaných světlem
- Porovnání účinnosti studovaných látek

8 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

8.1 VYBAVENÍ PRO PRÁCI S BUNĚČNOU LINIÍ

8.1.1 PRACOVNÍ POMŮCKY

- automatické pipety, různý rozsah (Eppendorf, Německo)
- 8-kanálová elektronická pipeta e-PET BioHit 50-1200 μ l (BioHit, Finsko)
- sterilní špičky, plastové, různý rozsah (Eppendorf, Německo)
- sterilní pipety, plastové, různý objem (TPP, Švýcarsko)
- pipetovací nástavce Biohit Midi Plus (Biohit, Finsko) a SwiftPet+ (HTL, Polsko)
- Pasteurovy pipety, sterilní (Brand, Německo)
- sterilní inkubační nádoby T75, plastové (TPP, Švýcarsko)
- 96-jamkové mikrotitrační destičky, ploché dno (TPP, Švýcarsko)
- Petriho misky, sterilní, vhodné pro konfokální mikroskopii, 3 cm průměr misky, 1,2 cm průměr skleněného dna, tloušťka skla 140 μ m; (WillCo Wells, Nizozemsko)
- sterilní plastové Petriho misky (TPP, Švýcarsko)
- sterilní škrabky (Sigma, Německo)
- sterilní mikroskopická sklíčka s kultivačním nástavcem (Eppendorf, Německo)
- plastové sterilní centrifugační zkumavky o objemu 15 ml (TPP, Švýcarsko)
- sterilní mikrozukavky, různý objem (Eppendorf, Německo)
- sterilní laboratorní sklo (Thermo Fisher Scientific, USA)
- sterilní plastové vaničky
- podložní a krycí sklíčka (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Bürkerova komůrka (Brand, Německo)

8.1.2 PRACOVNÍ PŘÍSTROJE

- buněčné inkubátory s termostatem a regulací koncentrace CO₂ (Sanyo, Japonsko a Esco, USA)
- box s laminárním prouděním Bio Air TopSafe 1.2 (EuroClone, Itálie)
- 450 W xenonová lampa Newport (Newport Corporation, USA)
- desková třepačka Heidolph Titramax 100 (Heidolph Instruments, Německo)
- vodní lázeň (Mettler, Německo)
- invertovaný fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse Ti-E (Nikon, Japonsko)
- čtečka mikrotitračních destiček Tecan Infinite M200 (Tecan Group Ltd., Švýcarsko)
- luminiscenční spektrometr AMINCO Bowman Series 2 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- konfokální laserový rastrovací mikroskopický systém Nikon A1+ (Nikon, Japonsko)
- centrifuga Hermle Z 300 (Hermle Labor Technik, Německo)

8.1.3 POUŽITÉ CHEMICKÉ LÁTKY A REAGENCIE

- kultivační médium DMEM (Lonza, Belgie)
- fetální bovinní sérum (Lonza, Belgie)
- pufr HEPES (Sigma-Aldrich, USA)
- L-glutamin (Lonza, Belgie)
- penicilin/streptomycin (Lonza, Belgie)
- fosfátový pufr, tablety (Sigma-Aldrich, USA nebo MP Biomedicals, USA)
- trypsin/EDTA (Lonza, Belgie)
- trypanová modř, 0,4% (Sigma-Aldrich, USA)
- roztok peroxidu vodíku, 3% (Fluka, Sigma, Německo)
- roztok neutrální červeně, 3,3 mg/ml (Sigma-Aldrich, USA)
- fixační roztok pro neutrální červeně – 1% roztok CaCl₂ v 0,5% formaldehydu

- lyzační roztok pro neutrální červeň – 1% roztok ledové kyseliny octové v 50% etanolu
- dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich, USA)
- fotosensitizer P39 (vědecká skupina prof. Zimčíka, FaF UK)
- fotosensitizer P40 (vědecká skupina prof. Zimčíka, FaF UK)
- fotosensitizer P41 (vědecká skupina prof. Zimčíka, FaF UK)
- fotosensitizer P42 (vědecká skupina prof. Zimčíka, FaF UK)
- paraformaldehyd (Sigma-Aldrich, USA)
- bovinní sérový albumin (BSA; Sigma-Aldrich, USA)
- purifikovaná ultračistá voda (MQ-voda, Millipore, USA)
- fluorescenční sonda LysoTracker Blue DND-22 (Molecular Probes, USA)
- fluorescenční sonda MitoTracker Green FM (Molecular Probes, USA)
- fluorescenční sonda Hoechst 33342 (Molecular Probes, USA)
- fluorescenční sonda MitoTracker Red CMXRos (Molecular Probes, USA)
- Fluorescenční sonda Actin Green (Molecular Probes, USA)
- ADS pufr (116 mM NaCl, 5,3 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄·7H₂O, 1,13 mM NaH₂PO₄·2H₂O, 20 mM HEPES)
- ProLong AntiFade montovací médium (Thermo Fisher Scientific, USA)
- permeabilizační pufr (0,5% Triton X-100 v dPBS)
- roztok BCA (bicinchonic acid)
- 4% roztok CuSO₄ · 6H₂O

8.2 BUNĚČNÁ LINIE HELA

Buněčná linie HeLa je nejrozšířeněji používanou buněčnou linií a je také první buněčnou linií, kterou se podařilo kultivovat v *in vitro* podmínkách. Tato buněčná linie vychází z buněk lidského cervikálního karcinomu odebraného v roce 1951 pacientce Henriettě Lacksové, odtud také pochází její název (Landry et al., 2013).

Dnes je tato linie široce používána díky své rychlé a nepřetržité proliferaci a snadné pasážovatelnosti buněk. Bohužel je však v buňkách přítomný gen pro lidský papillomavirus 18 (HPV-18), který může vyvolat neoplastickou aktivitu. Tato skutečnost je tedy jistou nevýhodou této buněčné linie a její použití s sebou tak přináší i určitá pracovní rizika. Proto je při práci s touto buněčnou linií důležité dodržovat bezpečnostní opatření.

HeLa buňky jsme získali z Americké banky buněčných linií (ATCC, USA) a byly použity pro všechny naše experimenty.

8.2.1 KULTIVAČNÍ MÉDIUM

Pro kultivaci buněk jsme použili suplementované médium DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium). K tomuto základnímu médiu bylo postupně přidáno 10 obj.% FBS, 1 obj.% 1M HEPES pufru, 1 obj.% 100× Penicilin-Streptomycin a 2 obj.% 200mM L-glutaminu. Takto připravené médium se označuje jako sérum obsahující médium (SCM, kultivační médium). Stejným způsobem bylo připravováno i bezsérové médium (SFM) používané pro některé experimenty. Jediným rozdílem v přípravě bylo vynechání přídavku FBS.

Kultivační médium bylo připravováno sterilně v prostorách laminárního boxu. Všechny použité látky kromě HEPES pufru byly předem vytemperovány na teplotu 37°C. Před použitím bylo médium důkladně promícháno. Takto připravené médium bylo uchováváno v ledničce a před každým použitím bylo vytemperováno ve vodní lázni na 37°C.

8.2.2 KULTIVACE BUNĚK

Buňky byly kultivovány v připraveném SCM médiu ve sterilních plastových kultivačních lahvích T75. Kultivace byla prováděna za standardních podmínek, tedy v inkubátoru při teplotě 37°C, v atmosféře s obsahem 5% CO₂ a konstantní humiditě. Veškerá manipulace s buňkami byla prováděna sterilně v prostředí laminárního boxu.

8.2.3 PASÁŽOVÁNÍ BUNĚK

Pasážování neboli subkultivace je proces, při kterém dochází k přenosu poměrné části buněk do nové lahve s čerstvým kultivačním médiem. Tento proces je nezbytný pro udržení životaschopnosti buněčné kultury v *in vitro* podmínkách. Je nutné provádět jej v pravidelných intervalech kvůli vyčerpání živného média.

Aby nedocházelo k nežádoucím změnám morfologie, vlastností a životaschopnosti buněčné kultury, bylo prováděno pasážování buněk pokaždé, když dosáhly 80-90% konfluence (stav, kdy buňky pokryjí většinu povrchu dna a začínají se dostávat do vzájemného kontaktu). Jeho dosažení bylo před každým pasážováním kontrolováno mikroskopicky, stejně jako morfologie buněk či přítomnost nežádoucí kontaminace. Obvyklá doba mezi dvěma pasážováními byla 3 až 4 dny.

Proces pasážování začíná odběrem původního média z kultivační lahve a následným oplachem buněk sterilním předeřátým PBS. Oplach buněk byl vždy proveden dvakrát, aby došlo k odstranění séra, které v sobě obsahuje trypsininaktivující složky. Následně byl přidán 1 ml roztoku trypsinu s EDTA, který pomohl oddělit buňky ode dna. Roztok byl rovnoměrně rozprostřen po celém dně a buňky byly v jeho přítomnosti inkubovány po dobu maximálně 5 minut v inkubátoru při 37°C.

Po uplynutí časového limitu byla opět provedena kontrola pod mikroskopem, abychom se ujistili, že se všechny buňky díky působení trypsinu oddělily ode dna a staly se suspenzemi. Následně bylo nutno inaktivovat trypsinový roztok a ukončit tak proces trypsinizace, jinak by jeho vlivem došlo i k poškození buněk. To bylo provedeno přidáním 9 ml předeřátého SCM.

Buňky pak byly důkladně opláchnuty a resuspendovány opakovaným nasátím obsahu lahve do pipety a vypuštěním proti dnu lahve, aby došlo k rozbití případných shluků buněk a vytvoření homogenní suspenze. Poměrná část této suspenze byla následně odebrána do nové sterilní kultivační lahve, do které bylo předem napipetováno 15 ml čerstvého předeřátého SCM.

V nové lahvi byla opět vytvořena homogenní suspenze opakovaným nasátím a vypuštěním obsahu lahve proti dnu. Takto vytvořená suspenze buněk se vodorovným pohybem lahví rozprostřela po celém dnu. Buňky byly dále kultivovány za standardních výše popsaných podmínek do další pasáže. Zbytek buněk byl poté využit pro samotné experimenty.

Celý proces byl prováděn za sterilních podmínek v prostředí laminárního boxu a všechny použité roztoky byly předem vytemperovány ve vodní lázni na teplotu 37°C.

8.2.4 STANOVENÍ POČTU ŽIVOTASCHOPNÝCH BUNĚK

Počet živých buněk byl stanoven mikroskopicky v Bürkerově komůrce po obarvení buněčné suspenze roztokem trypanové modři. Princip této metody spočívá v tom, že trypanová modř je barvivo schopné difundovat skrz plazmatickou membránu a snadno tak vstupovat do buněk. Živé buňky ji pak aktivně transportují zase ven, kdežto mrtvým buňkám tato schopnost chybí a barvivo se v nich hromadí. V mikroskopu se nám tedy živé buňky jeví jako bezbarvé kulaté útvary na slabě modrém pozadí a mrtvé buňky jsou sytě modré.

Nejprve jsme tedy do připravené mikroskopavky napipetovali 0,4% roztok trypanové modři. K tomuto roztoku byla přidána v poměru 1:1 buněčná suspenze zbylá z výše popsaného procesu pasážování. Obsah zkumavky byl následně promíchán a inkubován 5 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí tohoto intervalu byla směs opět promíchána a aplikována na Bürkerovu komůrku v množství 10 μ l na každou polovinu.

Pod mikroskopem byly počítány neobarvené buňky v 5 čtvercích každé poloviny při desetinásobném zvětšení. Výsledný počet živých buněk byl přepočítán na množství životaschopných buněk v 1 ml suspenze.

8.2.5 NASAZOVÁNÍ BUNĚK NA EXPERIMENTY

Pro zajištění reprodukovatelnosti výsledků bylo nutné zachovat pro všechny experimenty maximálně shodné podmínky. Pro všechny pokusy jsme tedy používali stejné kultivační nádoby a suspenzi buněk o stejné koncentraci. Pro cytotoxicitní experimenty jsme používali suspenzi buněk o koncentraci 100 000 buněk/ml. Tato koncentrace byla získána naředěním původní buněčné suspenze zbylé z pasážování buněk čistým SCM, jehož objem byl předem spočítán podle výsledného počtu živých buněk v suspenzi.

Takto připravená buněčná suspenze byla pomocí multikanálové automatické pipety aplikována na 96-jamkové destičky. Na každou jamku připadl objem 100 μ l, což znamená, že v každé jamce bylo přibližně 10 000 buněk. Destičky s buňkami byly poté ponechány 24 h v inkubátoru za standardních podmínek. Po uplynutí této doby byly buňky narostlé v dostatečném množství a připravené pro prováděné experimenty.

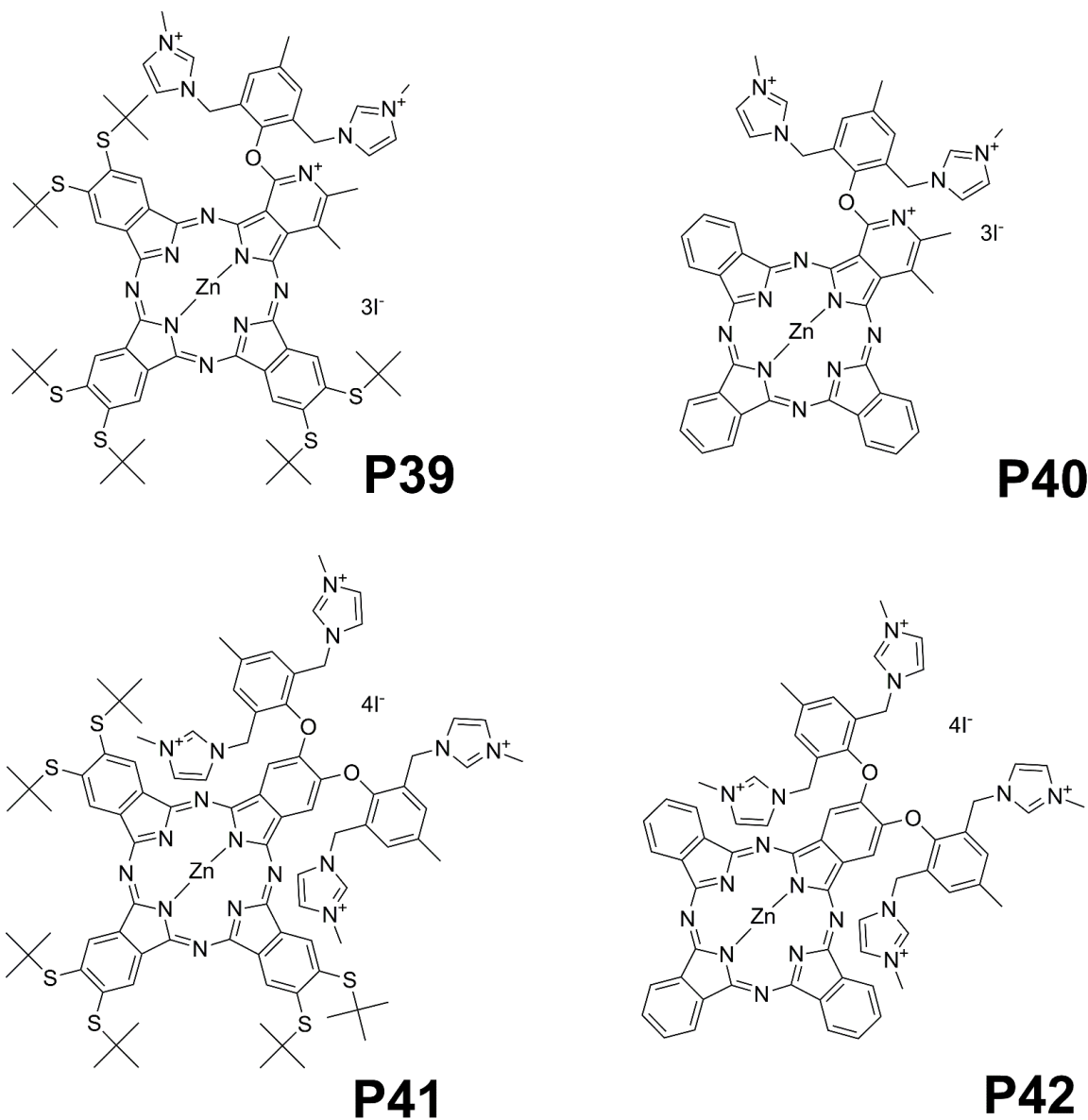
Pro fotografickou dokumentaci subcelulární lokalizace byly používány sterilní plastové misky se skleněným dnem určené pro konfokální mikroskopii o průměru 3 cm. Postup přípravy buněčné suspenze byl obdobný jako pro cytotoxicitní experimenty. V tomto případě však byl použit objem 500 μ l na dno petriho misky. Růst buněk opět probíhal 24 h za standardních podmínek.

Pro hodnocení morfologických změn byla používána sterilní mikroskopická sklíčka s kultivačním nástavcem (4 jamky). Tentokrát byla obdobným způsobem připravena buněčná suspenze o koncentraci 50 000 buněk/ml, která byla pipetována v objemu 500 μ l suspenze do každé jamky. Růst probíhal za stejných podmínek jako v obou předchozích případech.

8.3 STUDOVANÉ FOTOSENSITIZÉRY

Veškeré námi použité PS byly syntetizovány na katedře Farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Jejich přípravou se zabývá vědecká skupina prof. PharmDr. Petra Zimčíka, Ph.D.

Všechny studované látky obsahují centrálně koordinovaný atom zinku a nesou trvalý kladný náboj (Obr.20). Struktura látek obsahuje jako základ Pc jádro, které na sobě nese různé substituenty. U dvou testovaných látek došlo také k náhradě jednoho z uhlíků ftalocyaninové struktury dusíkem. Jsou tedy řazeny do skupiny AzaPc. Všechny testované látky jsou amfifilní povahy. Tři čtvrtiny molekuly jsou tvořeny lipofilním jádrem a v jedné čtvrtině molekuly je navázán hydrofilní substituent.



Obrázek 20 Struktury testovaných PS.

8.4 ČASOVÝ PROFIL PROSTUPU LÁTEK DO BUNĚK

Pro stanovení časového profilu prostupu studovaných látek do buněk byly buňky nasazeny na sterilní petriho misky o průměru 6 cm. Na každou misku bylo aplikováno 5 ml buněčné suspenze o koncentraci 75 000 buněk/ml. Takto připravené petriho misky byly inkubovány 24 h za standardních podmínek.

Druhý den bylo buňkám vyměněno médium za čerstvé SCM. Následně byly k buňkám přidávány testované látky v časových intervalech 12; 8; 6; 4; 2; 1; 0,5 a 0 h před ukončením experimentu. Látky byly přidávány ve finální koncentraci 4 μM , pouze pro látku P39 byla koncentrace nižší (1,6 μM) kvůli nižšímu limitu rozpustnosti.

Po uplynutí daných inkubačních časů jsme buňky dvakrát opláchli PBS předeřhátým na 37°C od zbytků PS. Poté jsme k buňkám přidali 5 ml předeřhátého PBS a pomocí škrabky jsme je seškrábali ze dna misky. Vzniklá suspenze byla pomocí pasturovy pipety přenesena do 15 ml zkumavky. Následně jsme ještě jednou přidali 5 ml PBS a znovu důkladně seškrábali zbylé buňky z petriho misky. Obsah byl přenesen do stejné zkumavky.

Zkumavky se vzorky se nechaly 5 minut centrifugovat při 1500 rpm. Následně byl odstraněn supernatant a buňky byly resuspendovány přidáním 500 μl DMSO. Takto vzniklá suspenze byla pomocí pipety přenesena do 1,5 ml mikrozkušavky. V nich byly buňky lyzovány vlivem přidaného DMSO a vymrazení při -20°C. Při této teplotě byly buňky v DMSO inkubovány do druhého dne.

Následující den byly buňky rozeřhátý na pokojovou teplotu. Stanovení koncentrace PS bylo provedeno pomocí fluorescenčního měření. Hodnota fluorescence byla měřena na luminiscenčním spektrometru AMINCO Bowman Series 2.

8.4.1 STANOVENÍ MNOŽSTVÍ BÍLKOVINY VE VZORCÍCH

Množství bílkovin bylo hodnoceno BCA metodou. Nejprve byla rozpuštěním BSA v MQ-vodě vytvořena řada roztoků o koncentracích 0; 50; 100; 200; 400; 600; 800; 1000 a 2000 $\mu\text{g/ml}$. Tato koncentrační řada sloužila k vytvoření kalibrační přímky. Takto

připravené roztoky o různých koncentracích BSA byly napipetovány do 96-jamkové destičky vždy v triplicátu. Pipetovaný objem činil 10 μ l.

Stejným způsobem byly do destičky napipetovány i příslušné alikvoty všech vzorků. Jelikož byly vzorky rozpuštěny v DMSO a koncentrační řada BSA byla připravena v MQ-vodě, byla tato nesourodost kompenzována přidáním 10 μ l MQ-vody ke všem vzorkům a přidáním stejného objemu DMSO ke koncentrační řadě BSA.

Samotný roztok BCA byl připraven těsně před použitím smísením 4% roztoku $\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a zásobního roztoku BCA v poměru 1:50. Takto připravený pracovní roztok byl pomocí automatické multikanálové pipety přidán ke všem vzorkům připraveným v destičce. Do každé jamky bylo pipetováno 200 μ l roztoku. Následovala 30 min inkubace v buněčném inkubátoru při teplotě 37°C. Poté byla na čtečce mikrotitračních destiček Tecan Infinite M200 změřena absorbance při 562 nm.

