

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD



## DIPLOMOVÁ PRÁCE

# Fotochemická internalizace saporinu ftalocyaninovými fotosensitizéry

**Bc. Kateřina Vlková**

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

**Konzultant: Mgr. Monika Rohlíčková**

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2022**

## Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala RNDr. Miloslavu Macháčkovi, Ph.D., vedoucímu mé diplomové práce, za odborné vedení, starostlivý přístup, poskytnuté rady a připomínky během experimentální i teoretické části. Děkuji za čas, který věnoval zpracování diplomové práce. Také bych ráda poděkovala Mgr. Monice Rohlíčkové za pomoc při práci v laboratoři, velkou ochotu, trpělivost a čas, který mi věnovala při hodnocení výsledků, dále pak vědeckým skupinám prof. Zimčíka a prof. Makhseeda za syntézu látek, které byly použity v experimentech. Děkuji také Grantové agentuře Univerzity Karlovy (projekt č. 1312220) za finanční podporu. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za podporu během celého studia.

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

V Hradci Králové 30. srpna 2022

Bc. Kateřina Vlková

# 1. ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

**Student:** Bc. Kateřina Vlková

**Školitel:** RNDr. Miloslav Macháček, Ph.D.

**Konzultant:** Mgr. Monika Rohlíčková

**Název diplomové práce:** Fotochemická internalizace saporinu ftalocyaninovými fotosensitizéry

Aplikace terapeutických makromolekul je často ovlivněna omezeným vstupem těchto látek do buněk a jejich následnou lyzomální degradací, čímž nedosáhnou svých intracelulárních cílů. Jejich buněčný příjem lze zvýšit prostřednictvím fotochemické internalizace. Fotochemická internalizace využívá fotosenzitivní látky, které se lokalizují v membránách endosomů a vyvolají uvolnění účinných látek po expozici světlu.

Diplomová práce, metodou fotochemické internalizace, zkoumá vliv cíleného toxinu saporinu a vybraných nesymetrických fotosensitizérů na buněčné linii HeLa. Hodnotí účinek různých koncentrací těchto látek na životaschopnost nádorových buněk. Dále se zabývá porovnáním dvou přístupů dodání světelné energie, a to před a po podání saporinu – tzv. „light-before“ a „light-after“ přístup.

Z našich dat je patrné, že samostatně podaný saporin příliš nesnižuje životaschopnost testované linie, přestože byl aplikován v poměrně vysoké koncentraci.

Snahou bylo vytvořit účinnou kombinaci koncentrací PS a saporinu. Nicméně z výsledků je patrné, že ne vždy se jedná o nízkou hodnotu koncentrací studovaných látek. Na druhou stranu, v porovnání účinností jednotlivých látek a jejich kombinací se saporinem jsou často zřetelné rozdíly  $EC_{50}$  (střední efektivní koncentrace) – toto je však nutné v budoucnu ještě potvrdit kombinačními studiemi.

Z výsledků provedených experimentů vyplývá, že vyšší cytotoxická účinnost, která snížila životaschopnost HeLa buněk na polovinu, byla pozorována u postupu „light-after“, v porovnání s přístupem „light-before“.

**Klíčová slova:** fotochemická internalizace, fotosensitizér, saporin, endosom

## 2. ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

**Student:** Bc. Kateřina Vlková

**Supervisor:** RNDr. Miloslav Macháček, Ph.D.

**Consultant:** Mgr. Monika Rohlíčková

**Title of the diploma thesis:** Photochemical internalization of saporine by phthalocyanine photosensitisers

The application of therapeutic macromolecules is often affected by limited cellular uptake and lysosomal degradation, thus failing to reach their intracellular targets. Their cellular uptake can be increased through photochemical internalization. Photochemical internalization uses photosensitive agents that localize in the membranes of endosomes and induce drug release upon exposure to light.

This diploma thesis is focused on the evaluation of the effect of saporin in the combination with non-symmetrical photosensitizers on HeLa cell line using photochemical internalization. Effect of various concentrations of these compounds on the viability of tumour cells was evaluated. Two approaches to deliver the energy from light were compared as well: before and after the administration of saporin (i.e., "light-before" and "light-after" approach).

From obtained data, it is evident that saporin (administered alone) does not significantly reduce the viability of HeLa cells, even though it was applied in a relatively high concentration.

Our main goal was to create an effective combination of PSs and saporin. However, based on the results, it is evident that the concentrations are not always low. On the other hand, when comparing the effectiveness of individual compounds and their combinations with saporin, there are often clear differences in  $EC_{50}$  (mean effective concentration). Nevertheless, this needs to be proven by drug combination studies in the future.

Results of the experiments have shown that higher efficiency, which reduced the viability of HeLa cells by half, was gained using "light-after" protocol compared to "light-before".

**Key words:** photochemical internalization, photosensitizer, saporin, endosome

### 3. OBSAH

1. ABSTRAKT .....	4
2. ABSTRACT .....	5
3. OBSAH .....	6
4. ÚVOD.....	9
5. CÍLE PRÁCE.....	10
6. TEORETICKÁ ČÁST.....	11
6.1 Fotochemická internalizace .....	11
6.2 Fotodynamická terapie .....	12
6.2.1 Průběh fotodynamické terapie .....	12
6.2.2 Nevýhody fotodynamické terapie.....	13
6.3 Klinické použití fotodynamické terapie a fotochemické internalizace .....	14
6.4 Rozdílný princip fotodynamické terapie a fotochemické internalizace.....	14
6.5 Příjem látek buňkami .....	16
6.6 Cílené toxiny.....	16
6.6.1 Dělení .....	17
6.6.2 Saporin .....	17
6.6.3 Mechanismy intoxikace a buněčné smrti indukované saporinem.....	18
6.7 Internalizace saporinu do cytosolu .....	18
6.7.1 Endocytóza fotosensitizerů.....	19
6.7.2 Výběr a aktivace fotosensitizerů .....	20
6.7.3 Fotofyzikální a fotochemické reakce.....	21
6.7.4 Interakce singletového kyslíku s endosomální membránou.....	22
6.7.5 Přístupy „light-after“ a „light-before“ .....	22
6.8 Další omezení a výhody fotochemické internalizace .....	24
7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	25
7.1 Vybavení pro práci s buněčnou linií .....	25

7.1.1	Základní laboratorní pomůcky .....	25
7.1.2	Přístrojová technika .....	25
7.1.3	Chemické látky a reakční činidla .....	25
7.2	Buněčná linie HeLa .....	27
7.2.1	Kultivace buněk .....	27
7.2.2	Kultivační médium .....	27
7.2.3	Pasážování buněk .....	27
7.2.4	Stanovení počtu životaschopných buněk .....	28
7.3	Cytotoxicitní experimenty .....	28
7.3.1	Nasazování buněk na experiment .....	28
7.3.2	Testování fotoaktivních sloučenin a toxických látek .....	29
7.3.3	Ftalocyaninové fotosensitizery .....	29
7.3.4	Fototoxicita .....	31
7.3.5	Přístup „light-after“ .....	31
7.3.6	Přístup „light-before“ .....	31
7.3.7	Stanovení životaschopnosti buněk testem vychytávání neutrální červeně ....	31
7.4	Vyhodnocení dat .....	32
8.	VÝSLEDKY .....	33
8.1	Experimenty pro stanovení toxicity po ozáření .....	33
8.1.1	P42-1Zn-Me .....	33
8.1.2	P44-COOH .....	34
8.1.3	Pc-Sugar .....	35
8.1.4	Pc-PEG .....	36
8.1.5	Saporin .....	37
8.2	Fototoxicitní experimenty látek v kombinaci Light After .....	38
8.2.1	P42-1Zn-Me 0,01 $\mu$ M a Saporin .....	38
8.2.2	P44-COOH 0,1 $\mu$ M a Saporin .....	40
8.2.3	Pc-Sugar 0,5 $\mu$ M a Saporin .....	42
8.2.4	Pc-PEG 0,5 $\mu$ M a Saporin .....	44
8.2.5	Saporin 0 – 1 – 10 $\mu$ g/ml a P42-1Zn-Me .....	46
8.2.6	Saporin 0 – 1 - 10 $\mu$ g/ml a P44-COOH .....	48
8.2.7	Saporin 0 – 5 - 7 $\mu$ g/ml a P44-COOH .....	50
8.2.8	Saporin 0 - 1 $\mu$ g/ml a Pc-Sugar .....	52

8.2.9	Saporin 0 – 1 µg/ml a Pc-PEG.....	54
8.3	Fototoxicitní experimenty látek v kombinaci Light Before .....	56
8.3.1	P42-1Zn-Me 0,01 µM a Saporin .....	56
8.3.2	P42-1Zn-Me 0,03 µM a Saporin .....	58
8.3.3	P44-COOH 0,1 µM a Saporin.....	60
8.3.4	P44-COOH 0,2 µM a Saporin.....	62
8.3.5	P44-COOH 0,3 µM a Saporin.....	64
8.3.6	Pc-Sugar 0,5 µM a Saporin .....	66
8.3.7	Pc-PEG 0,5 µM a Saporin.....	68
8.3.8	Pc-PEG 1 µM a Saporin.....	70
8.3.9	Saporin 0-1-10 µg/ml a P42-1Zn-Me.....	72
8.3.10	Saporin 0-1-10 µg/ml a Pc-Sugar.....	74
8.3.11	Saporin 0-1-10 µg/ml a Pc-PEG .....	76
8.4	Souhrnná tabulka výsledků toxicity jednotlivých látek po ozáření.....	78
8.5	Souhrnné tabulky fototoxicitních experimentů látek v kombinaci.....	79
9.	DISKUZE .....	81
10.	ZÁVĚRY .....	84
11.	POUŽITÉ ZKRATKY.....	85
12.	POUŽITÁ LITERATURA.....	86



## 4. ÚVOD

Zhoubná nádorová onemocnění patří mezi jednu z hlavních příčin úmrtí na celém světě. Vyznačují se především nekontrolovatelným buněčným růstem a vývojem fyziologických buněk v abnormální. K této přeměně dochází v důsledku genetických změn nebo expozice karcinogenním látkám. Mutace normálních buněk vede k abnormální buněčné proliferaci a rozvíjí se v nádor.

Navzdory značnému pokroku ve vývoji nových látek pro léčbu nádorových onemocnění zůstává nevyřešen vhodný způsob pro jejich podání. Je nutné najít vhodné strategie, které by umožnily léčivu dosáhnout cíle a efektivně uplatnit svou terapeutickou funkci. Pro většinu léčiv (proteiny, nukleové kyseliny nebo ve vodě rozpustná chemoterapeutika) je omezující velikost molekuly. Látky, které nejsou schopné přestoupit přes membránu, se do cílové buňky dostávají endocytózou (Prasmickaite et al., 2002). Tyto látky však nedokáží uniknout z endosomů, a tím se vyhnout lyzozomální degradaci, proto vykazují snížený terapeutický efekt (Lloyd, 2000).

Za významná protinádorová léčiva jsou považovány ribosom deaktivující proteinové toxiny typu I. Avšak k uplatnění jejich toxického účinku může dojít jen v případě, že se včas uvolní z lumen endosomů. Z tohoto důvodu je vývoj strategií narušujících membránu endosomů, k uvolnění terapeutických makromolekul, velmi důležitý. Tím může být dosaženo plného potenciálu protinádorových léčiv (Prasmickaite et al., 2002).

Diplomová práce se zaměřuje na fotochemickou internalizaci saporinu, pomocí ftalocyaninových fotosensitizerů. V podmínkách *in vitro* je kombinován cílený toxin saporin, jako účinná látka, a fotosensitizer, jako fotoaktivní činidlo. Pomocí fotosensitizerů se saporin dostává do cytosolu buňky a blokuje syntézu životně důležitých proteinů. Práce se následně zabývá hodnocením životaschopnosti HeLa buněk po proběhlé reakci.

## 5. CÍLE PRÁCE

- Stanovení kombinace nízkých a zároveň účinných koncentrací fotosensitizerů a saporinu pro vyvolání fotochemické internalizace.
- Porovnání dvou přístupů fotochemické internalizace „light-before“ a „light-after“.
- Posouzení, zda jsou vybrané fotosensitizerů vhodné pro provedení fotochemické internalizace saporinu.

## 6. TEORETICKÁ ČÁST

### 6.1 Fotochemická internalizace

Fotochemická internalizace (PCI) je technologický postup k usnadnění dodávání bioaktivních látek do cytosolu buňky. Pro techniku PCI je vhodná celá řada makromolekulárních látek, které jsou jinak náchylné k sekvestraci v endolyzosomech. Umožňuje dodávání toxinů, oligonukleotidů, imunokonjugátů nebo genů. Právě díky široké škále podávaných sloučenin je technika PCI všestranným aplikačním nástrojem (Aniogo et al., 2019; Martinez de Pinillos Bayona et al., 2016).

Pro tyto molekuly jsou typické nevýhodné farmakokinetické a biodistribuční vlastnosti, tudíž jsou vysoce náchylné k degradaci extracelulárními i intracelulárními enzymy. Struktura terapeutických biomolekul, jako jsou proteiny a nukleové kyseliny, způsobuje nízkou dostupnost do cílových míst v cytosolu nebo jádře buňky. Jejich hydrofilní nabitá povaha s vysokou molekulovou hmotností znesnadňuje průchod buněčnou membránou. PCI podporuje přesun makromolekulárních látek z endosomu do cytosolu nádorové buňky za pomoci fotosensitizeru (PS). Ozařováním buněk s PS se tvoří reaktivní formy kyslíku (ROS), které poškozují endosomální membrány a činí je propustnými pro endocytované molekuly (Fretz et al., 2007).

Léčba pomocí PCI je tedy založena na stejných principech jako fotodynamická terapie (PDT) s výjimkou jejího cíle. Záměrem je usmrtit nádorové buňky podávaným makromolekulárním léčivem, nikoli primárně fotochemickou reakcí jako je tomu v případě PDT. PS je selektivně zadržován v endosomálních membránách nádorových buněk. Excitací PS viditelným světlem dojde fotooxidačním poškozením k narušení membrán a makromolekula se uvolní do cytosolu. Léčba umožňuje lékům dosáhnout jejich zamýšleného subcelulárního cíle efektivněji a tím zlepšuje jejich účinnost (Aniogo et al., 2019; Martinez de Pinillos Bayona et al., 2016).

Terapeutický potenciál PCI je také spojen s překonáním lékové rezistence vůči chemoterapeutikům. Až 50 % maligních nádorů je rezistentních k chemoterapii, což je hlavní problém pro dosažení účinné léčby. Jako vhodná metoda se nabízí PDT, která obvykle není spojena s rezistencí. PDT je však mnohdy tkáňově i buněčně nespecifickou metodou, která má své využití především pro povrchové a solidní nádory. Ideální metodou pro překonání problému rezistence je metoda PCI. Tento postup umožňuje řízené dodávání chemoterapeutických léků do specifických nádorových buněk za pomoci metody PDT (Šošić et al., 2020).

Cílem PCI je snížení nebo eliminace nežádoucích účinků většiny chemoterapeutik podáním nižších dávek léčiva, a přesto dosažením žádaného výsledku. Výhodou je eliminace rezistence na chemoterapeutická léčiva. Dalšími úkoly PCI je snížit nebo se úplně vyhnout fotosenzitivní reakci kůže, zvýšit účinnost a zlepšit selektivitu terapie (Jerjes et al., 2020).

## 6.2 Fotodynamická terapie

Princip PCI pramení z PDT, která je součástí klinického výzkumu více než čtvrt století (Jerjes et al., 2020). PDT je nyní čtvrtou volbou léčby po operaci, radioterapii a chemoterapii. Metoda je založena na interakci třech složek, a to léku (PS), světla (se specifickou vlnovou délkou) a kyslíku (v patologické tkáni) (Agostinis et al., 2011). Vzájemné působení těchto složek způsobuje destrukci tkáně. PDT je na rozdíl od chirurgického zásahu minimálně invazivní a lze ji opakovat tolikrát, kolikrát je nutné. U PDT také nedochází ke kumulativní toxicitě na rozdíl od chemoterapie. PDT je vhodnou možností terapie se zanedbatelnými komplikacemi ve srovnání se zmíněnými typy léčby a také pokud jsou radioterapie a chemoterapie kontraindikovány (Jerjes et al., 2020).

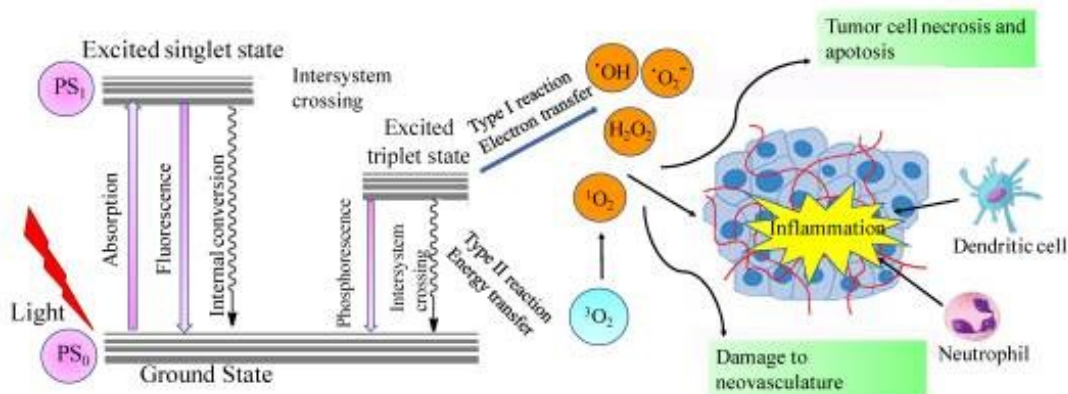
### 6.2.1 Průběh fotodynamické terapie

Mechanismus smrti nádorových buněk začíná aktivací podaného PS specifickou vlnovou délkou světla, která odpovídá absorpčnímu pásu konkrétního PS (Muniyandi et al., 2020).

PS jsou excitovány viditelným světlem do nestabilního singletového stavu, který může přejít na stabilnější tripletový stav mezisystémovým přechodem. Tripletový stav může excitovat molekulární kyslík ( $^3\text{O}_2$ ), který je v základním tripletovém stavu, do singletového excitovaného stavu (reakce typu II). Reakce II typu je u PDT dominantním typem (Agostinis et al., 2011). Vznikající singletový kyslík ( $^1\text{O}_2$ ) oxiduje především cholesterol, nenasycené mastné kyseliny, guanin a některé aminokyseliny (Jerjes et al., 2020).

Tripletový stav v reakci I typu interaguje přímo s biomolekulami přenosem elektronů nebo protonů za vzniku radikálů. Superoxid anion radikál ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) podléhá dismutaci a vzniká peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Jedná se o prekurzor vysoce reaktivního hydroxylového radikálu ( $\text{OH}\cdot$ ), který je extrémně chemicky reaktivní vůči téměř všem biologickým molekulám (Agostinis et al., 2011; Lee et al., 2020).

Zmíněné reakce mohou probíhat i současně a poměr reakcí závisí na typu použitého PS a koncentracích substrátu a kyslíku (Lee et al., 2020). Popsané reakce a jejich následky znázorňuje modifikovaný Jablonského diagram (viz obr. 1)



Obr. 1: Modifikovaný Jablonského diagram. Převzato z (Wang et al., 2021).

PS je přednostně zadržován v patologických tkáních. Povaha patologického procesu určuje interval pro maximální akumulaci PS. Fotochemický proces je zahájen aktivací PS, kdy je světlo nasměrováno na patologickou tkáň a vytváří se cytotoxické ROS, primárně  $^1\text{O}_2$  (Jerjes et al., 2020). Narušení tkáně způsobené PDT je pouze lokální, protože  $^1\text{O}_2$  (ale i jiné ROS) má krátkou životnost tudíž i malou vzdálenost, do které je schopen difundovat od místa svého vzniku (cca 10 – 55 nm) (Muniyandi et al., 2020).

Popsaná reakce se vyznačuje nejen přímým účinkem, který spouští nekrózu, apoptózu nebo autofagii, ale také nepřímým účinkem, kdy dochází k poškození cévního zásobení nádoru a imunitní odpovědi zprostředkovanou T-buňkami (Jerjes et al., 2020; Selbo et al., 2010).

Přímá i nepřímá destrukce nádorových buněk se klinicky projevuje jako zánět a otok, po kterém následuje tvorba nekrotické tkáně. Nekrotická tkáň se odlupuje a reepitalizuje jako normální proces hojení tkáně. PDT je studený proces při kterém nedochází k zahřívání tkáně, kdy je zachován kolagen, elastin a další struktury pojivové tkáně. K hojení obvykle dochází téměř bez jizev a architektura tkáně je také zachována. To je výhoda PDT ve srovnání s chirurgií, laserovou chirurgií nebo radioterapií, kde je narušena integrita základních struktur pojivové tkáně (Jerjes et al., 2020).

## 6.2.2 Nevýhody fotodynamické terapie

PDT je považována za minimálně invazivní výkon v léčbě nádorů. Obvykle je však vyžadována opakovatelnost této léčby, protože u dříve léčených nádorů se později objevily přetrvávající části nebo recidiva v okrajových částech původního nádoru, kde docházelo k opětovnému agresivnímu růstu nádoru (Jerjes et al., 2020).

Mezi přední nežádoucí účinky bezprostředně po PDT patří bolest a otok v místě ošetření. Bolest běžně pociťuje v určité fázi po PDT téměř většina pacientů. Nejčastěji se objevuje 24 – 48 hodin po ukončení působení světla a může trvat až dva týdny. Bolest je doprovázena dočasným zvýšením hladiny leukocytů, což souvisí s akutní zánětlivou reakcí a následnou nekrózou tkáně.

Dalším častým nežádoucím účinkem při použití systémového PS je zbytková fotosensitivita, která může trvat až šest týdnů v závislosti na použitém PS a jeho koncentraci v kůži. Pokud kůže není náležitě chráněna a pacient nedodrží doporučené pokyny pro vystavení slunečnímu záření po PDT, může to vést k zánětu, otoku nebo dokonce k povrchové nekróze kůže (Jerjes et al., 2009).

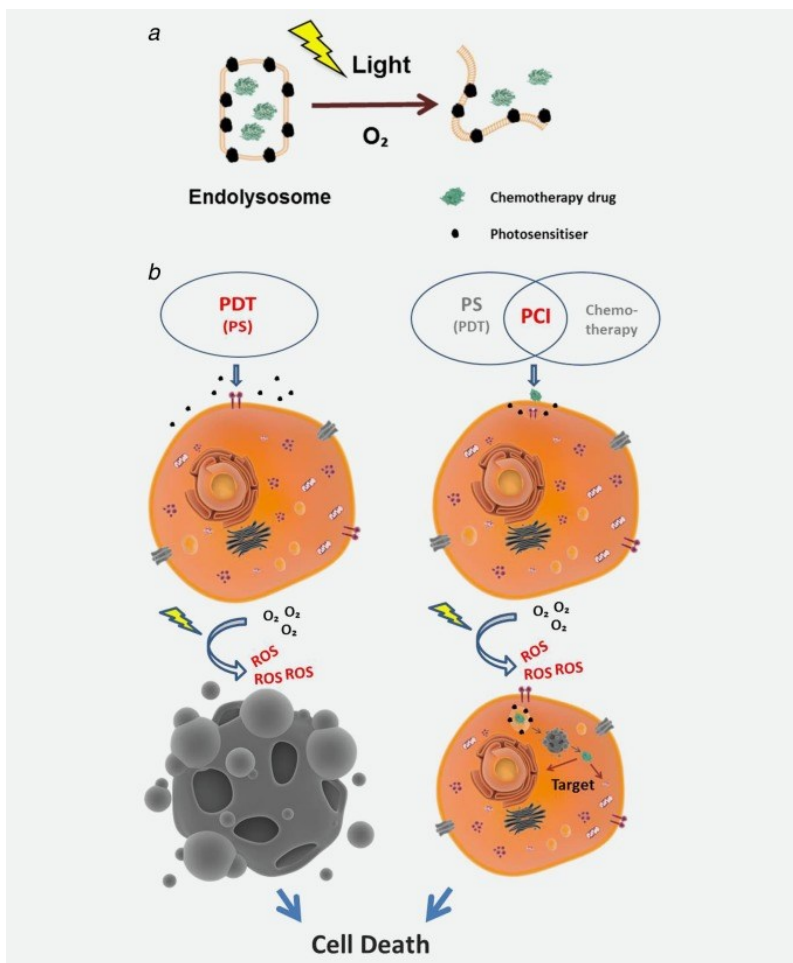
Přesto jsou výhody metody PDT četné. Zahrnují rychlejší podávání, menší poškození tkání, menší počet nežádoucích efektů, mírnější kosmetické změny tkáně a kvalitu života ve srovnání se třemi základními známými metodami (Jerjes et al., 2020).

### ***6.3 Klinické použití fotodynamické terapie a fotochemické internalizace***

PDT je ideální metoda léčby povrchových nádorů a také těch nádorů, které jsou v časném stádiu svého vývoje. U těchto nádorů dochází k malému nebo žádnému metastatickému postižení. Hlavním cílem léčby je zmírnění projevů onemocnění a lokální kontrola samotného nádoru. Ovšem u většiny navrhovaných indikací PDT nebylo dosaženo trvalé lokální kontroly nádoru. Některé studie potvrzují, že lepší cílený účinek na periferní nádor byl vyvolán pomocí metody PCI v porovnání s PDT. Při použití PCI byl opětovný růst nádoru i v okrajových částech téměř úplně potlačen. I v kombinaci léčebných metod s chirurgickou resekci vykazovala PCI pozitivní výsledky. Metoda PDT žádným způsobem neovlivnila léčbu nádoru po chirurgické resekci, zatímco PCI způsobila podstatné zpoždění recidivy. Technologie PCI může do budoucna zlepšit výsledky léčby, především některých indikací původně schválených pro metodu PDT, kde nebyla léčba účinná (Norum et al., 2009).

### ***6.4 Rozdílný princip fotodynamické terapie a fotochemické internalizace***

Léčby se liší v klíčových aspektech. PCI je místně specifická technika podávání léčiv, proto se PS v PCI nepoužívají k dosažení přímé buněčné smrti. PS je lokalizován v membránách endosomů a fotochemické poškození endosomu obsahujícího léčivo nastává při aplikaci světla. Fotooxidační poškození u PCI je subletální, ale dostatečné k uvolnění endosomálně zachycených látek (cytotoxinů), které se pak efektivně dostanou k intracelulárním cílům. PDT využívá produkci ROS k cytotoxickému generalizovanému poškození, které vede k buněčné smrti, zatímco u PCI je tento účinek směřován do membrán endosomů obklopujících endocytované léčivo (Martinez de Pinillos Bayona et al., 2016). Základní rozdíl cytotoxicity těchto metod je také znázorněn na Obr. 2



Obr. 2: Porovnání PDT a PCI. Převzato z (Martinez de Pinillos Bayona et al., 2016).

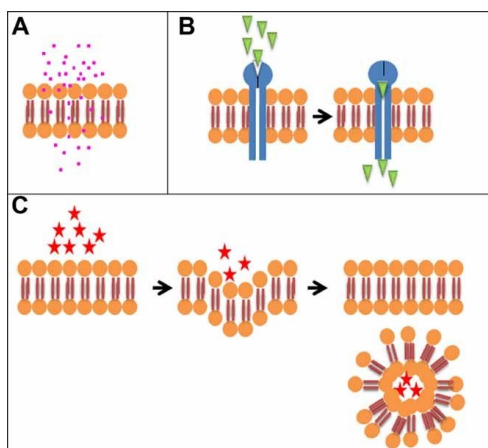
U PCI se používají nižší dávky PS v porovnání s PDT. Tím způsobem je možné se vyhnout vysoké cytotoxicitě okolních zdravých tkání a snížit vedlejší účinek PDT.

PCI zároveň umožňuje léčbu nižšími dávkami chemoterapeutických látek, které v klinické praxi přestaly být využívány kvůli své toxicitě při léčbě vyššími dávkami (Adigbli et al., 2012).

## 6.5 Příjem látek buňkami

Plazmatická membrána je semipermeabilní a umožňuje vstup živin a dalších potřebných látek do buňky. Pro malé a lipofilní molekuly je vstup do buňky snadný, protože jsou schopné volné difúze přes membránu. Průchod větších a polárních molekul, jako jsou například aminokyseliny, ionty nebo sacharidy, je umožněn pomocí specifických kanálů nebo přenašečových proteinů. Překonání plazmatické membrány je nejtěžší pro velké hydrofilní molekuly, které využívají třetí mechanismus. Tento mechanismus příjmu se nazývá endocytóza (Weyergang et al., 2011).

Eukaryotické buňky mají pro internalizaci extracelulárních látek výše zmíněné způsoby. Většina buněk využívá endocytózu (kromě zralých erytrocytů). Plazmatická membrána nejprve obklopí přijímané molekuly, následně se vchlipuje do buňky a odškracením vzniká nitrobuněčný váček (endosom). Molekuly pohlcené endocytózou jsou rychle zpracovány a směrovány do dalších organel. Terapeutická činidla, která cílí na intracelulární místa, musí po endocytóze uniknout z endosomů, aby dosáhla svého terapeutického účinku. Pokud takto přijatý materiál nemá účinný mechanismus úniku z endosomu, pak je transportován do lyzozomů, kde dochází k jejich degradaci hydrolytickými enzymy. To je hlavní překážka pro biomolekulární léčiva působící intracelulárně. Všechny zmíněné typy transportních mechanismů přes plazmatickou membránu jsou znázorněny na Obr. 3 (Norum et al., 2009; Weyergang et al., 2011).



Obr. 3: Přesun látek přes plazmatickou membránu. (A) volná difúze, (B) přenašečový systém a (C) endocytóza. Převzato z (Weyergang et al., 2011)

## 6.6 Cílené toxiny

Před více než 100 lety přišel Paul Ehrlich s myšlenkou „kouzelné kulky“ jako specificky cílené toxické molekuly pro nádorové buňky. Ideální molekula se musí vyhýbat buněčné rezistenci a musí být schopna opakovaného cytotoxického působení proti cílovým buňkám. Protein odpovídající těmto požadavkům byl poprvé popsán skupinou prof. Stirpe. Jednalo se o



saporin produkovaný rostlinou mydlice lékařská (*Saponaria officinalis*). Hlavní izoforma SO6 pochází ze semen této rostliny a nazývá se Sap-SO6 (Giansanti et al., 2018).

### 6.6.1 Dělení

Ribotoxiny (proteiny inaktivující ribosomy; RIP) lze rozdělit na 3 typy. Toxiny typu I obsahují pouze řetězec A s N-glykosylasovou aktivitou, zatímco proteiny typu II obsahují řetězec A i B. Tyto dva řetězce jsou spojeny jednou disulfidovou vazbou, jejíž redukce je nezbytná k tomu, aby volný řetězec A poškodil ribosomy v cytosolu buňky, jakmile je internalizován. Řetězec B obsahuje lektin specifický pro galaktózu, který zprostředkovává vazbu a umožňuje proteinu vstupovat do buněk. RIP I typu tento řetězec postrádají, tudíž nemohou mechanismus pro vstup využít. Mají nízkou účinnost buněčné internalizace a jejich intracelulární cesta je odlišná. Poslední skupina typu III má řetězec A s enzymovou aktivitou a další řetězec, strukturou odlišný od řetězce B, s neznámou funkcí (Bolshakov et al., 2020; Martínez-Jothar et al., 2019).

Pro terapeutické využití RIP je nutná jejich schopnost vstoupit do cytosolu cílových buněk. Musí překonat plazmatickou membránu a intracelulární membrány endolysosomálního systému. RIP II (např. ricin) obsahují lektinovou skupinu. Lektin zprostředkuje vazbu s cukernými zbytky galaktózy na povrchu plazmatické membrány a tím je pro ně umožněn přestup do nitra buňky endocytózou přes Golgiho aparát a komplex endoplazmatického retikula. Kdežto RIP I je vstup do buňky umožněn prostřednictvím endocytosy přes receptor  $\alpha$ 2-makroglobulin nebo mechanismy na receptorech nezávislé (Giansanti et al., 2018).

### 6.6.2 Saporin

Saporin, extrahovaný ze semen rostliny *Saponaria officinalis*, patří mezi RIP I, které mohou vyvolat selektivní smrt vybrané buněčné populace. Skupina RIP I postrádá specifické domény pro vstup do buňky, a pokud jsou přijímány endocytosou, budou degradovány v endolysosomálním kompartmentu. Pokud se však dostanou do cytoplazmy, jejich silný inhibiční účinek na syntézu proteinů vede k těžké cytotoxicitě (Fretz et al., 2007; Polito et al., 2013).

V buňkách HeLa se saporin dostává do plazmatické membrány, vezikul a vakuol po 20 min expozici. Po 40 min inkubace se molekuly saporinu hromadí v endosomech a lysosomech v blízkosti jádra a endoplazmatického retikula. K jaderné lokalizaci saporinu dochází po 60 min inkubace přibližně u 10 % buněk HeLa (Polito et al., 2013).

Saporiny se vyznačují stabilitou při vysoké teplotě, odolností vůči denaturaci (močovinou, guanidinem, proteolytickými enzymy) a také snadnou aplikací, proto jsou tyto proteiny vhodné pro PCI (Fretz et al., 2007; Polito et al., 2013).

### 6.6.3 Mechanismy intoxikace a buněčné smrti indukované saporinem

Zpočátku byly toxické účinky saporinu připisovány inhibici syntézy proteinů, ale zjištění, že RIP depurinují DNA a další nukleové kyseliny, otevřelo nové pohledy na mechanismus cytotoxicity (Polito et al., 2013).

Saporin v cytoplazmě inaktivuje ribosomy zavedením zlomu v rRNA a případně fragmentací DNA, což vede k nevratné inhibici proteosyntézy v cílové buňce a nakonec k buněčné smrti. Saporinem indukovaná buněčná smrt tudíž nesouvisí pouze se zastavením translace, ale i s indukci apoptózy (Bolshakov et al., 2020).

Saporin katalyzuje depurinaci adenosinového zbytku z 28S rRNA, což je hlavní rRNA eukaryotických buněk. Dochází k uvolnění adeninového zbytku z nukleových kyselin a hydrolýze  $\beta$ -N-glykosidové vazby mezi cukrem a dusíkatou bazí. Tato reakce způsobí trvalou inhibici podjednotky 28S rRNA, zastaví rozpoznání a vazbu elongačního faktoru-1 a následně vytvoří komplex elongačního faktoru-2, GTP a ribosomu, čímž zabráni translokaci tRNA z místa A do místa P ribosomálního komplexu. Tímto způsobem ireverzibilně blokuje proteosyntézu (Arslan et al., 2020; Weng et al., 2008).

Depurinační aktivita saporinu vyvolává také ribotoxickou stresovou reakci. V reakci dochází k tvorbě ROS, které způsobují oxidační stres buněk. Oxidační stres je pak jedním z klíčových faktorů při indukci apoptózy prostřednictvím mitochondriální dráhy. Reakce je charakterizována aktivací několika proteinkinás (Giansanti et al., 2018).

Mitogenem aktivované proteinkinasy (MAPK) jsou speciální skupinou proteinkinás, které regulují mnoho buněčných dějů, včetně transkripce, translace, proliferace, diferenciaci a apoptózy. Každý člen MAPK může být stimulován různými signálními kaskádami, které jsou podmíněny některými z environmentálních stimulantů, jako je UV záření, zánětlivé signály a ROS. Ribotoxická stresová reakce zvyšuje regulaci transkripce a expresi mnoha proteinů prostřednictvím své aktivace MAPK v buňkách (Arslan et al., 2020).

Lze tedy říci, že hlavní cestou smrti buněk intoxikovaných saporinem je apoptóza. Tento typ buněčné smrti může být vyvolán nevratnou inhibicí syntézy proteinů prostřednictvím aktivity RIP. Může se jednat o poškození DNA, prostřednictvím *N*-glykosylasy, o působení oxidačního stresu nebo v důsledku kombinace těchto vlivů (Polito et al., 2013).

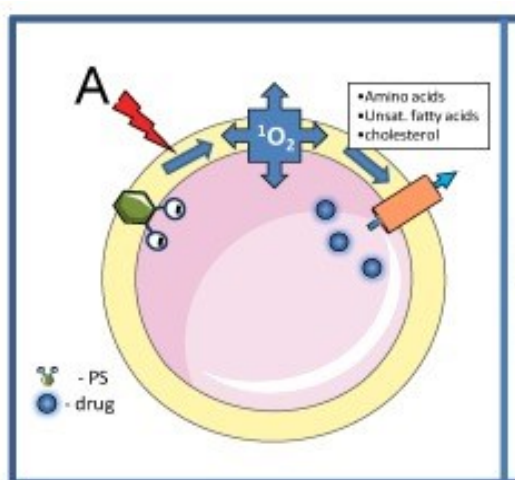
## 6.7 Internalizace saporinu do cytosolu

Silný cytotoxický účinek saporinu se jeví jako vhodný pro nádorovou léčbu. Avšak bez fotochemického uvolnění zůstane v lyzosomech, kde dojde k jeho enzymatické degradaci.

Expozice světlu v přítomnosti PS vyvolá v endosomálních membránách tvorbu ROS, především  $^1\text{O}_2$ . Tyto membrány jsou hlavním, primárním cílem tvorby ROS, protože životnost  $^1\text{O}_2$  je zde delší v porovnání s vodnou fází. Generovaný  $^1\text{O}_2$  permeabilizuje endosomální

membrány a jejich obsah včetně zachycených léčiv je uvolněn do cytosolu. Z cytosolu mají léky přístup k většině intracelulárních cílů v cytoplazmě či nukleoplazmě.

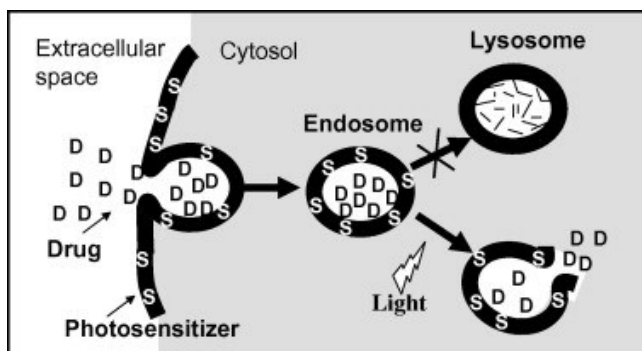
Účinnost fotochemické reakce ovlivňuje hloubka průniku PS do membrány a složení membrány (oxidace působením  $^1O_2$ ). Jedná se o látky jako je cholesterol, nenasycené mastné kyseliny, tryptofan, tyrosin, cystein, methionin a histidin. Peroxidace lipidů je důležitá pro rupturu endosomů. Vyvolává změny v zakřivení membrány, zejména v důsledku vmezeření PS do vnitřní části endosomů. Po peroxidaci lipidů vzniká membránová asymetrie, kterou může zmírňovat cholesterol mechanismem flip-flop. Cholesterol tedy dokáže po fotochemické reakci snížit permeabilitu membrány, což může vést k odlišné fotochemické citlivosti endosomů (Jerjes et al., 2020). Umístění všech komponent v endosomu při technice PCI je znázorněno na Obr. 4.



Obr. 4: Schéma endosomu při PCI. PS – fotosensitizer, drug – léčivo,  $^1O_2$  – singletový kyslík. Převzato z (Jerjes et al., 2020).

### 6.7.1 Endocytóza fotosensitizerů

Procesem endocytózy není do buňky přijímána jen terapeutická molekula, ale také PS. Lokalizace PS závisí na jeho fyzikálních vlastnostech. PS vhodný pro PCI se hromadí v blízkosti membrány a terapeutická látka se lokalizuje do lumen endosomu. Bez světelné energie se obsah endosomu degraduje v lyzozomu, zatímco v přítomnosti světelného zdroje membrána praskne a uvolní terapeutickou látku do cytosolu, kde může dosáhnout svého cíle. Procesem endocytózy se PS a terapeutická látka dostávají z extracelulárního prostoru do cytosolu – viz Obr. 5 (Norum et al., 2009).



Obr. 5: Schématické znázornění procesu PCI. Převzato z (Norum et al., 2009).

PS se do buňky přes plazmatickou membránu dostávají různými způsoby, které jsou podmíněny jejich vlastnostmi – viz kapitola 6.5.

Hydrofilnější PS, jako je ALPCs4 a uroporfyrin se do buněk dostávají pinocytózou, ale jde o mechanismus příjmu s nízkou účinností.

Amfifilní PS proniknou do plazmatické membrány, ale nejsou schopné překonat plazmatickou membránu až do cytosolu buňky. Vstup jim umožní adsorpční endocytóza, která je účinnějším mechanismem než pinocytóza. Tyto PS mohou být zabudovány do vnější části plazmatické membrány a následně skončit ve vnitřní části membrány endosomu. Pokud jsou PS spojeny s cílovými skupinami (protilátky nebo exogenní ligandy), které mají afinitu k plazmatické membráně, mohou být vychytány receptorem zprostředkovanou endocytózou.

Alternativní cesta pro lokalizaci PS je přímo přes plazmatickou membránu a endosomální membrány, pokud má PS slabé bazické vlastnosti (např. akridinová oranž). PS je poté zachycen v kyselých organelách – pozdních endosomech a lyzosomech (Norum et al., 2009).

## 6.7.2 Výběr a aktivace fotosenzitizérů

Nejúčinnější PS pro použití v PCI mají amfifilní povahu. Tyto PS se hromadí v plazmatické membráně endosomů. Jejich hydrofilní části zabraňují průniku buněčnými membránami (Norum et al., 2009).

Amfifilní PS se váže na plazmatickou membránu a endocytózou se dostává do buňky spolu s léčivem. PS a léčivo se lokalizují v endosomech nádorových buněk. Částečně hydrofilní a částečně hydrofobní PS zůstane v membráně, zatímco hydrofilní léčivo se bude lokalizovat v lumen (Mathews et al., 2012). Správné umístění PS je pro PCI rozhodující. Hydrofilní PS umístěné uvnitř endosomů nejsou schopny vyvolat PCI efekt.

Vystavení světlu pak vede k excitaci PS,  $^1O_2$  vyvolá fotochemické reakce, které vedou k ruptuře endosomu s následným uvolněním sekvestrovaného léčiva do cytosolu nebo jádra. Tím se také zabrání lyzomální degradaci (Mathews et al., 2012). Není nutné, aby PS a makromolekuly byly při expozici světlu umístěny ve stejných kompartmentech. Fotochemické

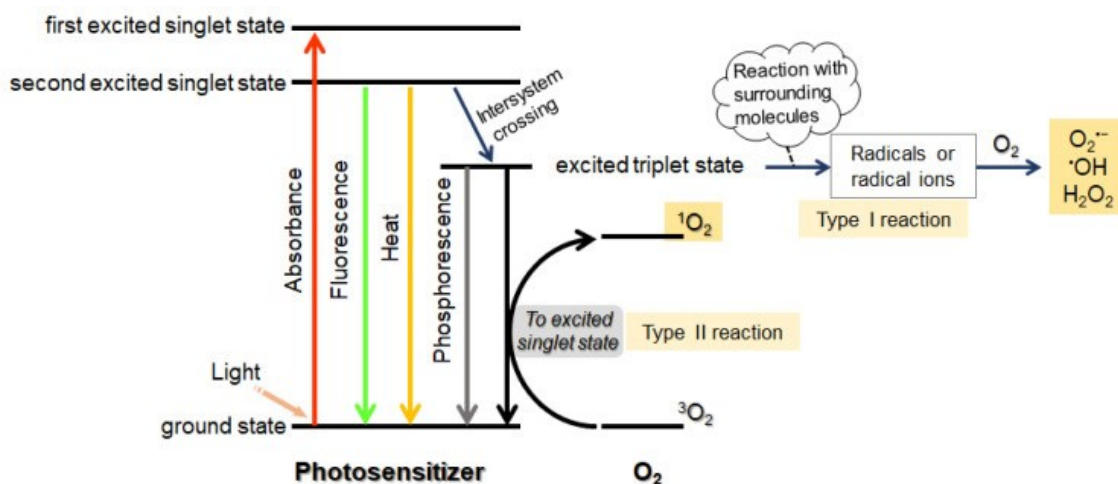
ozáření 6 až 8 h před podáním makromolekuly nesníží účinek kombinované léčby, protože nově vytvořené vezikuly jsou schopny fúzovat s fotochemicky poškozenými vezikuly (Norum et al., 2009).

V současné době je pro PCI k dispozici několik různých PS na bázi ftalocyaninu, porfyrinu nebo chlorinu – obvykle amfifilních sulfonovaných derivátů, kde jsou sulfonové skupiny substituovány jen na jedné straně aromatického makrocyklu. Opačná nesubstituovaná strana je proto relativně hydrofobní a může se zanořit do lipidové dvojvrstvy, což umožňuje lokalizaci na rozhraní lipidové/vodné fáze (Martinez de Pinillos Bayona et al., 2016).

### 6.7.3 Fotofyzikální a fotochemické reakce

PS vhodné pro PCI by měly mít vysoký absorpční koeficient, vysoký kvantový výtěžek  $^1\text{O}_2$  a vysokou fotostabilitu (Derosa et al., 2002). PS jsou po absorpci světla excitovány do singletového stavu a při návratu zpět do základního stavu emitují fotony ve formě fluorescence nebo teplo (Soe et al., 2020).

Excitované PS mohou podléhat oxidačním reakcím interakcí s  $^3\text{O}_2$  stejně jako u techniky PDT. Fotochemické reakce dělíme na typ I a II. U reakce typu I se elektrony přesunou z excitovaného PS na substráty v blízkém okolí. Vzniklé ionty v přítomnosti kyslíku vytváří ROS, jako jsou: superoxid anion radikál ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), hydroxylový radikál ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) a peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Avšak technika PCI většinou využívá PS, které vyvolávají reakci typu II, podobně jako tomu je u PDT. Zde probíhá přenos energie z excitovaného PS v tripletovém stavu na  $^3\text{O}_2$  a tím generuje  $^1\text{O}_2$ . Popsané reakce jsou shrnuty na Obr. 6 (Zhang et al., 2018; Soe et al., 2020).



**Obr. 6: Schéma fotochemických reakcí PCI. Převzato z (Soe et al., 2020).** Pro PCI je důležitý vztah mezi fotofyzikálními parametry a účinností endosomálního uvolnění látky. Dostatečné množství světelné energie je základním požadavkem PS pro vytvoření dostatečného množství ROS. Dávka světla je tedy klíčová pro stanovení účinnosti PCI. Efektivní dávka světla pro techniku PDT se pohybuje v rozmezí  $100\text{-}200\text{ J/cm}^2$ , a to ve většině klinických použití PS. V tomto směru se PCI liší, protože vyžaduje nižší dávku světla.

Nižší dávka světla vyvolává velmi nízkou cytotoxicitu, ale umožňuje dodávání molekul do cytosolu (Soe et al., 2020).

Vlastnosti každého PS určují světelnou energii potřebnou pro PCI. Pro optimální uvolnění molekul do cytosolu je důležité i množství PS. Dlouhodobá PCI s nízkou intenzitou (0,05 – 0,2 mW/cm<sup>2</sup> po dobu 120 minut) je účinnější než standardní prudká PCI (2 mW/cm<sup>2</sup> po dobu 3 – 12 min) (Shin et al., 2019).

#### 6.7.4 Interakce singletového kyslíku s endosomální membránou

Efektivní tvorba <sup>1</sup>O<sub>2</sub> způsobuje destabilizaci membrány, pokud byl PS vhodně lokalizován v membráně endosomu. Nevhodná endosomální lokalizace PS nevede k účinnému fotopoškození membrány organely i za předpokladu vysokého kvantového výtěžku <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. <sup>1</sup>O<sub>2</sub> je omezen nejen difúzí (< 20 nm), ale i krátkou životností v lipidové dvojvrstvě (12-36 μs) a ještě kratší (~ 4,2 μs) ve vodné fázi. Proto je <sup>1</sup>O<sub>2</sub> vyvolané poškození vysoce lokalizováno. Subcelulární lokalizace do mitochondrií vyvolává fotoindukovanou buněčnou smrt. Čím hlouběji je PS v membráně, tím vyšší účinnosti fotosensibilizace je dosaženo, což je pravděpodobně způsobeno delší životností <sup>1</sup>O<sub>2</sub> v lipidové membráně (Miyoshi et al., 2020; Soe et al., 2020).

K oxidaci vyvolanou <sup>1</sup>O<sub>2</sub> jsou náchylné především fosfolipidy, proteiny a cholesterol, zatímco sacharidové části glykoproteinů a glykolipidů jsou méně náchylné (Soe et al., 2020).

Složení endosomální membrány se liší od plazmatické. Příkladem je sfingomyelin a fosfatidylserin, které jsou v endosomální membráně zastoupeny hojně, avšak diacylfosfatidylcholin, diacylfosfatidylethanolamin a cholesterol jsou v endosomální membráně zastoupeny méně. Fotochemickou reakcí vyvolané morfologické změny souvisí se stupněm nasycení lipidů v membráně (Bour et al., 2019). Membránový cholesterol může hrát roli při fotoindukované destabilizaci endosomální membrány. Po oxidaci lipidů se objevují změny tvaru a permeabilizace membrány, které mohou být zmírněny cholesterolem (Kerdous et al., 2011). Snížení obsahu cholesterolu v pozdních endosomech může zvýšit zranitelnost endosomální membrány, a umožnit tak lepší průběh PCI (Soe et al., 2020).

Progresivní acidifikace prostřednictvím endocytózy, od časných endosomů (pH 6,0–6,5) k pozdním endosomům (pH 5,5–6,0) a nakonec k lyzosomům (pH 4,5–5,5), je důležitou buněčnou událostí. Endolyzomální transport a únik cizích agens u endosomů (jako jsou patogeny, toxiny a viry) závisí na fyziologických podmínkách v endosomech. Důležité je mj. pH a koncentrace vápenatých iontů (Hu et al., 2015; Odegard et al., 2009).

#### 6.7.5 Přístupy „light-after“ a „light-before“

Metodu PCI lze provádět dvěma přístupy. První se nazývá „light-after“ a je založen na aplikaci světelného záření až po endocytóze PS i makromolekul (Berstad et al., 2012). Technologie v tomto uspořádání funguje obecně dobře, přesto existuje několik nevýhod. Fotochemické reakce mohou poškodit endocytované biomolekuly. Nelze proto vyloučit fotochemické poškození zachycených terapeutických molekul, což by mohlo způsobit snížení

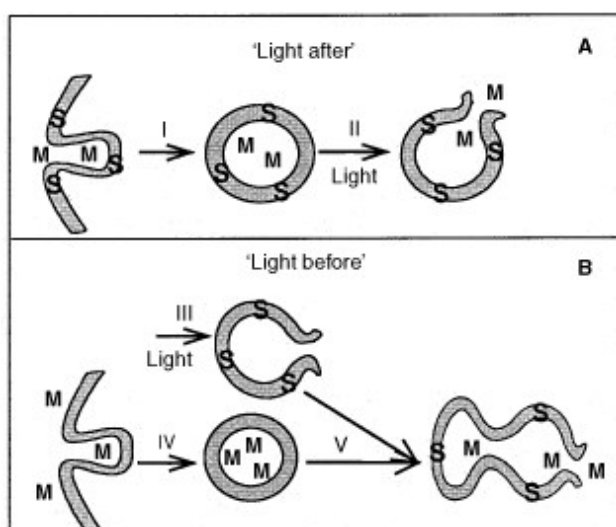
terapeutického účinku. Příčinou znehodnocení makromolekul může být také enzymatická degradace v endocytárních vezikulách ještě před jejich uvolněním do cytosolu (Prasmickate et al., 2002).

Postup „light-before“ je založený na podání samotného PS a jeho ozáření. Dojde k fotochemickému rozrušení endosomů ve specifických oblastech těla. Makromolekulární léčivo je podáno následně, dostává se ve formě endosomů do buňky a ty fúzí s fotochemicky narušenými endosomy, což umožní únik léčiva do cytosolu. Aplikace cílených toxinů je závislá na neporušených, funkčních receptorech, které budou po endocytóze vázat léčivo. Proto je důležité, aby při postupu „light-before“ nedošlo k poškození cílového receptoru (Berstad et al., 2012).

Tato fotochemická metoda nabízí způsob, jak vyvolat účinky léků specificky v nádorových buňkách. Technologie může být použita s různými makromolekulami, které jsou do buňky přijímány endocytózou a jejichž terapeutická aktivita je normálně omezena neschopností uniknout z endocytárních váčků. Permeabilizace endosomů před dodáním makromolekul zabrání prodlouženému a škodlivému pobytu molekul v těchto organelách. Ve skutečnosti to vede k velmi rychlé relokizaci endocytovaných makromolekul do cytosolu a následně zlepšuje jejich biologický účinek.

Fotochemické ošetření může částečně inaktivovat degradační lyzozomální enzymy nebo narušit mikrotubuly zapojené do transportu směrem k lyzozomům. Pokud je světlo aplikováno předem, mohlo by chránit endocytované molekuly před možnou lyzozomální degradací (Prasmickaite et al., 2002).

Postup „light-before“ je vhodný v případě, že je podávané léčivo zvláště citlivé na fotochemické poškození. Endolyzozomální membrány, které již utrpěly fotooxidační poškození, se spojí s membránami endolyzozomů obsahujících léčiva, čímž se stanou propustnějšími (Martinez de Pinillos Bayona et al., 2016). Oba postupy jsou znázorněny na Obr 7.



Obr. 7: Fotochemická internalizace. (S) fotosenzitizer, (M) makromolekula.

Převzato z (Prasmickaite et al., 2002).

## **6.8 Další omezení a výhody fotochemické internalizace**

Do jisté míry může komplikovat léčbu určení optimálních dávek PS, které se mohou významně lišit u různých typů buněk nebo nádorů. Avšak technika PCI se neustále vyvíjí a tím se také zvyšuje dostupnost nových amfifilních PS. Příkladem běžně používaných PS je ALPcS2 nebo TPCS2a, které jsou navrženy pro klinické použití (Adigbli et al., 2012).

PS jsou netoxické léky a mohou být aktivovány pouze světlem o specifické vlnové délce, které odpovídají absorpčnímu spektru použitého PS. Klinicky používané PS se nelocalizují v jádře buňky a z toho důvodu je vznik mutací nepravděpodobný. PDT je léčebná technika klinicky používaná desítky let po celém světě a nejsou žádné náznaky, že by mohla vyvolat sekundární nádorové onemocnění. Z tohoto důvodu se PCI považuje také za vhodnou techniku, která má zároveň potenciál obejít lékovou rezistenci.

PCI je minimálně invazivní léčebná metoda, která by měla snížit zátěž pro pacienta v porovnání s operací. Je možné ji použít i k léčbě relativně velkých nádorů o tloušťce více než 3 cm. Je vhodná pro léčbu subkutánních a kožních nádorů např. hlavy, krku a sarkomů; dále nádorů v ústech a tělních dutinách, jako je gastrointestinální trakt a močový měchýř.

Vybavení pro klinické použití PCI není finančně náročné. K aktivaci PS je potřeba laserová nebo lampa s vhodnými filtry. Diodové lasery nové generace jsou levné, přenosné, spolehlivé a snadno použitelné. Náklady na léčbu snižuje také menší dávka léčiv (Selbo et al., 2010).



## 7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 7.1 Vybavení pro práci s buněčnou linií

#### 7.1.1 Základní laboratorní pomůcky

- Pipetovací nástavce PIPETBOY acu 2 (Integra Biosciences, Švýcarsko)
- Sterilní dělené serologické pipety (TTP, Švýcarsko)
- Automatické pipety s nastavitelnými objemy, jednonábové i vícenábové (Eppendorf, Německo)
- 8-nábová automatická pipeta e-PET BioHit 50 – 1200 µl (BioHit, Finsko)
- Sterilní Pasteurovy pipety (Brand, Německo)
- Sterilní plastové špičky na různé objemy (Eppendorf, Německo)
- 96-nábové mikrotitrační destičky, ploché dno (TTP, Švýcarsko)
- Sterilní plastové vaničky (Eppendorf, Německo)
- Bürkerova komůrka (Brand, Německo)
- Sterilní laboratorní sklo (Simax, Česká Republika)

#### 7.1.2 Přístrojová technika

- Buněčné inkubátory s termostatem a regulací koncentrace CO<sub>2</sub> (Sanyo, Japonsko; Esco, USA)
- Boxy s laminárním prouděním BioAir TopSafe 1.2 (EuroClone, Itálie)
- Vodní lázeň (Memmert, Německo)
- 450 W Xenonová lampa Newport s 9 cm vodním a long-pass filtrem Newport OG570 (Newport Corporation, USA)
- Desková třepačka Heidolph Titramax 100 (Heidolph Instruments, Německo)
- Čtečka mikrotitračních destiček Tecan Infinite M200 (Tecan Group Ltd., Švýcarsko)

#### 7.1.3 Chemické látky a reakční činidla

- Kultivační médium DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; Lonza, Belgie)
- Fetální bovinní sérum FBS (Sigma-Aldrich)

- Hapes pufr (Lonza, Belgie)
- Ultraglutamin 1 (Lonza, Belgie)
- Antibiotika – penicilin/streptomycin – P/S (Lonza, Belgie)
- Tablety pro fosfátový pufr (Sigma-Aldrich, USA a MP Biomedicals, USA)
- Roztok trypsin/EDTA (Lonza, Belgie)
- Trypanová modř (0,4%; Sigma, Německo)
- Saporin (1 mg/ml; Sigma-Aldrich, USA)
- Peroxid vodíku (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 3 % roztok; Fluka, Sigma, Německo)
- Roztok neutrální červeně (NR, 3,3 mg/ml; Sigma-Aldrich, Německo)
- Fixační roztok (1% roztok CaCl<sub>2</sub> v 0,5% formaldehydu)
- Lyzační roztok (1% roztok ledové kyseliny octové v 50% etanolu)
- Fotosensitizer P42-ZnMeI (vědecká skupina prof. Zimčíka, Faf UK)
- Fotosensitizer P44-COOH (vědecká skupina prof. Zimčíka, Faf UK)
- Fotosensitizer Pc-PEG (vědecká skupina prof. Makhseeda, Kuwait University)
- Fotosensitizer Pc-Sugar (vědecká skupina prof. Makhseeda, Kuwait University)

## 7.2 Buněčná linie HeLa

HeLa je nejrozšířenější modelová buněčná linie v biologickém výzkumu. Jedná se o první úspěšnou kultivaci lidské buněčné linie v podmínkách *in vitro*, která byla založena v roce 1951. Buňky pochází z karcinomu děložního hrdla pacientky Henrietty Lacksové, která ve stejném roce tomuto onemocnění podlela. Robustní růst a neomezená distribuce buněk však vedly k jejímu širokému využití, a dnes plní úlohu modelového organismu (Adey et al., 2013; Landry et al., 2013).

Buněčná linie HeLa pro naše experimenty pochází z Americké banky buněčných linií (ATCC, USA).

### 7.2.1 Kultivace buněk

Kultivace HeLa buněk probíhala ve sterilních plastových kultivačních lahvích T75, v předem připraveném SCM (serum containing medium), které obsahuje všechny živiny nezbytné k přežívání a proliferaci buněk. Optimální kultivační podmínky zajistil inkubátor, který udržoval teplotu 37 °C, atmosféru 5 % CO<sub>2</sub> a konstantní vlhkost. Veškerá práce s buněčnou linií tedy probíhala ve sterilním prostředí a za standardních podmínek.

### 7.2.2 Kultivační médium

HeLa buňky byly po celou dobu experimentu kultivované v SCM. Kultivační médium jsme připravili přidáním FBS (10 %), 1 M HEPES pufru (1 %), 200 mM Ultraglutaminu I (2 %) a 100× antibiotik P/S (1 %) k základnímu médiu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium). Takto připravené médium se nakonec promíchalo. Veškeré roztoky se uchovávaly v ledničce (jen P/S v mrazáku) a před použitím byly vytemperovány ve vodní lázni na teplotu 37 °C, s výjimkou HEPES pufru a Ultraglutaminu I. Kultivační médium bylo nutné připravovat ve sterilním prostoru laminárního boxu.