8.5 CYTOTOXICITNÍ EXPERIMENTY

Pro stanovení cytotoxicity byly buňky připraveny výše popsaným způsobem v 96-jamkových destičkách. Po 24 h byly k buňkám přidány studované látky. Část buněk byla ponechána jako neovlivněná kontrola. Další část buněk byla usmrcena letální dávkou H_2O_2 a sloužila jako kontrola usmrcení buněk.

Buňkám neovlivněné kontroly bylo pouze vyměněno médium za čerstvé předeřáté SCM, případně SFM v závislosti na prováděném experimentu. U buněk kontroly usmrcení buněk bylo vyměněno médium za čerstvé, do kterého byla vzápětí přidána letální dávka H_2O_2 . Zbylým buňkám bylo médium vyměněno za roztoky studovaných látek o různých koncentracích.

Potřebné koncentrace testovaných PS byly předem připraveny ze zásobních roztoků naředěním SCM nebo SFM v závislosti na experimentu. Jelikož Pc i AzaPc jsou látky citlivé na světlo, což je také principem jejich účinku, bylo nutné veškerou manipulaci s nimi provádět za minimálního osvětlení, aby nedošlo k jejich předčasné aktivaci.

Veškeré použité roztoky byly opět vytemperovány na teplotu 37°C a veškerá manipulace s nimi i s buňkami probíhala sterilně v prostředí laminárního boxu. Takto připravené destičky byly inkubovány za standardních podmínek po dobu 12 h nebo 24 h podle prováděného experimentu. Další postup se odvíjel od toho, zda byla určována vlastní toxicita látek nebo toxicita po aktivaci světlem.

8.5.1 STANOVENÍ FOTOTOXICITY

Pojem fototoxicita znamená toxicita látek vystavených aktivujícímu záření. Pro její hodnocení u námi používaných látek byly buňky připraveny v mikrotitrační destičce výše popsaným způsobem a inkubovány s testovanými PS za standardních podmínek po dobu 12 h. Poté bylo opatrně pomocí multikanálové pipety v celé destičce vyměněno médium za česrtvé. Opět bylo pipetováno 100 μ l do každé jamky. Tento krok se opakoval dvakrát, aby došlo k opláchnutí buněk od veškerých zbytků PS, které se nedostaly do buněk.

Ihned po oplachu byla destička s buňkami přenesena pod 450 W xenonovou lampu osazenou vodním a long-pass filtrem ($\lambda > 570$ nm; 12,4 mW cm⁻²; 11,2 J cm⁻²) a ozařována po dobu 15 min. Po uplynutí této doby byla destička umístěna zpět do inkubátoru a inkubována za standardních podmínek dalších 24 h. Následně byla hodnocena viabilita buněk pomocí testu vychytávání neutrální červeně.

8.5.2 STANOVENÍ VLASTNÍ TOXICITY

Toxicita bez ozáření je vlastní toxicita studovaných látek bez jejich předchozí aktivace světlem. Veškerá příprava buněk i aplikace testovaných látek probíhala stejně jako v předchozím případě, byly však použity mnohonásobně vyšší koncentrace PS než pro stanovení fototoxixity a inkubace po nasazení látek probíhala 24 h namísto 12 h. Jelikož jsou zásobní roztoky testovaných PS připravovány v DMSO, který je ve vyšších koncentracích sám o sobě pro buňky toxický, byla navíc k obvyklé neovlivněné kontrole a kontrole usmrcení buněk přidána také kontrola toxicity samotného DMSO, abychom vyloučili ovlivnění výsledků jeho přítomností. Proto byly připravené také roztoky

různých koncentrací DMSO. Jejich příprava probíhala stejnou řadící řadou jako příprava roztoků PS. Stejným způsobem probíhala i jejich aplikace na buňky a veškerý následující postup. Pro tento experiment bylo velmi důležité pracovat za tmy, aby nedošlo k aktivaci látek, a následnému falešnému snížení životaschopnosti buněk. Z tohoto důvodu byly také destičky během inkubace zabaleny v hliníkové fólii. Po uplynutí inkubační doby byla stanovena životaschopnost buněk pomocí testu vychytávání neutrální červeně.

8.5.3 HODNOCENÍ VIABILITY BUNĚK TESTEM VYCHYTÁVÁNÍ NEUTRÁLNÍ ČERVENĚ

Neutrální červeň (NR) je slabě kationické barvivo schopné v nenabitě formě přecházet přes buněčné membrány a difundovat do buněk. Uvnitř buněk se toto barvivo hromadí v lyzosomech. K akumulaci v lyzosomech dochází díky tomu, že u živých buněk je v lyzosomech udržován protonový gradient. Z tohoto důvodu je zde pH kyselější než v cytoplazmě, což vede k protonizaci neutrální červeně. Takto nabitě molekuly NR nejsou schopné projít skrz lyzosomální membránu zpět do cytosolu. U mrtvých a poškozených buněk dochází k narušení integrity lyzosomální membrány a buňka tak není schopná NR zadržet. Díky tomu můžeme pomocí NR rozlišovat živé a mrtvé buňky. Množství zadrženého barviva je zde přímo úměrné počtu živých buněk (Fields et al., 2017).

Test vychytávání neutrální červeně byl použit pro hodnocení všech fototoxických experimentů i pro stanovení vlastní toxicity látek. Po ukončení inkubační doby bylo pomocí automatické multikanálové pipety k buňkám napipetováno 100 μ l roztoku NR o koncentraci 60 μ g/ml. Výsledná koncentrace NR v každé jamce tedy činila 30 μ g/ml. Poté se destičky nechali 2 h inkubovat při 37°C. Při hodnocení vlastní toxicity bylo nutné před přidáním NR buňky 2× opláchnout čistým médiem kvůli odstranění zbytků PS, které by mohly falešně zvyšovat absorbanci NR, vzhledem k jejich vysoké koncentraci.

Po skončení inkubace s NR bylo z buněk odstraněno veškeré médium a do každé jamky bylo přidáno 100 μ l fixačního roztoku (1% roztok CaCl_2 v 0,5% formaldehydu). Tento roztok byl na buňkách ponechán při laboratorní teplotě po dobu 15 min. Během této doby došlo k fixaci buněk na dno jamek mikrotitrační destičky.

Následně byl fixační roztok odstraněn a buňky byly dvakrát opláchnuty 100 μ l PBS. Nakonec byl k buňkám přidán lyzační roztok (1% roztok ledové kyseliny octové v 50% ethanolu), opět v množství 100 μ l na jamku. Destičky s lyzačním roztokem byly umístěny na deskovou třepačku, kde se nechaly lyzovat při laboratorní teplotě po dobu 30 min.

Výsledky byly hodnoceny spektrofotometricky na čtečce mikrotitračních destiček Tecan Infinite 200M, na které byla změřena absorbance při 540 nm. Výsledky měření byly dále zpracovány v programu Microsoft Office Excel a životaschopnost buněk byla vyjádřena jako procenta neovlivněné kontroly po odečtení kontroly zabití buněk (pozadí).

8.5.4 VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

Při hodnocení fototoxických experimentů byla pro každou látku stanovena hodnota její střední efektivní koncentrace (EC_{50}). Tato hodnota udává koncentraci testované látky, která po ozáření způsobí pokles viability na 50 % vzhledem k neovlivněným buňkám. Ze získaných výsledků byly vytvořeny grafy a zjištěna hodnota EC_{50} v programu GraphPad Prism. Do grafů byly vyneseny průměrné hodnoty naměřených výsledků spolu s hodnotami směrodatné odchylky.

8.5.5 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT

Pro statistickou analýzu dat byla použita jednofaktorová analýza rozptylu (one way ANOVA) s Bonferroniho *post hoc* metodou vícenásobného porovnání. Všechny experimenty jsme provedli minimálně v pěti opakováních v případě cytotoxických experimentů a v duplikátu v případě časového prostupu látek do buněk. Ve výsledcích jsou uvedeny průměrné hodnoty se směrodatnou odchylkou. Výsledky experimentů byly pokládány za signifikantní, pokud hladina významnosti (p) byla * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ a *** $p < 0.001$.

8.6 FOTOGRAFICKÁ DOKUMENTACE

K pořizování mikrofotografií sloužil invertovaný fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse Ti-E (Nikon, Japonsko) s chlazenou sCMOS kamerou Andor Zyla 5.5 (Andor Technology, UK) a LED fluorescenčním zdrojem (CoolLED pE-300^{white}, CoolLED Ltd., UK) a laserový rastrovací konfokální mikroskop Nikon A1+ (Nikon, Japonsko).

8.6.1 SUBCELULÁRNÍ LOKALIZACE A RELOKALIZACE PO OZÁŘENÍ

Pro určení subcelulární lokalizace testovaných PS v buňkách byly buňky nasazeny na sterilní plastové petriho misky se skleněným dnem určené pro konfokální mikroskopii. Po 24 h inkubaci jim bylo vyměněno médium a byl k nim přidán testovaný PS o koncentraci 5 μM . Poté se buňky nechaly 12 h inkubovat za standardních podmínek.

Po ukončení inkubace byly buňky značeny fluorescenčními sondami 2 μM LysoTracker Blue DND-22 (značení lyzozomů) a 2 μM MitoTracker Green FM (značení mitochondrií) v čerstvém médiu. Značení probíhalo po dobu 15 min. Poté byly buňky dvakrát opláchnuty přehřátým ADS pufrem (116 mM NaCl; 5,3 mM KCl; 1,2 mM $\text{MgSO}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,13 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 20 mM HEPES) s obsahem vápníku (1 mM CaCl_2) a bylo přidáno 2 ml čerstvého přehřátého SFM. Následně byly zhotoveny mikrofotografie buněk na fluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse Ti-E za použití fluorescenčních filtrů pro DAPI, FITC a Cy5 a olejového 60 \times objektivu.

Obdobným způsobem bylo provedeno značení membrán a jader. V tomto případě byly ke značení použity sondy Hoechst 33342 (barvení jader) o koncentraci 4 nM a 1 \times CellMask Green (značení membrán). Barvení probíhalo po dobu 10 min. Následně byly buňky dvakrát opláchnuty přehřátým ADS pufrem, bylo přidáno čerstvé přehřáté SFM a byly zhotoveny mikrofotografie jako v předchozím případě.

Po zhotovení mikrofotografií po relokalizaci PS po aktivaci byly buňky ozařovány fluorescenčním LED zdrojem mikroskopu nastaveným na minimální intenzitu (1 %)

červeným světlem (Cy5 filtrový set) po dobu 5 min. Poté byla opět zhotovena série mikrofotografií.

8.6.2 HODNOCENÍ MORFOLOGICKÝCH ZMĚN

Pro hodnocení morfologických změn byly buňky kultivovány na sterilních mikroskopických sklíčkách s kultivačním nástavcem. Po 24 h kultivaci k nim byly přidány testované látky o koncentracích odpovídajících EC_{15} a EC_{85} . Buňky byly následně inkubovány 12 h za standardních podmínek a po uplynutí této doby následoval proces výměny média a ozařování. Průběh tohoto kroku byl stejný jako v případě fototoxických experimentů. Stejně tak následovala i 24 h inkubace.

Další den byly buňky opláchnuty a značeny $0,3 \mu\text{M}$ fluorescenční sondou MitoTracker Red CMXRos v SCM pro značení mitochondrií. Značení probíhalo po dobu 30 min. Poté byly buňky inkubovány 5 min v čistém SCM, aby došlo k vymytí zbytků nenavázané sondy. Následovala 15 min fixace buněk 4% paraformaldehydem v SCM. Po ukončení fixace byly buňky dvakrát opláchnuty dPBS.

Následně byl k buňkám na 15 min přidán permeabilizační pufr (0,5% Triton X-100 v dPBS). Poté byly buňky opět dvakrát opláchnuty dPBS a byl na ně aplikován blokační roztok (3% BSA v dPBS). Blokace probíhala po dobu 60 min. Následovalo značení další fluorescenční sondou, tentokrát Actin Green (konjugát faloidinu s Alexa Fluor 488 fluoroforem), která označila aktinový cytoskelet. Značení trvalo 30 min. Poté byl roztok vyměněn za 4 nM roztok Hoechst 33342, který sloužil pro barvení jader. Barvení probíhalo 20 min.

Po dokončení barvení byly buňky dvakrát opláchnuty od zbytků nenavázané sondy v dPBS. Následně byly z preparátu po dobu 10 min odtraňovány soli v MQ-vodě. Po uplynutí této doby jsme opatrně odstranili MQ-vodu a nechali takto připravené preparáty zcela oschnout. Suché preparáty byly montovány na podložní sklíčka. Pro montování preparátů bylo použito montovací médium ProLong AntiFade.

K pořízení mikrofotografií sloužil laserový skenovací konfokální mikroskop Nikon A1+ s objektivem $20\times$. Snímáno bylo vždy 7 konfokálních řezů v celé tloušťce preparátu bez použití konfokálního zoomu.

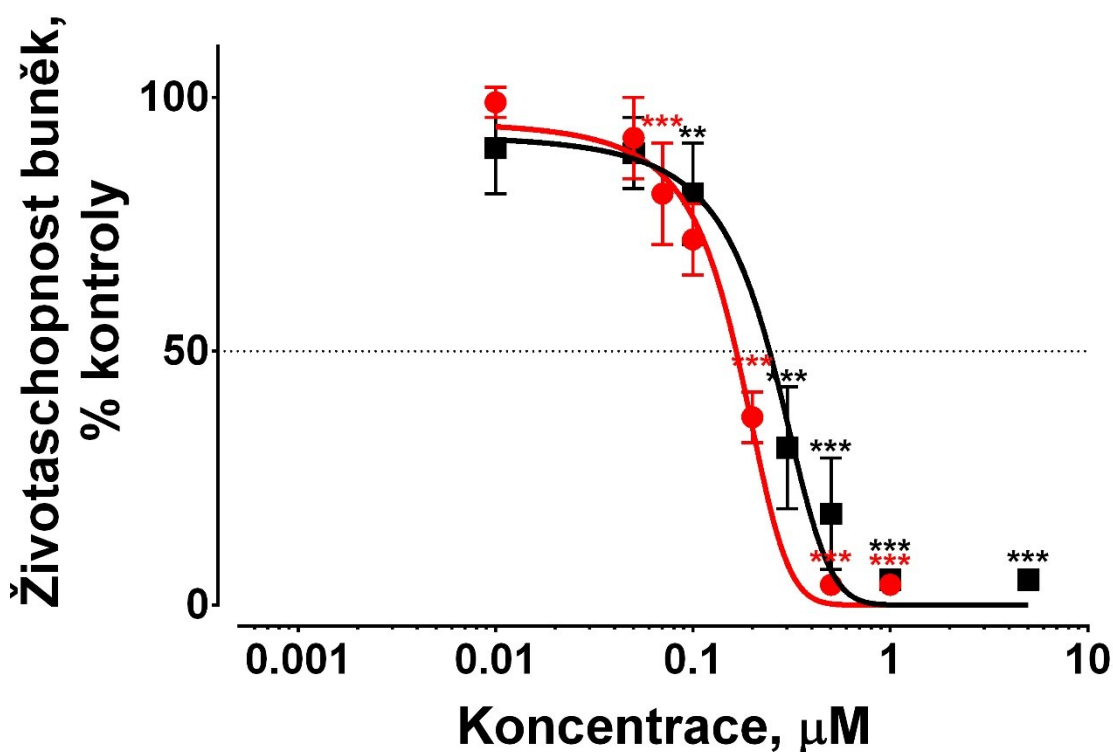
9 VÝSLEDKY

9.1 CYTOTOXICITNÍ EXPERIMENTY

9.1.1 FOTOTOXICITA

9.1.1.1 P39

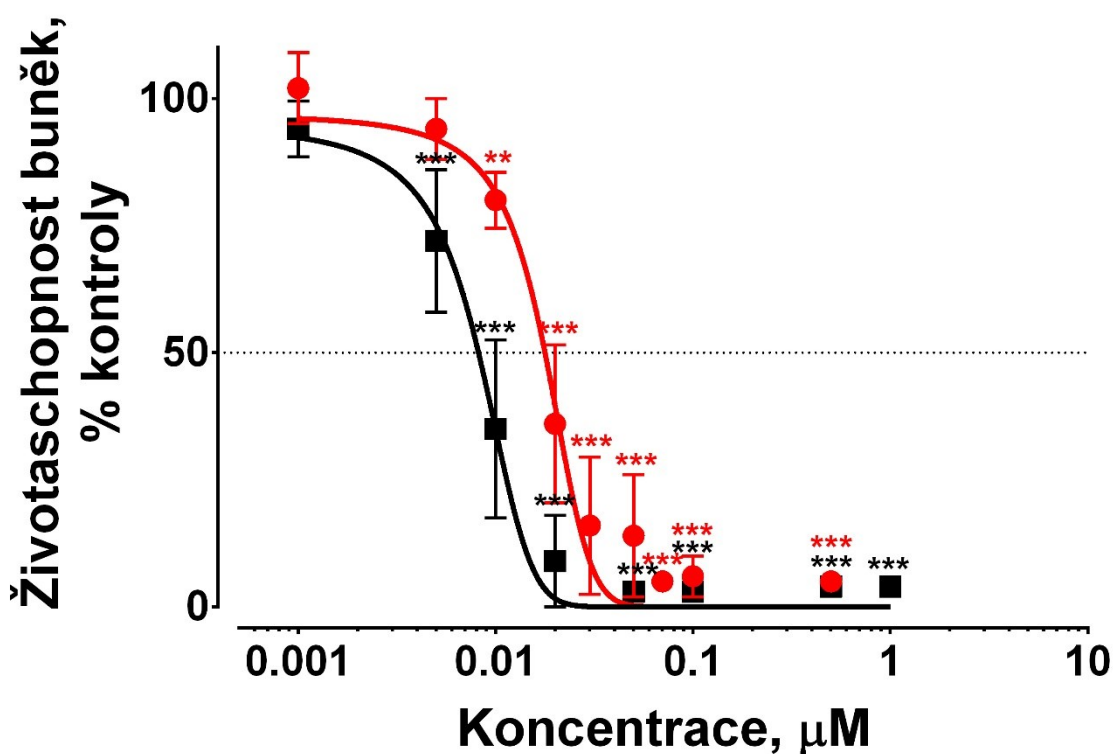
Fototoxicita této látky byla hodnocena na buněčné linii HeLa v rozmezí koncentrací 0,01 – 1 μM v SCM a v rozmezí 0,01 – 5 μM v SFM. Ze získaných výsledků byla stanovena střední efektivní koncentrace (EC_{50}). EC_{50} v SCM odpovídá $165,5 \pm 27,0$ (n = 5) nM a EC_{50} v SFM se rovná $244,3 \pm 49,0$ nM (n = 6). Získané hodnoty jsou vyobrazeny v grafu na Obrázku 21.



Obrázek 21 Graf závislosti životaschopnosti buněk na koncentraci látky P39 po ozáření v SCM (•) a SFM (◼). *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001.

9.1.1.2 P40

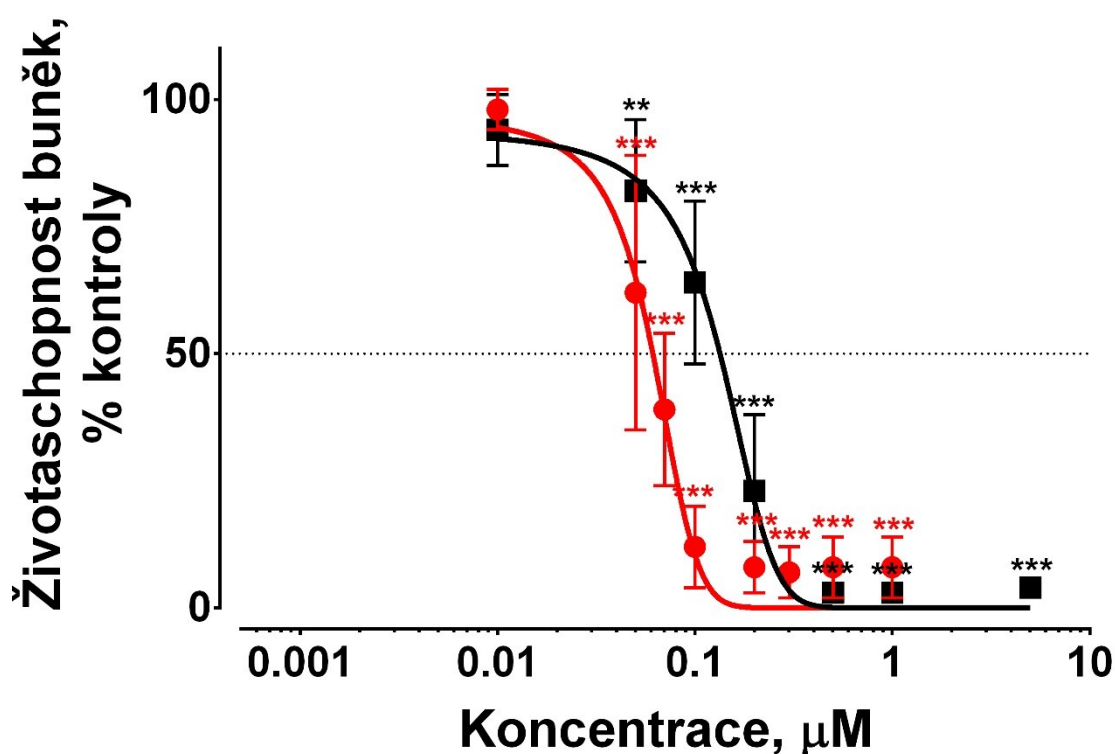
U této látky byly fototoxické experimenty prováděné na HeLa buňkách v rozmezí koncentrací 0,001 – 0,5 μM pro médium SCM a 0,001 – 1 μM pro SFM. Opět byla stanovena hodnota EC_{50} . Tato látka byla účinná při nejnižších koncentracích v porovnání s ostatními testovanými látkami. EC_{50} v SCM se rovná $17,8 \pm 3,7 \text{ nM}$ ($n = 6$) a EC_{50} v SFM odpovídá $8,2 \pm 2,6 \text{ nM}$ ($n = 5$). Výsledné hodnoty byly vyneseny do grafu (Obr.22).