### 7.2.3 Pasážování buněk

Po určité době kultivace se živiny z média vyčerpají a počet buněk dosáhne vysokého stupně konfluence. Dlouhodobé kultivace buněk lze dosáhnout pasážováním, kdy se část buněk odebere, přenesse do nové kultivační láhve a smísí s čerstvým médiem. Pasážování se provádí, když buňky pokrývají 80–90 % povrchu kultivační nádoby a dosahují vzájemného kontaktu. Tohoto stavu obvykle dosahují po 3-4 dnech kultivace.

Ještě před samotným pasážováním jsme mikroskopicky hodnotili nárůst buněk, kontrolovali jejich morfolonii a případnou kontaminaci. Prvním krokem bylo odsát původní médium z kultivační láhve a opláchnout buňky předeřhřátým PBS pufrem. Abychom dosáhli dokonalého oplachu buněk a úplného odstranění séra, byl postup proveden dvakrát. Následně se k buňkám přidal 1 ml roztoku trypsinu, který se rozprostřel po celém dnu láhve. Během maximálně 5 min inkubace při 37 °C se buňky uvolní ode dna lahve. Ihned po trypsinizaci bylo

přidáno 9 ml SCM a buňky jsme resuspendovali, tím se inaktivoval trypsin a zabránil natrávení buněčných struktur. Pro dosažení homogenní suspenze se buňky resuspendovaly opakovaným nasátím obsahu lahve a vypuštěním proti dnu lahve, čímž došlo k rozbití shluků buněk.

Do nové sterilní láhve jsme nejprve napipetovali 15 ml čerstvého SCM, do kterého jsme přenesli část vytvořené suspenze buněk z původní lahve. Objem přenášených buněk závisí na zjištěné konfluenci a také na přenášeném objemu při předchozí pasáži. Nově připravená láhev se kultivovala v inkubátoru za standartních podmínek do další pasáže, zatímco zbytek suspenze buněk se ještě využil pro nasazení buněk na experimenty.

Celý postup bylo nutné provádět ve sterilním prostředí laminárního boxu a vždy pracovat s předem vytemperovanými roztoky na 37 °C.

#### **7.2.4 Stanovení počtu životaschopných buněk**

Životaschopnost buněk byla stanovena po působení barviva trypanové modři. Principem metody je selektivní propustnost plazmatické membrány živé buňky, kdy zůstává plně zachována membránová i funkční aktivita buňky a barvivo je z intracelulárního prostoru aktivně transportováno ven. Avšak u mrtvých buněk s narušenou strukturou plazmatické membrány a jejich transportních mechanismů se methylenová modř uvnitř buňky hromadí.

Nejprve jsme do mikrozkušavky napipetovali 100  $\mu$ l 0,4% trypanové modři a 100  $\mu$ l buněčné suspenze, které jsme promíchali a nechali inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě. Dobře promíchanou směs jsme poté pipetovali pod krycí sklo Bürkerovy komůrky, 10  $\mu$ l na každou polovinu.

Počítání buněk probíhalo pod mikroskopem při zvětšení objektivu 10 $\times$ . V každé polovině Bürkerovy komůrky se počítali živé buňky v 5 velkých čtvercích. Živé buňky se jeví jako světlé, kulaté útvary na světle modrém pozadí, zatímco mrtvé buňky se vyznačovaly sytě modrou barvou z důvodu hromadění barviva. Dosažený výsledek z mikroskopického počítání se následně přepočítal na 1 ml suspenze, a byl dále využit při přípravě mikrotitračních destiček na nové experimenty.

### **7.3 Cytotoxické experimenty**

#### **7.3.1 Nasazování buněk na experiment**

Pro experimenty bylo nutné zajistit shodné koncentrace buněk v jamkách mikrotitrační destičky. Pro přípravu koncentrace 100 000 buněk/ml se odebrala buněčná suspenze z původní kultivační lahve a důkladně promíchala s potřebným množstvím SCM. Objem pipetované buněčné suspenze a SCM vždy závisel na zjištěném výsledku životaschopných buněk z mikroskopického stanovení.

Do každé jamky mikrotitrační destičky bylo pomocí automatické multikanálové pipety pipetováno 100  $\mu$ l připravené buněčné suspenze. Tento objem odpovídá 10 000 buněk v každé jamce. Připravené destičky se inkubovaly 24 hodin při 37 °C.

### 7.3.2 Testování fotoaktivních sloučenin a toxických látek

Po uplynutí inkubační doby se část buněk v jamkách mikrotitrační destičky nechala jako negativní kontrola, kde se pouze vyměnilo médium za čerstvé SCM. Další část jamek sloužila jako pozitivní kontrola, zde bylo také vyměněno SCM a přidán roztok H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, který zajistil 100% usmrcení buněk. V ostatních jamkách proběhla výměna média za připravené koncentrace studovaných látek.

Zásobní roztoky PS a saporinu byly naředěny s SCM v mikrozkrumavkách podle zvolených koncentrací. Připravené roztoky byly do mikrotitrační destičky pipetovány tak, aby kombinace látek (PS a saporinu) mohla být porovnána se samotným PS nebo saporinem.

Roztoky pro přípravu jednotlivých koncentrací byly předem vytemperovány na teplotu 37 °C ve vodní lázni. Celý postup práce pak probíhal ve sterilních podmínkách laminárního boxu bez přístupu světla, čímž jsme zabránili předčasné fotoaktivaci PS.

### 7.3.3 Ftalocyaninové fotosensitizéry

Ftalocyaniny patří do skupiny PS druhé generace. Jejich vnitřní aromatický chromofor obsahuje kovový iont. Může se jednat např. o Zn<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup> nebo Ga<sup>3+</sup>, které jsou schopny účinně vytvářet ROS. Tyto makrocykly mohou být dále doplněny různými typy funkčních substituentů. Jejich molekulární uspořádání určuje fyzikálně-chemické vlastnosti. Struktura PS ovlivňuje buněčnou absorpci a lokalizaci v buňce.

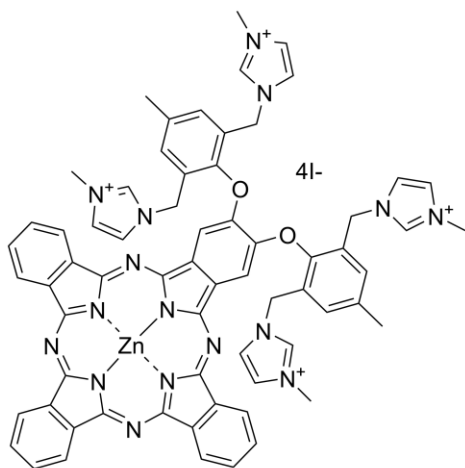
Ftalocyaniny konjugované se sacharidy mohou vykazovat vyšší hydrofilitu a také mohou být lépe přijímány buňkami. Sacharidy mohou podporovat akumulaci PS v nádorových buňkách díky tomu, že jsou rozpoznány jejich receptory.

Rozpustnost ftalocyaninových PS ve vodě může být zvýšena periferní substitucí makrocyklu polárními kyselými skupinami např. -SO<sub>3</sub>H, -COOH.

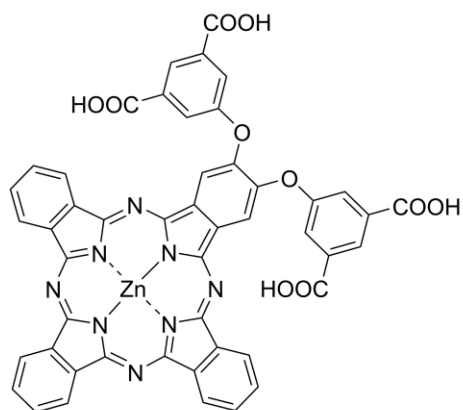
Pro zlepšení intracelulární distribuce hydrofobního PS a příjem nádorovými buňkami je možná substituce PS hydrofilním polyethylenglykolem (PEG), čímž získá lepší farmakokinetické vlastnosti (Janas et al., 2021).

PS P42-ZnMel a P44-COOH používané v experimentech této práce připravila vědecká skupina prof. PharmDr. Petra Zimčička, Ph.D. na katedře Farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

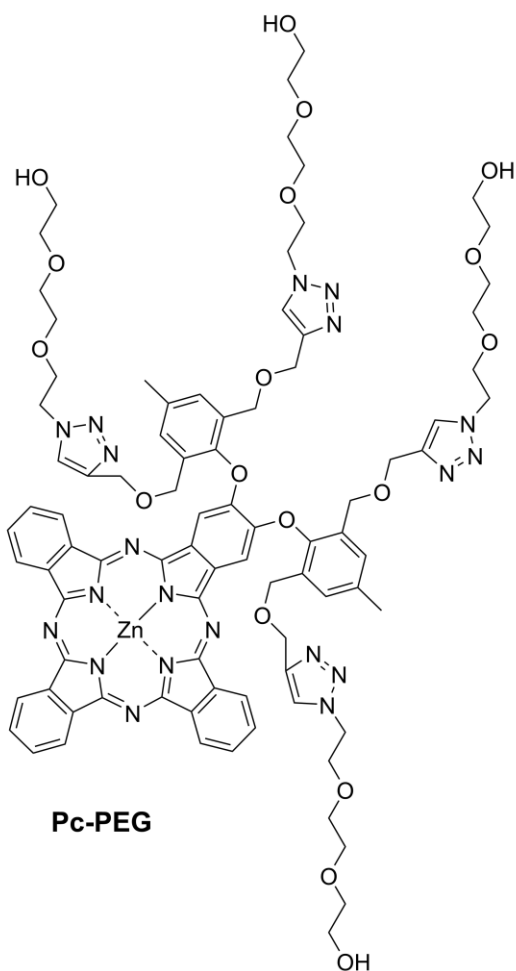
Pc-Sugar a Pc-PEG s kterými jsme také pracovali v našich experimentech, připravila vědecká skupina prof. Makhseeda z Kuwait University.



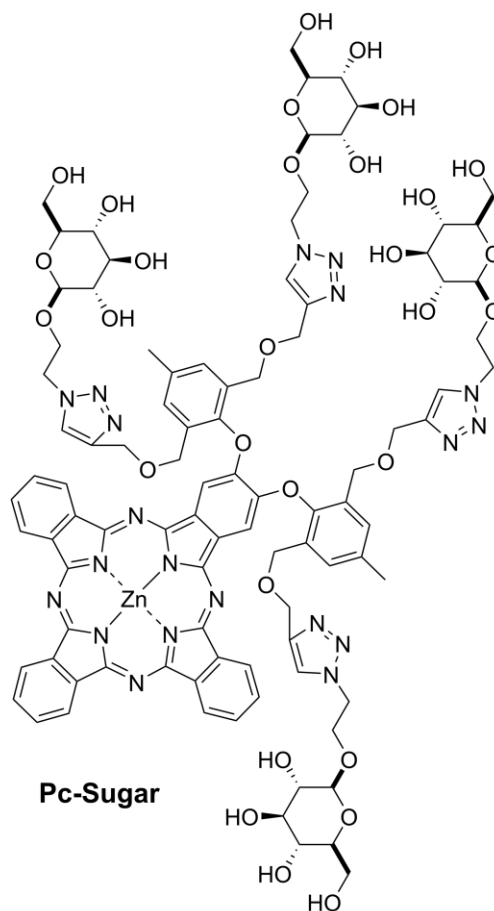
**P42-ZnMeI**



**P44-COOH**



**Pc-PEG**



**Pc-Sugar**

### **7.3.4 Fototoxicita**

Buňky se studovanými látkami se po 12 h inkubaci připravily pro fototoxickou reakci. V každé jamce mikrotitrační destičky se multikanálovou pipetou vyměnilo médium za 100  $\mu$ l nového předeřátého SCM. Inkubace destičky probíhala další 4 h v čistém médiu. Tím jsme zajistili, že se PS před expozicí světlu lokalizoval do endosomů (a nezůstal v cytoplasmatické membráně). Poté se vystavil aktivujícímu záření. Každá destička se ozařovala 15 min pod 450 W xenonovou lampou s vodním a long-pass filtrem ( $\lambda > 570$  nm; 12,4 mW/cm<sup>2</sup>; 11,2 J/cm<sup>2</sup>).

Výměna média probíhala za sterilních podmínek v laminárním boxu. Destičky bylo nutné udržovat stále ve tmě, aby fototoxická reakce proběhla při zvoleném světle právě pod xenonovou lampou.

### **7.3.5 Přístup „light-after“**

U přístupu „light-after“ se k buňkám přidal současně PS i saporin které jsme nechali současně inkubovat. Poté byly buňky ozářeny a znovu se inkubovaly do následujícího dne, kdy se hodnotila jejich životaschopnost.

### **7.3.6 Přístup „light-before“**

U přístupu „Light-before“ vyvolá světlo fotochemickou reakci před podáním cytotoxické látky. Jedná se o přístup založený na podání samotných PS. Až po inkubaci a fotochemické reakci se aplikoval cílený toxin saporin. I u této metody se čekalo do následujícího dne, než bylo provedeno hodnocení životaschopnosti.

Ještě před stanovením životaschopnosti buněk, z důvodu možné interference saporinu či PS se stanovením neutrální červeně (NR) jsme znovu vyměnili médium v celé mikrotitrační destičce.

### **7.3.7 Stanovení životaschopnosti buněk testem vychytávání neutrální červeně**

Test životaschopnosti buněk je klíčový pro kvantifikaci toxicity zkoumané látky (xenobiotika). Hodnotí se buněčná integrita pomocí testu vychytávání NR, který identifikuje živé buňky podle množství absorbovaného barviva.

NR je supravitální barvivo slabě kationtové povahy. Barvivo dokáže neiontovou pasivní difuzí prostupovat buněčnými membránami a koncentrovat se především v lyzosomech. Uvnitř lyzosomů živých buněk udržuje protonový gradient nižší pH než v cytoplazmě, proto je barvivo nabitě a zadrženo v těchto organelách. Vazbou s anionty a/nebo fosfátovými skupinami vytváří uvnitř lyzosomu elektrostatické vazby. V případě poškození nebo úmrtí buňky se pH lyzosomálního lumen zvyšuje a barvivo se z buňky uvolňuje (přestává být nabitě). Množství

zachyceného NR pak odpovídá celkovému počtu životaschopných buněk (Lim et al., 2015; Nablo et al., 2020).

Životaschopnost buněk metodou NR se hodnotila po proběhnutí fototoxické reakce a 24 hodinové inkubaci. Pro přípravu roztoku neutrální červeně byl použit zásobní roztok NR (3,3 g/ml) a potřebné množství média SCM. 100  $\mu$ l připraveného roztoku se pomocí automatické multikanálové pipety přidalo do každé jamky mikrotitrační destičky k původnímu médiu, tím jsme dosáhli výsledné koncentrace 30  $\mu$ g/ml. Destičky s barvivem se poté nechaly inkubovat ještě následující 2 h v inkubátoru při 37 °C.

Po inkubaci se z destiček odstranilo médium a bylo postupně přidáno několik roztoků. Pro fixaci buněk na dně jamky jsme pipetovali 100  $\mu$ l/jamku fixačního roztoku (1% roztok CaCl<sub>2</sub> v 0,5% formaldehydu). Fixace probíhala 15 min.

Po fixaci se roztok z destiček opět úplně odstranil a následovalo 2 $\times$  promývání buněk 100  $\mu$ l/jamku připraveným roztokem PBS.

Posledním přidávaným roztokem, po odstranění PBS, bylo 100  $\mu$ l/jamku lyzačního roztoku (1% roztok ledové kyseliny octové v 50% ethanolu), který narušil buněčné membrány a uvolnil barvivo z buněk. Pro docílení homogenního roztoku se destičky umístily alespoň na 30 min na deskovou třepačku.

Metoda je vhodná pro spektrofotometrické stanovení. Pro měření byla použita čtečka mikrotitračních destiček Tecan Infinite M200. Intenzita zabarvení roztoku v destičkách odpovídala naměřené absorbanci při 540 nm. Výsledné absorbance v jednotlivých jamkách byly dále zpracovány v programu Microsoft Office Excel. Po odečtení pozitivní kontroly (usmrčených buněk) a vztahení k neovlivněné kontrole (negativní kontrola) jsme získali výsledné procentuální zastoupení životaschopných buněk.

## **7.4 Vyhodnocení dat**

Podstatou fototoxických experimentů je zjištění střední účinné (efektivní) koncentrace EC<sub>50</sub>, která představuje koncentrace zkoušených látek v kombinaci s účinkem záření, jejichž následkem je 50% snížení životaschopnosti vzhledem k neovlivněné kontrole.

Získané výsledky našich experimentů byly graficky zpracovány v programu GraphPad Prism (GraphPad Software, USA). Grafy byly vytvořeny z průměrné hodnoty naměřených výsledků a hodnoty směrodatné odchylky. Pomocí těchto grafů byly znázorněny testované koncentrace látek a zjištěny hodnoty EC<sub>50</sub>.

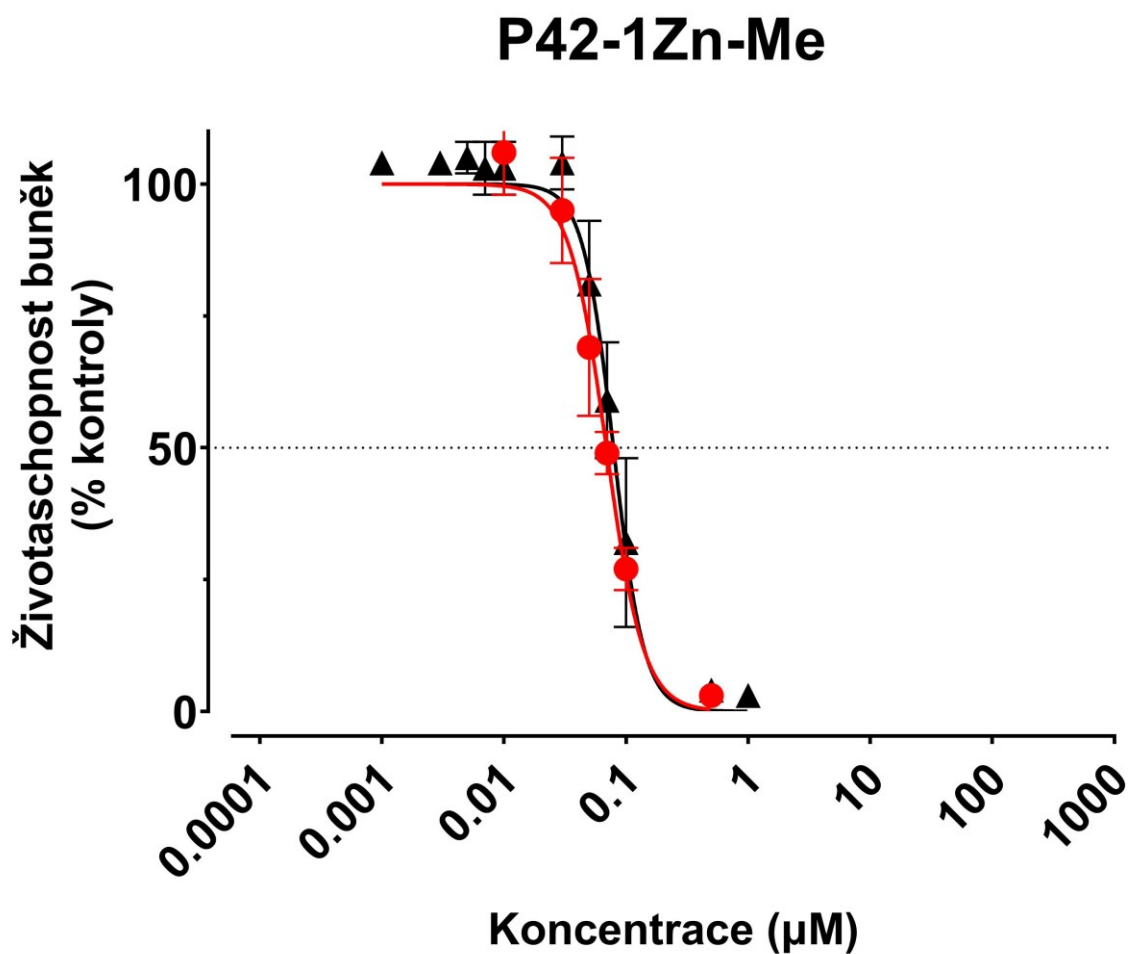


## 8. VÝSLEDKY

### 8.1 Experimenty pro stanovení toxicity po ozáření

#### 8.1.1 P42-1Zn-Me

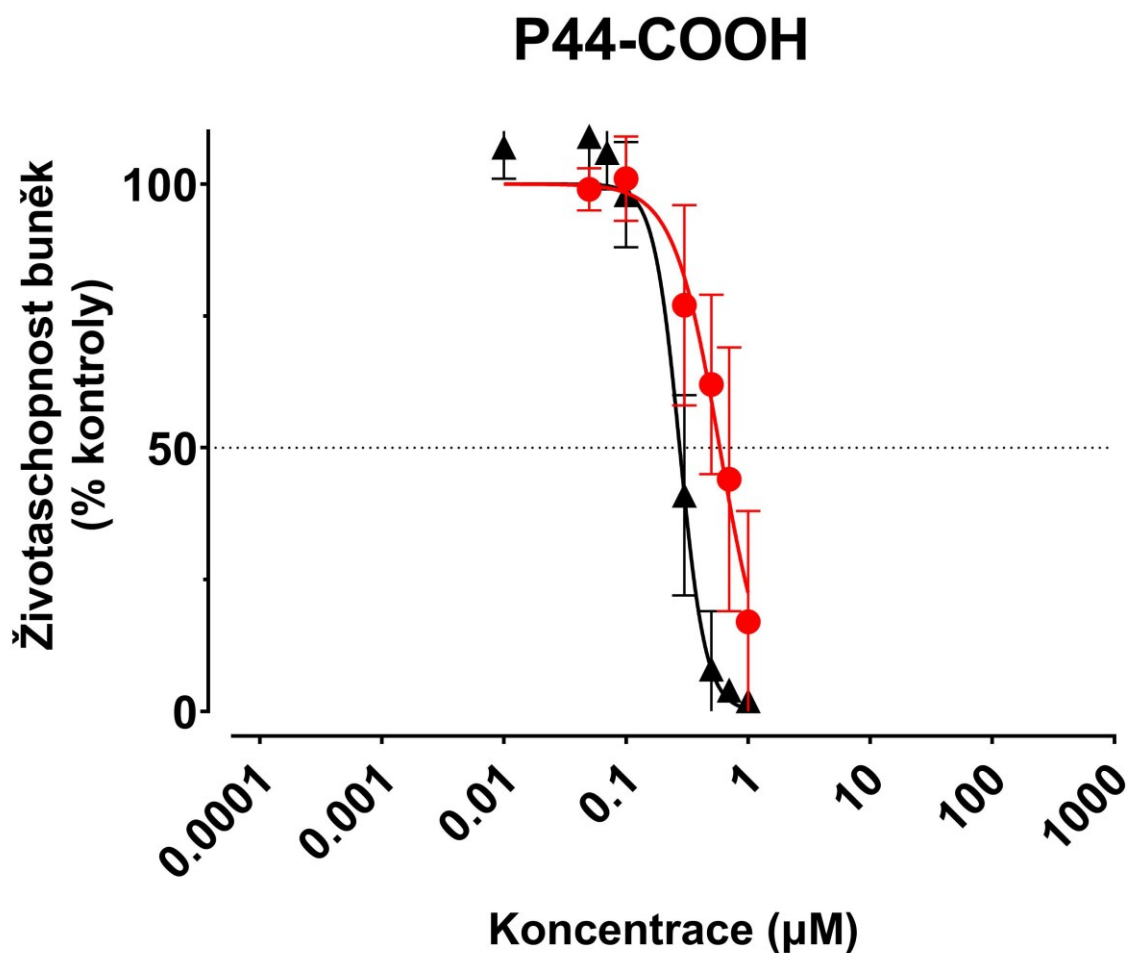
Fototoxicita PS při postupu Light Before odpovídá  $EC_{50} = 0,067 \pm 0,008 \mu\text{M}$  a při Light-After  $EC_{50} = 0,084 \pm 0,009 \mu\text{M}$ , tudíž zde není významný rozdíl mezi zmíněnými postupy. Experimentálně získaná data znázorňuje Obr. 8.



Obr. 8: Životaschopnost HeLa buněk v závislosti na stoupající koncentraci P42-1Zn-Me při použití přístupů Light Before (●) a Light After (●). Data jsou vyjádřena jako průměr (SD),  $n = 2$  pro Light Before a  $n = 3$  pro Light After.

### 8.1.2 P44-COOH

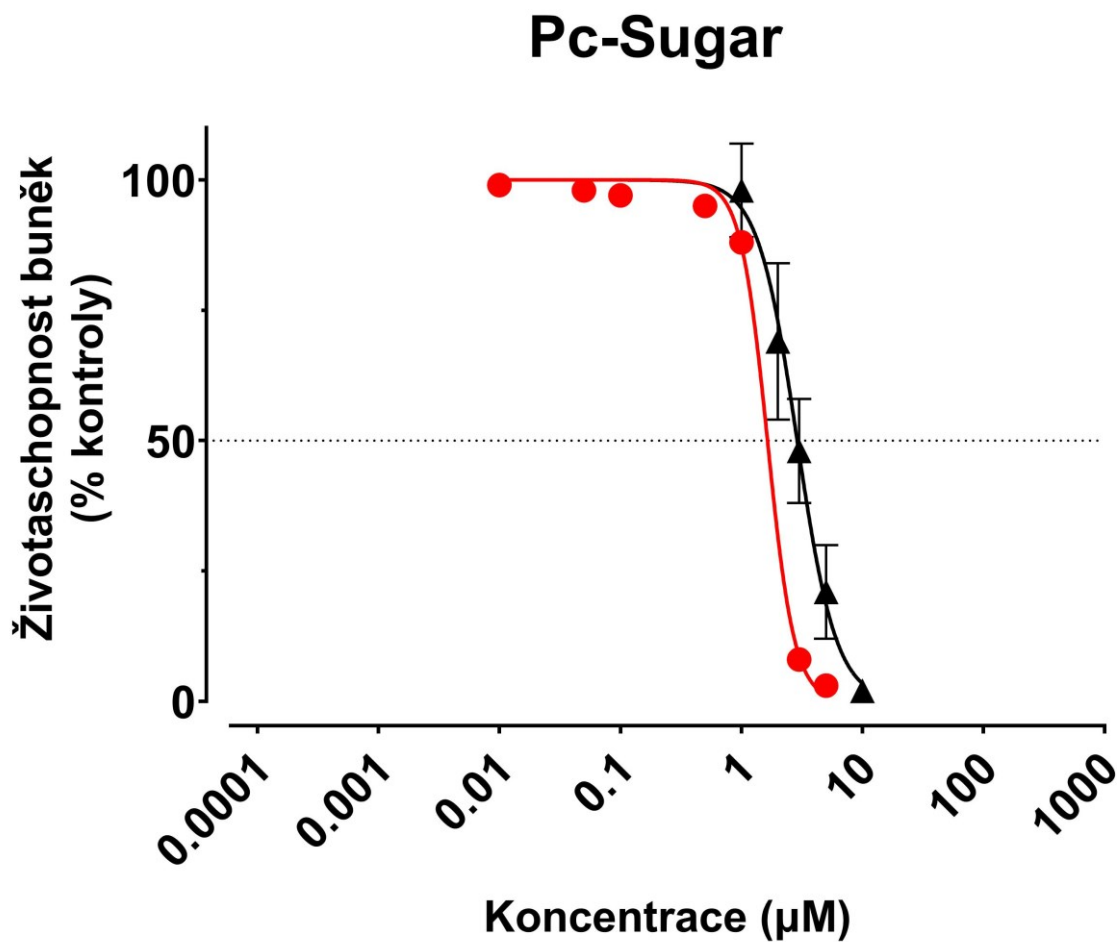
Fototoxický experiment PS při Light Before odpovídá hodnotě  $EC_{50} = 0,62 \pm 0,23 \mu\text{M}$  a při postupu Light After  $EC_{50} = 0,27 \pm 0,07 \mu\text{M}$ . Při postupu Light After je  $EC_{50}$  mírně nižší v porovnání s Light Before. Experimentálně získaná data znázorňuje následující Obr. 9.



Obr. 9: Životaschopnost HeLa buněk v závislosti na stoupající koncentraci P44-COOH a při použití přístupů Light Before (●) a Light After (▲). Data jsou vyjádřena jako průměr (SD),  $n = 2$  pro Light Before a  $n = 7$  pro Light After.