Obrázek 22 Graf závislosti životaschopnosti buněk na koncentraci látky P40 po ozáření v SCM (•) a SFM (◼). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

9.1.1.3 P41

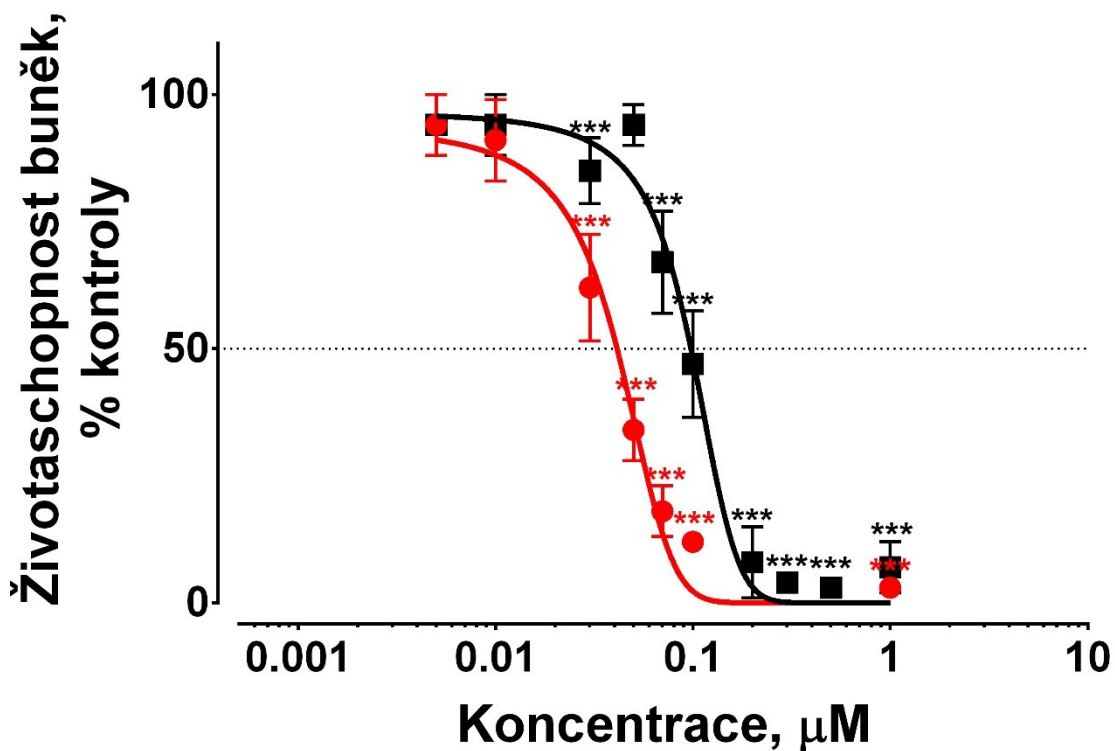
Stejně jako u všech předchozích byla i u této látky stanovena EC_{50} za využití buněčné linie HeLa. Pro hodnocení její fototoxicity bylo vybráno rozmezí koncentrací 0,1 – 1 μM v sérovém médiu a 0,01 – 1 μM v bezsérovém médiu. Zjištěná hodnota EC_{50} pro SCM je $61,2 \pm 20,7$ nM ($n = 7$) a pro SFM $133,9 \pm 41,4$ nM ($n = 7$). Získané hodnoty byly opět vyneseny do grafu, který můžete vidět na Obrázku 23.



Obrázek 23 Graf závislosti životaschopnosti buněk na koncentraci látky P41 po ozáření v SCM (•) a SFM (◼). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

9.1.1.4 P42

Tato látka byla opět studována v širokém rozmezí koncentrací na buněčné linii HeLa. V tomto případě bylo pro SCM a SFM použito stejné koncentrační rozmezí – 0,005 – 1 μM . Následně byla určena hodnota EC_{50} , která odpovídala koncentraci $41,2 \pm 10,7 \text{ nM}$ ($n = 8$) pro SCM a $97,6 \pm 29,6 \text{ nM}$ ($n = 8$). Opět byl vytvořen graf závislosti viability buněk na koncentraci testované látky (Obr.24).



Obrázek 24 Graf závislosti životaschopnosti buněk na koncentraci látky P42 po ozáření v SCM (•) a SFM (•). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

9.1.2 DARK TOXICITA

9.1.2.1 P39

Vlastní toxicita této látky byla původně hodnocena v rozmezí koncentrací 0,005 – 200 μM . Použití koncentrací nad 1 μM bohužel nebylo možné, kvůli překročení limitu rozpustnosti této látky v médiu. Nicméně v daném koncentračním rozmezí nevykazovala látka žádnou vlastní toxicitu.

9.1.2.2 P40

Pro hodnocení vlastní toxicity této látky bylo použito rozmezí koncentrací 1 – 200 μM . Látka neprojevila žádnou vlastní toxicitu až do 100 μM koncentrace. Při této koncentraci však už docházelo k jejímu vypadávání z roztoku.

9.1.2.3 P41

Hodnocení vlastní toxicity této látky opět probíhalo na buněčné linii HeLa v širokém rozmezí koncentrací (1 – 200 μM). Od koncentrace 50 μM se začalo projevovat překročení limitu rozpustnosti látky tvorbou amorfních mikroskopických agregátů v roztoku. Až do této koncentrace nebyla patrná žádná vlastní toxicita látky.

9.1.2.4 P42

Dark toxicita této látky byla hodnocena v širokém rozmezí koncentrací (1 – 1000 μM). Při koncentracích nad 200 μM se však výrazně projevila toxicita DMSO, ve kterém byla látka rozpuštěna a výsledky tak už nebylo možné správně vyhodnotit. Až do 200 μM koncentrace se žádná toxicita látky neprojevila.

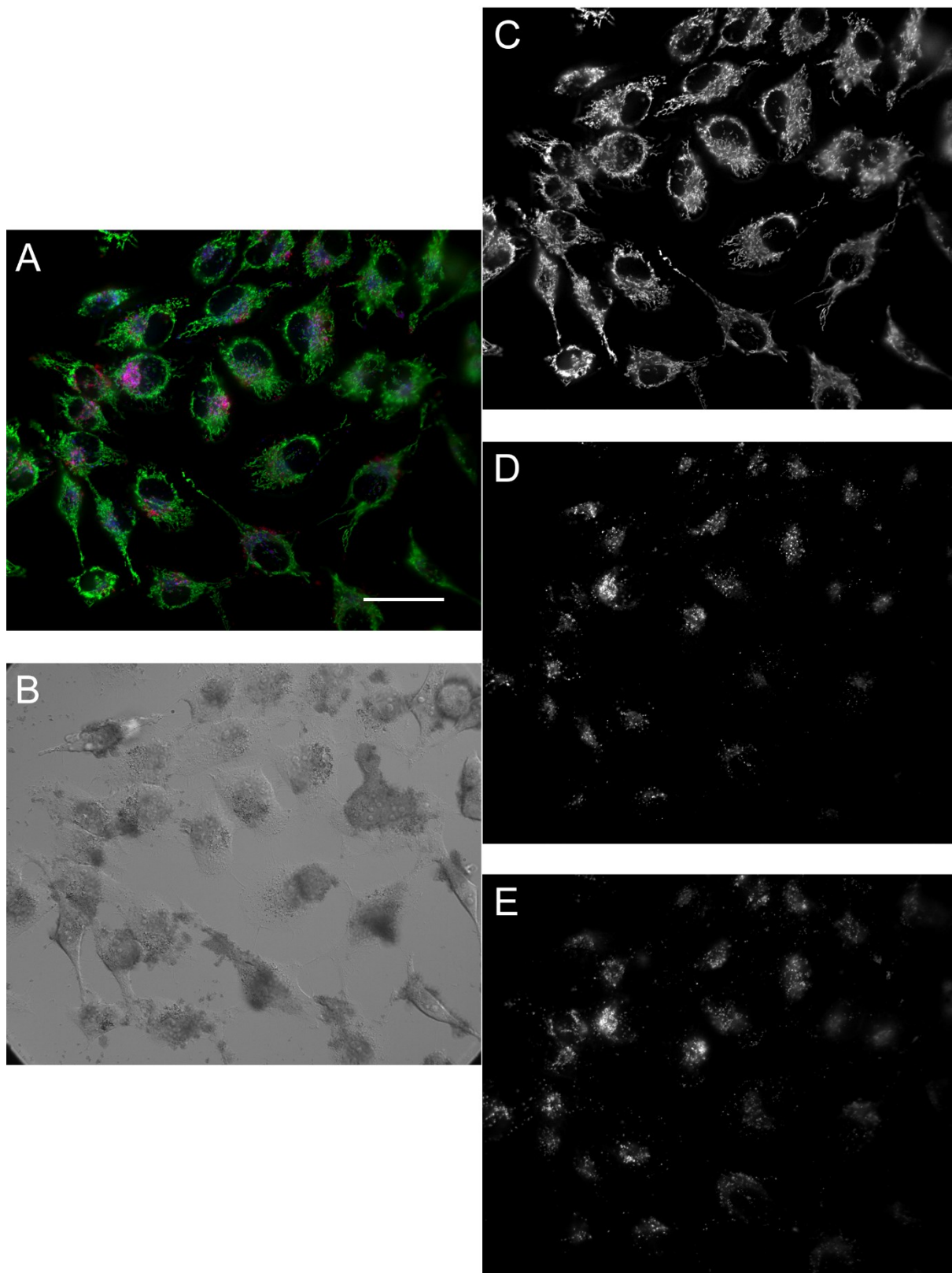
9.2 SUBCELULÁRNÍ LOKALIZACE A RELOKALIZACE PO OZÁŘENÍ

Pro stanovení subcelulární lokalizace použitých látek byla použita fluorescenční mikroskopie. Buňky byly značeny čtyřmi fluorescenčními sondami. Pro označení mitochondrii jsme použili sondu MitoTracker Green FM, jako druhá byla použita sonda LysoTracker Blue DND-22 pro značení kyselých organel endolyzosomálního kompartmentu (především lyzozomů), dále sonda Hoechst 33342 pro značení jader a nakonec sonda CellMask Green pro označení membrán. Studované látky nebylo třeba žádným způsobem značit, jelikož vykazují svoji vlastní fluorescenci detekovatelnou v kanálu pro vzdálenou červenou oblast (fluorescenční kanál Cy5). K pořízení mikrofotografií byly použity fluorescenční filtry pro DAPI, FITC a Cy5.

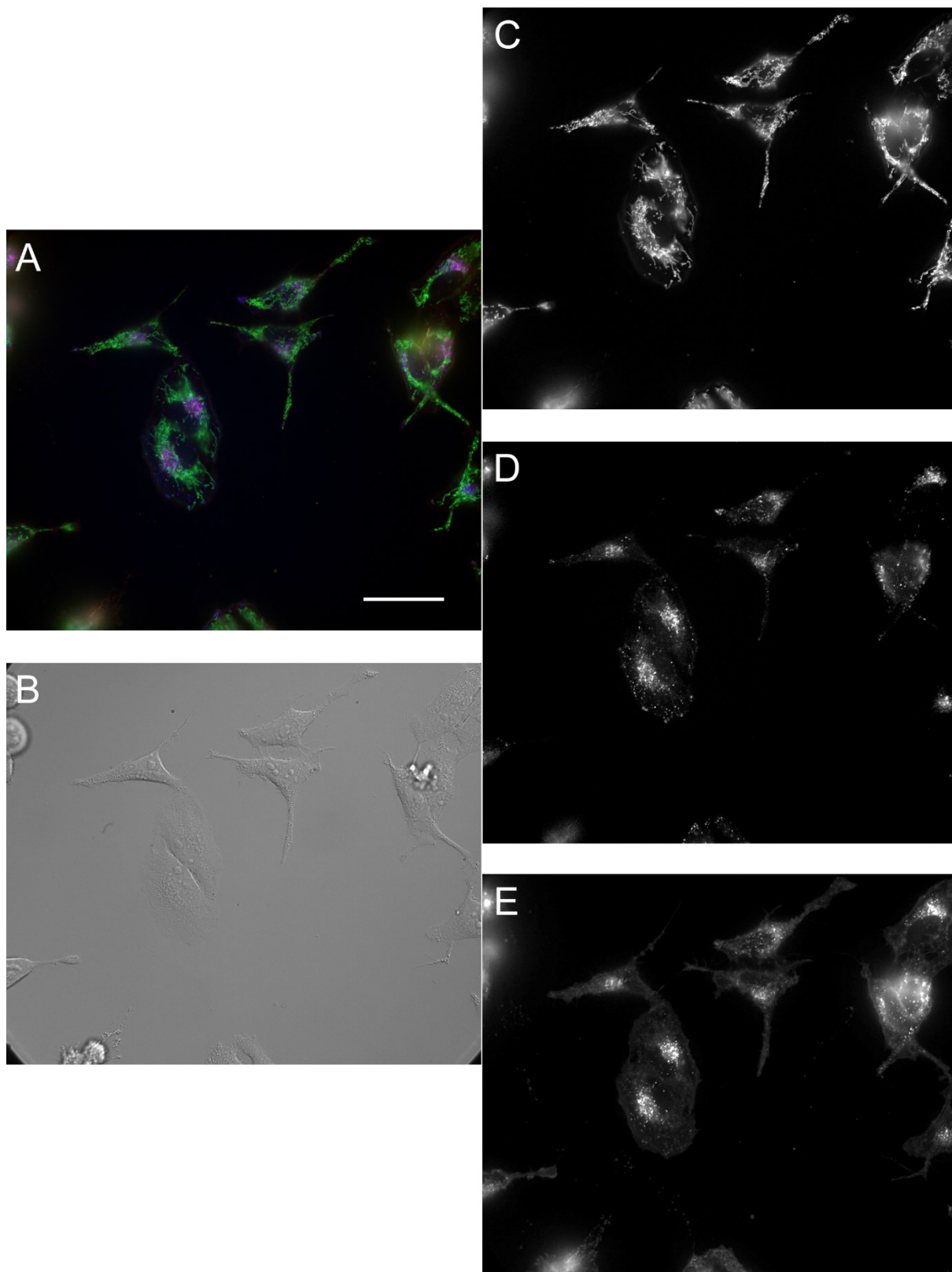
Ze získaných výsledků je vidět, že cílem všech testovaných látek je endolyzosomální kompartment (Obr.25 - Obr.28). Vzhledem k velikosti molekul testovaných látek a také přítomnosti náboje není tato skutečnost žádným překvapením. Předpokládáme tedy, že testované látky vstupují do buněk endocytózou. Tento fakt je však potřeba ještě potvrdit.

V menší míře (v porovnání se signálem z endolyzosomálního kompartmentu) vykazovaly látky také fluorescenci lokalizovanou v membráně. Pro potvrzení této lokalizace byly buňky značeny sondou CellMask Green a byl použit delší expoziční čas (cca 5× delší; dostatečné proexponování slabšího signálu v membráně, překročení horního limitu detekce v endolyzosomálním kompartmentu, který je tudíž přeexponovaný), viz. Obr.29, Obr.31, Obr.33 a Obr.35. Toto je také velmi dobře viditelné na obrázcích pořízených po ozáření buněk, kdy dochází k poškození endolyzosomálního kompartmentu a uvolnění PS z jejich lumen a další vazbě na buněčnou membránu. Navíc dochází k navození oxidačního stresu, v jehož důsledku dochází k retrakci cytoskeletu doprovázeného smrštěním buněk a případně i tvorbě rozsáhlých membránových blebů až puchýřů, kdy je membrána lépe zřetelná a tudíž i signál vycházející z ní.

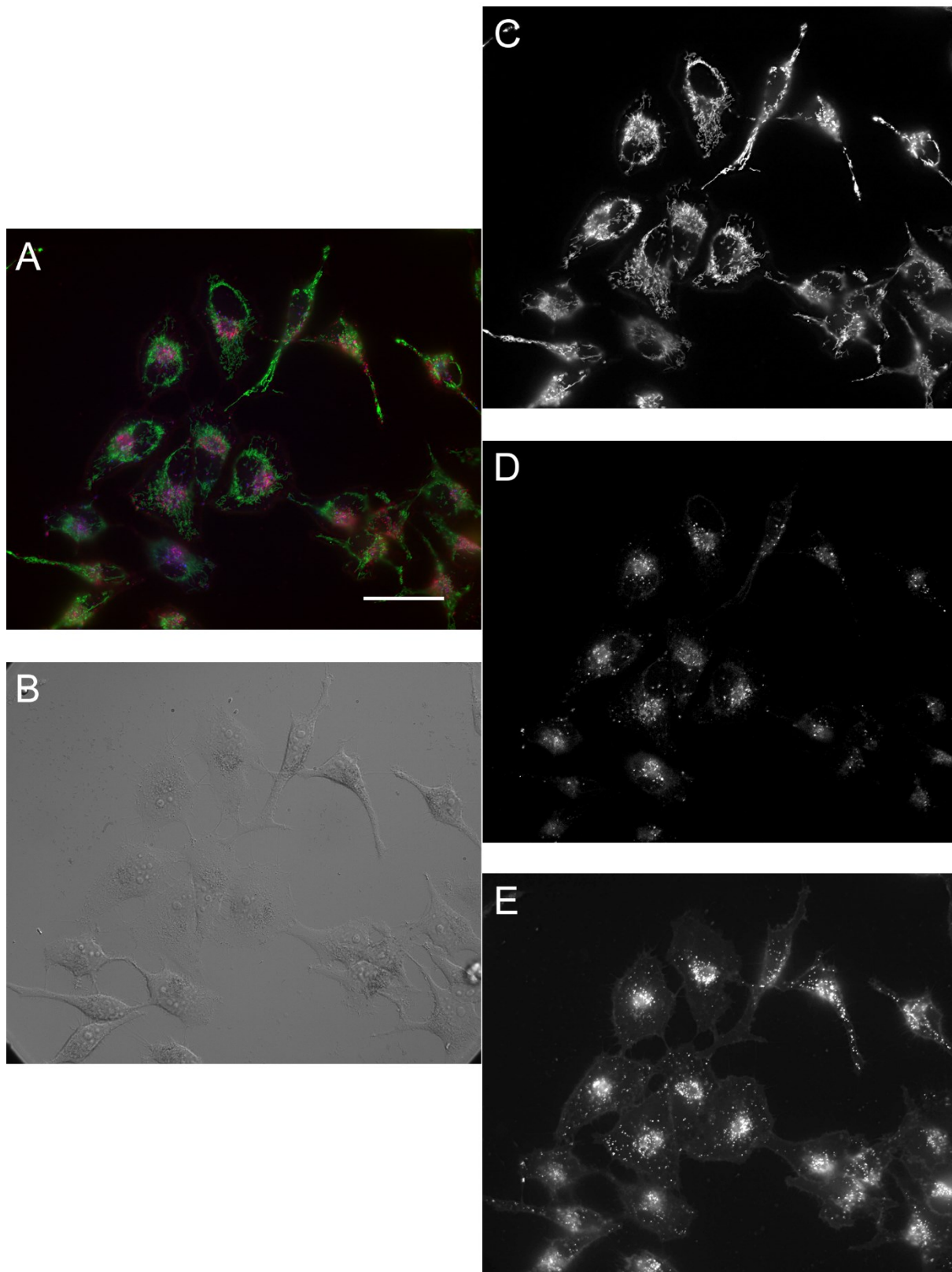
Díky vazbě testovaných látek na membrány buněk můžeme po ozáření pozorovat přímé morfologické změny na buněčné membráně a tvorbu rozsáhlých membránových blebů, které se v čase zvětšují, což naznačuje nekrotickou buněčnou smrt (Obr.30, Obr.32, Obr.34 a Obr.36).



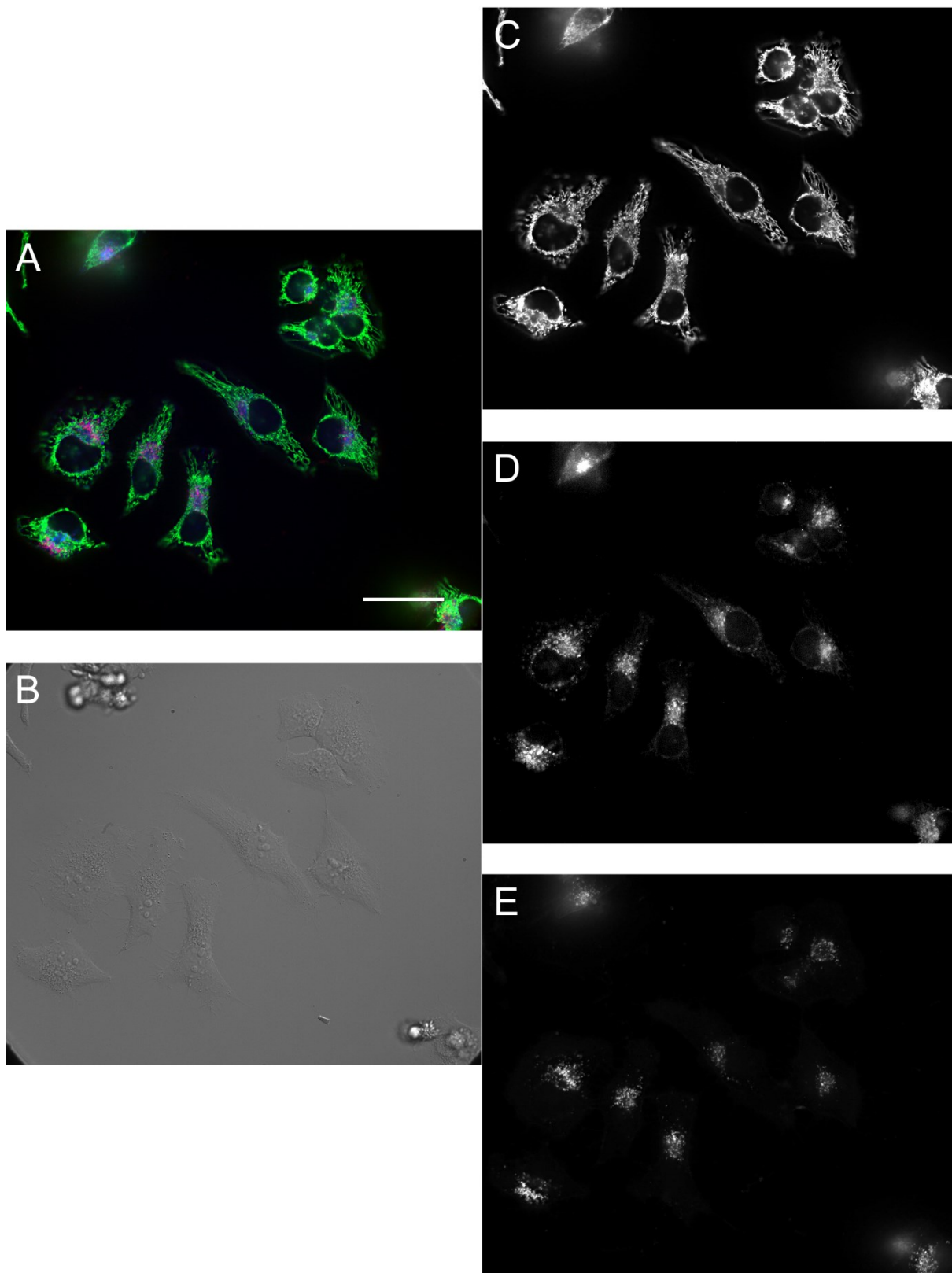
Obrázek 25 Subcelulární lokalizace látky P39 (červená) v HeLa buňkách, barvení MitoTracker Green FM (zelená) a LysoTracker Blue DND-22 (modrá): A - překryv fluorescenčních kanálů, B - DIC, C - lyzosomy (kanál DAPI), D - mitochondrie (kanál FITC), E - vlastní fluorescence P39 (kanál Cy5). Měřítko odpovídá 50 μm .



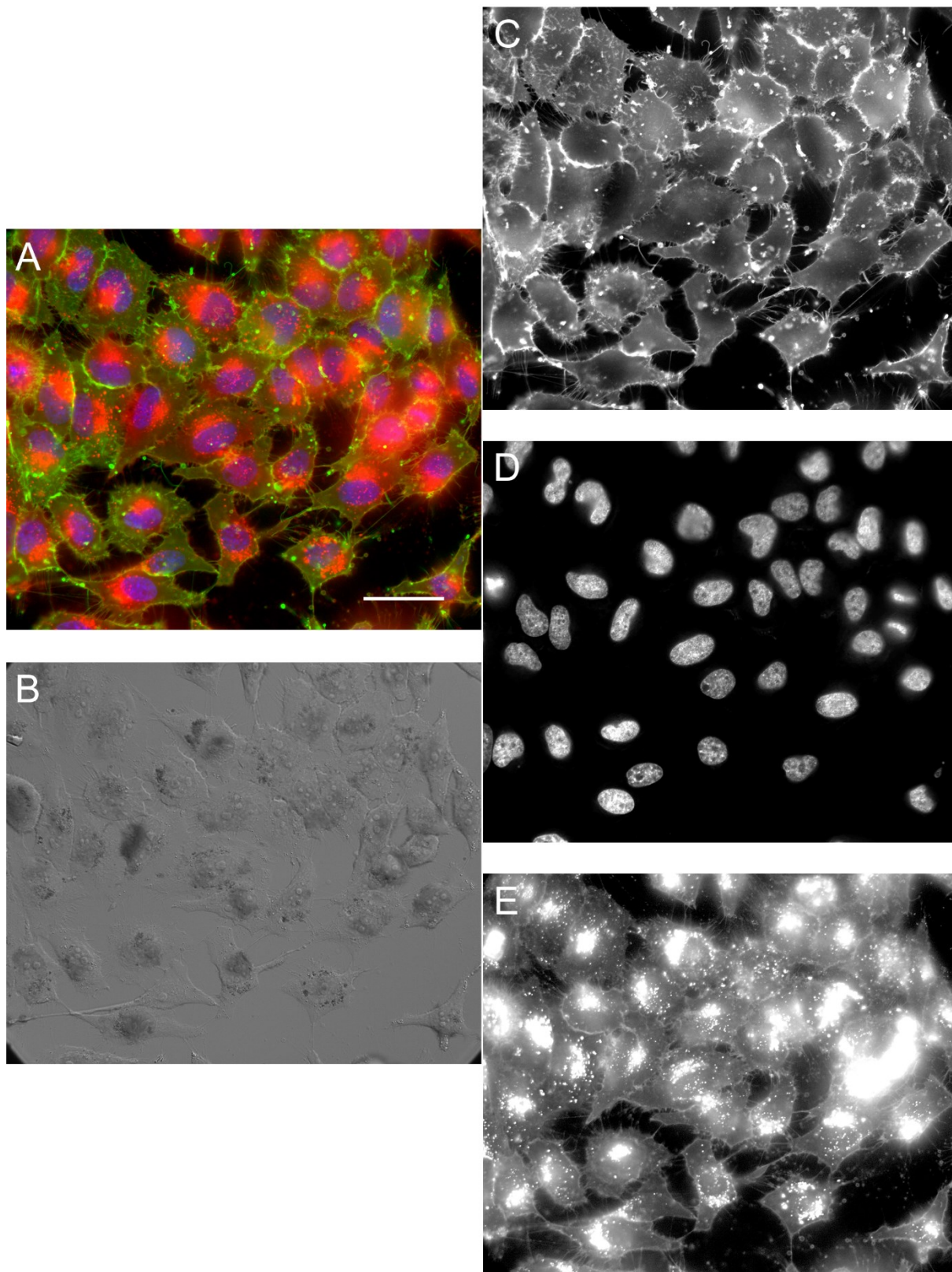
Obrázek 26 Subcelulární lokalizace látky P40 (červená) v HeLa buňkách, barvení MitoTracker Green FM (zelená) a LysoTracker Blue DND-22 (modrá): A - překryv fluorescenčních kanálů, B - DIC, C - lyzosity (kanál DAPI), D - mitochondrie (kanál FITC), E - vlastní fluorescence P39 (kanál Cy5). Měřítka odpovídá 50 μm .



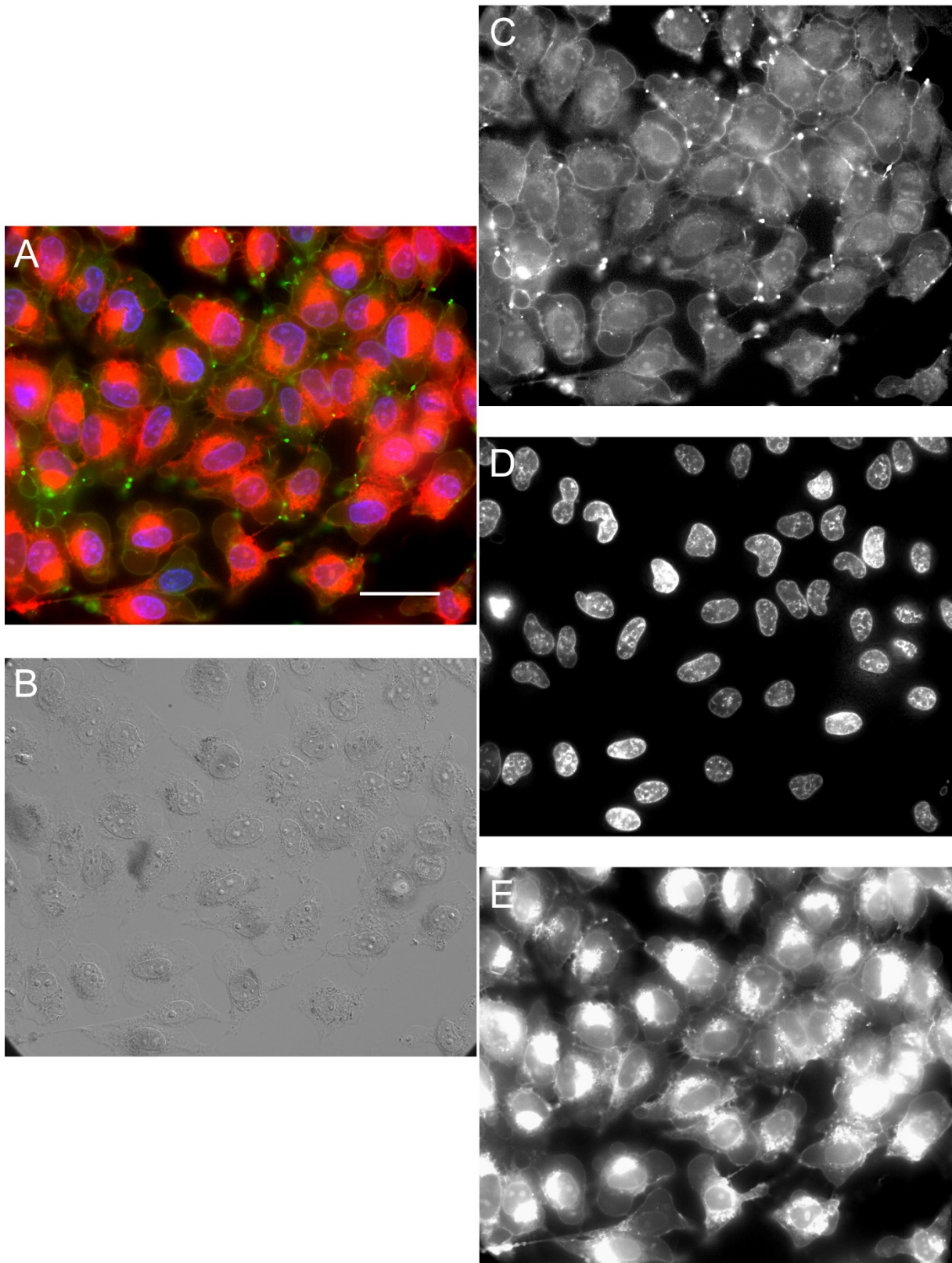
Obrázek 27 Subcelulární lokalizace látky P41 (červená) v HeLa buňkách, barvení MitoTracker Green FM (zelená) a LysoTracker Blue DND-22 (modrá): A - překryv fluorescenčních kanálů, B - DIC, C - lyzosity (kanál DAPI), D - mitochondrie (kanál FITC), E - vlastní fluorescence P39 (kanál Cy5), měřítko odpovídá 50 μm .



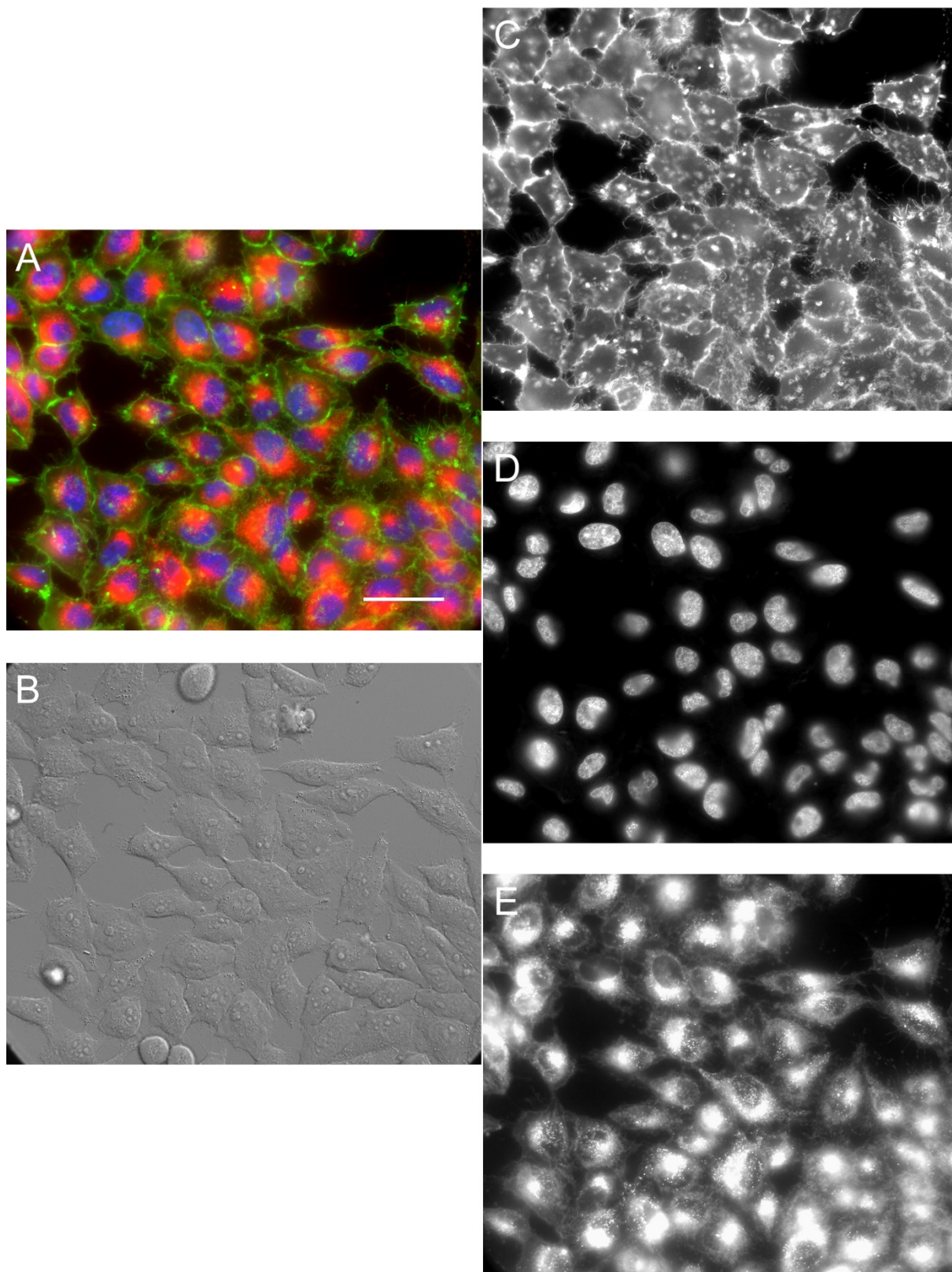
Obrázek 28 Subcelulární lokalizace látky P42 (červená) v HeLa buňkách, barvení MitoTracker Green FM (zelená) a LysoTracker Blue DND-22 (modrá): A - překryv fluorescenčních kanálů, B - DIC, C - lyzosomy (kanál DAPI), D - mitochondrie (kanál FITC), E - vlastní fluorescence P39 (kanál Cy5), měřítko odpovídá 50 μm .



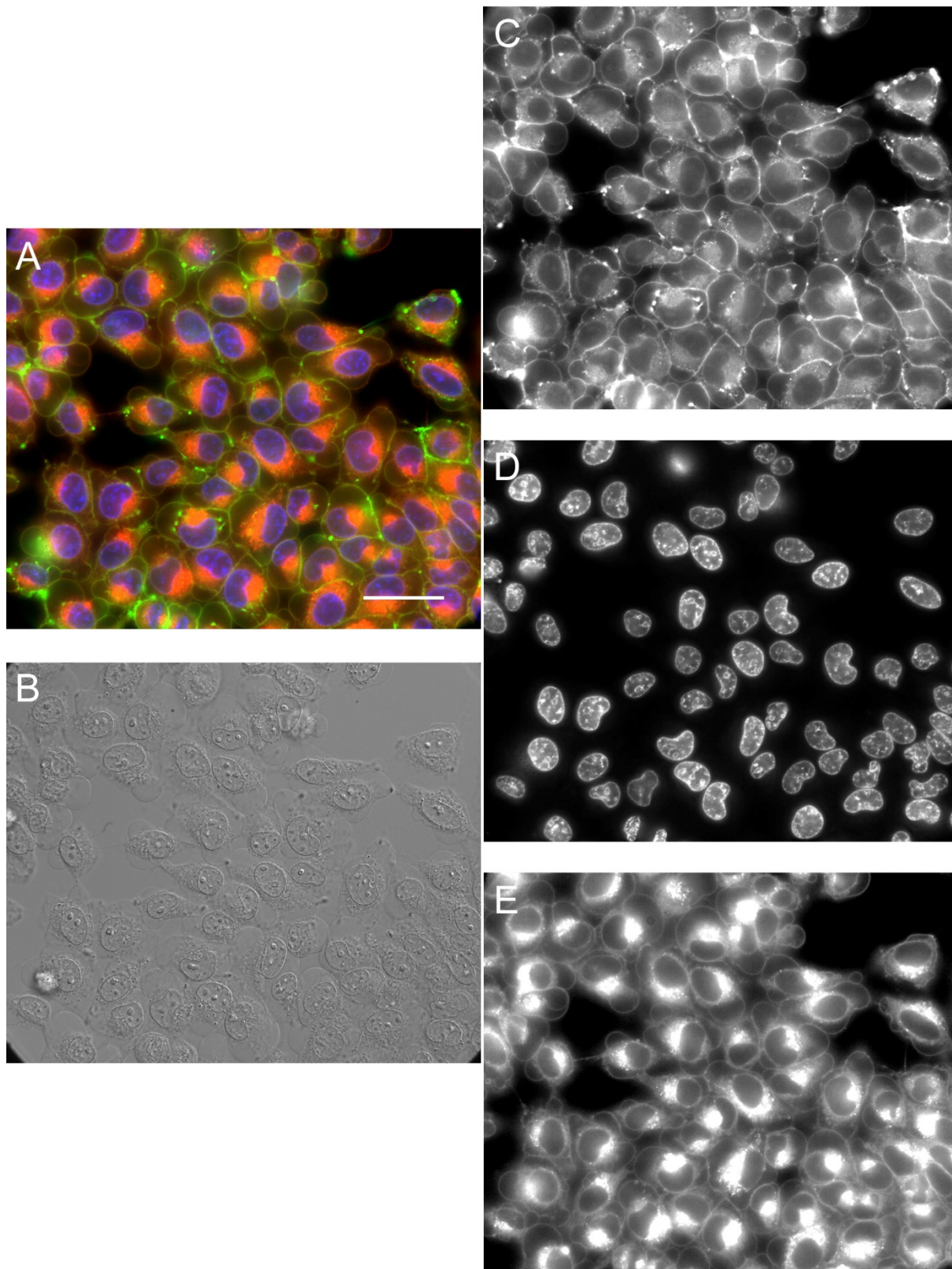
Obrázek 29 Subcelulární lokalizace látky P39 (červená) v HeLa buňkách, barvení Hoechst 33342 (modrá) a CellMask Green (zelená) před ozářením: A - překryv fluorescenčních kanálů, B - DIC, C - membrány (kanál FITC), D - jádra (kanál DAPI), E - vlastní fluorescence P39 (kanál Cy5), měřítko odpovídá 50 μm .