### 8.1.3 Pc-Sugar

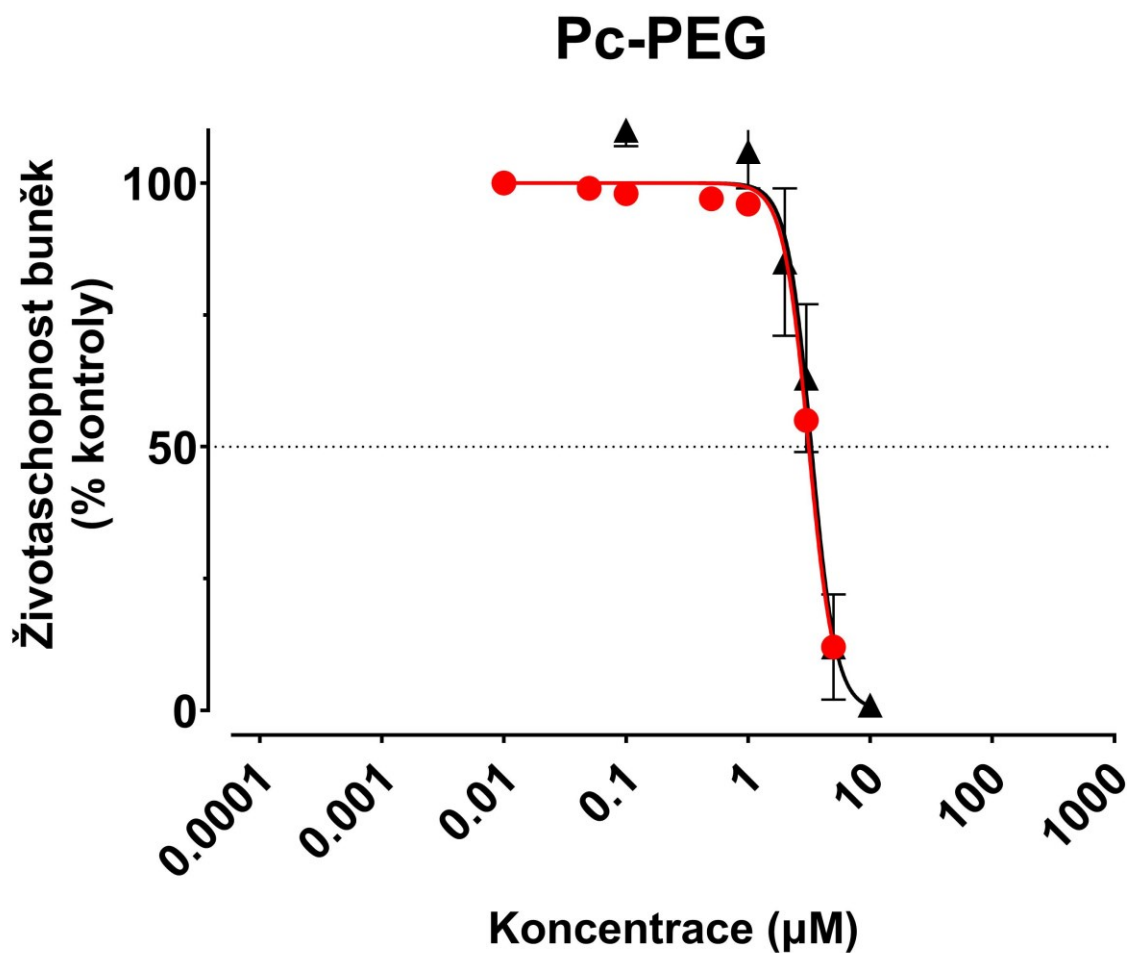
Fototoxický experiment Pc-Sugar opět porovnává postup Light Before, kde  $EC_{50} = 1,6 \mu\text{M}$  a Light After s  $EC_{50} = 2,9 \pm 0,5 \mu\text{M}$ . U tohoto PS je mírně nižší  $EC_{50}$  u postupu Light Before v porovnání s Light After. Experimentálně získaná data jsou znázorněna na následujícím Obr. 10.



Obr. 10: Životaschopnost HeLa buněk v závislosti na stoupající koncentraci Pc-Sugar při použití přístupů Light Before (●) a Light After (▲). Data jsou vyjádřena jako průměr (SD),  $n = 1$  pro Light Before a  $n = 6$  pro Light After.

### 8.1.4 Pc-PEG

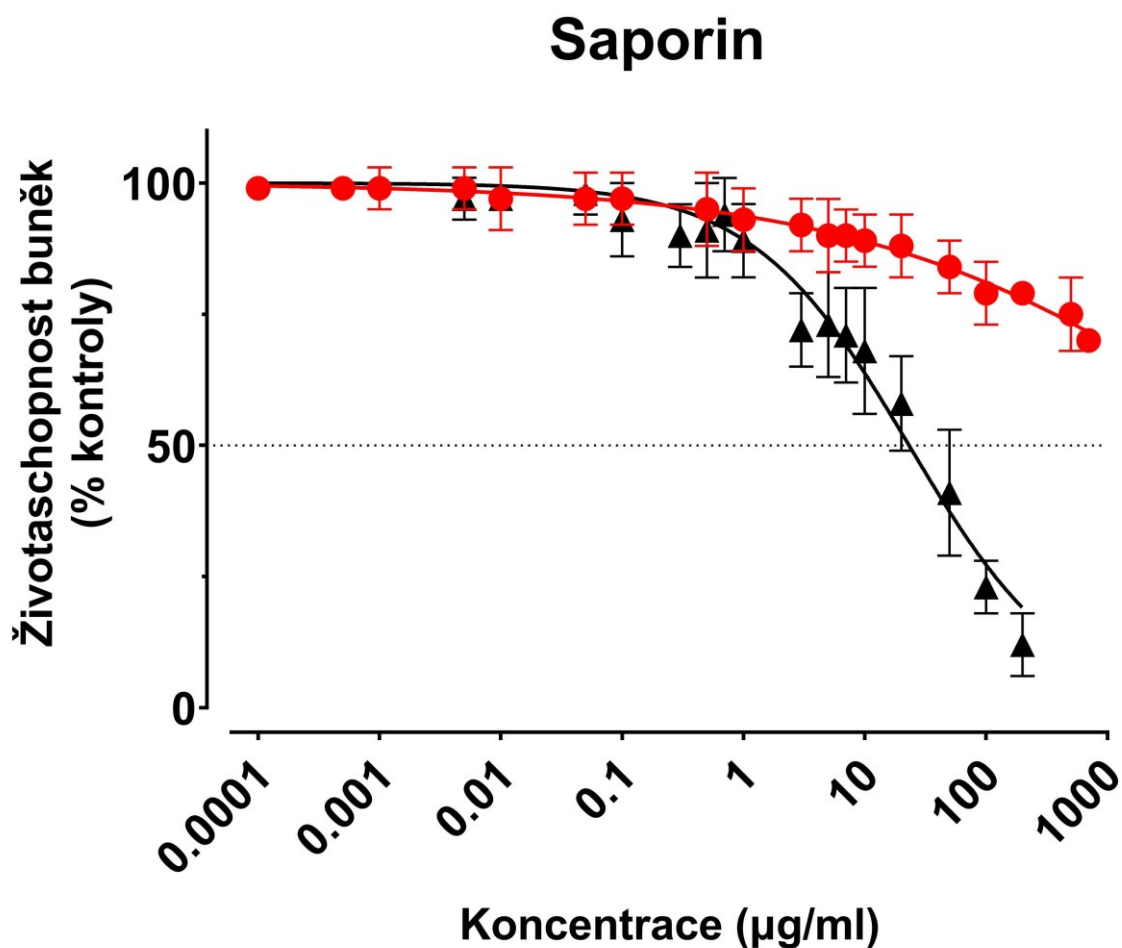
Fototoxicita PS při postupu Light Before odpovídá  $EC_{50} = 3,1 \mu\text{M}$  a při Light After  $EC_{50} = 3,4 \pm 0,5 \mu\text{M}$ . Zde jsou koncentrace PS téměř shodné. Životaschopnost buněk tedy nebyla ovlivněna postupem reakce. Získaná experimentální data jsou zobrazena na Obr. 11.



Obr. 11: Životaschopnost HeLa buněk v závislosti na stoupající koncentraci Pc-PEG při použití přístupů Light Before (●) a Light After (▲). Data jsou vyjádřena jako průměr (SD),  $n = 1$  pro Light Before a  $n = 5$  pro Light After.

### 8.1.5 Saporin

Toxicita samotného léčiva odpovídá při Light Before  $EC_{50} > 700 \mu\text{g/ml}$  a při Light After  $EC_{50} = 20,49 \pm 9,60 \mu\text{g/ml}$ . Jedná se o velmi významný rozdíl, kdy je životaschopnost buněk závislá na zvoleném postupu experimentu ve prospěch Light After, který má vysokou toxicitní účinnost v porovnání s Light Before. Získaná experimentální data jsou znázorněna na Obr. 12.

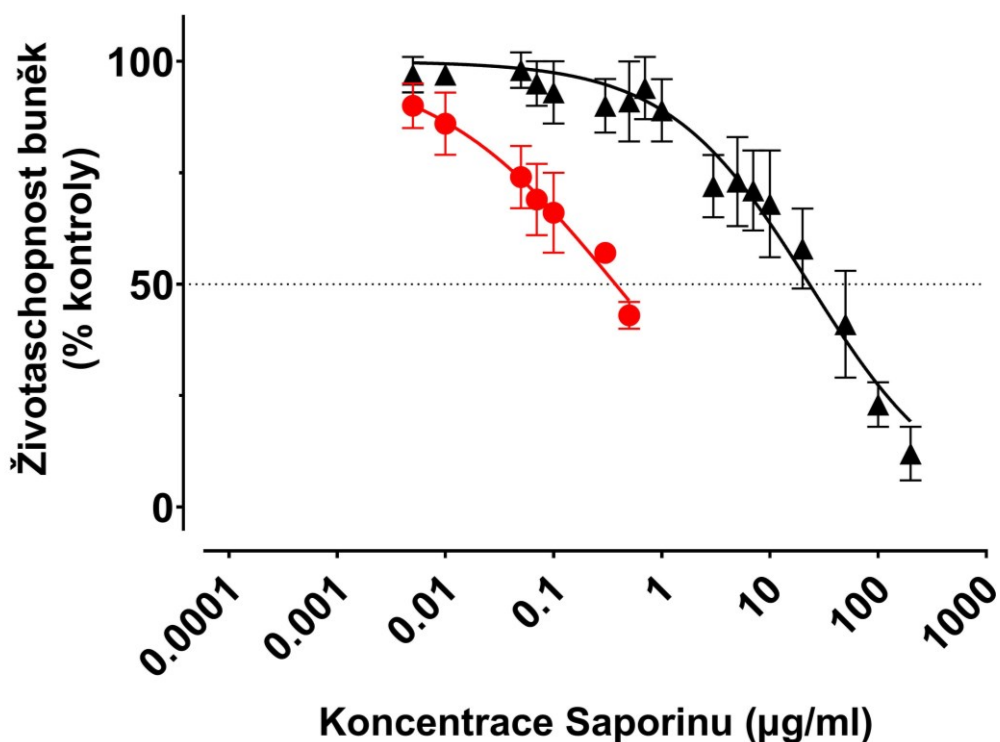


Obr. 8: Životaschopnost HeLa buněk v závislosti na stoupající koncentraci Saporinu při použití přístupů Light Before (●) a Light After (▲). Data jsou vyjádřena jako průměr (SD),  $n = 27$  pro Light Before a  $n = 28$  pro Light After.

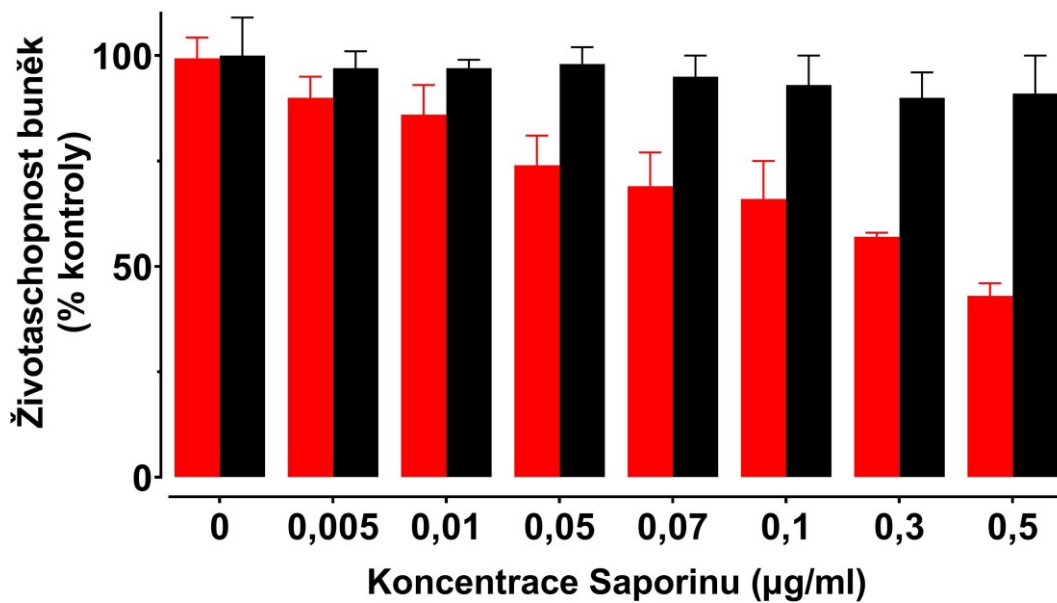
## 8.2 Fototoxicitní experimenty látek v kombinaci Light After

### 8.2.1 P42-1Zn-Me 0,01 $\mu\text{M}$ a Saporin

Fototoxická P42-1Zn-Me o koncentraci 0,01  $\mu\text{M}$  v kombinaci s měnící se koncentrací Saporinu odpovídá  $\text{EC}_{50} = 0,36 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$ . Toxický účinek Saporinu, kde P42-1Zn-Me odpovídá koncentraci 0  $\mu\text{M}$ , je  $\text{EC}_{50} = 20,49 \pm 9,60 \mu\text{g/ml}$ . Porovnání účinku koncentrací PS znázorňuje Obr. 13 a 14.



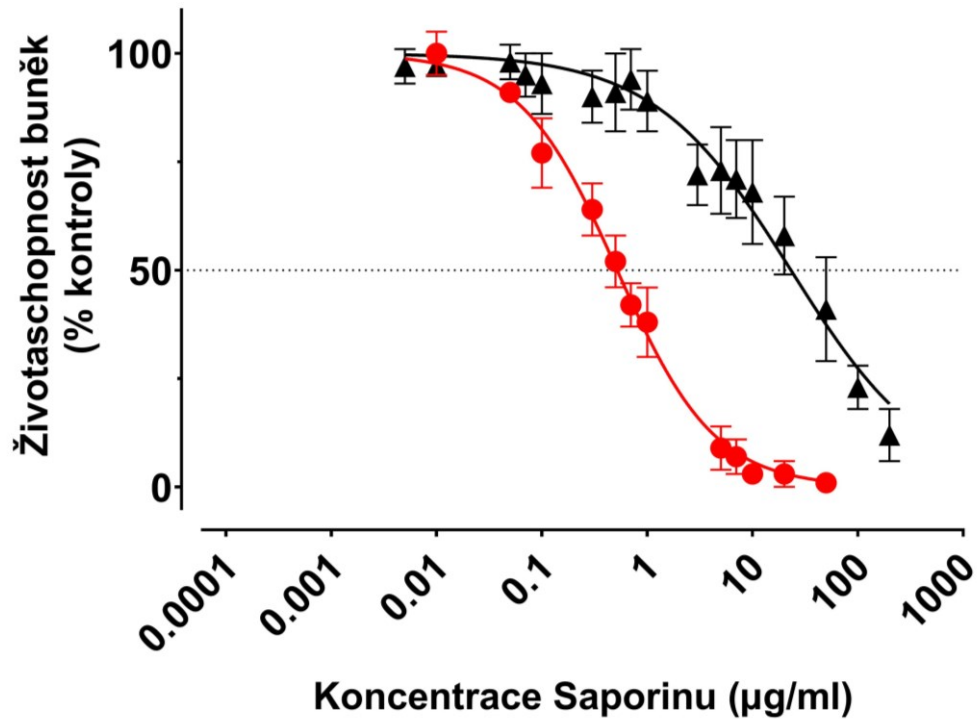
Obr. 13: Životaschopnost HeLa buněk při konstantní koncentraci P42-1Zn-Me 0,01  $\mu\text{M}$  (●) a 0  $\mu\text{M}$  (▲) a stoupající koncentrací Saporinu. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD),  $n = 3$  pro 0,01  $\mu\text{M}$  a  $n = 28$  pro 0  $\mu\text{M}$ .



Obr. 14: Životaschopnost HeLa buněk při konstantní koncentraci P42-1Zn-Me 0,01 µM (●) a 0 µM (●) a stoupající koncentrací Saporinu. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD),  $n = 3$  pro 0,01 µM a  $n = 28$  pro 0 µM.

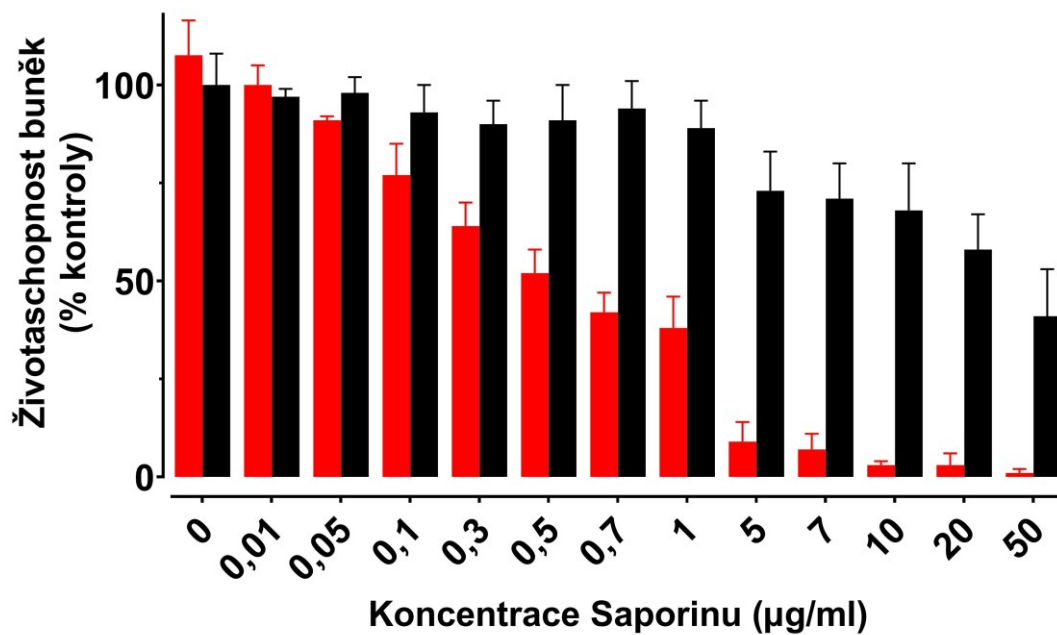
### 8.2.2 P44-COOH 0,1 $\mu\text{M}$ a Saporin

Fototoxicita P44-COOH 0,1  $\mu\text{M}$  v kombinaci se Saporinem odpovídá  $\text{EC}_{50} = 0,63 \pm 0,20$   $\mu\text{g/ml}$ . Fototoxický účinek Saporinu, kde PS P44-COOH 0  $\mu\text{M}$ , je  $\text{EC}_{50} = 20,49 \pm 9,60$   $\mu\text{g/ml}$ . Porovnání účinku koncentrací PS znázorňují Obr. 15 a 16.



Obr. 15: Životaschopnost HeLa buněk při konstantní koncentraci P44-COOH 0,1  $\mu\text{M}$  (●) a 0  $\mu\text{M}$  (▲) a stoupající koncentrací Saporinu. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD),  $n = 7$  pro 0,1  $\mu\text{M}$  a  $n = 28$  pro 0  $\mu\text{M}$ .

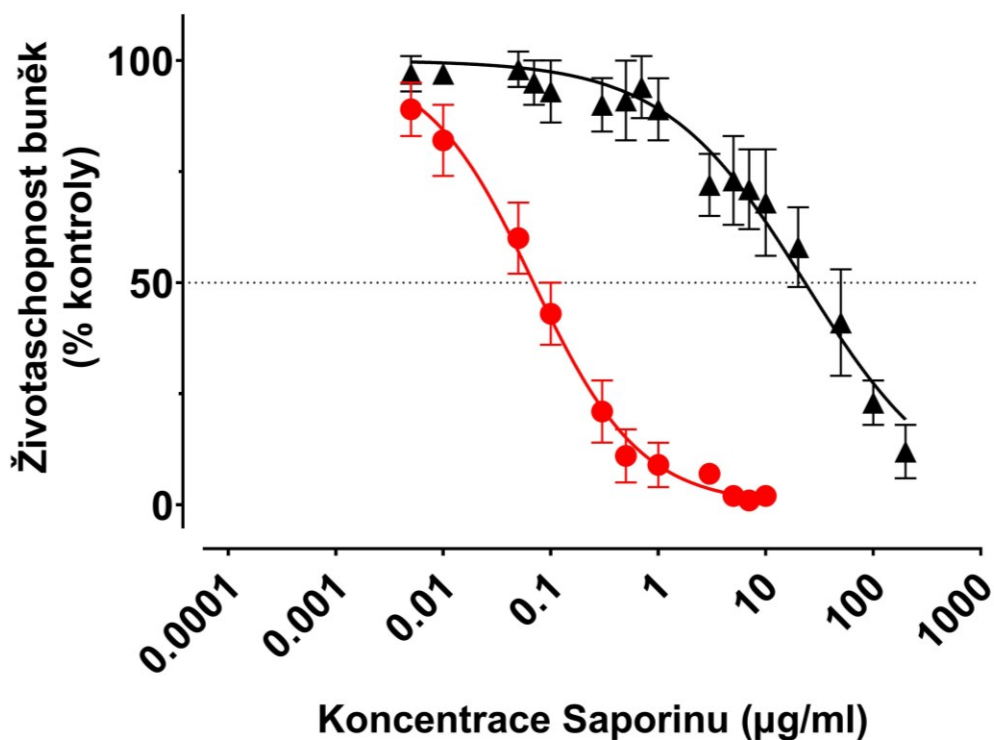




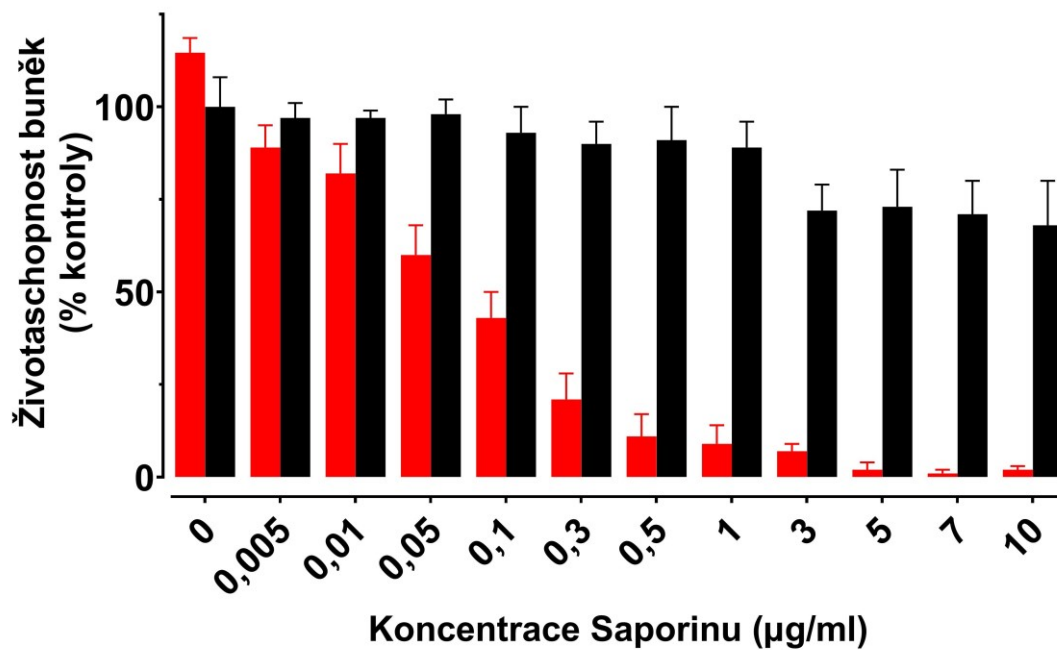
Obr. 16: Životaschopnost HeLa buněk při konstantní koncentraci P44-COOH 0,1 µM (●) a 0 µM (●) a stoupající koncentrací Saporinu. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD),  $n = 7$  pro 0,1 µM a  $n = 28$  pro 0 µM.

### 8.2.3 Pc-Sugar 0,5 $\mu\text{M}$ a Saporin

Fototoxicita Pc-Sugar 0,5  $\mu\text{M}$  v kombinaci se Saporinem odpovídá  $\text{EC}_{50} = 0,073 \pm 0,027$   $\mu\text{g/ml}$ . Toxický účinek Saporinu, kde PS Pc-Sugar 0  $\mu\text{M}$ , je  $\text{EC}_{50} = 20,49 \pm 9,60$   $\mu\text{g/ml}$ . Porovnání účinku koncentrací PS znázorňuje Obr. 17 a 18.



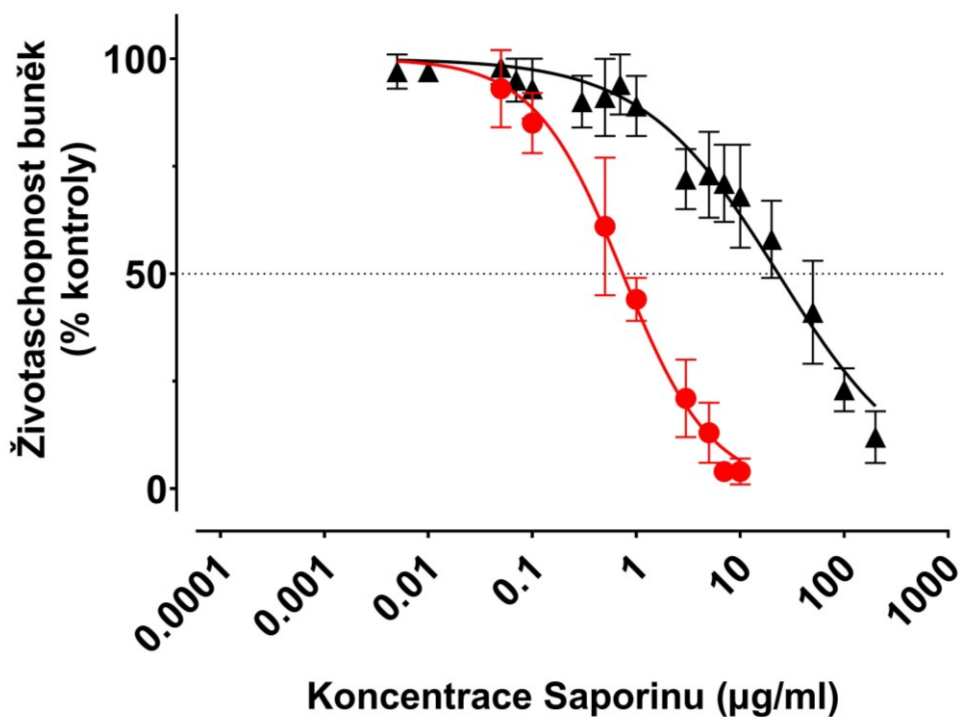
Obr. 17: Životaschopnost HeLa buněk při konstantní koncentraci Pc-Sugar 0,5  $\mu\text{M}$  (●) a 0  $\mu\text{M}$  (▲) a stoupající koncentrací Saporinu. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD),  $n = 5$  pro 0,1  $\mu\text{M}$  a  $n = 28$  pro 0  $\mu\text{M}$ .



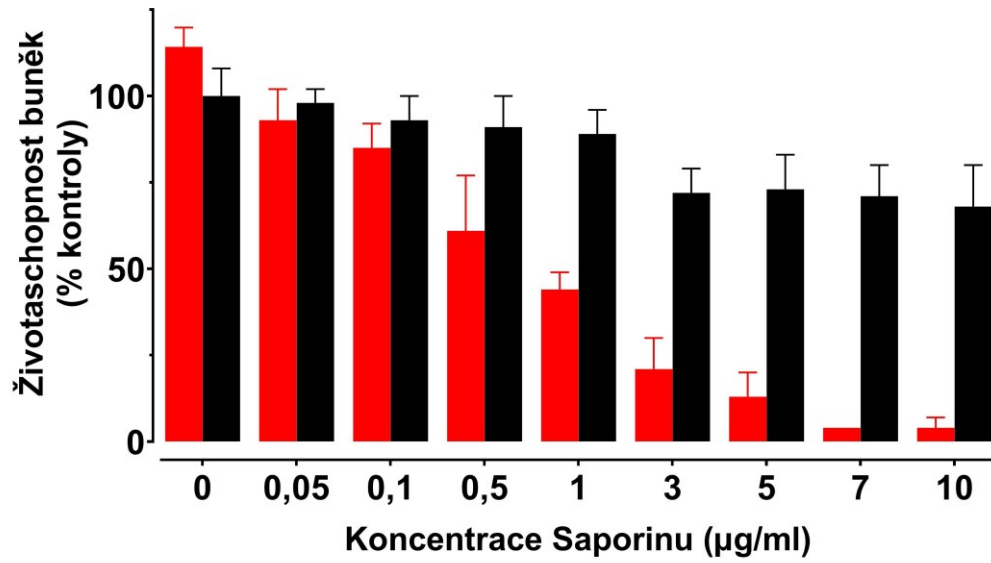
Obr. 18: Životaschopnost HeLa buněk při konstantní koncentraci Pc-Sugar 0,5 µM (●) a 0 µM (●) a stoupající koncentrací Saporinu. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD), n = 5 pro 0,1 µM a n = 28 pro 0 µM.

## 8.2.4 Pc-PEG 0,5 $\mu\text{M}$ a Saporin

Fototoxicita Pc-PEG 0,5  $\mu\text{M}$  v kombinaci se Saporinem odpovídá  $\text{EC}_{50} = 0,81 \pm 0,28$   $\mu\text{g/ml}$ . Toxický účinek Saporinu, kde PS Pc-PEG 0  $\mu\text{M}$ , je  $\text{EC}_{50} = 20,49 \pm 9,60$   $\mu\text{g/ml}$ . Porovnání účinku koncentrací PS znázorňují Obr. 19 a 20.