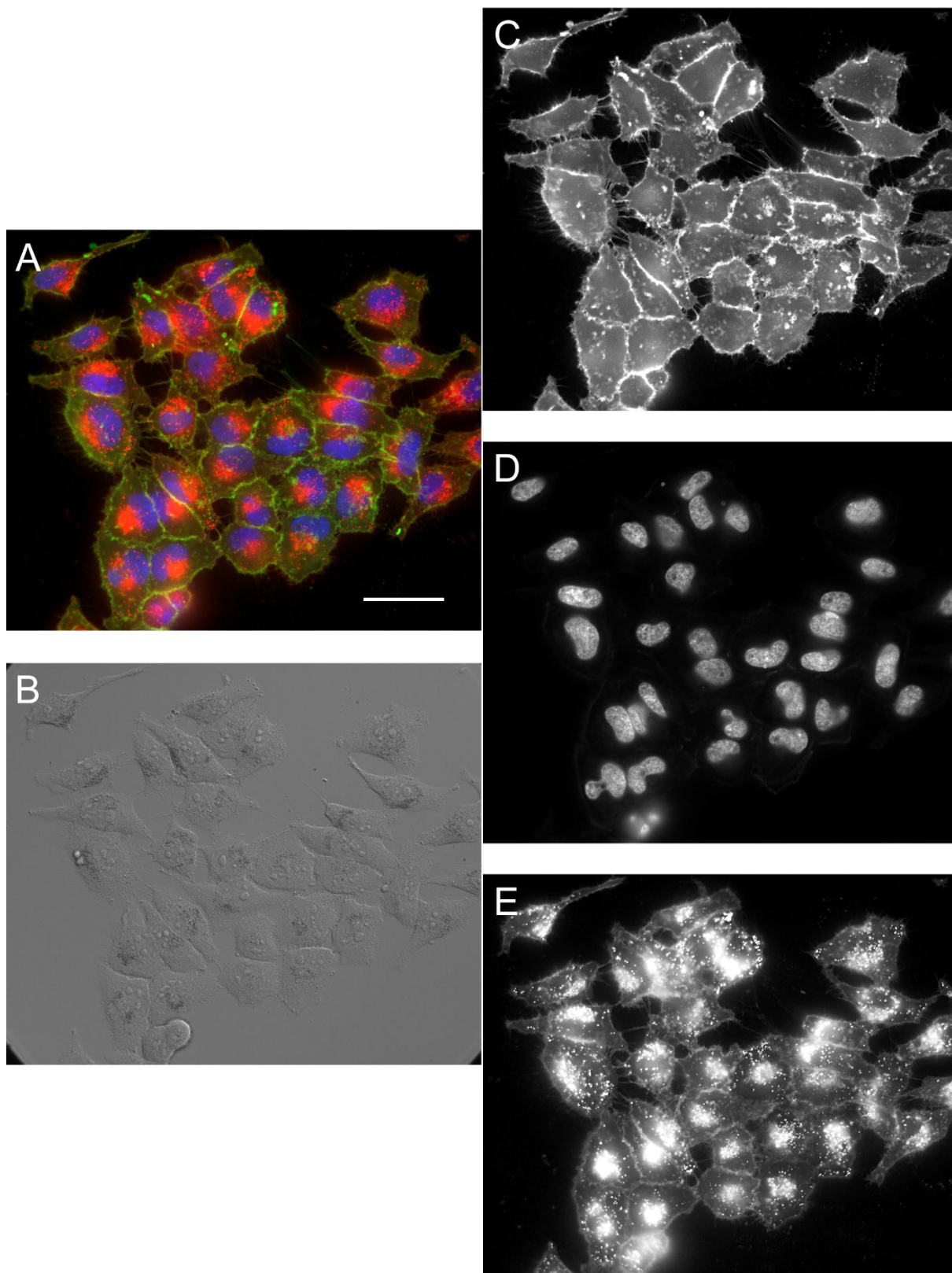
Obrázek 30 Subcelulární lokalizace látky P39 (červená) v HeLa buňkách, barvení Hoechst 33342 (modrá) a CellMask Green (zelená) po ozáření: A - překryv fluorescenčních kanálů, B - DIC, C - membrány (kanál FITC), D - jádra (kanál DAPI), E - vlastní fluorescence P39 (kanál Cy5), měřítko odpovídá 50 μm .



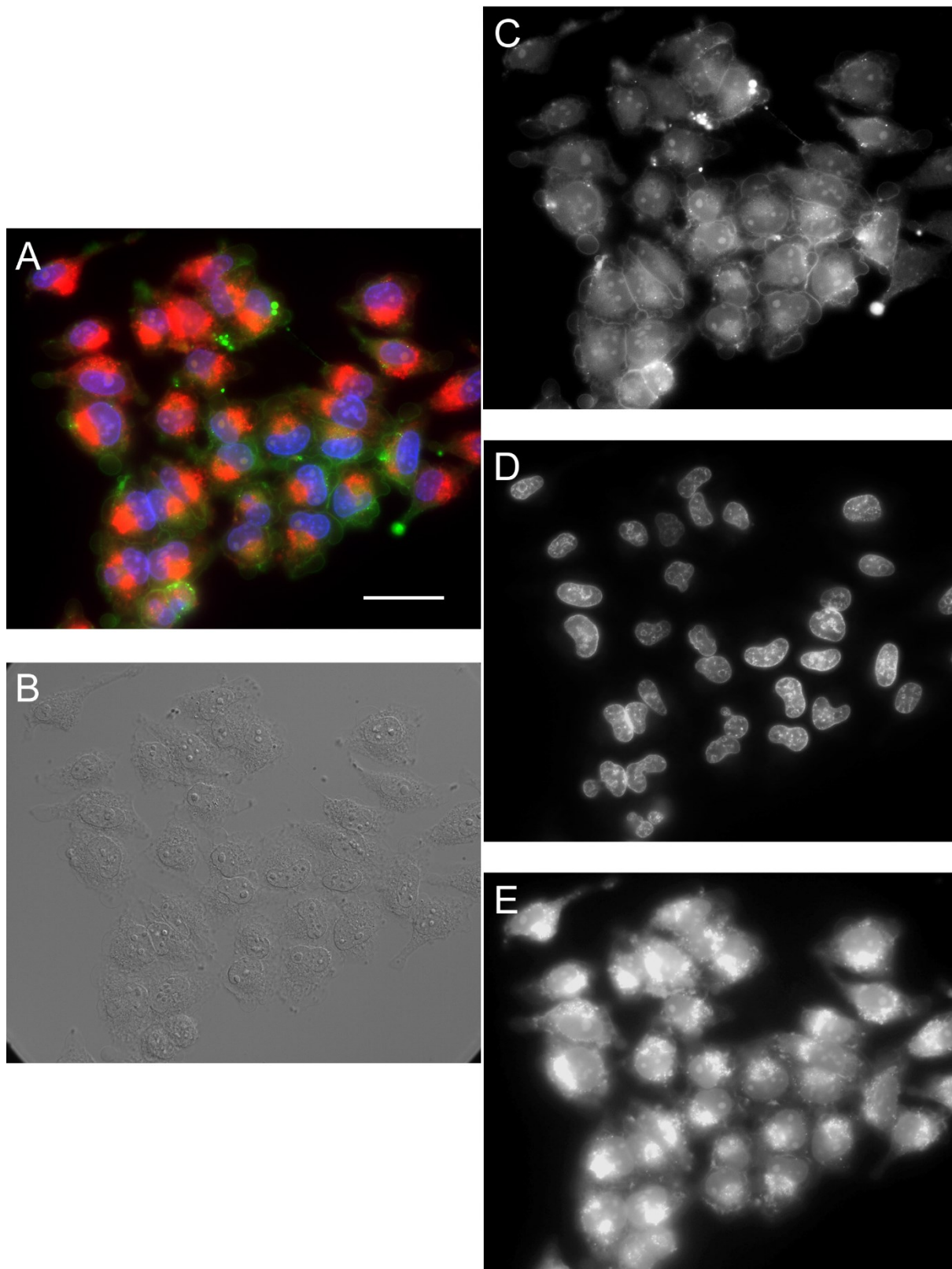
Obrázek 31 Subcelulární lokalizace látky P40 (červená) v HeLa buňkách, barvení Hoechst 33342 (modrá) a CellMask Green (zelená) před ozářením: A - překryv fluorescenčních kanálů, B - DIC, C - membrány (kanál FITC), D - jádra (kanál DAPI), E - vlastní fluorescence P40 (kanál Cy5), měřítko odpovídá 50 μm .



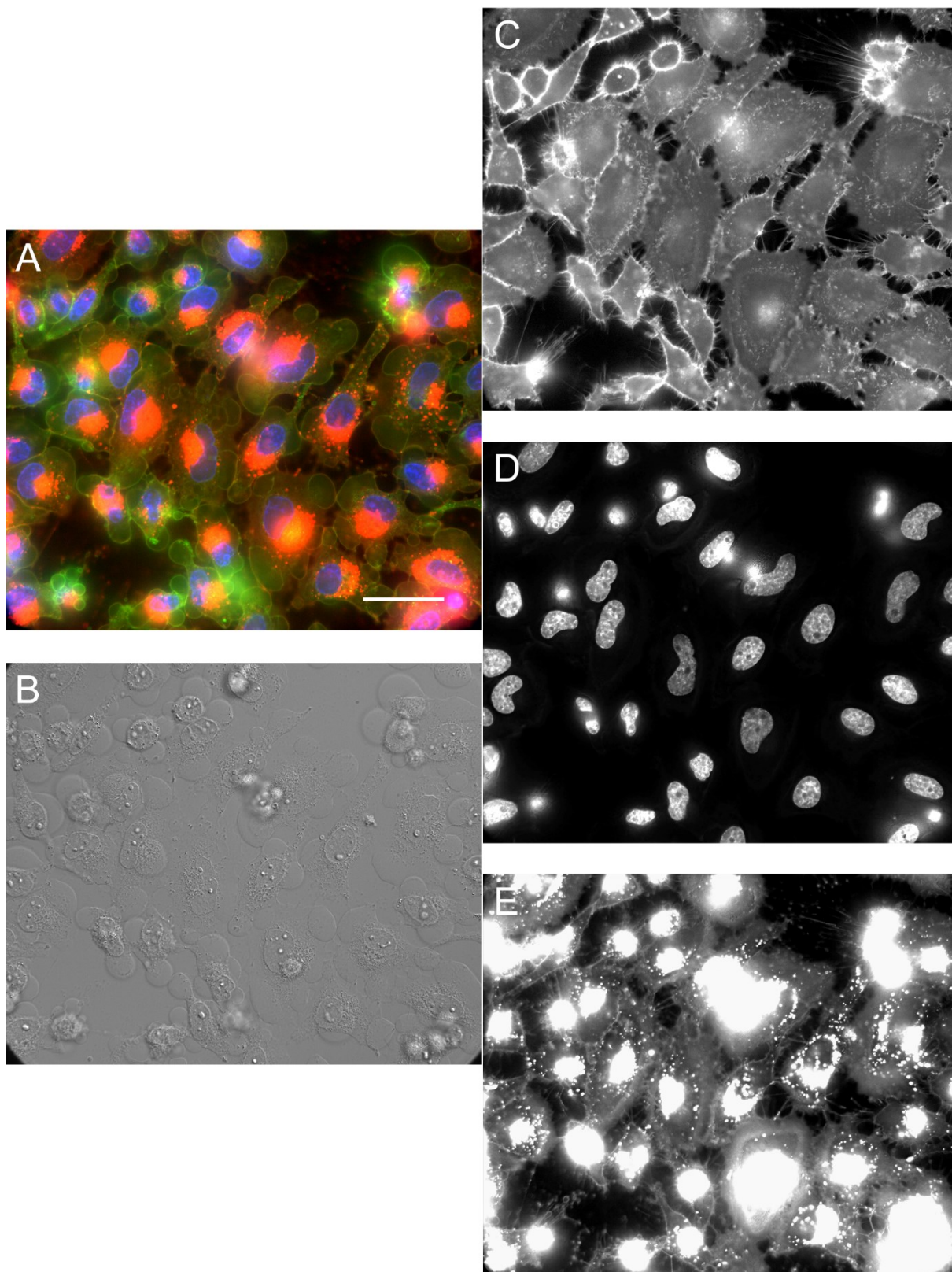
Obrázek 32 Subcelulární lokalizace látky P40 (červená) v HeLa buňkách, barvení Hoechst 33342 (modrá) a CellMask Green (zelená) po ozáření: A - překryv fluorescenčních kanálů, B - DIC, C - membrány (kanál FITC), D - jádra (kanál DAPI), E - vlastní fluorescence P40 (kanál Cy5), měřítko odpovídá 50 μm .



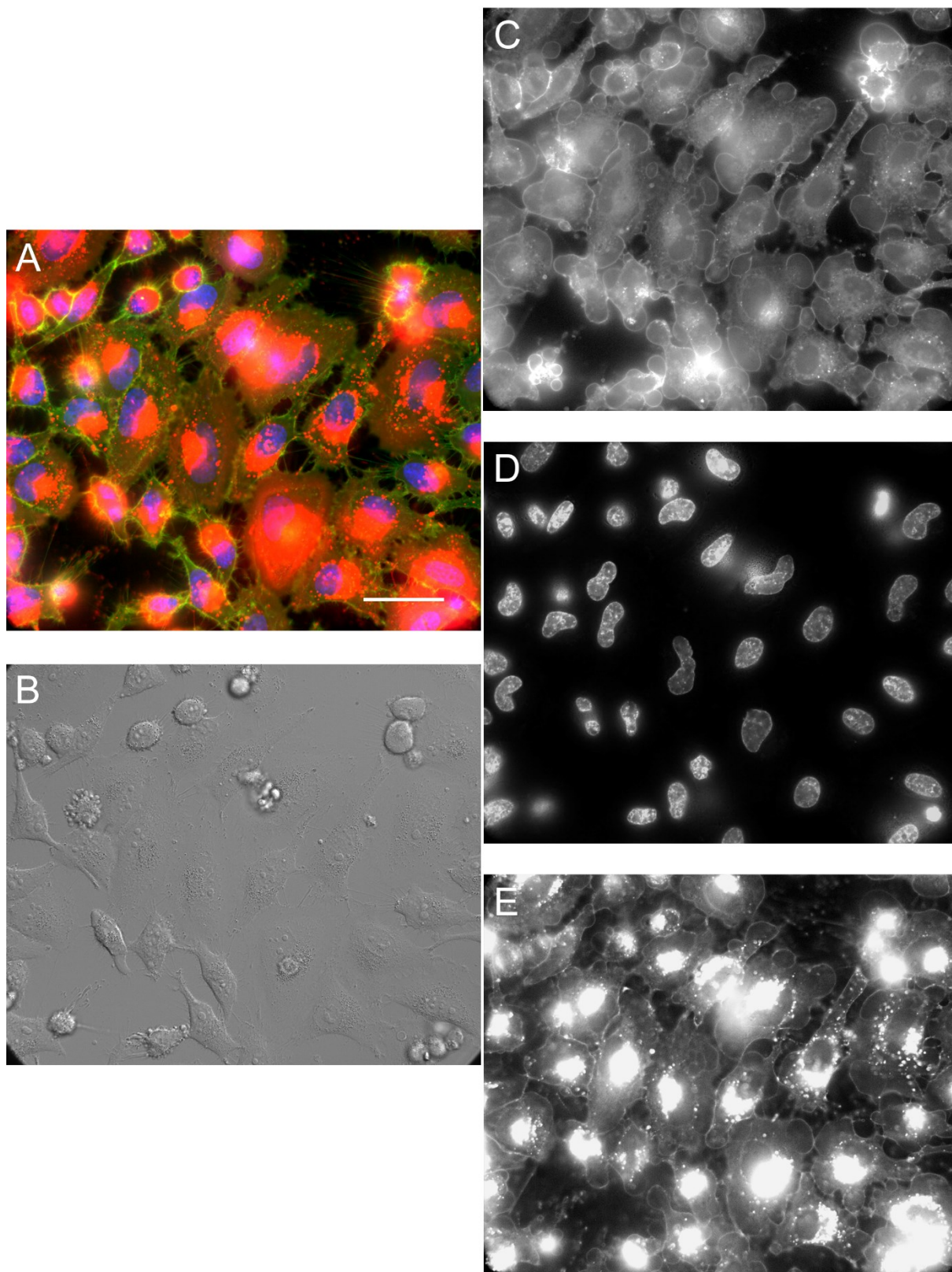
Obrázek 33 Subcelulární lokalizace látky P41 (červená) v HeLa buňkách, barvení Hoechst 33342 (modrá) a CellMask Green (zelená) před ozářením: A - překryv fluorescenčních kanálů, B - DIC, C - membrány (kanál FITC), D - jádra (kanál DAPI), E - vlastní fluorescence P41 (kanál Cy5), měřítko odpovídá 50 μm .



Obrázek 34 Subcelulární lokalizace látky P41 (červená) v HeLa buňkách, barvení Hoechst 33342 (modrá) a CellMask Green (zelená) po ozáření: A - překryv fluorescenčních kanálů, B - DIC, C - membrány (kanál FITC), D - jádra (kanál DAPI), E - vlastní fluorescence P41 (kanál Cy5), měřítko odpovídá 50 μm .



Obrázek 35 Subcelulární lokalizace látky P42 (červená) v HeLa buňkách, barvení Hoechst 33342 (modrá) a CellMask Green (zelená) před ozářením: A - překryv fluorescenčních kanálů, B - DIC, C - membrány (kanál FITC), D - jádra (kanál DAPI), E - vlastní fluorescence P42 (kanál Cy5), měřítko odpovídá 50 μm .



Obrázek 36 Subcelulární lokalizace látky P42 (červená) v HeLa buňkách, barvení Hoechst 33342 (modrá) a CellMask Green (zelená) po ozáření: A - překryv fluorescenčních kanálů, B - DIC, C - membrány (kanál FITC), D - jádra (kanál DAPI), E - vlastní fluorescence P42 (kanál Cy5), měřítko odpovídá 50 μm .

9.3 MORFOLOGICKÉ ZMĚNY BUNĚK

Morfologické změny způsobené PDT byly na HeLa buňkách sledovány pomocí konfokální mikroskopie. K obarvení buněk byly použity tři fluorescenční sondy. Pro značení jader byla využita sonda Hoechst 33342. Fluorescenční sonda MitoTracker Red CMXRos byla použita pro barvení mitochondrií a k označení aktinového cytoskeletu jsme využili sondu Actin Green.

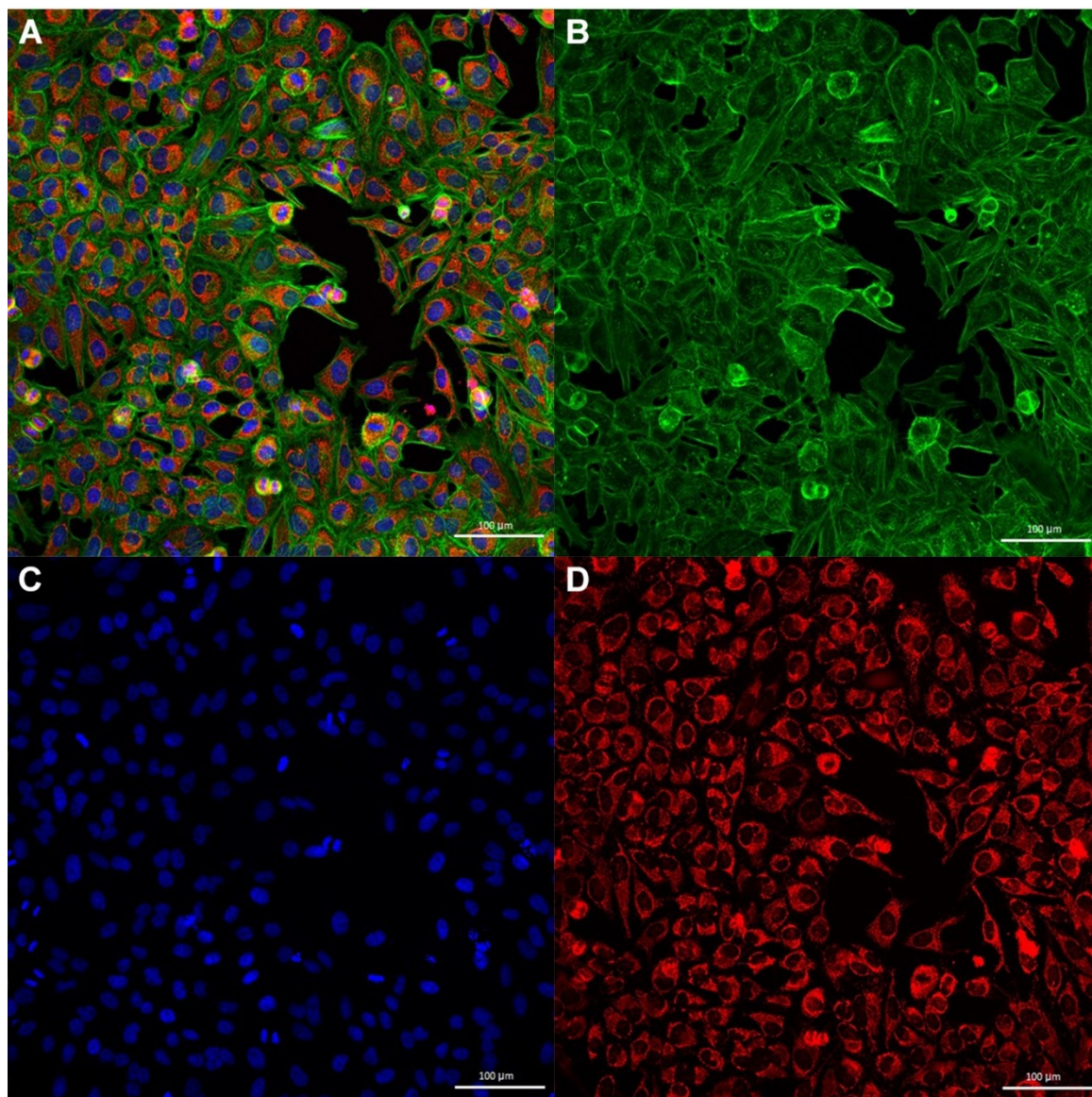
Změny na buňkách způsobené vlivem PDT byly u všech použitých látek sledovány při koncentracích odpovídajících EC_{15} a EC_{85} . Experimenty byly provedené pouze s látkami P40 a P41, jakožto aktivnějšími zástupci PS s nesubstituovanou lipofilní částí jádra a substituovanou lipofilní částí jádra. Přiložené mikrofotografie byly pořízeny na laserovém skenovacím konfokálním mikroskopu Nikon A1+. K jejich získání byly použity lasery 405, 488 a 561 a příslušné emisní filtry pro DAPI, FITC a Cy3 kanál.

Kontrolní buňky (Obr. 37) bez přidaného PS nevykazují žádné strukturální změny. Buňky mají zcela normální protáhlý tvar. Můžeme také vidět vřetenovitý či vláknitý tvar mitochondrií, celistvá jádra bez strukturálních změn chromatinu a vláknitou strukturu aktinového cytoskeletu. Místy se zde vyskytují i dělicí se buňky.

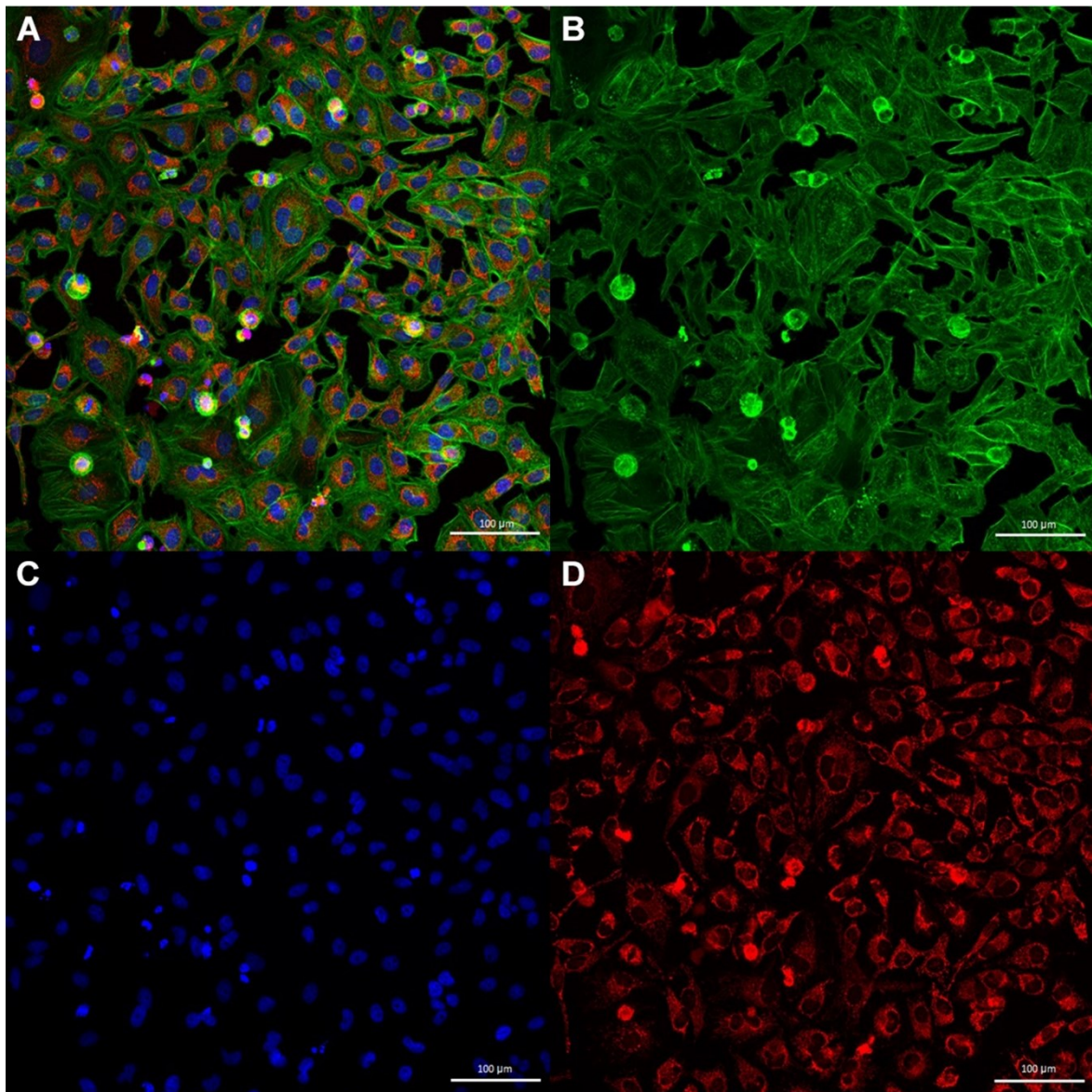
Při koncentraci PS odpovídající EC_{15} (Obr. 38 a Obr.40) nejsou ještě patrné žádné výrazné morfologické změny buněk, vyskytují se zde i dělicí se buňky. Můžeme pouze pozorovat pokles jejich počtu. Kromě toho je v některých buňkách vidět kondenzace jaderného chromatinu, což může poukazovat na vstup buněk do apoptózy. V některých buňkách je také patrná reorganizace aktinových vláken na periferii.

Výrazné morfologické změny lze pozorovat až při koncentracích odpovídajících EC_{85} (Obr.39 a Obr.41). Při těchto koncentracích dochází k výrazné kondenzaci jaderného chromatinu a smrštění jader. V některých buňkách je patrný rozpad jádra. U mitochondrií můžeme pozorovat změnu jejich typického vřetenovitého tvaru na kulovitý. U výrazně poškozených buněk se úplně ztrácí mitochondriální morfologie a signál mitochondriální sondy je difúzně rozptýlen v celé cytoplazmě. Dochází i k přestavbě cytoskeletu. Aktinová vlákna se kondenzují na periferiích buněk a mění se i jejich vláknitá struktura. Místy se signál aktinové sondy ztrácí úplně. Celkově lze vidět smrštění

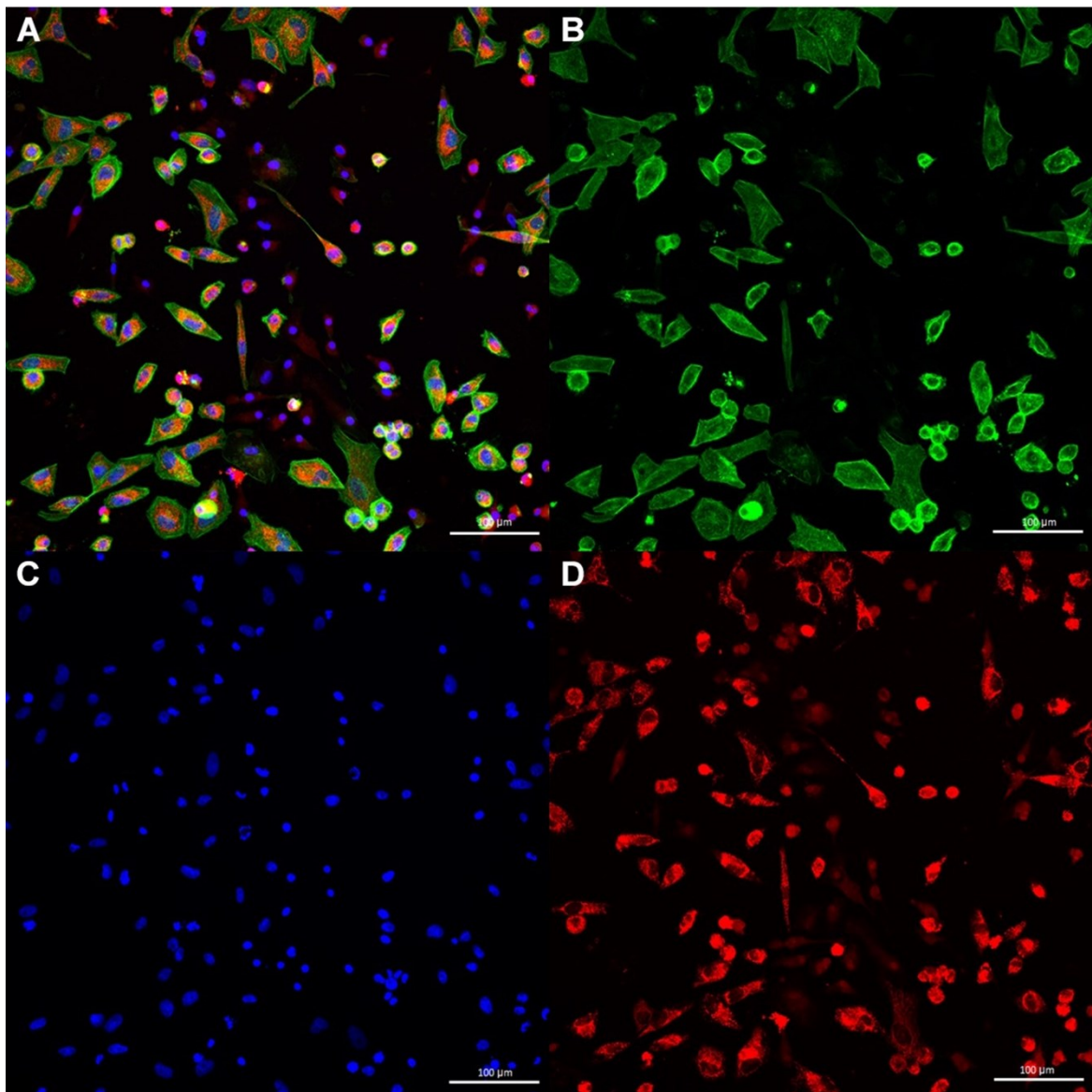
nebo zakulacení buněk, výrazné poškození buněčných membrán s tvorbou membránových blebů a výrazný pokles počtu buněk.



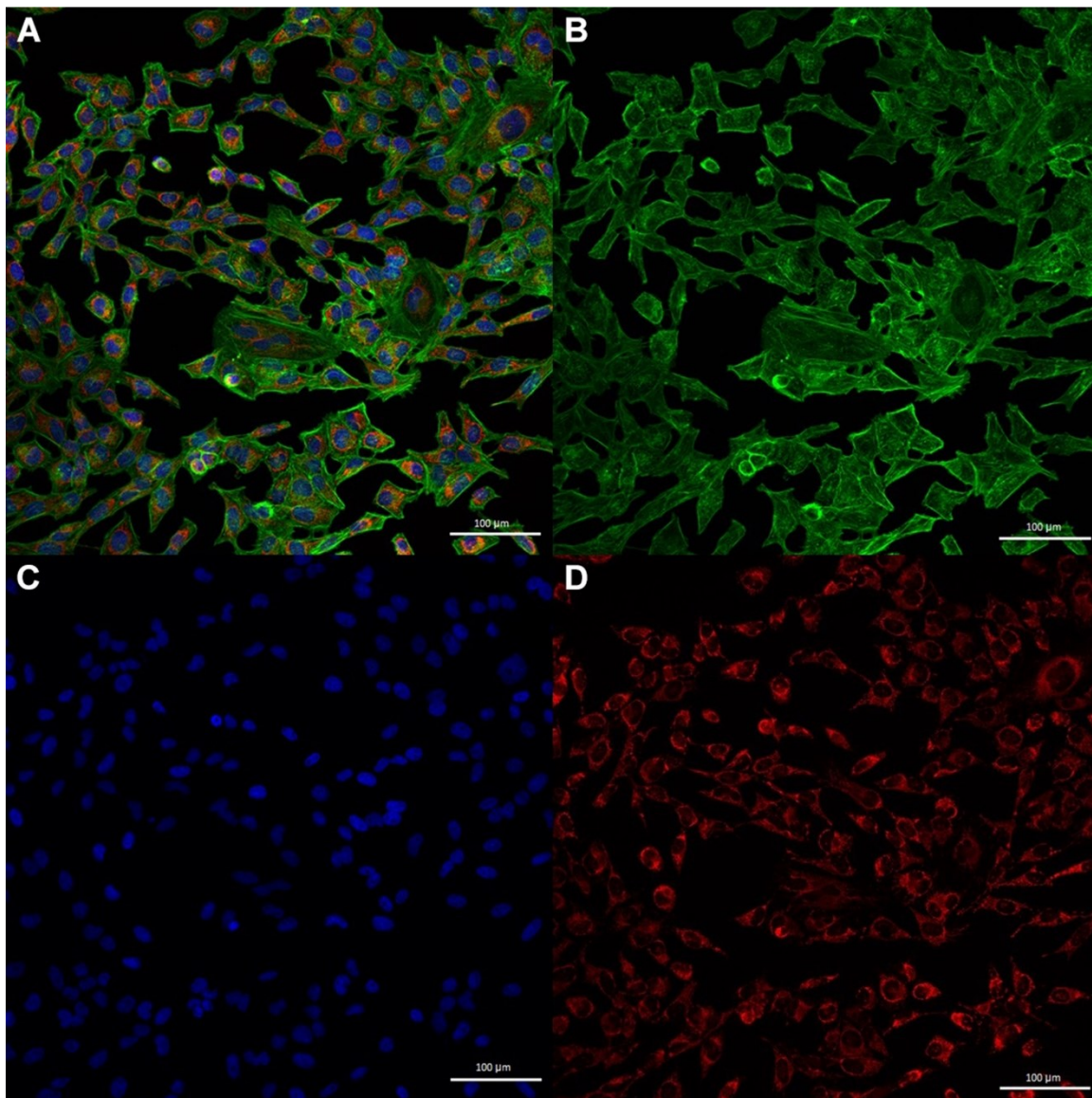
Obrázek 37 Neovlivněné HeLa buňky: A - překryv flourescenčních kanálů, B - aktinový cytoskelet (zelená), C - buněčná jádra (modrá), D - mitochondrie (červená).



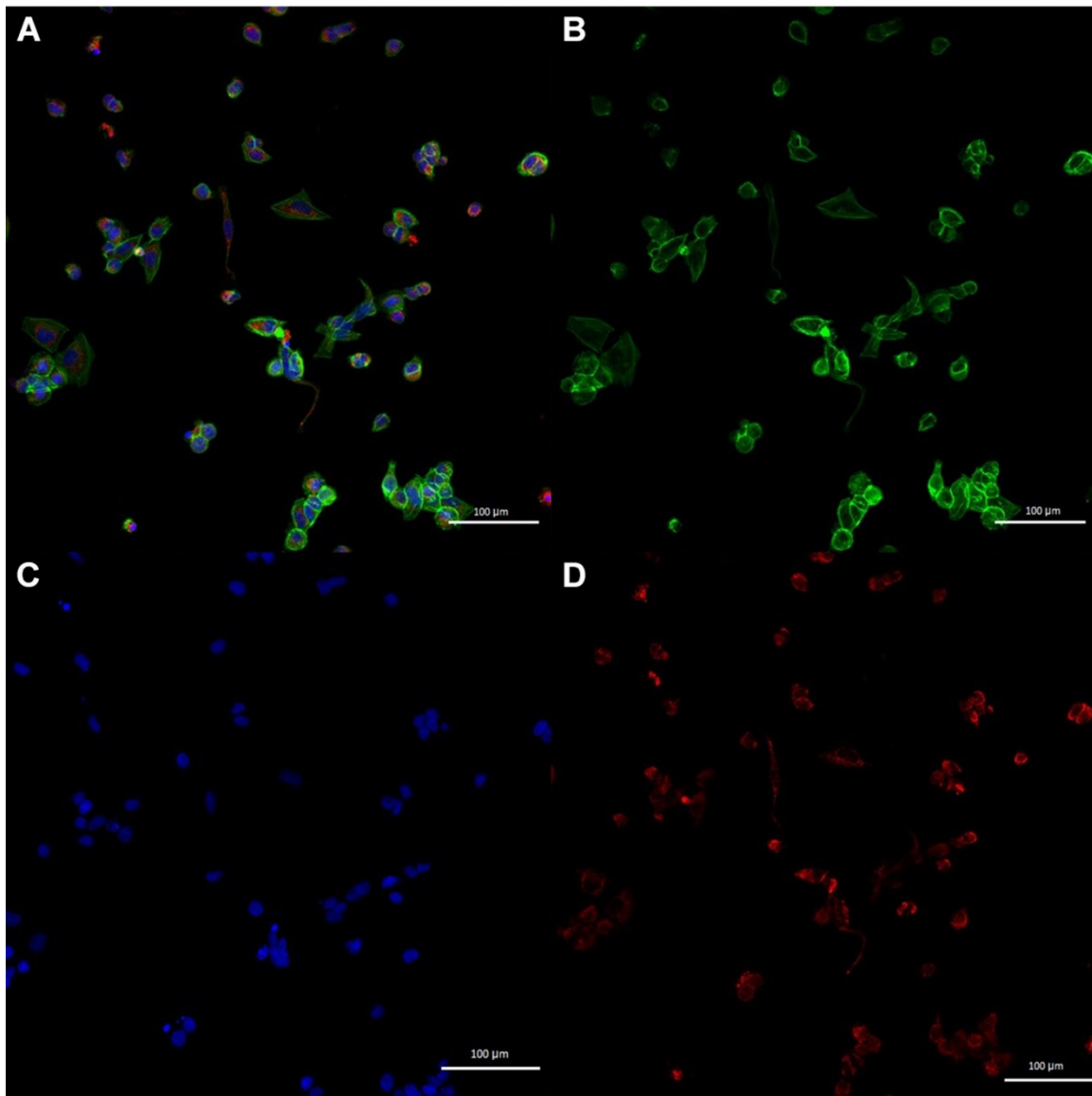
Obrázek 38 Morfologické změny HeLa buňek ovlivněných látkou P41 při koncentraci IC15: A - překryv flourescenčních kanálů, B - aktinový cytoskelet (zelená), C - buněčná jádra (modrá), D - mitochondrie (červená).



Obrázek 39 Morfologické změny HeLa buňek ovlivněných látkou P41 při koncentraci IC85: A - překryv fluorescenčních kanálů, B - aktinový cytoskelet (zelená), C - buněčná jádra (modrá), D - mitochondrie (červená).



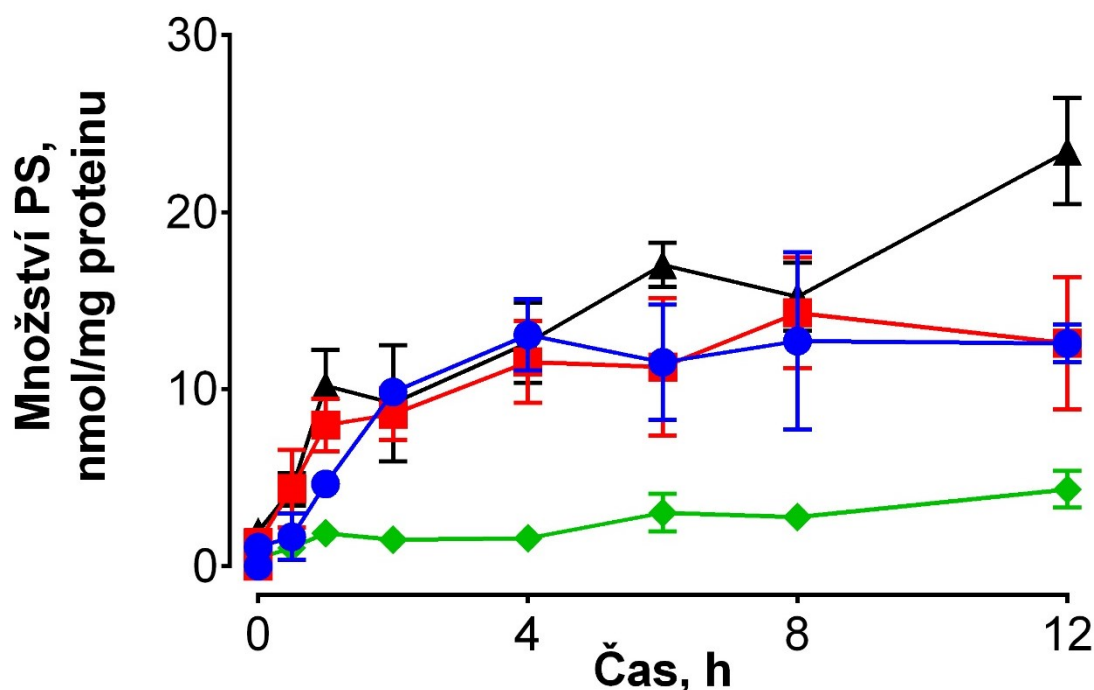
Obrázek 40 Morfologické změny HeLa buňek ovlivněných látkou P40 při koncentraci IC15: A - překryv fluorescenčních kanálů, B - aktinový cytoskelet (zelená), C - buněčná jádra (modrá), D - mitochondrie (červená).



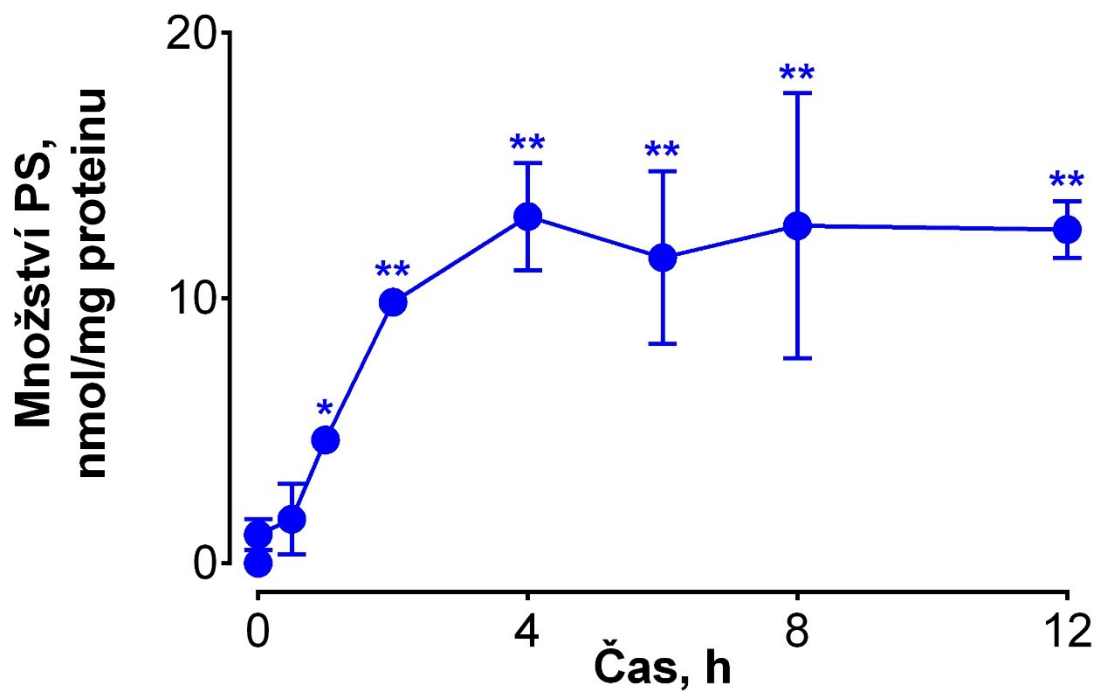
Obrázek 41 Morfologické změny HeLa buněk ovlivněných látkou P40 při koncentraci IC85: A - překryv fluorescenčních kanálů, B - aktinový cytoskelet (zelená), C - buněčná jádra (modrá), D - mitochondrie (červená).