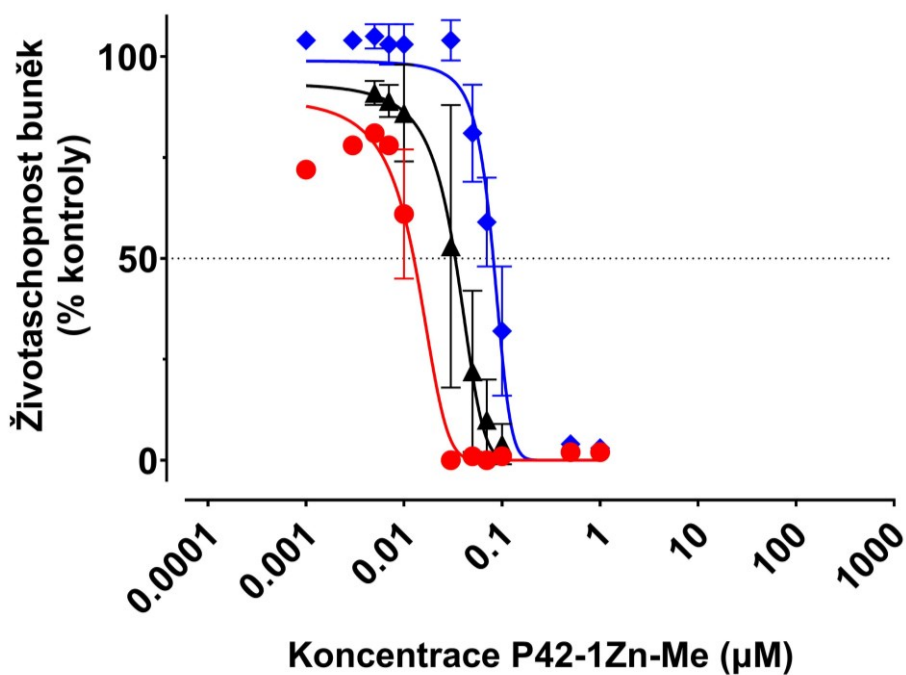
Obr. 19: Životaschopnost HeLa buněk při konstantní koncentraci Pc-PEG 0,5  $\mu\text{M}$  (●) a 0  $\mu\text{M}$  (▲) a stoupající koncentrací Saporinu. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD),  $n = 5$  pro 0,1  $\mu\text{M}$  a  $n = 28$  pro 0  $\mu\text{M}$ .



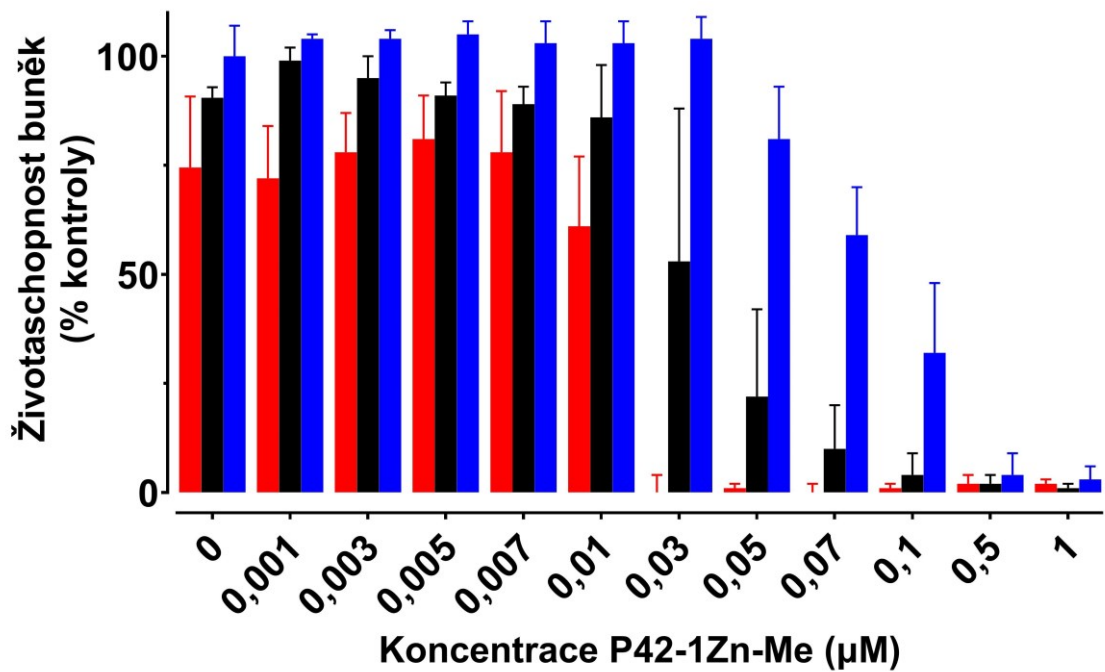
Obr. 20: Životaschopnost HeLa buněk při konstantní koncentraci Pc-PEG 0,5 µM (●) a 0 µM (●) a stoupající koncentrací Saporinu. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD),  $n = 5$  pro 0,1 µM a  $n = 28$  pro 0 µM.

### 8.2.5 Saporin 0 – 1 – 10 $\mu\text{g/ml}$ a P42-1Zn-Me

Toxický účinek Saporinu při koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$  v kombinaci s P42-1Zn-Me odpovídá  $\text{EC}_{50} = 0,014 \pm 0,006 \mu\text{M}$ , při koncentraci 1  $\mu\text{g/ml}$   $\text{EC}_{50} = 0,033 \pm 0,016 \mu\text{M}$  a samotný PS (koncentrace saporinu = 0  $\mu\text{g/ml}$ )  $\text{EC}_{50} = 0,084 \pm 0,009 \mu\text{M}$ . Porovnání jednotlivých účinků kombinací konstantních koncentrací Saporinu v závislosti na stoupající koncentraci P42-1Zn-Me znázorňuje Obr. 21 a 22.



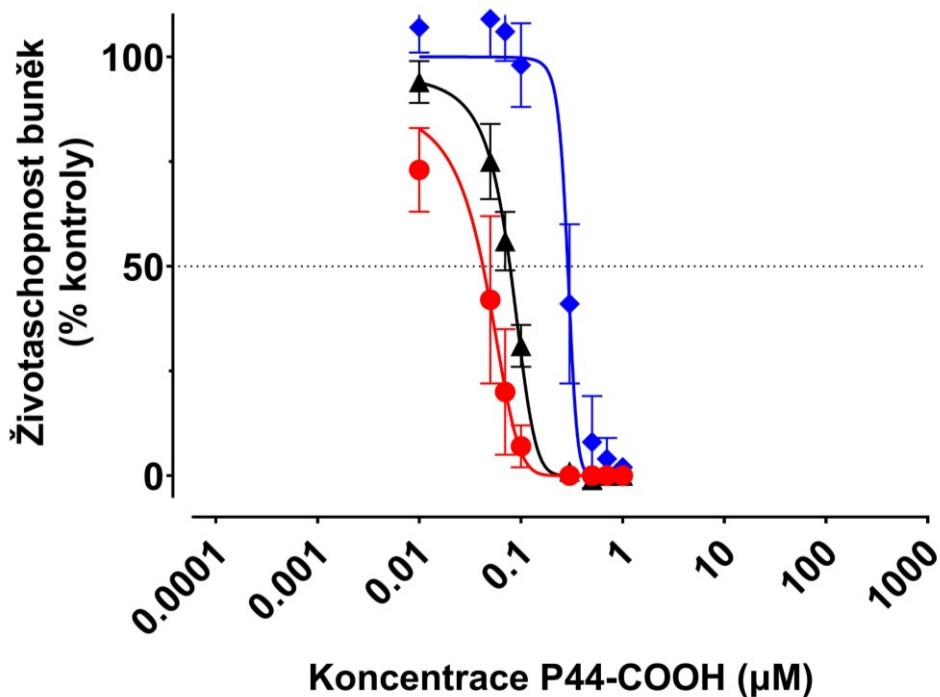
Obr. 21: Životaschopnost HeLa buněk při konstantních koncentracích Saporinu 10  $\mu\text{g/ml}$  (●), 1  $\mu\text{g/ml}$  (▲) a 0  $\mu\text{g/ml}$  (◆) a stoupající koncentraci P42-1Zn-Me. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD),  $n = 2$  pro 10  $\mu\text{g/ml}$ ,  $n = 4$  pro 1  $\mu\text{g/ml}$  a  $n = 3$  pro 0  $\mu\text{g/ml}$ .



Obr. 22: Životaschopnost HeLa buněk při konstantních koncentracích Saporinu 10 μg/ml (●), 1 μg/ml (●) a 0 μg/ml (●) a stoupající koncentraci P42-1Zn-Me. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD), n = 2 pro 10 μg/ml, n = 4 pro 1 μg/ml a n = 3 pro 0 μg/ml.

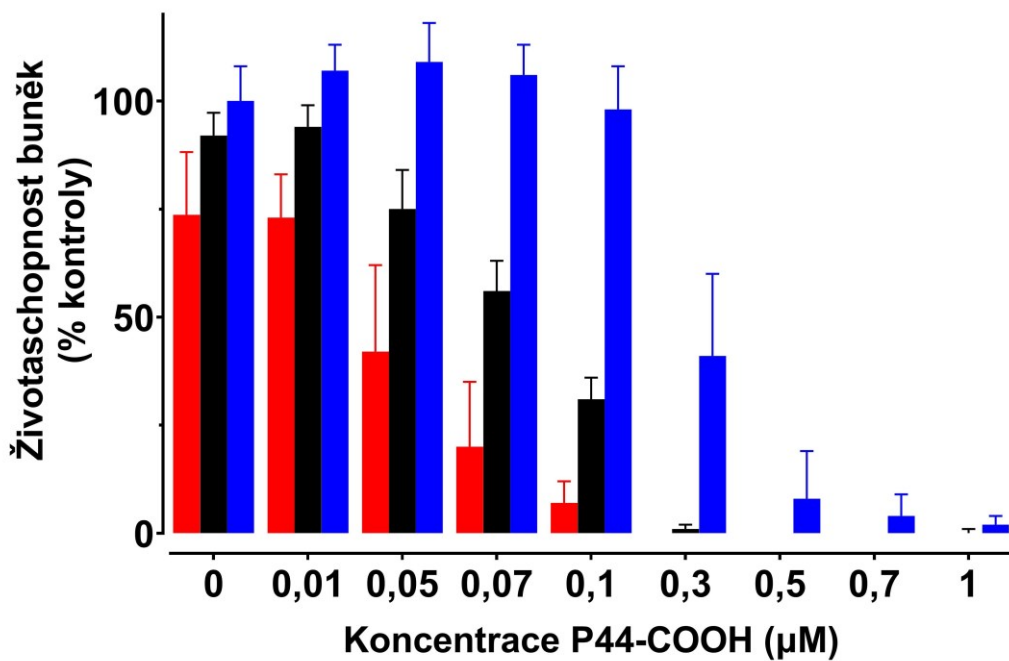
### 8.2.6 Saporin 0 – 1 - 10 $\mu\text{g/ml}$ a P44-COOH

Toxický účinek Saporinu při koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$  v kombinaci s P44-COOH odpovídá  $\text{EC}_{50} = 0,043 \pm 0,015 \mu\text{M}$ , při koncentraci 1  $\mu\text{g/ml}$   $\text{EC}_{50} = 0,078 \pm 0,008 \mu\text{M}$  a při koncentraci 0  $\mu\text{g/ml}$   $\text{EC}_{50} = 0,027 \pm 0,07 \mu\text{M}$ . Porovnání jednotlivých účinků kombinací konstantní koncentraci Saporinu v závislosti na stoupající koncentraci P44-COOH znázorňuje Obr. 23 a 24.



Obr. 23: Životaschopnost HeLa buněk při konstantních koncentracích Saporinu 10  $\mu\text{g/ml}$  (●), 1  $\mu\text{g/ml}$  (▲) a 0  $\mu\text{g/ml}$  (◆) a stoupající koncentraci P44-COOH. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD),  $n = 3$  pro 10  $\mu\text{g/ml}$ ,  $n = 4$  pro 1  $\mu\text{g/ml}$  a  $n = 7$  pro 0  $\mu\text{g/ml}$ .

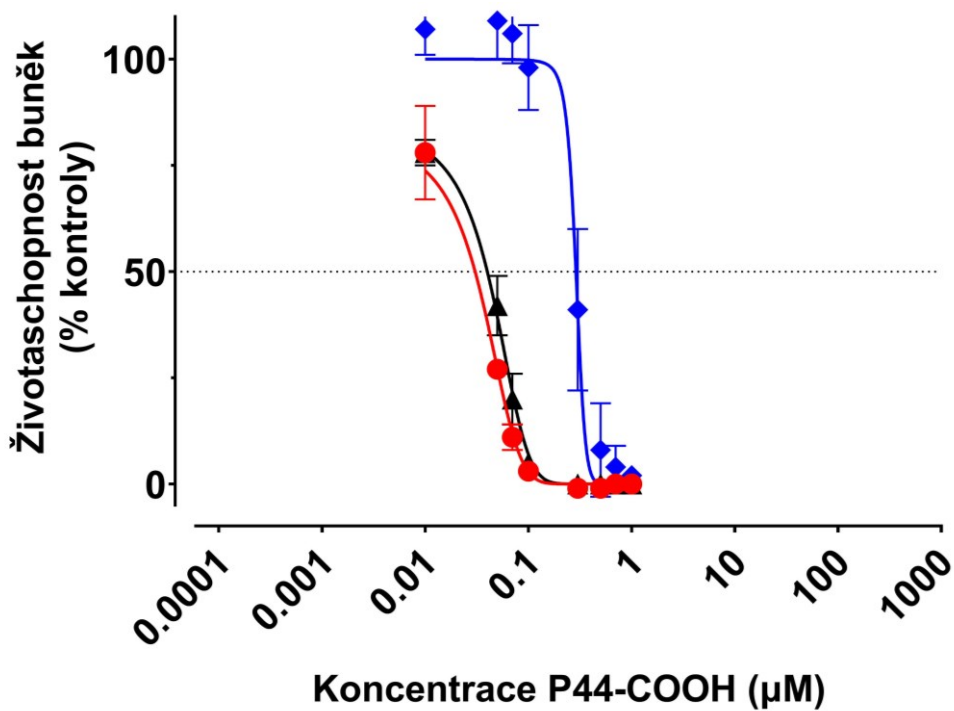




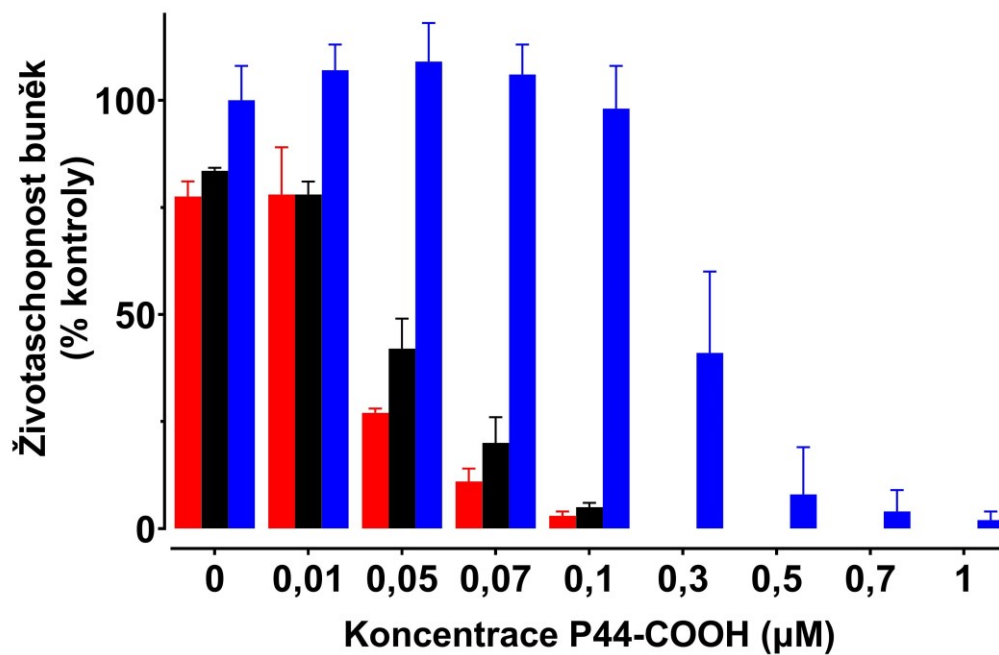
Obr. 24: Životaschopnost HeLa buněk při konstantních koncentracích Saporinu 10 µg/ml (●), 1 µg/ml (●) a 0 µg/ml (●) a stoupající koncentraci P44-COOH. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD), n = 3 pro 10 µg/ml, n = 4 pro 1 µg/ml a n = 7 pro 0 µg/ml.

### 8.2.7 Saporin 0 – 5 - 7 $\mu\text{g/ml}$ a P44-COOH

Toxický účinek Saporinu při koncentraci 7  $\mu\text{g/ml}$  v kombinaci s P44-COOH odpovídá  $\text{EC}_{50} = 0,035 \pm 0,003 \mu\text{M}$ , při koncentraci 5  $\mu\text{g/ml}$   $\text{EC}_{50} = 0,044 \pm 0,005 \mu\text{M}$  a při koncentraci 0  $\mu\text{g/ml}$   $\text{EC}_{50} = 0,027 \pm 0,07 \mu\text{M}$ . Porovnání jednotlivých účinků kombinací konstantní koncentraci Saporinu v závislosti na stoupající koncentraci P44-COOH znázorňuje Obr. 25 a 26.



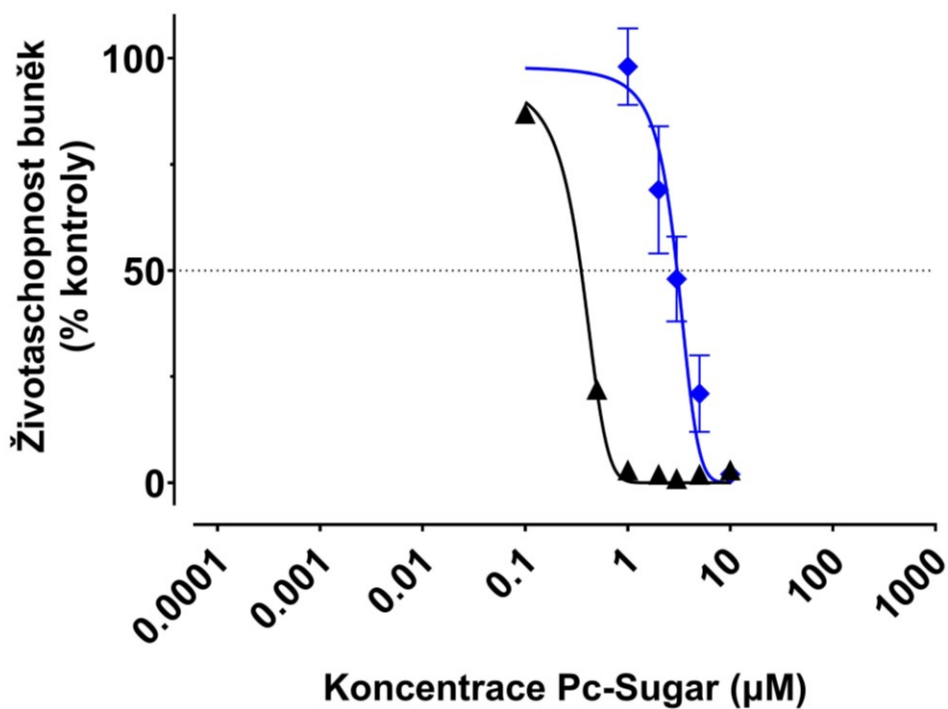
Obr. 25: Životaschopnost HeLa buněk při konstantních koncentracích Saporinu 7  $\mu\text{g/ml}$  (●), 5  $\mu\text{g/ml}$  (●) a 0  $\mu\text{g/ml}$  (●) a stoupající koncentraci P44-COOH. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD),  $n = 2$  pro 7  $\mu\text{g/ml}$ ,  $n = 2$  pro 5  $\mu\text{g/ml}$  a  $n = 7$  pro 0  $\mu\text{g/ml}$ .



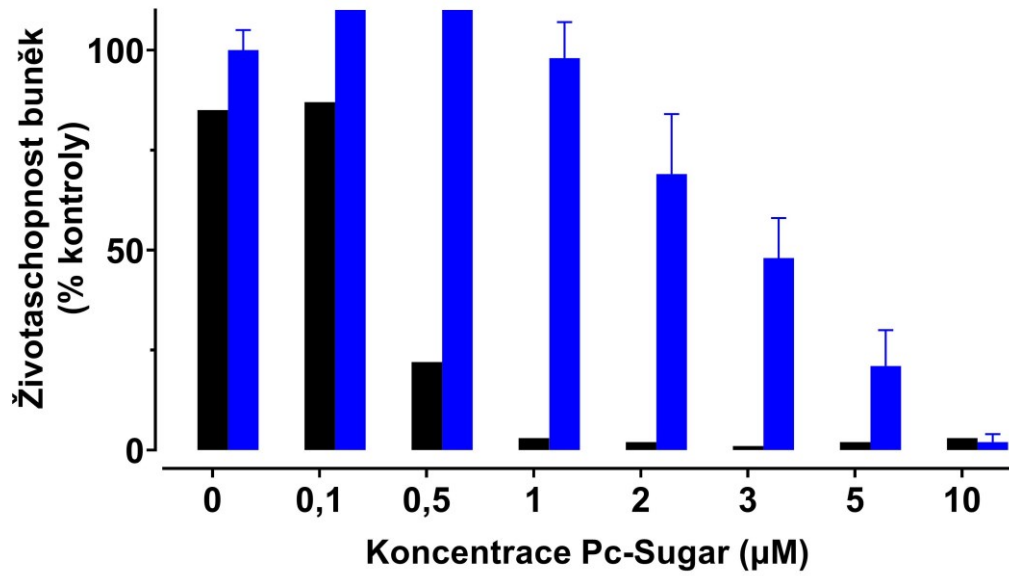
Obr. 26: Životaschopnost HeLa buněk při konstantních koncentracích Saporinu 7 µg/ml (●), 5 µg/ml (●) a 0 µg/ml (●) a stoupající koncentraci P44-COOH. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD), n = 2 pro 7 µg/ml, n = 2 pro 5 µg/ml a n = 7 pro 0 µg/ml.

### 8.2.8 Saporin 0 - 1 µg/ml a Pc-Sugar

Toxický účinek Saporinu při koncentraci 10 µg/ml v kombinaci s Pc-Sugar nebyl stanoven, při koncentraci 1 µg/ml  $EC_{50} = 0,3 \mu\text{M}$  a při koncentraci 0 µg/ml  $EC_{50} = 2,9 \pm 0,5 \mu\text{M}$ . Porovnání jednotlivých koncentrací Saporinu v závislosti na stoupající koncentraci Pc-Sugar znázorňuje Obr. 27 a 28.



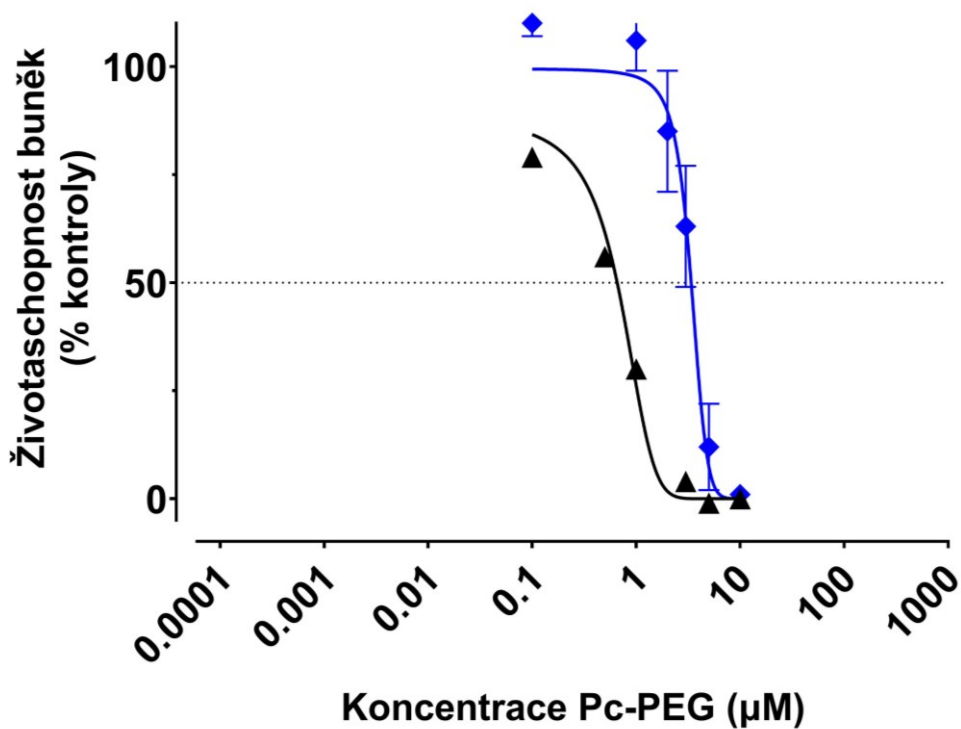
Obr. 27: Životaschopnost HeLa buněk při konstantních koncentracích Saporinu 10 µg/ml (▲), 1 µg/ml (●) a 0 µg/ml (◆) a stoupající koncentraci Pc-Sugar. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD),  $n = 0$  pro 10 µg/ml,  $n = 1$  pro 1 µg/ml a  $n = 6$  pro 0 µg/ml.



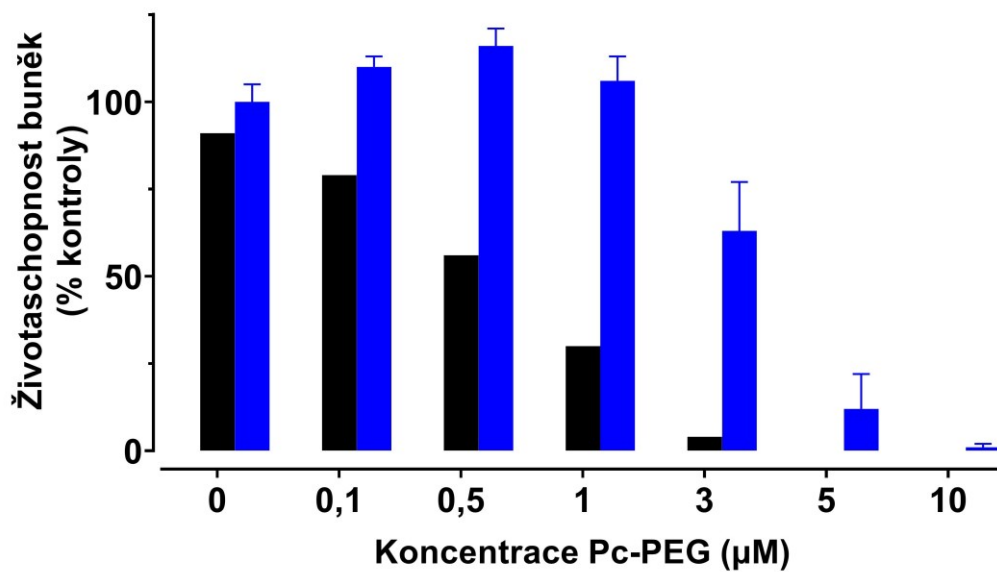
Obr. 28: Životaschopnost HeLa buněk při konstantních koncentracích Saporinu 10 μg/ml (●), 1 μg/ml (●) a 0 μg/ml (●) a stoupající koncentraci Pc-Sugar. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD), n = 0 pro 10 μg/ml, n = 1 pro 1 μg/ml a n = 6 pro 0 μg/ml.

### 8.2.9 Saporin 0 – 1 µg/ml a Pc-PEG

Toxický účinek Saporinu při koncentraci 10 µg/ml v kombinaci s Pc-PEG nebyl stanoven, při koncentraci 1 µg/ml  $EC_{50} = 0,7 \mu M$  a při koncentraci 0 µg/ml  $EC_{50} = 3,4 \pm 0,5 \mu M$ . Porovnání jednotlivých koncentrací Saporinu v závislosti na stoupající koncentraci Pc-PEG znázorňují Obr. 29 a 30.



Obr. 29: Životaschopnost HeLa buněk při konstantních koncentracích Saporinu 10 µg/ml (●), 1 µg/ml (●) a 0 µg/ml (●) a stoupající koncentraci Pc-PEG. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD),  $n = 0$  pro 10 µg/ml,  $n = 1$  pro 1 µg/ml a  $n = 5$  pro 0 µg/ml.

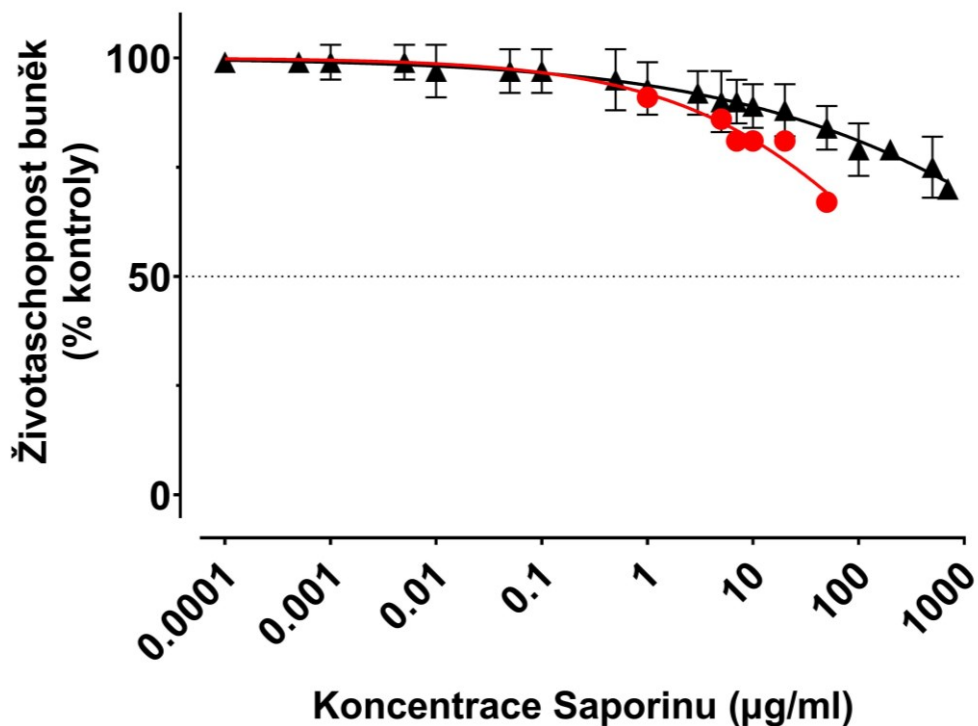


Obr. 30: Životaschopnost HeLa buněk při konstantních koncentracích Saporinu 10 μg/ml (●), 1 μg/ml (●) a 0 μg/ml (●) a stoupající koncentraci Pc-PEG. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD), n = 0 pro 10 μg/ml, n = 1 pro 1 μg/ml a n = 5 pro 0 μg/ml.