9.4 ČASOVÝ PROFIL PROSTUPU LÁTEK DO BUNĚK

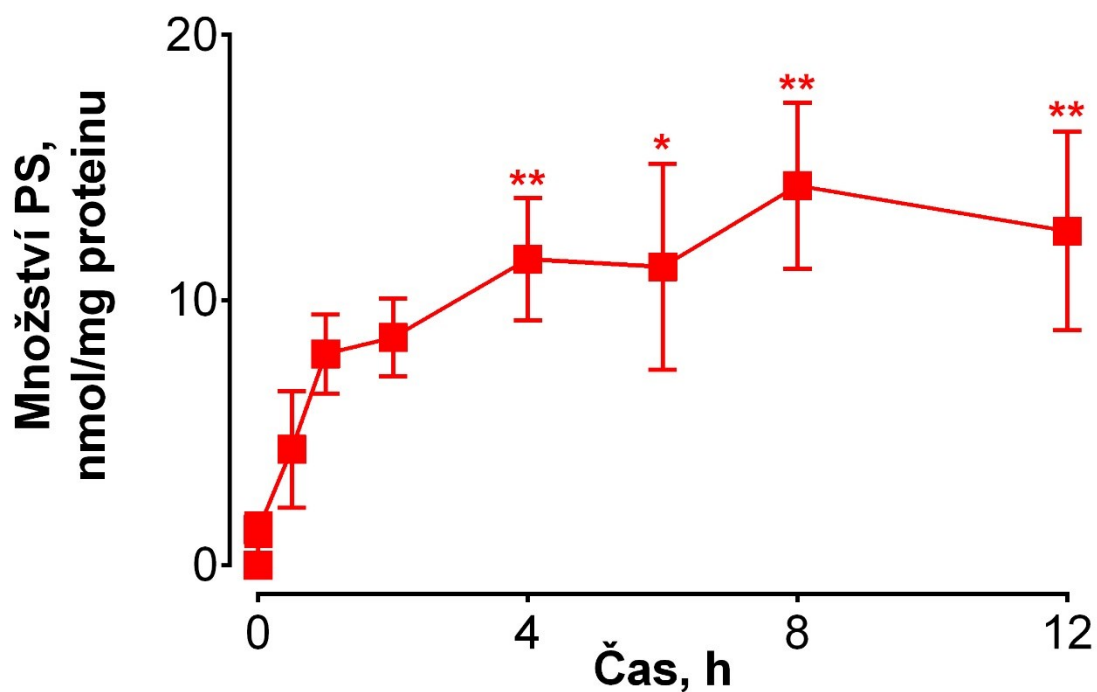
Časový profil prostupu testovaných látek do buněk byl sledován v časových intervalech 0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8 a 12 h. Výsledky byly zpracovány graficky jako závislost množství PS v buňkách (vztažená na celkovou bílkovinu vzorku) na čase (Obr.42 – Obr.46). Hodnoty koncentrace PS v buňkách byly odečteny z kalibrační přímky, která byla získána přidáváním známého množství PS k buněčnému lyzátu neobsahujícího PS. Následně byly tyto hodnoty vztaženy ke koncentraci bílkoviny ve vzorku. U látek P39 a P40 docházelo k velmi rychlému prostupu PS do buněk v prvních čtyřech hodinách (Obr.43 a Obr.44). Rychlost vstupu látky do buněk se postupně zpomalovala, až bylo dosaženo plató fáze. U látek P41 a P42 byl prostup látek velmi rychlý pouze v první hodině, poté se prostup PS zpomalil (Obr.45 a Obr.46). Po 12 hodinách dosáhla nejvyšší koncentrace v buňkách látka P41 (23,46 nmol/mg proteinu). Naopak látka P42 byla v buňkách obsažena v nejnižší koncentraci (4,34 nmol/mg proteinu). Látky P39 a P40 dosáhly téměř shodných koncentrací (12,59 nmol/mg proteinu resp. 12,60 nmol/mg proteinu).



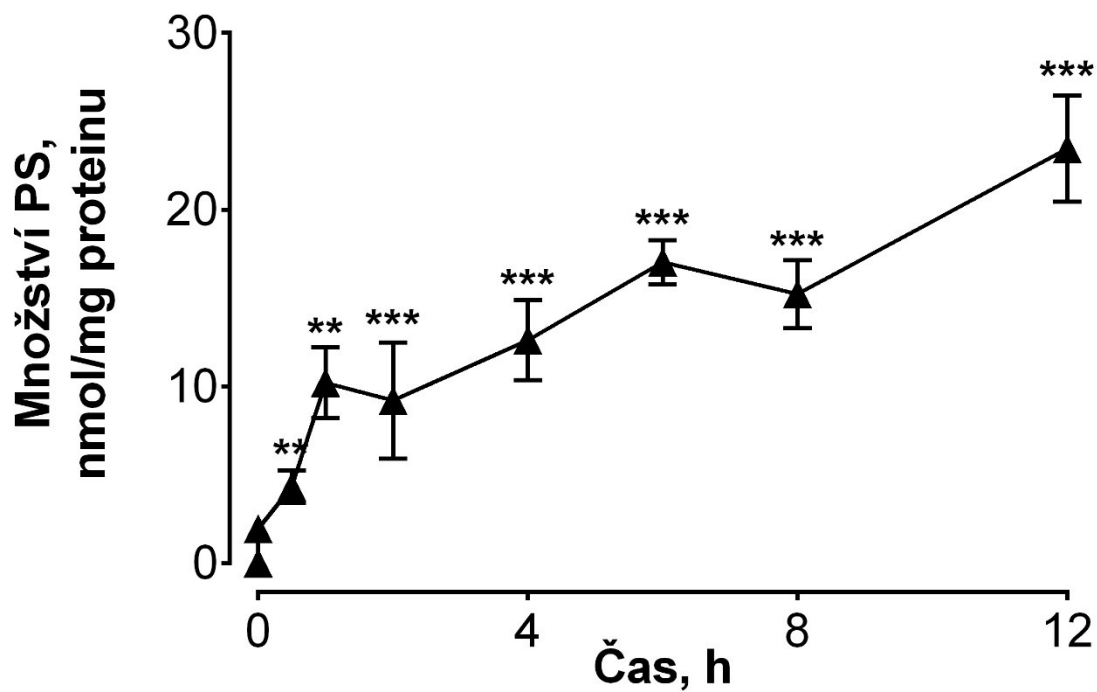
Obrázek 42 Porovnání časových profilů prostupu látek do HeLa buněk. P39 – modrá, P40 – červená, P41 – černá a P42 – zelená.



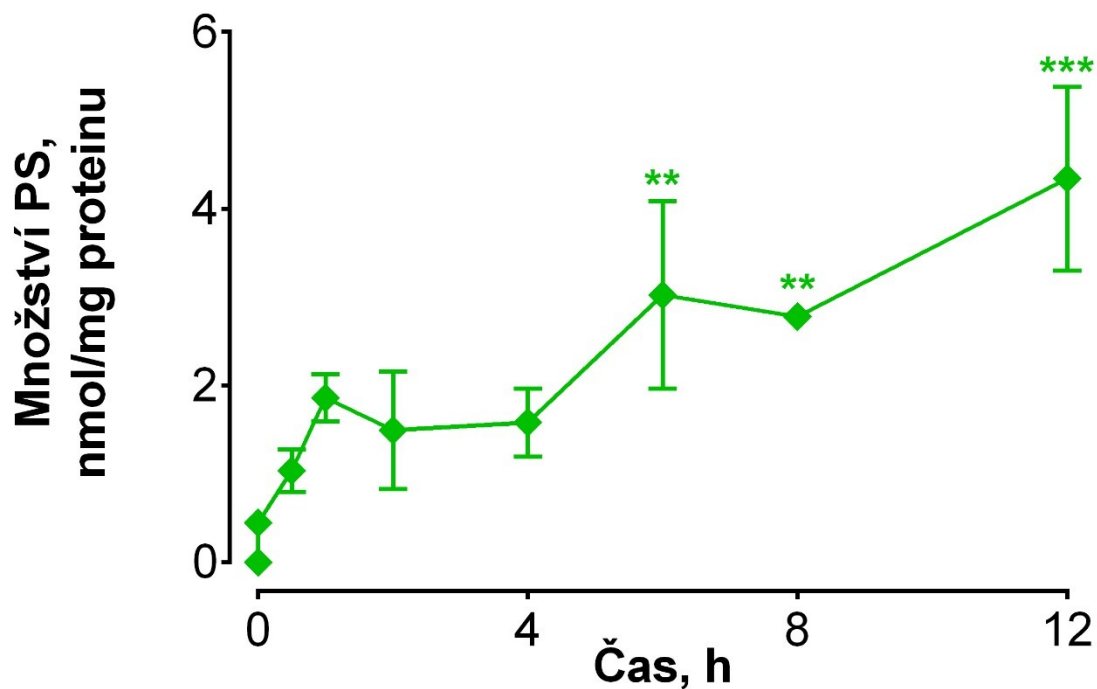
Obrázek 43 Časový profil prostupu látky P39 do HeLa buněk.



Obrázek 44 Časový profil prostupu látky P40 do HeLa buněk.



Obrázek 45 Časový profil prostupu látky P41 do HeLa buněk.



Obrázek 46 Časový profil prostupu látky P42 do HeLa buněk.

10 DISKUZE

Nádorová onemocnění jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí ve vyspělých státech. V České republice jsou druhou nejčastější příčinou morbidity i mortality obyvatelstva (ÚZIS ČR). Některé typy nádorových onemocnění dokáže dnešní medicína včas diagnostikovat i účinně léčit. Mnohá z nich jsou však stále nevléčitelná a některá z nich i velmi těžko diagnostikovatelná.

Dostupné léčebné metody mají často širokou škálu vedlejších účinků a u mnohých z nich je jejich využití v terapii velmi nákladné. Proto není divu, že je věnováno značné úsilí výzkumu nových možností terapie i diagnostiky nádorových onemocnění.

Fotodynamická terapie je jednou z již zavedených alternativních metod terapie. Její výhodou je minimální invazivita a vysoká specifita k nádorovým tkáním. Na rozdíl od ostatních terapeutických postupů zde nedochází k supresi imunitního systému a ten se tak může podílet na zničení nádorových ložisek (primárních ale i sekundárních). Její další výhodou je minimum vedlejších účinků. Nevýhodou zatím zůstává neefektivita jejího využití při léčbě diseminovaných onemocnění a nádorových metastáz (Agostinis et al., 2011, Brown et al., 2004).

Pro fotodynamickou terapii je nezbytná přítomnost tří základních komponent. Je to PS, světlo a $^3\text{O}_2$. Všechny tři jsou pro tělo samostatně netoxické. Pokud se však ve tkáni vyskytnou společně, dochází ke vzniku fotochemické reakce, což je principem účinku PDT. Při této reakci totiž dochází k tvorbě ROS, především pak $^1\text{O}_2$. Všechny tyto molekuly jsou vysoce toxické a schopné vyvolat buněčnou smrt (Sharman et al., 1999).

Nutnost přítomnosti všech tří složek pro vznik fotochemické reakce zvyšuje selektivitu PDT. Ta je ovlivněna nejprve PS, který se selektivně hromadí v nádorové tkáni, a následně selektivním ozařováním cílové tkáně. Díky tomu při PDT dochází k minimálnímu poškození okolních tkání (Kamkaew et al., 2013).

Kromě již zmíněného přímého cytotoxického efektu na nádorové buňky dochází při PDT i k poškození nádorové mikrocirkulace. Tím dochází ke kyslíkové a výživové deprivaci buněk tumoru, což vede k jejich dalšímu odumírání. V takto poškozené tkáni dochází ke vzniku zánětlivé reakce, čímž dojde k aktivaci imunitního systému, který se tak může také podílet na likvidaci nádorového ložiska (Dolmans et al., 2003).

Jelikož se využití fotodynamické terapie zdá velmi výhodné, byly již některé PS zavedeny do klinické praxe. Těchto několik látek dnes slouží k terapii mnoha nádorových, ale i nenádorových onemocnění. Za zmínku stojí například Photofrin[®], což je první PS využívaný v klinické praxi, verteporfin, který se hojně využívá v očním lékařství, nebo Photosens[®], jenž je prvním PS ze skupiny Pc v klinické praxi (Connor et al., 2009, Ormond & Freeman, 2013).

Nicméně ani jedna z těchto látek nemá ideální vlastnosti, a proto nadále probíhá výzkum nových PS, jehož cílem je zvýšení efektivity terapie a dostupnosti látek v cílových strukturách a zároveň snížení nežádoucích účinků.

Pc jsou velmi nadějná PS s výhodnými vlastnostmi pro využití v terapii. Díky absorpci světla vyšších vlnových délek (> 670 nm) mohou být použity pro léčbu hlouběji uložených lézí. Navíc jejich využití nevyvolává téměř žádnou kožní fotosensitizaci. Jsou také schopny velmi efektivně produkovat ¹O₂ a další ROS. Díky tomu stačí k usmrcení nádorových buněk velmi malé dávky PS (Li et al., 2019, Ragoussi & Ince, 2013).

Jejich problémem je však nízká rozpustnost ve vodných rozpouštědlech. Většina z nich má tendenci ve vodném prostředí agregovat, čímž dochází ke ztrátě jejich fotodynamické aktivity a tím i ke ztrátě jejich schopnosti produkovat letální cytotoxické molekuly. To je pro jejich potenciální využití ve fotodynamické terapii velmi nežádoucí. Z toho důvodu jsou stále vyvíjeny nové postupy syntézy a různě substituované molekuly Pc (Kostka et al., 2006).

V této práci jsme se zabývali studiem fotodynamické aktivity nově připravených PS ze skupiny Pc a AzaPc. Všechny testované látky byly syntetizovány na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové, konkrétně na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy výzkumnou skupinou prof. PharmDr. Petra Zimčíka, Ph.D. Testované látky jsou amfifilní molekuly kationické povahy a obsahují ve své struktuře centrální atom zinku.

Veškeré experimenty byly provedeny na lidské nádorové buněčné linii HeLa. Fotodynamická aktivita testovaných PS byla hodnocena v SCM i SFM médiu. Dále byla stanovena subcelulární lokalizace a byly sledovány morfologické změny vyvolané v buňkách vlivem jejich působení. Dále byl hodnocen i časový profil prostupu látek do buněk.

Již dříve byly publikovány studie zabývající se fotodynamickou aktivitou plně hydrofilních analog našich testovaných látek. Například Machacek et al., 2016a porovnává účinnost a toxicitu již zavedených PS s některými plně symetrickými hydrofilními AzaPc. Nejeftivnější studovnou látkou této studie byla látka číslo 6, jejíž $EC_{50} = 3,8 \pm 0,2$ nM. Tato látka vykazovala také výrazně nejnížší vlastní toxicitu a byla tak nejslibnější látkou v celé studii. Strukturálně jde o plně symetrický hydrofilní analog námi testovaných látek P39 a P40.

Zinečnatými ftalocyaniny a jejich vlastnostmi se také zabývala studie Makhseed et al., 2013. Látka číslo 5 v této studii odpovídá zcela hydrofilnímu symetrickému analogu námi testovaných ftalocyaninů. I tato látka se ukázala jako účinná při nízkých koncentracích ($EC_{50} = 36,7$ nM) a zároveň velmi málo toxická v absenci záření. Navíc je tato látka i velmi dobře rozpustná ve vodných rozpouštědlech.

Nevýhodou amfifilních látek oproti zcela hydrofilním je obvykle jejich nižší účinnost. V případě námi studovaných látek však pokles účinnosti není příliš výrazný. Například u látky P42 je účinnost dokonce srovnatelná s dříve publikovanou (Makhseed et al., 2013) hydrofilní verzí a látka P40 tuto hydrofilní látku dokonce překonává. Látka P41 má aktivitu zhruba poloviční oproti tomuto hydrofilnímu Pc nesoucím substituenty v rigidním uspořádání a P39 se svou nižší aktivitou dostává řádově na úroveň hydrofilních kationických derivátů s flexibilními substituenty, a dokonce je svou aktivitou mírně překonává (Machacek et al., 2015).

Naopak velkou výhodou jejich amfifilní povahy je lepší schopnost vázat se do membrán, a tudíž je přímo poškozovat. Toho se dá mj. využít například pro jejich vazbu na liposomy a řízeně tak uvolňovat jejich obsah (Macháček et al., 2018). Z výsledků subcelulární lokalizace v této diplomové práci vyplývá, že se obdobně tyto látky chovají i *in vitro*, kde se váží na buněčnou membránu (odkud se následně endocytózou dostávají do endolysosomálního kompartmentu). V prostředí *in vivo* by se dala kombinovat vazba na liposomy s navázáním nějaké další látky pro lepší zacílení PS.

Kromě kationických ftalocyaninů jsou zkoumány také ftalocyaniny anionické. Jedním z anionických aza-analogů se zabývá Machacek et al., 2016b. V této studii můžeme vidět, že i anionické molekuly mohou mít vlastnosti vhodné pro využití v PDT. Testovaná látka vykazovala účinnost v *in vitro* podmínkách při poměrně nízké koncentraci ($IC_{50} = 5,7$ μ M) a nízkou vlastní toxicitu (154 mM). Nicméně u tohoto

anionického PS byla prokázána výrazná vazba na sérové proteiny, což způsobilo desetinásobný pokles fotodynamické aktivity v SCM. U kationických amfifilních PS použitých v této studii se žádná vazba na sérové proteiny neprokázala (měřeno Mgr. Janem Kollárem ze skupiny prof. Zimčíka; dosud nepublikovaná data). Obdobně nízké aktivity oproti kationickým derivátům bylo dosaženo i s jinými anionickými hydrofilními analogy viz. Choi et al., 2004, Ke et al., 2009, Liu et al., 2005 nebo Kollar et al., 2019.

Z výsledků této diplomové práce je patrné, že námi testované PS vykazují v *in vitro* podmínkách velmi výhodné vlastnosti pro potenciální využití v PDT. Výsledky experimentů naznačují, že námi studované látky jsou účinné při nižších koncentracích než klinicky používané PS (viz. dále v diskuzi). Zároveň vykazují i velmi malou vlastní toxicitu, která nebyla detekována až do limitu rozpustnosti těchto látek.

V cytotoxicitních experimentech v rámci této studie byla neúčinnější látka P40 jejíž EC_{50} je $17,8 \pm 3,7$ nM v SCM. Velmi účinná byla i látka P42 s hodnotou EC_{50} $41,2 \pm 10,7$ nM, která je srovnatelná s hodnotou jejího hydrofilního analoga s hodnotou $EC_{50} = 36,7$ nM testovaného ve studii Makhseed et al., 2013. Naopak nejméně účinná byla látka P39 ($EC_{50} = 165,5 \pm 27,0$ nM). Nicméně i tato látka je účinnější než některé klinicky používané PS testované za zcela stejných experimentálních podmínek. Pro srovnání je možné použít výsledky z výše zmíněné studie Machacek et al., 2016a, ve které jsou porovnány některé klinicky používané PS s nově syntetizovanými PS. Například hodnota EC_{50} pro PpIX zjištěná v této studii odpovídá 800 nM, což je mnohem vyšší než u všech námi studovaných originálních látek. Stejně tak jediný klinicky používaný PC Photosens[®] zde dosáhl hodnoty $EC_{50} = 2\ 070$ nM, tedy mnohonásobně vyšší než u všech námi testovaných látek. Naopak srovnatelné hodnoty EC_{50} s námi studovanými PS mají verteporfín ($EC_{50} = 36$ nM) a temoporfín ($EC_{50} = 45$ nM).

Bohužel se nám nepodařilo stanovit hodnoty TC_{50} kvůli nízkému limitu rozpustnosti námi testovaných látek ve vodném prostředí kultivačního média. Žádná z nich však neprojevila žádnou vlastní toxicitu až do svého limitu rozpustnosti. Můžeme je tedy alespoň přibližně porovnat s klinicky používanými PS ze studie Machacek et al., 2016a. Například hodnota TC_{50} pro Photosens[®] zde byla stanovena $127 \pm 7,8$ μ M (viz. Machacek, et al., 2016a). Tato látka byla jednou z nejméně toxických. Pro porovnání námi testovaná látka P42 nevykazovala žádnou vlastní toxicitu ani při limitu rozpustnosti, který je 200 μ M.

Časový profil prostupu látek do buněk pro látky P39 a P40 se mírně lišil od profilu látek P41 a P42. U látek P39 a P40 docházelo k velmi rychlému prostupu PS do buněk v prvních čtyřech hodinách. Rychlost vstupu látky do buněk se postupně zpomalovala, až došlo k dosažení plató fáze. Oproti tomu u látek P41 a P42 byl prostup látek velmi rychlý pouze v první hodině, poté se prostup PS zpomalil, ale k dosažení plató fáze nedošlo. Srovnatelné chování bylo zjištěno i u jiných kationických ftalocyaninů, můžeme ho pozorovat i s již zmíněnou látkou číslo 6 ve studii Machacek, et al., 2016a, tato látka však dosáhla mnohonásobně nižší finální koncentrace. Anionické fotosenzitizéry pronikají do buněk v nižších koncentracích a mnohem dříve dosahují fáze plató viz. Machacek, et al., 2016b.