### 8.3 Fototoxiciční experimenty látek v kombinaci Light Before

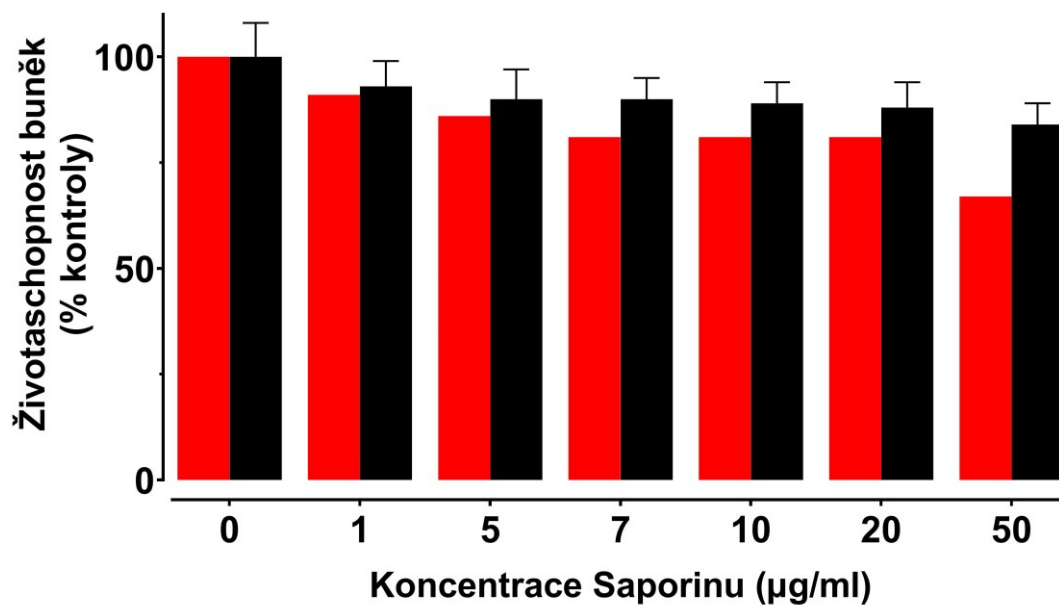
#### 8.3.1 P42-1Zn-Me 0,01 $\mu\text{M}$ a Saporin

Toxicita 0,01  $\mu\text{M}$  P42-1Zn-Me v kombinaci s měnící se koncentrací Saporinu odpovídá  $\text{EC}_{50} > 50 \mu\text{g/ml}$ . Toxický účinek samotného Saporinu (koncentrace P42-1Zn-Me = 0  $\mu\text{M}$ ) je  $\text{EC}_{50} > 700 \mu\text{g/ml}$ . Porovnání účinku znázorňují Obr. 31 a 32.



Obr. 31: Životaschopnost HeLa buněk při konstantní koncentraci P42-1Zn-Me (0,01  $\mu\text{M}$ ; ●) a bez PS (●) se stoupající koncentrací Saporinu. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD),  $n = 1$  pro 0,01  $\mu\text{M}$  a  $n = 18$  pro 0  $\mu\text{M}$ .

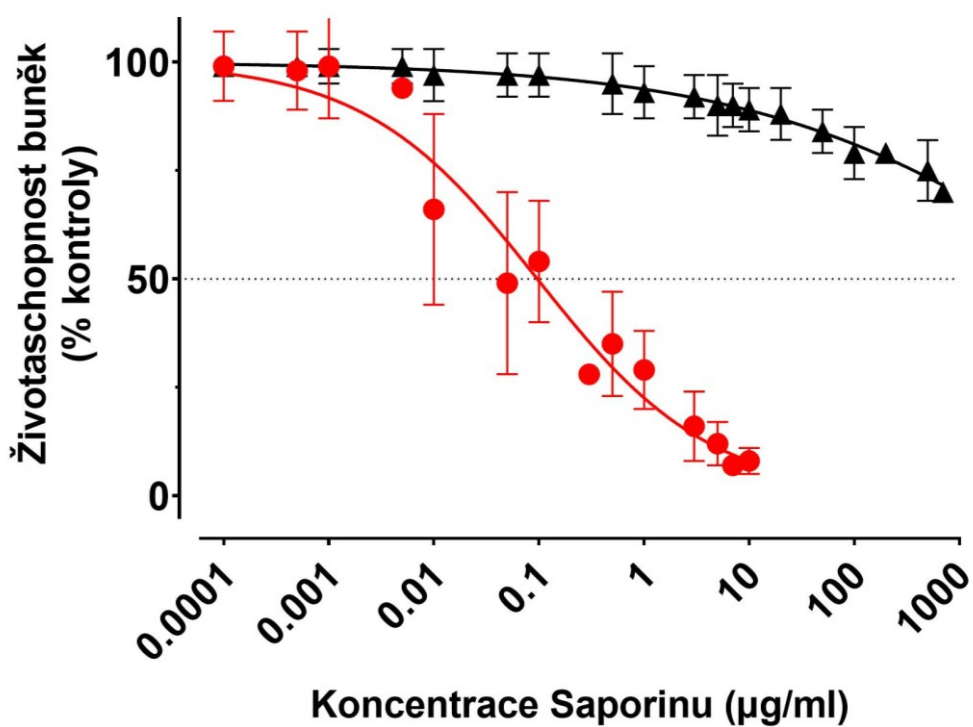




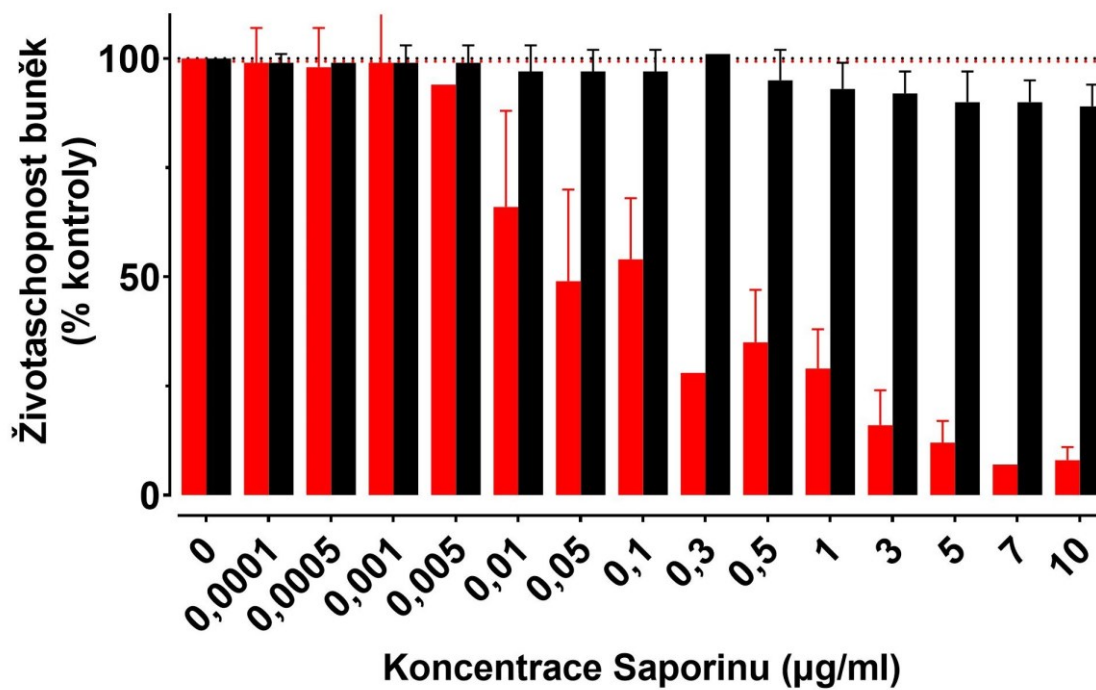
Obr. 32: Životaschopnost HeLa buněk při konstantní koncentraci P42-1Zn-Me (0,01 µM; ●) a bez PS (●) se stoupající koncentrací Saporinu. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD), n = 1 pro 0,01 µM a n = 18 pro 0 µM.

### 8.3.2 P42-1Zn-Me 0,03 $\mu\text{M}$ a Saporin

Toxicita P42-1Zn-Me (0,03  $\mu\text{M}$ ) v kombinaci se stoupající koncentrací Saporinu odpovídá  $\text{EC}_{50} = 0,2146 \pm 0,1762 \mu\text{g/ml}$ . Účinek Saporinu bez PS (0  $\mu\text{M}$  P42-1Zn-Me) je  $\text{EC}_{50} > 700 \mu\text{g/ml}$ . Porovnání účinku znázorňují Obr. 33 a 34.



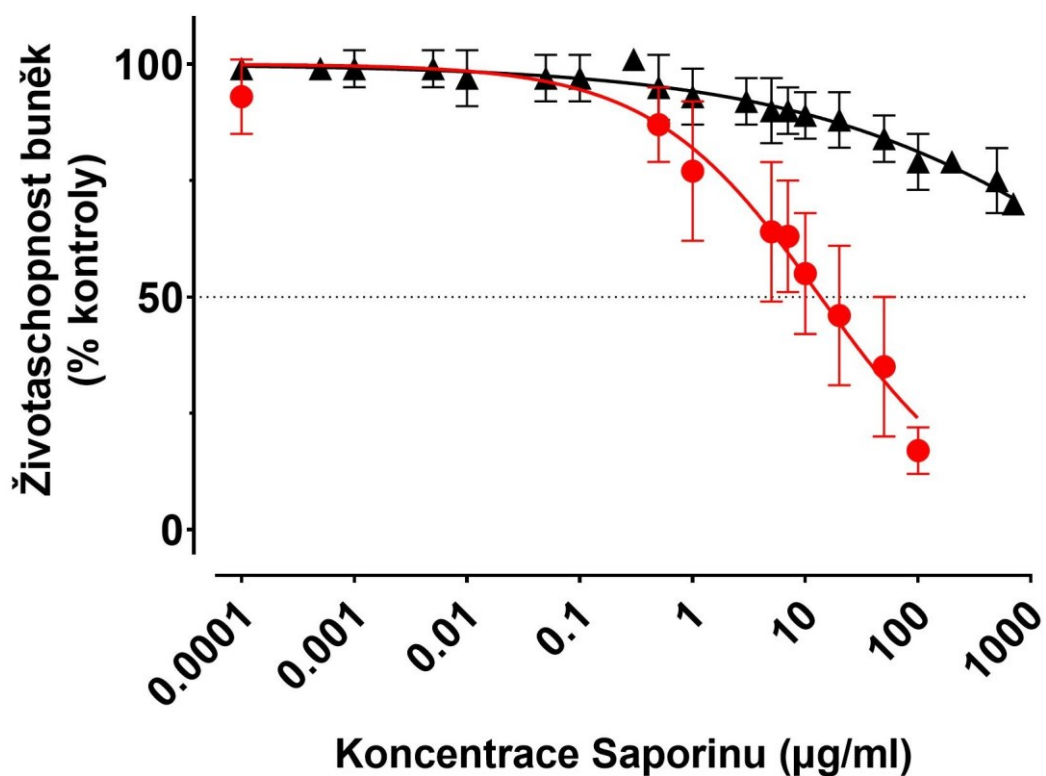
Obr. 33: Životaschopnost HeLa buněk při konstantní koncentraci P42-1Zn-Me (0,03  $\mu\text{M}$ ; ●) a bez PS (●) se stoupající koncentrací Saporinu. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD),  $n = 8$  pro 0,03  $\mu\text{M}$  a  $n = 18$  pro 0  $\mu\text{M}$ .



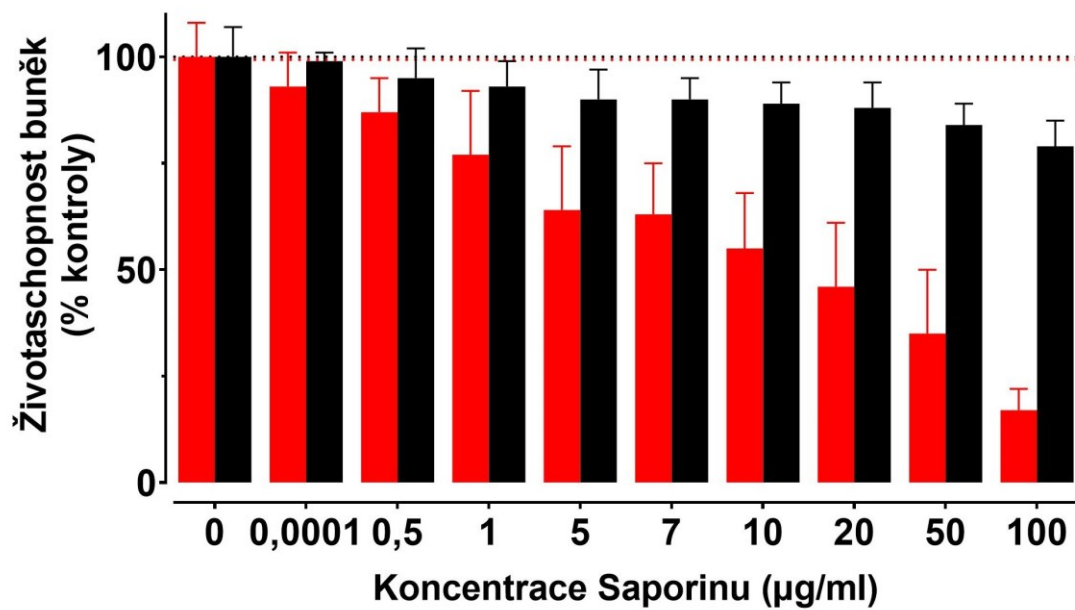
Obr. 34: Životaschopnost HeLa buněk při konstantní koncentraci P42-1Zn-Me (0,03 μM; ●) a bez PS (●) se stoupající koncentrací Saporinu. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD), n = 8 pro 0,03 μM a n = 18 pro 0 μM.

### 8.3.3 P44-COOH 0,1 $\mu$ M a Saporin

Toxicita 0,1  $\mu$ M P44-COOH v kombinaci se stoupající koncentrací Saporinu odpovídá  $EC_{50} = 25,9 \pm 25,8 \mu\text{g/ml}$ . Účinek samotného Saporinu (0  $\mu$ M P44-COOH) je  $EC_{50} > 700 \mu\text{g/ml}$ . Porovnání účinku znázorňují Obr. 35 a 36.



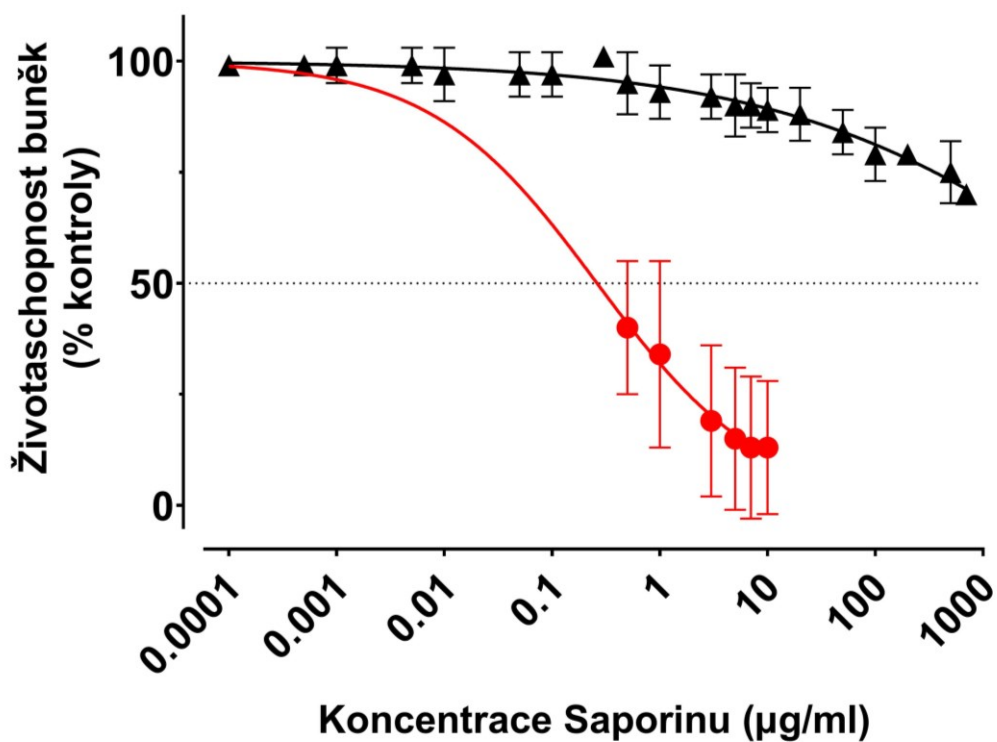
Obr. 35: Životaschopnost HeLa buněk při konstantní koncentraci P44-COOH (0,1  $\mu\text{M}$ ; ●) a bez PS (●) se stoupající koncentrací Saporinu. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD),  $n = 11$  pro 0,1  $\mu\text{M}$  a  $n = 18$  pro 0  $\mu\text{M}$ .



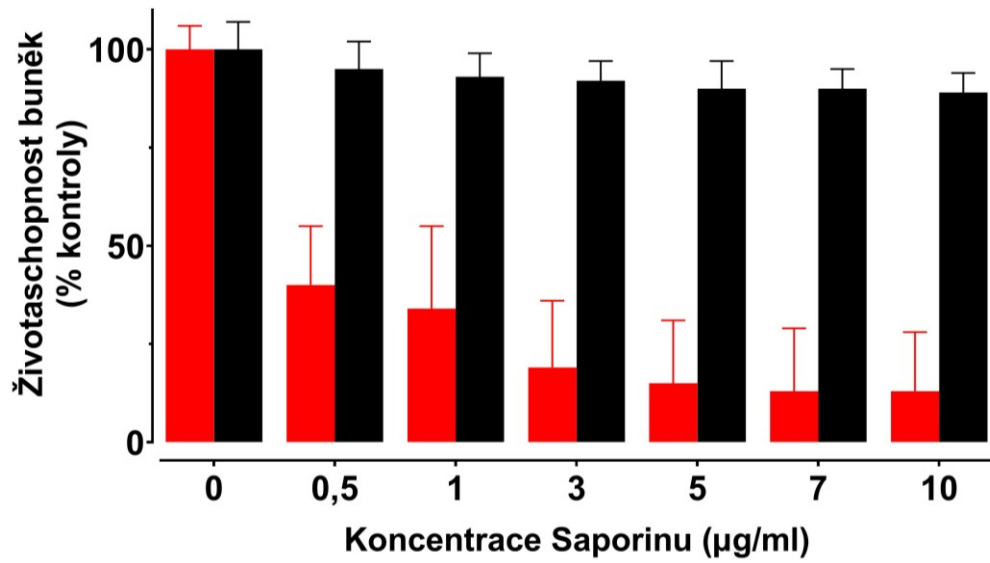
Obr. 36: Životaschopnost HeLa buněk při konstantní koncentraci P44-COOH (0,1 µM; ●) a bez PS (●) se stoupající koncentrací Saporinu. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD),  $n = 11$  pro 0,1 µM a  $n = 18$  pro 0 µM.

### 8.3.4 P44-COOH 0,2 $\mu$ M a Saporin

Toxicita 0,2  $\mu$ M P44-COOH v kombinaci se Saporinem odpovídá  $EC_{50} = 0,40 \pm 0,25$   $\mu$ g/ml. Účinek Saporinu (0  $\mu$ M P44-COOH ) je  $EC_{50} > 700$   $\mu$ g/ml. Porovnání účinku znázorňují Obr. 37 a 38.



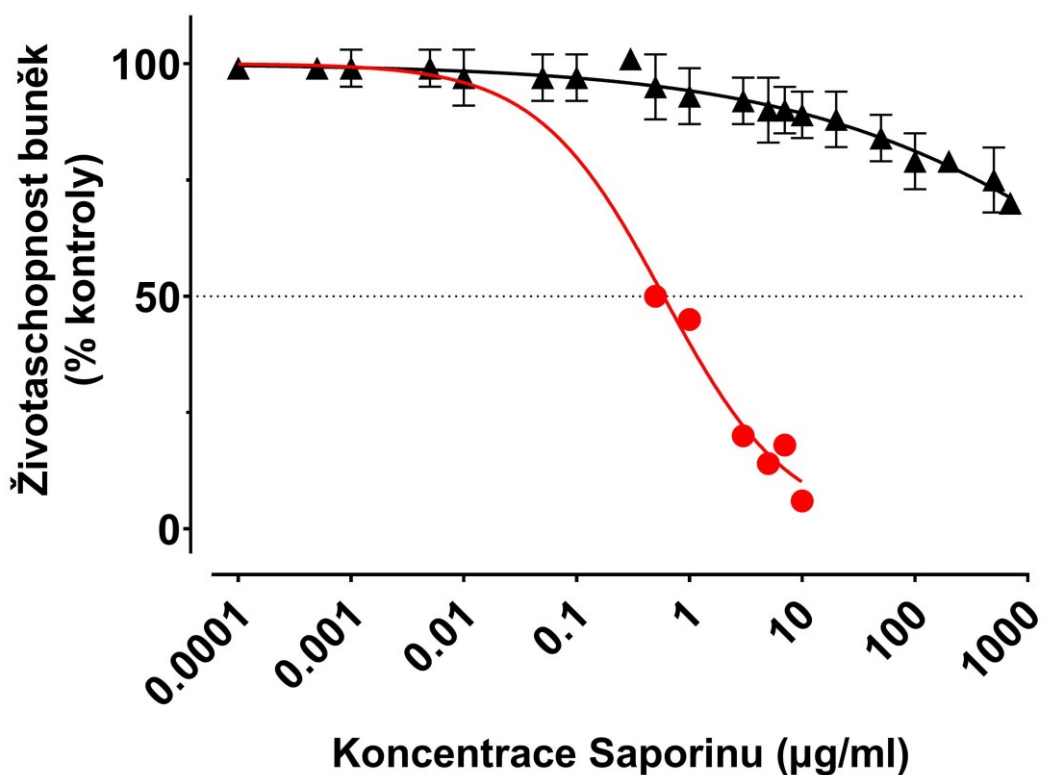
Obr: 37: Životaschopnost HeLa buněk při konstantní koncentraci P44-COOH (0,2  $\mu$ M; ●) a bez PS (●) se stoupající koncentrací Saporinu. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD),  $n = 11$  pro 0,2  $\mu$ M a  $n = 18$  pro 0  $\mu$ M.



Obr. 38: Životaschopnost HeLa buněk při konstantní koncentraci P44-COOH (0,2 µM; ●) a bez PS (●) se stoupající koncentrací Saporinu. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD),  $n = 11$  pro 0,2 µM a  $n = 18$  pro 0 µM.

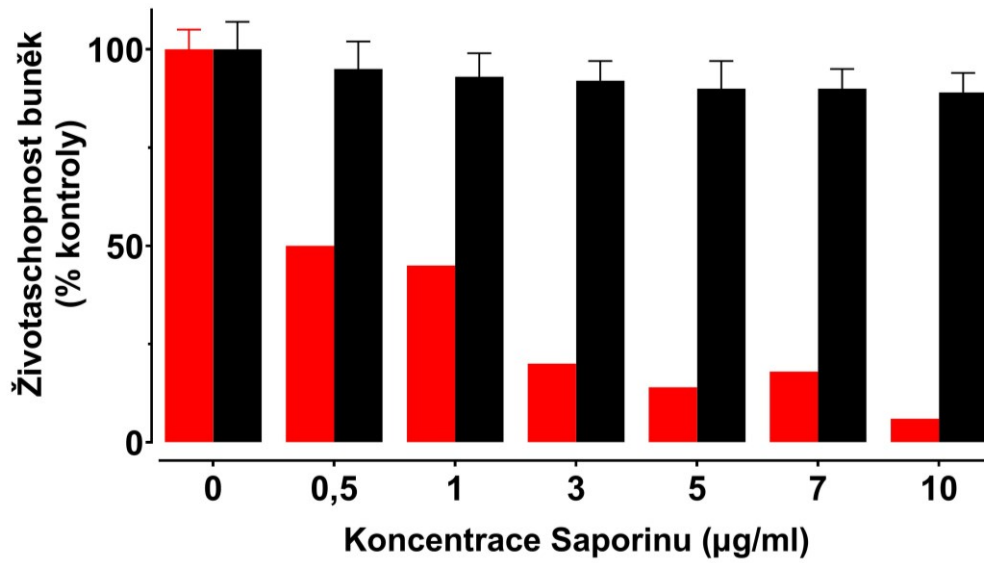
### 8.3.5 P44-COOH 0,3 $\mu$ M a Saporin

Účinek kombinace 0,3  $\mu$ M P44-COOH spolu se stoupající koncentrací Saporinu odpovídá  $EC_{50} = 0,57 \mu\text{g/ml}$ . Účinek samotného Saporinu bez P44-COOH (0  $\mu$ M) je  $EC_{50} > 700 \mu\text{g/ml}$ . Porovnání účinku znázorňují Obr. 39 a 40.



Obr. 39: Životaschopnost HeLa buněk při konstantní koncentraci P44-COOH (0,3  $\mu$ M; ●) a bez PS (●) se stoupající koncentrací Saporinu. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD),  $n = 1$  pro 0,3  $\mu$ M a  $n = 18$  pro 0  $\mu$ M.

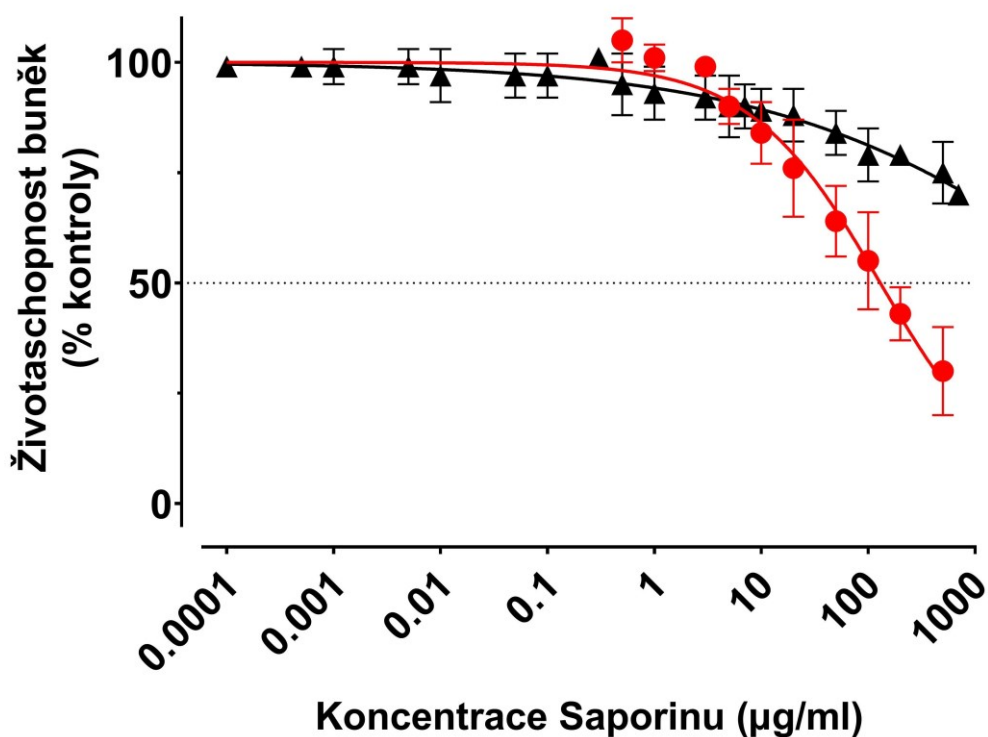




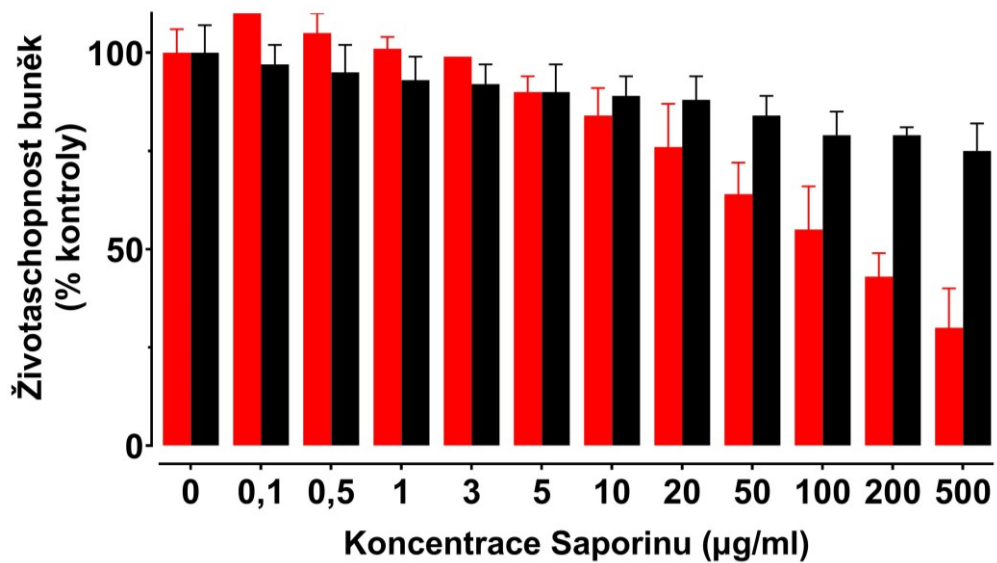
Obr. 40: Životaschopnost HeLa buněk při konstantní koncentraci P44-COOH (0,3 µM; ●) a bez PS (●) se stoupající koncentrací Saporinu. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD),  $n = 1$  pro 0,3 µM a  $n = 18$  pro 0 µM.