Pomocí fluorescenční mikroskopie byla také určena subcelulární lokalizace studovaných látek za využití fluorescenčních sond MitoTracker Green FM, LysoTracker Blue DND-22, Hoechst 33342 a CellMask Green. Námi testované látky nebylo třeba značit, jelikož vykazují svoji vlastní fluorescenci detekovatelnou kanálem pro Cy5.

V buňkách obarvených sondami pro lyzosomy a mitochondrie bylo patrné, že všechny testované látky se hromadí v endolyzosomalním kompartmentu, což jsme předpokládali vzhledem k jejich velikosti a náboji. Tato skutečnost se shoduje i s dříve publikovanými daty například ve studiích Machacek et al., 2016a nebo Zimcik et al., 2010. Kromě toho bylo při obarvení buněk sondami Hoechst 33342 a CellMask Green zjištěno, že látky se také v menší míře váží na buněčné membrány.

Jelikož všechny použité látky se projeví jako účinné PS můžeme v buňkách po ozáření pozorovat výrazné morfologické změny vyvolané působením testovaných látek. Při koncentraci PS odpovídající EC_{15} jsou pozorovány pouze změny počtu buněk a v některých buňkách kondenzace jaderného chromatinu či reorganizace aktinových vláken na periferii buněk. Komplexní morfologické změny v buňkách vidíme až při koncentracích odpovídajících EC_{85} . Při této koncentraci dochází k výrazné kondenzaci jaderného chromatinu a smrštění jader, změně tvaru mitochondrií či úplnému vymizení jejich signálu a také kondenzaci aktinových vláken na periferiích buněk. Celkově tedy dochází ke smrštění, popř. zakulacení buněk, výraznému poškození buněčných membrán s tvorbou membránových blebů a výraznému poklesu počtu buněk.

Z výsledků této práce vidíme, že všechny testované látky jsou v *in vitro* podmínkách velmi účinné PS, aktivní již při velmi nízkých dávkách. Do budoucna by

tedy výsledky těchto experimentů mohly vést k dalšímu hlubšímu studiu těchto látek *in vitro* a časem případně i k jejich studiu v *in vivo* experimentech.

11 ZÁVĚRY

- Časový profil prostupu látek do buněk byl zpočátku rychlý, postupně však došlo k jeho zpomalení a u látek P39 a P40 bylo časem dosaženo plató fáze.
- Místem subcelulární lokalizace testovaných látek byl určen endolyzozomální kompartment. Navíc jsou tyto látky vázány i na buněčné membrány.
- Všechny testované PS vykazovaly výbornou fotodynamickou aktivitu na buněčné linii HeLa. Nejúčinnější byla látka P40, jejíž hodnota EC_{50} v SCM odpovídá $17,8 \pm 3,7$ nM.
- Hodnotu vlastní toxicity látek se nepodařilo stanovit kvůli nízkému limitu rozpustnosti testovaných látek, nicméně až do jeho limitu neprojevila žádná z nich toxicitu bez ozáření.
- Vzhledem k výborné fotodynamické aktivitě všech testovaných substancí bylo možné pozorovat výrazné morfologické změny v buňkách po jejich ozáření vznikající působením PS. Změny byly patrné v jádře, mitochondriích i cytoskeletu. Celkově jsme mohli pozorovat zakulacení buněk, výrazné poškození buněčných membrán s tvorbou membránových blebů a znatelný pokles počtu buněk.
- Všechny testované látky vykazovaly velmi dobré fotodynamické vlastnosti. Nejvýhodnější vlastnosti mají látky P40 a P42, které jsou aktivní při velmi nízkých koncentracích, neprojevily žádnou vlastní toxicitu a jejich limit rozpustnosti je také nejvyšší.

12 POUŽITÁ LITERATURA

- Abrahamse, H., Hamblin, M. R., Africa, S., & Hospital, M. G. (2017). New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochemical Journal*, 473(4), 347–364.
<http://doi.org/10.1042/BJ20150942.New>
- Ackroyd, R., Kelty, C., Brown, N., & Reed, M. (2001). The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 74(5), 656–669.
[http://doi.org/10.1562/0031-8655\(2001\)0740656THOPAP2.0.CO2](http://doi.org/10.1562/0031-8655(2001)0740656THOPAP2.0.CO2)
- Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. a, Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., ... Golab, J. (2011). Photodynamic Therapy of Cancer : An Update. *American Cancer Society*, 61(4), 250–281. <http://doi.org/10.3322/caac.20114>. Available
- Agostinis, P., Vantieghem, A., Merlevede, W., & Witte, P. A. M. De. (2002). Hypericin in cancer treatment : more light on the way. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 34(3), 221–241.
- Allison, R. R., Downie, G. H., Cuenca, R., Hu, X.-H., Childs, C. J., & Sibata, C. H. (2004). Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1(1), 27–42. [http://doi.org/10.1016/S1572-1000\(04\)00007-9](http://doi.org/10.1016/S1572-1000(04)00007-9)
- Allison, R. R., & Sibata, C. H. (2010). Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 7(2), 61–75.
<http://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2010.02.001>
- Bonnett, R. (1995). Photosensitizers of the Porphyrin and Phthalocyanine Series for Photodynamic Therapy. *Chemical Society Reviews*, 24(1), 19–33.
- Brown, S. B., Brown, E. A., & Walker, I. (2004). Review The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment Photodynamic therapy. *Lancet Oncology*, 5(8), 497–508.
- Calzavara-pinton, P. G., Venturini, M., & Sala, R. (2007a). Photodynamic therapy : update 2006 Part 1 : Photochemistry and photobiology. *JOURNAL OF THE EUROPEAN ACADEMY OF DERMATOLOGY AND VENEREOLOGY*, 21(4), 293–302.
<http://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2006.01902.x>
- Calzavara-pinton, P. G., Venturini, M., & Sala, R. (2007b). Photodynamic therapy : update 2006 Part 2 : Clinical results. *Journal of European Academy of Dermatology and Venereology*, 21(4), 439–451. <http://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2006.02038.x>
- Castano, A. P., Demidova, T. N., & Hamblin, M. R. (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: Part one - Photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1(4), 279–293.
[http://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00007-4](http://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00007-4)
- Choi, C. F., Tsang, P. T., Huang, J. D., Chan, E. Y. M., Ko, W. H., Fong, W. P., & Ng, D. K. P. (2004). Synthesis and in vitro photodynamic activity of new hexadeca-carboxy phthalocyanines. *Chemical Communications*, 10(19), 2236–2237.
<http://doi.org/10.1039/b405868b>
- Connor, A. E. O., Gallagher, W. M., & Byrne, A. T. (2009). Porphyrin and Nonporphyrin

- Photosensitizers in Oncology : Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 85(5), 1053–1074.
<http://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2009.00585.x>
- Detty, R. M., Gibson, L. S., & Wagner, J. S. (2004). Current Clinical and Preclinical Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(16), 3898–3915.
- Dolmans, D., Fukumura, D., & Jain, R. (2003). Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 380–387.
- Dumoulin, F., Durmus, M., Ahsen, V., & Nyokong, T. (2010). Synthetic pathways to water-soluble phthalocyanines and close analogs. *Coordination Chemistry Reviews*, 254(23–24), 2792–2847. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.05.002>
- Ertem, B., Yalazan, H., Güngör, Ö., & Durmu, M. (2018). Synthesis , structural characterization , and investigation on photophysical and photochemical features of new metallophthalocyanines. *Journal of Luminescence*, 204, 464–471.
<http://doi.org/10.1016/j.jlumin.2018.08.043>
- Fabris, C., Soncin, M., Miotto, G., Fantetti, L., Chiti, G., Dei, D., ... Jori, G. (2006). Zn (II) - phthalocyanines as phototherapeutic agents for cutaneous diseases . Photosensitization of fibroblasts and keratinocytes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B - Biology*, 83(1), 48–54. <http://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2005.12.006>
- Fields, W., Fowler, K., Hargreaves, V., Reeve, L., & Bombick, B. (2017). Development , qualification , validation and application of the neutral red uptake assay in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells using a VITROCELL ® VC10 ® smoke exposure system ☆. *Toxicology in Vitro*, 40, 144–152. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.01.001>
- Gomes, A. N. A. T. P. C., Neves, M. G. P. M. S., Qu, C., & Naturais, P. (2018). Cancer , Photodynamic Therapy and Porphyrin-Type Derivatives. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 90, 993–1026.
- Hamblin, M. R., & Hasan, T. (2004). Photodynamic therapy : a new antimicrobial approach to infectious disease ? *Photochemical & Photobiological Sciences*, 3(5), 436–450.
- Ishii, K. (2012). Functional singlet oxygen generators based on phthalocyanines. *Coordination Chemistry Reviews*, 256(15–16), 1556–1568.
<http://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.03.022>
- Josefsen, L. B., & Boyle, R. W. (2012). Unique diagnostic and therapeutic roles of porphyrins and phthalocyanines in photodynamic therapy, imaging and theranostics. *Theranostics*, 2(9), 916–966. <http://doi.org/10.7150/thno.4571>
- Juarranz, Á., Jaén, P., Jesús, F. S., & Salvador, C. (2008). Photodynamic therapy of cancer . Basic principles and applications. *Clinical & Translational Oncology*, 10(3), 148–154.
<http://doi.org/10.1007/s12094-008-0172-2>
- Kamkaew, A., Lim, S. H., Lee, H. B., Kiew, L. V., Chung, L. Y., & Burgess, K. (2013). BODIPY dyes in photodynamic therapy. *Chemical Society Reviews*, 42(1), 77–88.
<http://doi.org/10.1039/c2cs35216h>
- Ke, M. R., Huang, J. D., & Weng, S. M. (2009). Comparison between non-peripherally and peripherally tetra-substituted zinc (II) phthalocyanines as photosensitizers: Synthesis, spectroscopic, photochemical and photobiological properties. *Journal of Photochemistry*

- and *Photobiology A: Chemistry*, 201(1), 23–31.
<http://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2008.09.011>
- Keca, J. M., & Zheng, G. (2019). Texaphyrin: From molecule to nanoparticle. *Coordination Chemistry Reviews*, 379(SI), 133–146. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.08.026>
- Kessel, D. (2004). Photodynamic therapy: From the beginning. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1(1), 3–7. [http://doi.org/10.1016/S1572-1000\(04\)00003-1](http://doi.org/10.1016/S1572-1000(04)00003-1)
- Knap, B., Przystupski, D., Saczko, J., Ewa, K., Knap-czop, K., Kotli, J., ... Kulbacka, J. (2018). Photodynamic therapy – mechanisms , photosensitizers and combinations. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 1098–1107.
<http://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.049>
- Kobak, R. Z. U., & Gül, A. (2009). Synthesis and solution studies on azaphthalocyanines with quaternary aminoethyl substituents. *Coloration Technology*, 125(1), 22–28.
<http://doi.org/10.1111/j.1478-4408.2008.00171.x>
- Kollar, J., Machacek, M., Jancarova, A., Kubat, P., Kucera, R., Miletin, M., ... Zimcik, P. (2019). Effect of bovine serum albumin on the photodynamic activity of sulfonated tetrapyrazinoporphyrazine. *Dyes and Pigments*, 162, 358–366.
<http://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.10.051>
- Kostka, M., Zimcik, P., Miletin, M., Klemnera, P., Kopecky, K., & Musil, Z. (2006). Comparison of aggregation properties and photodynamic activity of phthalocyanines and azaphthalocyanines. *Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry*, 178(1), 16–25. <http://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2005.06.014>
- Kudrevich, S. V., & Van Lier, J. E. (1996). Azaanalogs of phthalocyanine: syntheses and properties. *Coordination Chemistry Reviews*, 163–182.
- Landry, J. J. M., Pyl, P. T., Rausch, T., Zichner, T., Tekkedil, M. M., Stütz, A. M., ... Steinmetz, L. M. (2013). The Genomic and Transcriptomic Landscape of a HeLa Cell Line. *G3-Genes Genomes Genetics*, 3(8), 1213–1224.
<http://doi.org/10.1534/g3.113.005777>
- Li, X., Zheng, B., Peng, X., Li, S., Ying, J., & Zhao, Y. (2019). Phthalocyanines as medicinal photosensitizers : Developments in the last five years. *Coordination Chemistry Reviews*, 379, 147–160. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.08.003>
- Lipatova, I. M., Yusova, A. A., & Lukyanets, E. A. (2018). Supramolecular complexation of the cationic derivative of Zn (II) phthalocyanine and sodium alginate in mixed aqueous solutions. *Journal of Photochemistry & Photobiology, A: Chemistry*, 364, 588–594.
<http://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2018.06.046>
- Liu, W., Jensen, T. J., Fronczek, F. R., Hammer, R. P., Smith, K. M., & Vicente, M. G. H. (2005). Synthesis and cellular studies of nonaggregated water-soluble phthalocyanines. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(4), 1033–1041. <http://doi.org/10.1021/jm049375b>
- Macháček, M., Carter, K. A., Kostelanský, F., Miranda, D., Seffouh, A., Ortega, J., ... Lovell, J. F. (2018). Binding of an amphiphilic phthalocyanine to pre-formed liposomes confers light-triggered cargo release. *Journal of Materials Chemistry B*, 6(44), 7298–7305.
<http://doi.org/10.1039/c8tb01602j>
- Machacek, M., Cidlina, A., Novakova, V., Svec, J., Rudolf, E., Miletin, M., ... Zimcik, P. (2015). Far-red-absorbing cationic phthalocyanine photosensitizers: Synthesis and

- evaluation of the photodynamic anticancer activity and the mode of cell death induction. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(4), 1736–1749. <http://doi.org/10.1021/jm5014852>
- Machacek, M., Demuth, J., Cermak, P., Vavreckova, M., Hrubá, L., Jedlickova, A., ... Zimcik, P. (2016a). Tetra(3,4-pyrido)porphyrazines Caught in the Cationic Cage: Toward Nanomolar Active Photosensitizers. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(20), 9443–9456. <http://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01140>
- Machacek, M., Kollár, J., Miletin, M., Kučera, R., Kubát, P., Simunek, T., ... Zimcik, P. (2016b). Anionic hexadeca-carboxylate tetrapyrazinoporphyrazine: Synthesis and in vitro photodynamic studies of a water-soluble, non-aggregating photosensitizer. *RSC Advances*, 6(12), 10064–10077. <http://doi.org/10.1039/c5ra25881b>
- Makhseed, S., Machacek, M., Alfadly, W., Tuhl, A., Vinodh, V., Simunek, T., ... Zimcik, P. (2013). Water-soluble non-aggregating zinc phthalocyanine and in vitro studies for photodynamic therapy. *Chemical Communications*, 49(95), 11149–11151. <http://doi.org/10.1039/c3cc44609c>
- Master, A., Livingston, M., & Sen, A. (2013). Photodynamic nanomedicine in the treatment of solid tumors : Perspectives and challenges. *Journal of Controlled Release*, 168(1), 88–102. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.02.020>
- Meisel, P., & Kocher, T. (2005). Photodynamic therapy for periodontal diseases : State of the art. *Journal of Photochemistry and Photobiology B - Biology*, 79(2), 159–170. <http://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2004.11.023>
- Miletin, M., Zimcik, P., & Novakova, V. (2018). Photodynamic properties of aza-analogues of phthalocyanines. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 17(11), 1749–1766. <http://doi.org/10.1039/c8pp00106e>
- Namikawa, T., Fujisawa, K., Munekage, E., Iwabu, J., Uemura, S., & Tsujii, S. (2018). Clinical application of photodynamic medicine technology using light-emitting fluorescence imaging based on a specialized luminous source. *Medical Molecular Morphology*, 51(4), 187–193. <http://doi.org/10.1007/s00795-018-0190-2>
- 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. <http://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2003.10.002>
- Oniszczyk, A., Wojtunik-Kulesza, K. A., Oniszczyk, T., & Kasprzak, K. (2016). The potential of photodynamic therapy (PDT)??Experimental investigations and clinical use. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 83, 912–929. <http://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.07.058>
- Ormond, A. B., & Freeman, H. S. (2013). Dye sensitizers for photodynamic therapy. *Materials*, 6(3), 817–840. <http://doi.org/10.3390/ma6030817>
- Ragoussi, M., & Ince, M. (2013). Recent Advances in Phthalocyanine-Based Sensitizers for Dye-Sensitized Solar. *European Journal of Organic Chemistry*, 29, 6475–6489. <http://doi.org/10.1002/ejoc.201301009>
- Rook, A. H., Wood, G. S., Duvic, M., Vonderheid, E. C., Tobia, A., & Cabana, B. (2010). A phase II placebo-controlled study of photodynamic therapy with topical hypericin and visible light irradiation in the treatment of cutaneous T-cell lymphoma and psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 63(6), 984–990.

<http://doi.org/10.1016/j.jaad.2010.02.039>

- Salerno, L., Dichiara, M., Prezzavento, O., Marrazzo, A., Pittal, V., Resci, A., & Amata, E. (2017). Recent advances in drug discovery of phototherapeutic non-porphyrinic anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *142*, 459–485. <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.08.070>
- Samy, N. A., Salah, M. M., Ali, M. F., & Sadek, A. M. (2015). Effect of methylene blue-mediated photodynamic therapy for treatment of basal cell carcinoma. *Lasers in Medical Science*, *30*(1), 109–115. <http://doi.org/10.1007/s10103-014-1609-1>
- Sekkat, N. (2012). Like a Bolt from the Blue: Phthalocyanines in Biomedical Optics. *Molecules*, *17*(1), 98–144. <http://doi.org/10.3390/molecules17010098>
- Sharman, W. M., Allen, C. M., & Van Lier, J. E. (1999). Photodynamic therapeutics: Basic principles and clinical applications. *Drug Discovery Today*, *4*(11), 507–517. [http://doi.org/10.1016/S1359-6446\(99\)01412-9](http://doi.org/10.1016/S1359-6446(99)01412-9)
- Straten, D. Van, Mashayekhi, V., Bruijn, H. S. De, Oliveira, S., & Robinson, D. J. (2017). Oncologic Photodynamic Therapy : Basic Principles , Current Clinical Status and Future Directions. *Cancers*, *9*(2), 1–54. <http://doi.org/10.3390/cancers9020019>
- Tardivo, J. P., Del, A., Santos, C., Oliveira, D., Santesso, D., Couto, H., ... Baptista, M. S. (2005). Methylene blue in photodynamic therapy : From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, *2*(3), 175–191. [http://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00097-9](http://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00097-9)
- Tewari, K. M., & Eggleston, I. M. (2018). Chemical approaches for the enhancement of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy and photodiagnosis. *Photochemical & Photobiological Sciences*, *17*(11), 1553–1572. <http://doi.org/10.1039/c8pp00362a>
- Wan, S., Zeng, J., Cheng, H., & Zhang, X. (2018). ROS-induced NO generation for gas therapy and sensitizing photodynamic therapy of tumor. *Biomaterials*, *185*, 51–62. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.09.004>
- Warloe, T., Ph, D., Berg, K., Ph, D., Moan, J., Ph, D., ... Ph, D. (1997). 5-Aminolevulinic Acid – Based Photodynamic Therapy Clinical Research and Future Challenges. *American Cancer Society*, *79*(12), 2282–2308.
- Wei, S., Zhou, J., Huang, D., & Wang, X. (2006). Synthesis and Type I / Type II photosensitizing properties of a novel amphiphilic zinc phthalocyanine. *Dyes and Pigments*, *71*(1), 61–67. <http://doi.org/10.1016/j.dyepig.2005.06.016>
- Wilson, B. C., & Patterson, M. S. (2008). The physics , biophysics and technology of photodynamic therapy. *Physics in Medicine and Biology*, *53*(9), R61–R109. <http://doi.org/10.1088/0031-9155/53/9/R01>
- Yano, S., Hirohara, S., Obata, M., Hagiya, Y., Ogura, S., Ikeda, A., ... Joh, T. (2011). Current states and future views in photodynamic therapy. “*Journal of Photochemistry & Photobiology, C: Photochemistry Reviews*,” *12*(1), 46–67. <http://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2011.06.001>
- Yuan, P., Ruan, Z., Jiang, W., Liu, L., Dou, J., Li, T., & Yan, L. (2018). Oxygen self-sufficient fluorinated polypeptide nanoparticles for NIR imaging-guided enhanced photodynamic therapy. *Journal of Materials Chemistry B*, *6*(15), 2323–2331. <http://doi.org/10.1039/c8tb00493e>

- Zhang, J., Jiang, C., Paulo, J., Longo, F., Bentes, R., Zhang, H., & Alexandre, L. (2018). An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 8(2), 137–146.
<http://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.09.003>
- Zimcik, P., Miletin, M., Musil, Z., Kopecky, K., Kubza, L., & Brault, D. (2006). Cationic azaphthalocyanines bearing aliphatic tertiary amino substituents — Synthesis, singlet oxygen production and spectroscopic studies. *Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry*, 183(1–2), 59–69.
<http://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2006.02.022>
- Zimcik, P., Miletin, M., Radilova, H., Novakova, V., Kopecky, K., Svec, J., & Rudolf, E. (2010). Synthesis, Properties and In Vitro Photodynamic Activity of Water-soluble Azaphthalocyanines and Azanaphthalocyanines. *Photochemistry and Photobiology*, 86(1), 168–175.