### 8.3.6 Pc-Sugar 0,5 $\mu$ M a Saporin

Toxicita Pc-Sugar o konstantní koncentraci 0,5  $\mu$ M v kombinaci se Saporinem odpovídá  $EC_{50} = 103,7 \pm 57,2$   $\mu$ g/ml. Toxický účinek Saporinu, kde PS Pc-Sugar = 0  $\mu$ M, je  $EC_{50} > 700$   $\mu$ g/ml. Porovnání účinku znázorňují Obr. 41 a 42.



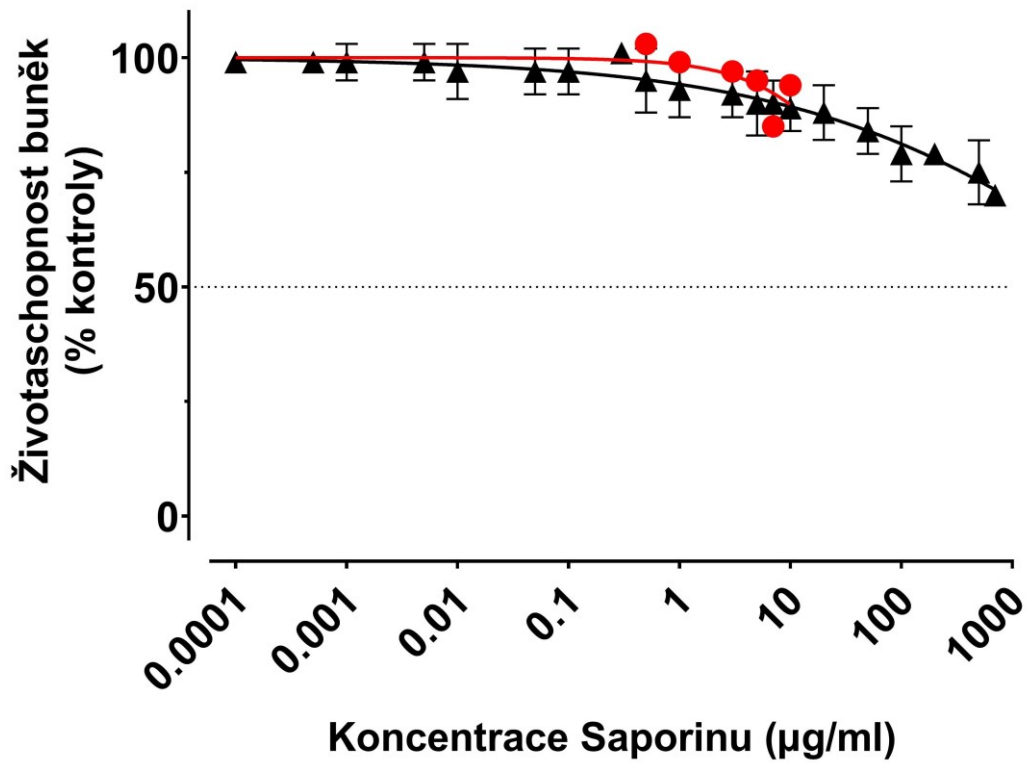
Obr. 41: Životaschopnost HeLa buněk při konstantní koncentraci Pc-Sugar (0,5  $\mu$ M; ●) a bez PS (●) se stoupající koncentrací Saporinu. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD),  $n = 7$  pro 0,5  $\mu$ M a  $n = 18$  pro 0  $\mu$ M.



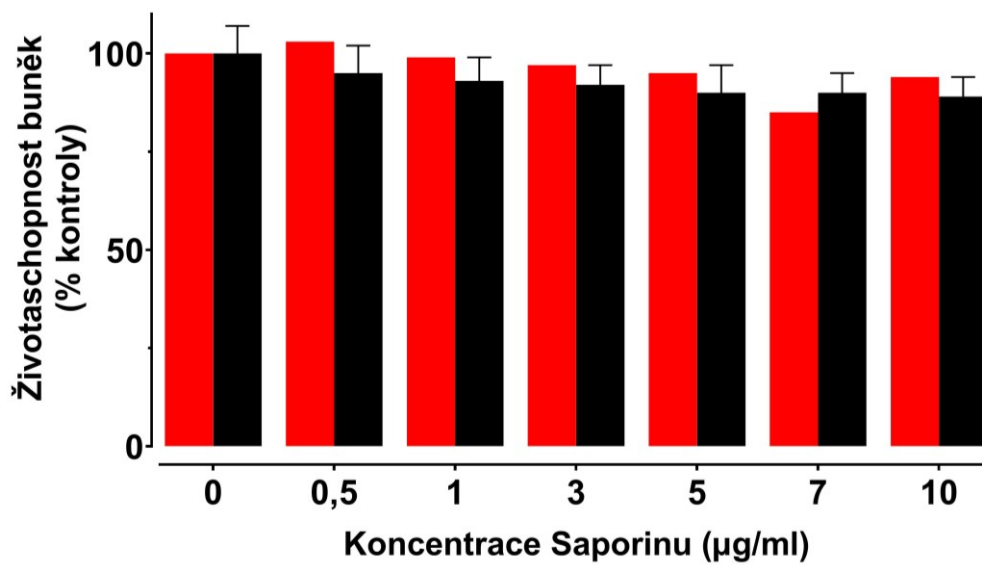
Obr. 42: Životaschopnost HeLa buněk při konstantní koncentraci Pc-Sugar (0,5 µM; ●) a bez PS (●) se stoupající koncentrací Saporinu. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD), n = 7 pro 0,5 µM a n = 18 pro 0 µM.

### 8.3.7 Pc-PEG 0,5 $\mu\text{M}$ a Saporin

Toxicita 0,5  $\mu\text{M}$  Pc-PEG v kombinaci se Saporinem odpovídá  $\text{EC}_{50} > 10 \mu\text{g/ml}$ . Účinek Saporinu, kde je 0  $\mu\text{M}$  Pc-PEG je  $\text{EC}_{50} > 700 \mu\text{g/ml}$ . Porovnání účinku znázorňují Obr. 43 a 44.



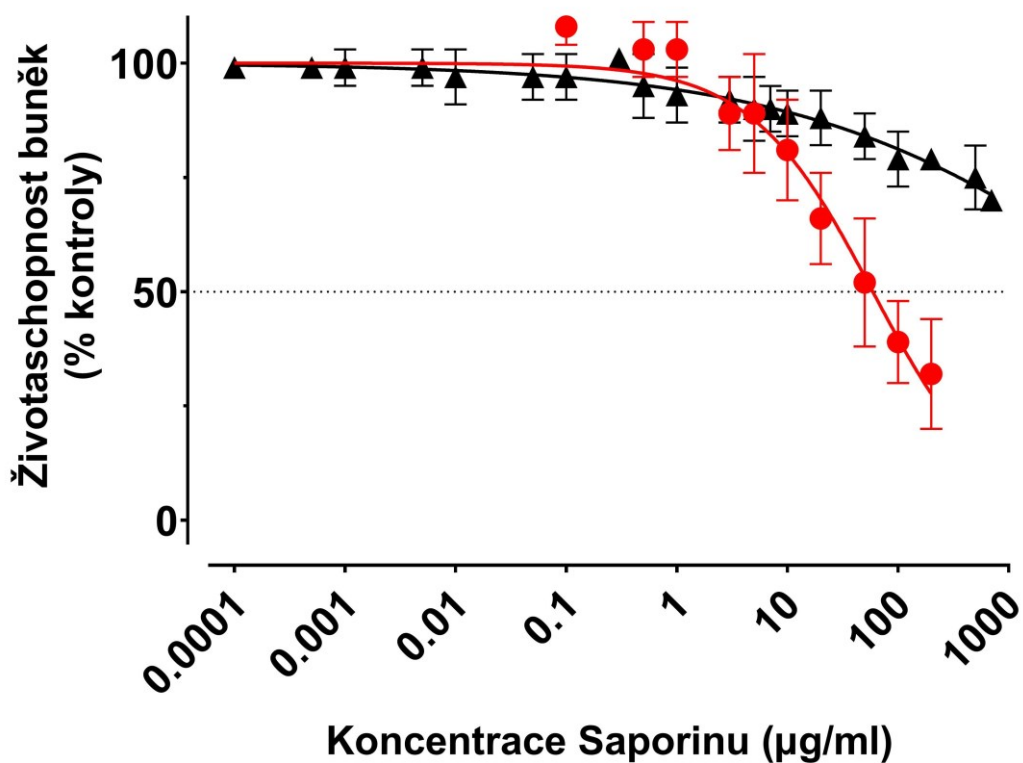
Obr. 43: Životaschopnost HeLa buněk při konstantní koncentraci Pc-PEG (0,5  $\mu\text{M}$ ; ●) a bez PS (●) se stoupající koncentrací Saporinu. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD),  $n = 1$  pro 0,5  $\mu\text{M}$  a  $n = 18$  pro 0  $\mu\text{M}$ .



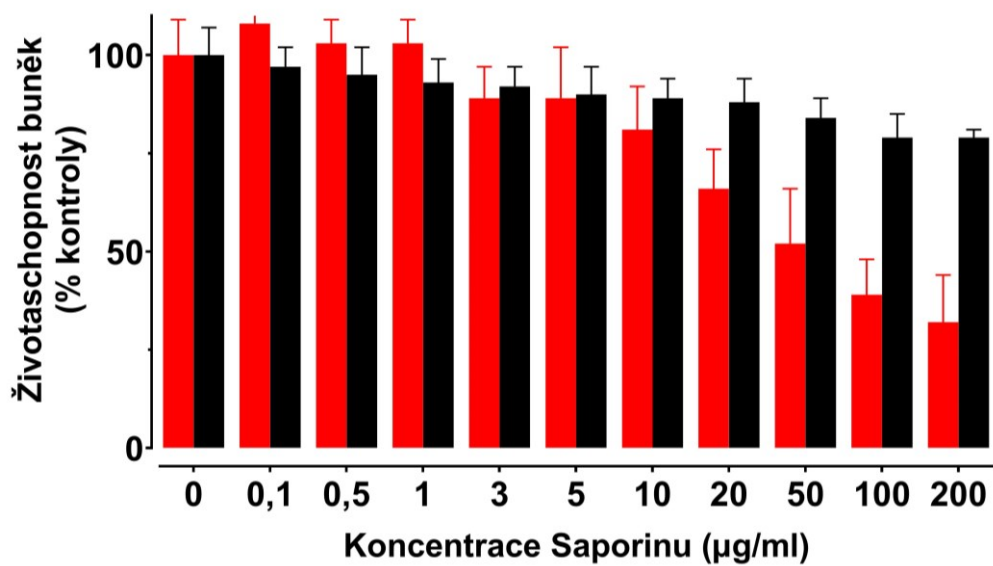
Obr. 44: Životaschopnost HeLa buněk při konstantní koncentraci Pc-PEG (0,5 µM; ●) a bez PS (●) se stoupající koncentrací Saporinu. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD), n = 1 pro 0,5 µM a n = 18 pro 0 µM.

### 8.3.8 Pc-PEG 1 $\mu\text{M}$ a Saporin

Toxicita 1  $\mu\text{M}$  Pc-PEG v kombinaci se Saporinem odpovídá  $\text{EC}_{50} = 59,16 \pm 39,69 \mu\text{g/ml}$ . Účinek Saporinu bez PS (Pc-PEG = 0  $\mu\text{M}$ ) je  $\text{EC}_{50} > 700 \mu\text{g/ml}$ . Porovnání účinku znázorňují Obr. 45 a 46.



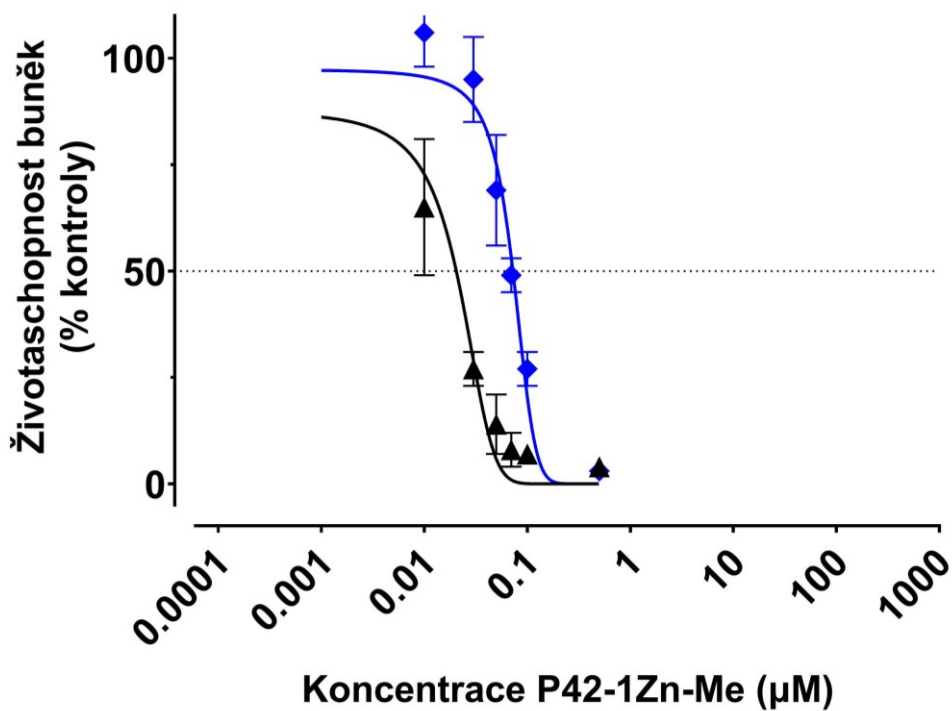
Obr. 45: Životaschopnost HeLa buněk při konstantní koncentraci Pc-PEG (1  $\mu\text{M}$ ; ●) a bez PS (▲) se stoupající koncentrací Saporinu. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD),  $n = 7$  pro 1  $\mu\text{M}$  a  $n = 18$  pro 0  $\mu\text{M}$ .



Obr. 46: Životaschopnost HeLa buněk při konstantní koncentraci Pc-PEG (1 µM; ●) a bez PS (●) se stoupající koncentrací Saporinu. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD),  $n = 7$  pro 1 µM a  $n = 18$  pro 0 µM.

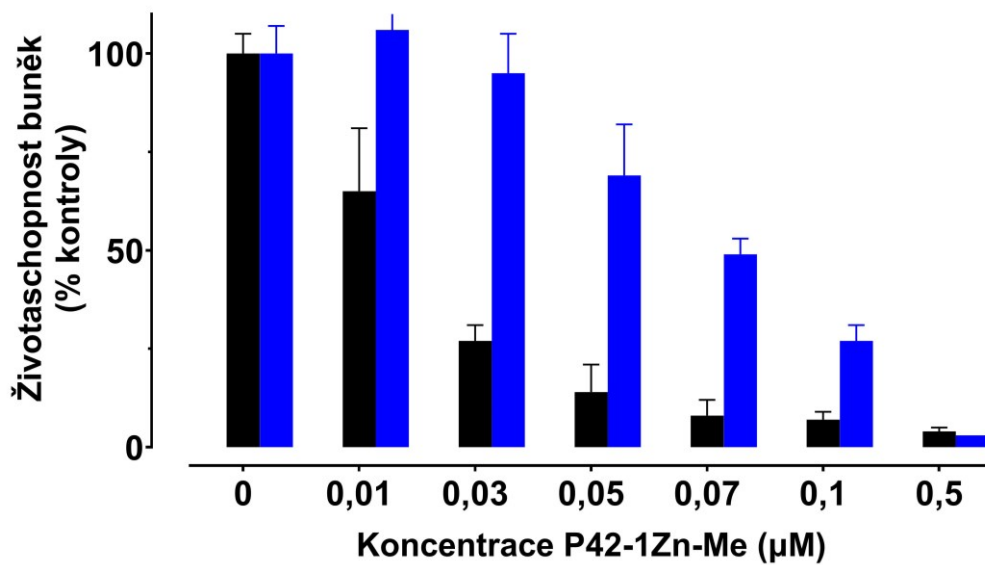
### 8.3.9 Saporin 0-1-10 µg/ml a P42-1Zn-Me

Toxický účinek Saporinu při konstantní koncentraci 10 µg/ml v kombinaci se stoupající koncentrací P42-1Zn-Me nebyl stanoven, při koncentraci 1 µg/ml  $EC_{50} = 0,021 \pm 0,005 \mu\text{M}$  a při koncentraci 0 µg/ml  $EC_{50} = 0,067 \pm 0,008 \mu\text{M}$ . Porovnání účinku znázorňují Obr. 47 a 48.



Obr. 47: Životaschopnost HeLa buněk při konstantní koncentraci Saporinu 10 µg/ml (●), při 1 µg/ml (●), 0 µg/ml (●) a stoupající koncentraci P42-1Zn-Me. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD),  $n = 0$  pro 10 µg/ml,  $n = 2$  pro 1 µg/ml a  $n = 2$  pro 0 µg/ml.

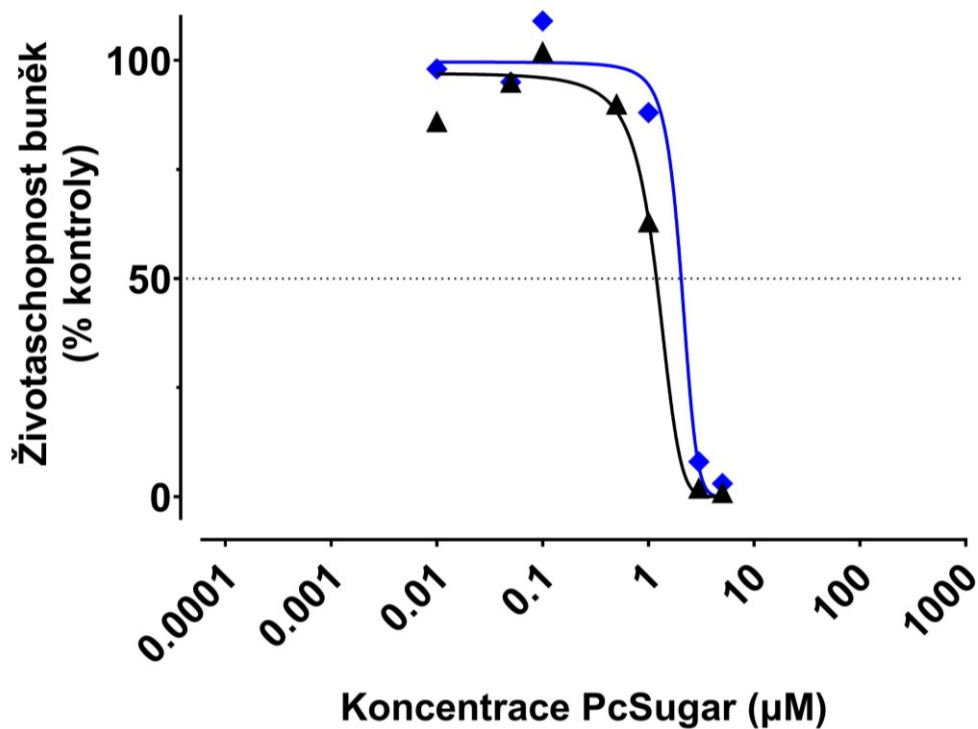




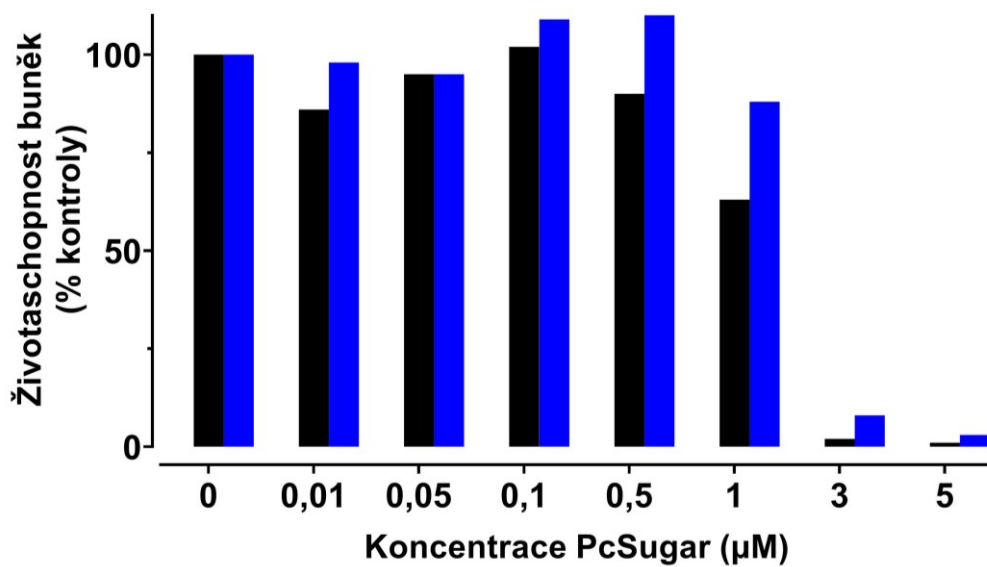
Obr. 48: Životaschopnost HeLa buněk při konstantní koncentraci Saporinu 10 μg/ml (●), při 1 μg/ml (●), 0 μg/ml (●) a stoupající koncentraci P42-1Zn-Me. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD), n = 0 pro 10 μg/ml, n = 2 pro 1 μg/ml a n = 2 pro 0 μg/ml.

### 8.3.10 Saporin 0-1-10 $\mu\text{g/ml}$ a Pc-Sugar

Účinek konstantní koncentrace Saporinu ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) v kombinaci se stoupající koncentrací Pc-Sugar nebyl stanoven, při koncentraci  $1 \mu\text{g/ml}$   $\text{EC}_{50} = 1,19 \mu\text{M}$  a při koncentraci  $0 \mu\text{g/ml}$   $\text{EC}_{50} = 1,66$ . Porovnání účinku znázorňují Obr. 49 a 50.



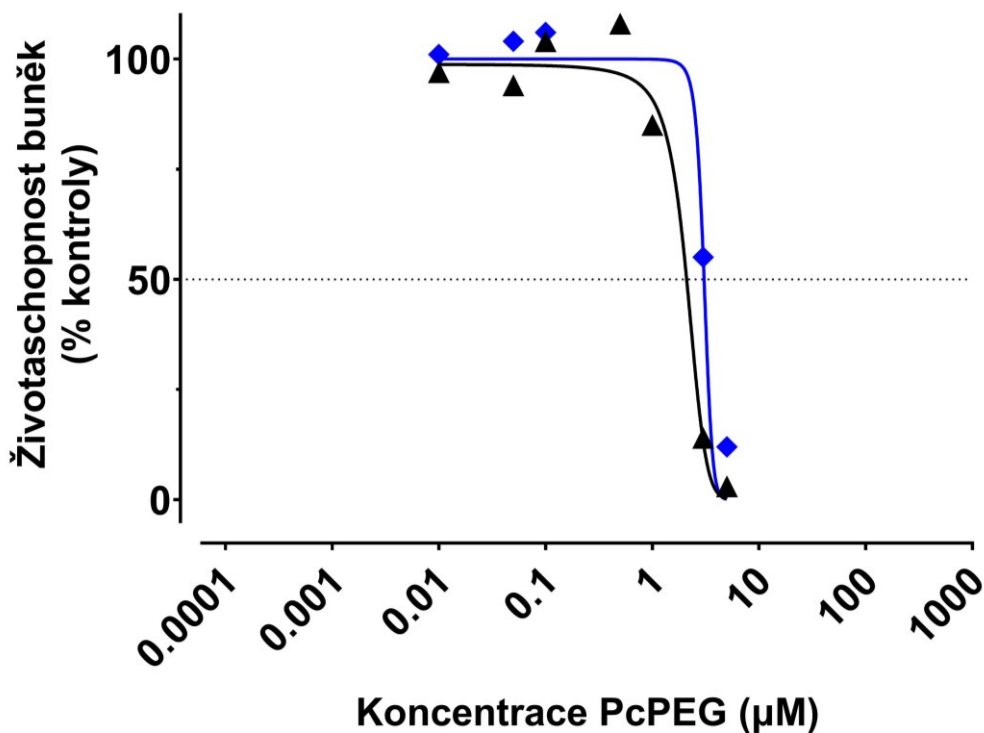
Obr. 49: Životaschopnost HeLa buněk při konstantní koncentraci Saporinu  $10 \mu\text{g/ml}$  (♦), při  $1 \mu\text{g/ml}$  (●),  $0 \mu\text{g/ml}$  (▲) a stoupající koncentraci Pc-Sugar. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD),  $n = 0$  pro  $10 \mu\text{g/ml}$ ,  $n = 1$  pro  $1 \mu\text{g/ml}$  a  $n = 1$  pro  $0 \mu\text{g/ml}$ .



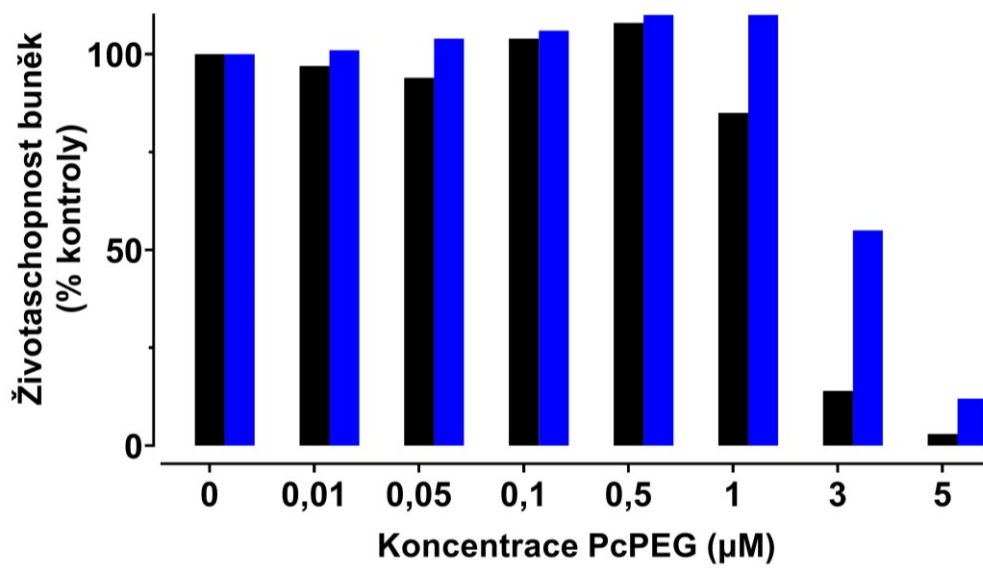
Obr. 50: Životaschopnost HeLa buněk při konstantní koncentraci Saporinu 10 µg/ml (●), při 1 µg/ml (●), 0 µg/ml (●) a stoupající koncentraci Pc-Sugar. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD), n = 0 pro 10 µg/ml, n = 1 pro 1 µg/ml a n = 1 pro 0 µg/ml.

### 8.3.11 Saporin 0-1-10 $\mu\text{g/ml}$ a Pc-PEG

Účinek Saporinu při konstantní koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$  v kombinaci s Pc-Sugar nebyl stanoven, při koncentraci 1  $\mu\text{g/ml}$   $\text{EC}_{50} = 2,09 \mu\text{M}$  a při koncentraci 0  $\mu\text{g/ml}$   $\text{EC}_{50} = 3,14 \mu\text{M}$ . Porovnání účinku znázorňují Obr. 51 a 52.



Obr. 51: Životaschopnost HeLa buněk při konstantní koncentraci Saporinu 10  $\mu\text{g/ml}$  (●), při 1  $\mu\text{g/ml}$  (●), 0  $\mu\text{g/ml}$  (●) a stoupající koncentraci Pc-PEG. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD),  $n = 0$  pro 10  $\mu\text{g/ml}$ ,  $n = 1$  pro 1  $\mu\text{g/ml}$  a  $n = 1$  pro 0  $\mu\text{g/ml}$ .



Obr. 52: Životaschopnost HeLa buněk při konstantní koncentraci Saporinu 10 μg/ml (●), při 1 μg/ml (●), 0 μg/ml (●) a stoupající koncentraci Pc-PEG. Data jsou vyjádřena jako průměr (SD), n = 0 pro 10 μg/ml, n = 1 pro 1 μg/ml a n = 1 pro 0 μg/ml.

## 8.4 Souhrnná tabulka výsledků toxicity jednotlivých látek po ozáření

Tabulka 1: Stanovení toxicity jednotlivých látek po ozáření. Porovnání přístupů Light-Before, Light-After a všech látek použitých v našich experimentech.

Stanovení toxicity jednotlivých látek po ozáření			
	Light Before	Light After	
Látky	EC <sub>50</sub>	EC <sub>50</sub>	Jednotky
<b>P42</b>	0,067 ± 0,008	0,084 ± 0,009	μM
<b>P44</b>	0,62 ± 0,23	0,27 ± 0,07	μM
<b>Pc-Sugar</b>	1,6 ± 0,2	2,9 ± 0,5	μM
<b>Pc-PEG</b>	3,1 ± 0,4	3,4 ± 0,5	μM
<b>Saporin</b>	> 700	20,49 ± 9,60	μg/ml

## 8.5 Souhrnné tabulky fototoxických experimentů látek v kombinaci

Tabulka 2: Fototoxické experimenty látek v kombinaci. Stanovení účinné koncentrace Saporinu při konstantních koncentracích PS. Porovnání přístupů Light-Before a Light-After.

Fototoxické experimenty látek v kombinaci				
Kombinace látek	Light Before		Light After	Jednotky
	EC <sub>50</sub>		EC <sub>50</sub>	
Konstatní koncentrace PS a účinná koncentrace Saporinu				
<b>P42 0,03 μM + Saporin</b>	0,2146 ± 0,1762		/	μg/ml
<b>P42 0,01 μM + Saporin</b>	> 50		0,36 ± 0,05	μg/ml
<b>P42 0 μM + Saporin</b>	> 700		20,49 ± 9,60	μg/ml
<b>P44 0,3 μM + Saporin</b>	0,57		/	μg/ml
<b>P44 0,2 μM + Saporin</b>	0,40 ± 0,25		/	μg/ml
<b>P44 0,1 μM + Saporin</b>	25,9 ± 25,8		0,63 ± 0,20	μg/ml
<b>P44 0 μM + Saporin</b>	> 700		20,49 ± 9,60	μg/ml
<b>Pc-Sugar 0,5 μM + Saporin</b>	103,7 ± 57,2		0,073 ± 0,027	μg/ml
<b>Pc-Sugar 0 μM + Saporin</b>	> 700		20,49 ± 9,60	μg/ml
<b>Pc-PEG 1 μM + Saporin</b>	59,16 ± 39,69		/	μg/ml
<b>Pc-PEG 0,5 μM + Saporin</b>	> 10		0,81 ± 0,28	μg/ml
<b>Pc-PEG 0 μM + Saporin</b>	> 700		20,49 ± 9,60	μg/ml

Tabulka 3: Fototoxiciční experimenty látek v kombinaci. Stanovení účinné koncentrace PS při konstantních koncentracích Saporinu. Porovnání přístupů Light-Before a Light-After.

Fototoxiciční experimenty látek v kombinaci				
Kombinace látek	Light Before		Light After	Jednotky
	EC <sub>50</sub>		EC <sub>50</sub>	
Konstatní koncentrace Saporinu a účinná koncentrace PS				
Saporin 10 µg/ml + P42	/		0,014 ± 0,006	µM
Saporin 1 µg/ml + P42	0,021 ± 0,005		0,033 ± 0,016	µM
Saporin 0 µg/ml + P42	0,067 ± 0,008		0,084 ± 0,009	µM
Saporin 10 µg/ml + P44	/		0,043 ± 0,015	µM
Saporin 7 µg/ml + P44	/		0,035 ± 0,003	µM
Saporin 5 µg/ml + P44	/		0,044 ± 0,005	µM
Saporin 1 µg/ml + P44	/		0,078 ± 0,008	µM
Saporin 0 µg/ml + P44	/		0,27 ± 0,07	µM
Saporin 10 µg/ml + Pc-Sugar	/		/	/
Saporin 1 µg/ml + Pc-Sugar	1,19		0,3	µM
Saporin 0 µg/ml + Pc-Sugar	1,66		2,9 ± 0,5	µM
Saporin 10 µg/ml + Pc-PEG	/		/	/
Saporin 1 µg/ml + Pc-PEG	2,09		0,7	µM
Saporin 0 µg/ml + Pc-PEG	3,14		3,4 ± 0,5	µM



## 9. DISKUZE

Vzhledem k častému výskytu nádorových onemocnění, vysoké míře recidivy a také toxickým účinkům běžně podávaných léčiv byly vyvinuty neinvazivní formy terapie. PCI je terapeutický přístup, který umožňuje specificky dodávat léčiva do cytosolu nádorových buněk, aniž by ovlivnil zdravé tkáně.

Technika je založena na principech PDT, která je schválená pro nádorové i nenádorové indikace (Madsen, 2016). K vyvolání fotochemické reakce dochází na základě aktivace molekul PS, které absorbují světlo o vlnové délce odpovídající maximu jejich absorpčního spektra (ideálně v červené oblasti). Následkem přenosu energie na  $^3\text{O}_2$  vzniká ROS, především  $^1\text{O}_2$ , který je hlavním produktem fotodynamické reakce typu II. Reakce probíhají uvnitř patologických tkání v oblasti distribuce PS, čímž je zajištěna selektivní destrukce tkáně (Kwiatkowski et al., 2018).

PCI využívá metodu PDT v subletálních dávkách k uvolnění terapeutických látek z endosomů do cytosolu, kde mohou plně využít svůj cytotoxický potenciál. Včasné uvolnění látek z endosomů zabrání jejich natrávení proteolytickými enzymy v lysosomech.

Optimální účinek metody PCI závisí především na použitém PS, který musí mít vhodné fyzikálně-chemické vlastnosti. Amfifilní povaha PS zajistí, že se hydrofobní část molekuly zachytí v lipidové dvouvrstvě membrány endosomu, zatímco polární/nabitá část (např. sulfoskupina) zůstane na rozhraní membrány a vodné části. V případě, že se PS bude lokalizovat pouze ve vnitřním kompartmentu tzn. jeho struktura bude čistě polární, pak bude pro PCI neúčinný (Yaghini et al., 2017). S touto skutečností přispěli Berg et al. při porovnávání vlastností di- a tetrasulfonovaných derivátů tetrafenylporfinu. V provedených experimentech byl účinný pouze amfifilní disulfonovaný derivát, zatímco polárnější symetrický tetrasulfonovaný derivát byl neúčinný (Berg et al., 1999). Při vývoji PS pro klinickou praxi se uplatnily právě tyto úvahy a byl připraven disulfonovaný tetrafenylchlorin. Jeho možné klinické použití při léčbě pacientů s pokročilými či recidivujícími solidními malignitami uvádí ve své studii Sultan et al., za použití léčiva bleomycinu (Sultan et al., 2016).

Některé PS, obvykle klinicky používány pro metody PDT, mohou být pro PCI nevhodné z důvodu lokalizace mezi jiné buněčné organely (např. mitochondrie, Golgiho aparát nebo endoplasmatické retikulum). Přestože se vyznačují dobrou absorpcí světelného záření a vysokým kvantovým výtěžkem ROS, jako je  $^1\text{O}_2$ , jejich umístění není ve stejných kompartmentech buňky (endosomech) jako podané léčivo (Yaghini et al., 2017).

Pro prostředí solidních nádorů je typické nižší pH, které způsobuje kvůli zvýšené protonaci karboxylových skupin změnu lipofility PS. U lipofilní sloučeniny poté dochází k difuzi přes buněčné membrány, zatímco ionizované formy rozpustné ve vodném prostředí jsou přijímány adsorpční endocytózou (Yaghini et al., 2017).

Techniku PCI je možné studovat na mnoha typech nádorových případně i nenádorových buněčných liniích. V případě buněčné linie HeLa je úspěšnost PCI ovlivněna v závislosti na buněčném cyklu, což ve své studii vysvětluje Kim et al., ve které byl použit

TatBim, jakožto konjugát peptidu a PS. Apoptóza byla neúčinněji spuštěna v přechodné fázi G1/S (Kim et al., 2020).

Do buňky lze aplikovat více typů molekul, které mohou být i značně modifikované a zároveň je možné využít různé typy PS, ať již známé z PDT či připravené nové struktury. Právě změnou jejich fyzikálně – chemických vlastností je možné zvýšit účinnost reakce. Některá léčiva a PS je možné v současné době aplikovat i klinicky.

Analýza a hodnocení dat se mohou lišit, a to v závislosti na typu testované buněčné linie, použitého PS a léčiva (např. saporinu nebo bleomycinu). Důsledkem toho je složitější porovnávání různých dat mezi sebou, přestože se jedná o tutéž léčebnou techniku.

Z výše uvedených experimentálních výsledků vyplývá, že u přístupu light-after bylo dosaženo  $EC_{50}$  při nižších koncentracích látek, než u přístupu light-before. Pokud byla v některé kombinaci látek (PS a saporinu) zjištěna nižší koncentrace u přístupu „light-before“, nejednalo se o výrazný rozdíl v porovnání s „light-after“.

Lepších výsledků při postupu „light-after“ oproti „light-before“ dosáhli ve své studii také Berstad et al., kteří se zabývali podáním 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  saporinu, kdy fotochemická aktivace byla vyvolána  $TPCS_{2a}$  a jednalo se o buněčnou linii Zr-75-1 z nádoru prsu. Účinek postupu „light-after“ byl lepší, zatímco postupem „light-before“ byl v jejich studii velmi nízký. Výsledky naznačují, že po fotochemické reakci bylo zabráněno saporinu ve vstupu do cytosolu buňky (Berstad et al., 2012).

$TPCS_{2a}$  byl využit i v klinické léčbě recidivujícího chondroblastického osteosarkomu, jak popisuje Jerjes et al. Pacient v minulosti podstoupil léčbu ve formě chemoterapie, radioterapie a několika velkých chirurgických výkonů. Bohužel, dosavadní léčba nebyla úspěšná. Pacient podstoupil PCI léčbu založenou na dodávání bleomycinu pomocí  $TPCS_{2a}$ . Tři měsíce po léčbě byla odebrána tkáň z více míst. Biopsie potvrdila, že ošetřovaná oblast je již bez sarkomu. Nebyly zaznamenány žádné nežádoucí účinky, kromě bolesti, která odpovídala usmrcení nádorových buněk (Jerjes et al., 2019).

Základním aspektem techniky PCI je, že se podává subletální koncentrace léčiva. Poté je fotochemickou reakcí, za pomoci PS, vyvolán cytotoxický účinek. Pro nás je tedy důležité hodnocení nejen kombinace látek, ale i srovnání účinnosti jednotlivých látek (samotného saporinu a samotné fotosensitivní látky). To se v našich experimentálních výsledcích ukazuje jako významné především u postupu „light-before“, kde by při pouhém použití saporinu byla nutná dávka pro dosažení  $EC_{50}$  daleko vyšší než maximální použitá koncentrace, tedy 700  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Naproti tomu, při kombinaci s P42-1Zn-Me o koncentraci 0,03  $\mu\text{M}$  je možné docílit  $EC_{50} = 0,2146 \pm 0,1762 \mu\text{g}/\text{ml}$  nebo v kombinaci s 0,2  $\mu\text{M}$  P44-COOH je  $EC_{50} = 0,40 \pm 0,25 \mu\text{g}/\text{ml}$ . V případě Pc-Sugar o koncentraci 0,5  $\mu\text{M}$  v kombinaci se saporinem dosahuje  $EC_{50} = 103,7 \pm 57,2 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Zde se jedná o poměrně vysokou hodnotu, ale opět v porovnání s  $EC_{50}$  samotného saporinu ( $EC_{50} > 700 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) se účinnost výrazně zvýšila.

U přístupu „light-after“ vykazoval samotný saporin výrazně vyšší cytotoxicitu a to  $EC_{50} = 20,49 \pm 9,60 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Byly porovnávány hodnoty samotného saporinu v kombinaci s vybraným PS. Z naměřených dat byl nejvýraznější rozdíl v kombinaci s Pc-Sugar o koncentraci 0,5  $\mu\text{M}$ , kde

$EC_{50} = 0,073 \pm 0,027 \mu\text{g/ml}$ . Dále vykazovala účinnost látek v kombinaci lepších výsledků u P42-1Zn-Me o koncentraci  $0,01 \mu\text{M}$ , kde  $EC_{50} = 0,36 \pm 0,05$ . Pokud se jednalo o látky P44-COOH a Pc-PEG, také kombinace těchto látek byla účinnější než samotný PS, ale tento rozdíl nebyl, v porovnání s experimenty bez kombinace, příliš výrazný.

Je tedy otázkou, zda jsou použité koncentrace látek vhodné pro použití v technice PCI nebo se jedná o nevýznamné snížení koncentrací dosahujících  $EC_{50}$ . Z výsledků našich experimentů také vyplývá, že provedení samotné PDT (cytotoxická reakce PS po ozáření) mělo nepatrně nižší účinnost než při PCI, tudíž již PDT přispívá k vyšší účinnosti výsledné PCI a vliv saporinu už není tak výrazný. Při porovnání s technikou PDT nemusí PCI vykazovat výrazně lepší účinnost, přičemž výhoda této techniky spočívá především v použití menších dávek PS, a tedy snížení případné fotosensitivní reakce na kůži, možnost použití v léčbě mnoha typů nádorových i nenádorových onemocnění a jako náhrada za chemoterapeutickou léčbu. PCI je tedy technikou, která má uplatnění především pro dodání léčiva do organismu, a tedy zvýšení jeho účinku. Avšak k tomu, abychom mohli vyvodit závěry o účinnosti kombinací PS a saporinu, bude potřeba provést kombinační experimenty (např. metodika dle Chou-Talalay).

Pro další zvýšení cytotoxického účinku saporinu, v technice PCI, je možné se zabývat také různými typy cílených liposomů. Fretz et al. se ve své studii zabývají aplikací saporinu zapouzdřeného v liposomu na buněčné linii lidského karcinomu vaječnicků po inkubaci s TPPS<sub>2a</sub>. Bylo připraveno několik typů liposomů např. kationtové povahy, které se vyznačují silnou afinitou k negativně nabitým povrchům membrán nebo PEG-liposomy, které cílí na receptor epidermálního růstového faktoru. Výsledky studií ukazují, že některé typy liposomů zvyšují dodávání saporinu. V případě PEG-liposomu obsahujícího saporin byla účinnost srovnatelná s klasickou technikou PCI (Fretz et al., 2007).

Pro techniku PCI a její následný rozvoj jsou klíčové další studie nejen *in vitro*, ale i klinické studie zaměřené na hodnocení účinnosti léčby pro různé typy nádorových buněk v závislosti na použitém PS a konkrétním léčivu. Je vhodné se dále zabývat proteiny ve formě toxinů, ale také jejich možnými modifikacemi, případně nukleovými kyselinami v genové terapii a v neposlední řadě také novými PSs, které by účinně uvolňovaly léčiva z endosomů, aniž by vyvolávaly nežádoucí a vedlejší účinky v organismu pacienta.

## 10. ZÁVĚRY

- Ve všech uváděných datech jsme PCI provedli v nejnižších možných koncentracích nejen pro PS, ale také pro saporin. Snahou bylo vytvořit ideální kombinaci koncentrací těchto látek. Nicméně z grafů je patrné, že ne vždy se jedná o nízkou hodnotu koncentrací. Ovšem v porovnání účinností jednotlivých látek a jejich kombinací jsou často zřetelné rozdíly hodnot.
- Z výsledků provedených experimentů vyplývá, že vyšší účinnosti dosahuje přístup „light-after“. Přičemž nejvýraznější rozdíly byly zaznamenány u Pc-Sugar o konstantní koncentraci 0,5  $\mu\text{M}$  v kombinaci se saporinem o stoupající koncentraci. Avšak v rámci hodnocení musíme výsledné hodnoty posuzovat v porovnání s PDT (toxicita vyvolaná ozářením PS). Tím bylo zjištěno, že technika PCI byla pravděpodobně jen zanedbatelně účinnější než PDT, tudíž reakce PDT měla významný vliv na výsledné PCI. K potvrzení je však potřeba dalších experimentů.
- Z našich dat je patrné, že samostatně podaný saporin příliš nesnižuje životaschopnost testované linie, přestože byl aplikován v poměrně vysoké koncentraci. U postupu „light-after“ odpovídala hodnota  $EC_{50} = 20,49 \pm 9,60 \mu\text{g/ml}$  a u postupu „light-before“ nebylo možné hodnoty  $EC_{50}$  dosáhnout ani při nejvyšší použité koncentraci 700  $\mu\text{g/ml}$ . Lze tedy říci, že aplikace samotného saporinu není dostatečná a je tedy vhodné pro toto léčivo zprostředkovat účinné uvolnění za pomoci PS. To je možné pozorovat z výsledků obou typů prováděných postupů.

## 11. POUŽITÉ ZKRATKY

AlPcS2 – ftalocyanin disulfonát hlinitý

DMEM – Dulbecco's modified Eagle's medium, základní kultivační médium

DNA – deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina

EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid, ethylendiamintetraoctová kyselina

FBS – fetal bovine serum, fetální bovinní sérum

HEPES – N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid,  
N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina

OH• – hydroxylový radikál

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

MAPK – mitogen activated protein kinase, mitogenem aktivované proteinkinázy

NR – neutral red, neutrální červeň

O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> - superoxid anion radikál

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

<sup>3</sup>O<sub>2</sub> – molekulární kyslík

PBS – phosphate buffered saline, pufr

PCI – photochemical internalization, fotochemická internalizace

PDT – photodynamic therapy, fotodynamická terapie

PS – photosensitizer, fotosenzitizér

P/S – směs Penicilin/Streptomycin

RIP – ribosome inactivating protein, protein inaktivující ribozomy

ROS – reactive oxygen species, reaktivní formy kyslíku

SCM - serum containing medium, sérové kultivační médium

TPCS<sub>2a</sub> – meso-tetraphenyl chlorin disulphonate, meso-tetrafenylchlorindisulfonát

TPPS<sub>2a</sub> – tetraphenyl porfin disulphonate, tetrafenylporfindisulfonát

## 12. POUŽITÁ LITERATURA

- ADEY A., BURTON JN., KITZMAN JO., HIATT JB., LEWIS AP., MARTIN BK., QIU R., LEE C., SHENDURE J.: The haplotype-resolved genome and epigenome of the aneuploid HeLa cancer cell line. *Nature*. 2013; 500(7461):207-11. doi: 10.1038/nature12064
- ADIGBLI DK., MACROBERT AJ.: Photochemical internalisation: The journey from basic scientific concept to the threshold of clinical application. *Curr Opin Pharmacol*. 2012; 12(4):434-8. doi: 10.1016/j.coph.2012.04.005
- AGOSTINIS P., BERG K., CENGEL KA., FOSTER TH., GIROTTI AW., GOLLNICK SO., HAHN SM., HAMBLIN MR., JUZENIENE A., KESSEL D., KORBELIK M., MOAN J., MROZ P., NOWIS D., PIETTE J., WILSON BC., GOLAB J.: Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin*. 2011; 61(4):250-81. doi: 10.3322/caac.2011
- ANIOGO EC., PLACKAL ADIMURIYIL GEORGE B., ABRAHAMSE H.: The role of photodynamic therapy on multidrug resistant breast cancer. *Cancer Cell Int*. 2019; 19:91. doi: 10.1186/s12935-019-0815-0. eCollection 2019
- ARSLAN I., AKGUL H., KARA M.: Saporin, a olynucleotide-Adenosine Nucleosidase, May Be an Efficacious Therapeutic Agent for SARS-CoV-2 Infection. *SLAS Discov*. 2021; 26(3):330-335. doi: 10.1177/2472555220970911
- BERG K., SELBO PK., PRASMICKAITE L., TJELLE TE., SANDVIG K., MOAN J., GAUDERNACK G., FODSTAD O., KJØLSRUD S., ANHOLT H., RODAL GH., RODAL SK., HØGSET A.: Photochemical internalization: a novel technology for delivery of macromolecules into cytosol. *Cancer Res*; 1999 Mar 15;59(6):1180-3
- BERSTAD MB., WEYERANG A., BERG K.: Photochemical internalization (PCI) of HER2-targeted toxins: synergy is dependent on the treatment sequence. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1820(12):1849-58. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.08.027
- BOUR A., KRUGLIK SG., CHABANON M., RANGAMANI P., PUFF N., BONNEAU S.: Lipid unsaturation properties govern the sensitivity of membranes to photoinduced oxidative stress. *Biophys. J*. 2019; 116:910–920. doi: 10.1016/j.bpj.2019.01.033
- CHOU TC.: Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res*. 2010; 70(2):440-6. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1947
- DEROSA MC., CRUTCHLEY RJ.: Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord. Chem. Rev*. 2002; 233–234 :351–371. doi: 10.1016/S0010-8545(02)00034-6
- FRETZ MM., HØGSET A., KONING GA., JISKOOT W., STORM G.: Cytosolic delivery of liposomally targeted proteins induced by photochemical internalization. *Pharm Res*. 2007; 24(11):2040-7. doi: 10.1007/s11095-007-9338-9
- GUNAYDIN G., GEDIK ME., AYAN S.: Photodynamic therapy-current limitations and novel approaches. *Front Chem*. 2021; 9:691697. doi: 10.3389/fchem.2021.691697
- GIANSANTI F., FLAVELL DJ., ANGELUCCI F., FABBRINI MS., IPPOLITI R.: Strategies to improve the clinical utility of saporin-based targeted toxins. *Toxins (Basel)*. 2018; 13;10(2):82. doi: 10.3390/toxins10020082

- HU YB., DAMMER EB., REN RJ., WANG G.: The endosomal-lysosomal system: From acidification and cargo sorting to neurodegeneration. *Transl. Neurodegener.* 2015; 4:18. doi: 10.1186/s40035-015-0041-1
- JANAS K., BONIEWSKA-BERNACKA E., DYRDA G., SLOTA R.: Porphyrin and phthalocyanine photosensitizers designed for targeted photodynamic therapy of colorectal cancer. *Bioorg Med Chem.* 2021;30:115926. doi: 10.1016/j.bmc.2020.115926
- JERJES W., UPILE T., HAMDOON Z., NHEMBE F., BHANDARI R., MACKAY S., SHAH P., MOSSE CA., BROOKES JA., MORLEY S., HOPPER C.: Ultrasound-guided photodynamic therapy for deep seated pathologies: Prospective study. *Lasers Surg. Med.* 2009; 41:612–621. doi: 10.1002/lsm.20853
- JERJES W., HAMDOON Z., BERG K., HØGSET A., HOPPER C.: Recurrent chondroblastic osteosarcoma of the right mandible subjected to photochemical internalization. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019; 27:288-290 doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.06.018
- JERJES W., THEODOSSIOU TA., HIRSCHBERG H., HØGSET A., WEYERGANG A., SELBO PK., HAMDOON Z., HOPPER C., BERG K.: Photochemical Internalization for Intracellular Drug Delivery. From Basic Mechanisms to Clinical Research. *J Clin Med.* 2020; 9(2):528. doi: 10.3390/jcm9020528
- KERDOUS R., HEUVINGH J., BONNEAU S.: Photo-dynamic induction of oxidative stress within cholesterol-containing membranes: Shape transitions and permeabilization. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011; 1808:2965–2972. doi: 10.1016/j.bbamem.2011.08.002
- KIM H., WATANABE S., KITAMATSU M., WATANABE K., OHTSUKI T.: Cell cycle dependence of apoptosis photo-triggered using peptide-photosensitizer conjugate. *Sci Rep.* 2020; 10(1):19087. doi: 10.1038/s41598-020-76100-7
- KWIATKOVSKI S., KNAP B., PRZYSTUPSKI D., SACZKO J., KEDZIERSKA E., KNAP - CZOP K., KOTLIŃSKA J., MICHEL O., KOTOWSKI K., KULBACKA J.: Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed Pharmacother.* 2018; 106:1098-1107. doi: 10.1016/j.biopha.2018.07.049
- LANDRY JJM., PYL PT., RAUSCH T., ZICHNER T., TEKKEDIL MM., STÜTZ AM., JAUCH A., AIYAR RS., PAU G., DELHOMME N., GAGNEUR J., KORBEL JO., HUBER W., STEINMETZ LM.: The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. *G3 (Bethesda).* 2013; 3(8):1213-24. doi: 10.1534/g3.113.005777
- LEE CHN., HSU R., CHEN H., WONG TW.: Daylight Photodynamic Therapy: An Update. *Molecules.* 2020; 25(21):5195. doi: 10.3390/molecules25215195
- LIM SW., LOH HS., TING KN., BRADSHAW TD., ALLAUDIN ZN.: Reduction of MTT to purple formazan by vitamin E isomers in the absence of cells. *Trop Life Sci Res.* 2015; 26(1):111-20.
- LLOYD JB.: Lysosome membrane permeability: implications for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 30; 2000;41(2):189-200. doi: 10.1016/s0169-409x(99)00065-4
- LU HL., SYU WJ., NISHIVAMA N., KATAOKA K., LAI PS.: Dendrimer phthalocyanine-encapsulated polymeric micelle-mediated photochemical internalization extends the efficacy of photodynamic therapy and overcomes drug-resistance in vivo. *J Control Release.* 2011; 155(3):458-64. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.06.005

- MADSEN S.: Photochemical internalisation for solid malignancies. *Lancet Oncol.* 2016; 17(9):1173-4. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30274-1
- MARTINEZ DE PINILLOS BAYONA A., MOORE CM., LOIZIDOU M., MACROBERT AJ., WOODHAMS JH.: Enhancing the efficacy of cytotoxic agents for cancer therapy using photochemical internalisation. *Int J Cancer.* 2016; 1; 138(5): 1049–1057. doi: 10.1002/ijc.29510
- MARTÍNEZ-JOTHAR L., BEZTSINNA N., F VAN NOSTRUM C., E HENNINK W., OLIVEIRA S.: Selective Cytotoxicity to HER2 Positive Breast Cancer Cells by Saporin-Loaded Nanobody-Targeted Polymeric Nanoparticles in Combination with Photochemical Internalization. *Mol Pharm.* 2019; 1;16(4):1633-1647. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b01318
- MATHEWS MS., BLICKENSTAFF JW., SHIH EC., ZAMORA G., VO V., SUN CH., HIRSCHBERG H., MADSEN SJ.: Photochemical internalization of bleomycin for glioma treatment. *J Biomed Opt.* 2012; 17(5):058001. doi: 10.1117/1.JBO.17.5.058001
- MIYOSHI Y., KADONO M., OKAZAKI S., NISHIMURA A., KITAMATSU M., WATANABLE K., OHTSUKI T.: Endosomal escape of peptide-photosensitizer conjugates is affected by amino acid sequences near the photosensitizer. *Bioconjug. Chem.* 2020; 31 :916-922. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.0c00046
- MUNIYANDI K., GEORGE B., PARIMELAZHAGAN T., ABRAHAMSE H.: Role of Photoactive Phytocompounds in Photodynamic Therapy of Cancer. *Molecules.* 2020; 8;25(18):4102. doi: 10.3390/molecules25184102
- NABLO BJ., AHN JJ., BHADRIRAJU K., LEE JM., REYES DR.: Lens-free imaging as a sensor for dynamic cell viability detection using the neutral red uptake assay. *ACS Appl Bio Mater.* 2020; 3(10):10.1021/acsabm.0c01082. doi: 10.1021/acsabm.0c01082
- NORUM OJ., GAUSTAD JV., ANGELL-PETERSEN E., ROFSTAD EK., PENG Q., GIERCKSKY KE., BERG K.: Photochemical internalization of bleomycin is superior to photodynamic therapy due to the therapeutic effect in the tumor periphery. *Photochem Photobiol.* 2009;85(3):740-9. doi: 10.1111/j.1751-1097.2008.00477
- ODEGARD AL., KWAN MH., WALUKIEWICZ HE., BANERJEE M., SCHNEEMANN A., JOHNSON JE.: Low endocytic pH and capsid protein autocleavage are critical components of flock house virus cell entry. *J. Virol.* 2009; 83:8628–8637. doi: 10.1128/JVI.00873-09
- PRASMICKAITE L., HØGSET A., SELBO PK., ENGESAETER BØ., HELLUM M., BERG K.: Photochemical disruption of endocytic vesicles before delivery of drugs: a new strategy for cancer therapy. *Br J Cancer.* 2002; 86(4): 652–657. doi: 10.1038/sj.bjc.6600138
- SELBO PK., WEYERANG A., HØGSET A., NORUM OJ., BERSTAD MB., VIKDAL M., BERG K.: Photochemical internalization provides time- and space-controlled endolysosomal escape of therapeutic molecules. *J Control Release.* 2010; 20;148(1):2-12. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.06.008
- SHIN D., NGUYEN L., LE MT., JU D., LE JN., BERG K., HIRSCHBERG H.: The effects of low irradiance long duration photochemical internalization on glioma spheroids. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019 Jun;26:442-447. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.05.005



SOE TH., WATANABE K., OHTSUKI T.: Photoinduced Endosomal Escape Mechanism: A View from Photochemical Internalization Mediated by CPP-Photosensitizer Conjugates. *Molecules*. 2020; Dec 23;26(1):36. doi: 10.3390/molecules26010036

SULTAN AA., JERJES W., BERG K., HØGSET A., MOSSE CA., HAMOUDI R., HAMDOON Z., SIMEON C., CARNELL D., FORSTER M., HOPPER C.: Disulfonated tetraphenyl chlorin (TPCS2a)-induced photochemical internalisation of bleomycin in patients with solid malignancies: a phase 1, dose-escalation, first-in-man trial

ŠOŠIĆ L., SELBO PK., KOTKOWSKA ZK., KÜNDIG TM., HØGSET A., JOHANSEN P.: Photochemical Internalization: Light Paves Way for New Cancer Chemotherapies and Vaccines. *Cancers (Basel)*. 2020 Jan 9;12(1):165. doi: 10.3390/cancers12010165

WANG X., LUO D., BASILION JP.: Photodynamic Therapy: Targeting Cancer Biomarkers for the Treatment of Cancers. *Cancers (Basel)*. 2021; 15;13(12):2992. doi: 10.3390/cancers13122992

WENG A., BACHRAN C., FUCHS H., MELZIG MF.: Soapwort saponins trigger clathrin-mediated endocytosis of saporin, a type I ribosome-inactivating protein. *Chem Biol Interact*. 2008; 25;176(2-3):204-11. doi: 10.1016/j.cbi.2008.08.004

WEYERGANG A., SELBO PK., BERSTAD AEB., BOSTAD M., BERG K.: Photochemical internalization of tumor-targeted protein toxins. *Lasers Surg Med*. 2011 Sep;43(7):721-33. doi: 10.1002/lsm.21084

YAGHINI E., DONDI R., TEWARI KM., LOIZIDOU M., EGGLESTON IM., MACROBERT AJ.: Endolysosomal targeting of a clinical chlorin photosensitizer for light-triggered delivery of nano-sized medicines. *Sci Rep*; 2017 Jul 20;7(1):6059. doi: 10.1038/s41598-017-06109-y

ZHANG J., JIANG C., FIGUEIRÓ LONGO JP., AZEVEDO RB., ZHANG H., MUEHLMANN LA.: An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. *Acta Pharm Sin B*. 2018; 8(2):137-146. doi: 10.1016/j.apsb.2017.09.003