

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Mgr. Marie Halašková

Školitel: RNDr. Miloslav Macháček, Ph.D.

Název disertační práce: Studium originálních ftalocyaninových fotosensitizerů na buněčné úrovni

Fotodynamická terapie (PDT) je léčebná metoda, která v posledních desetiletích zaznamenala velký pokrok a používá se k léčbě řady onemocnění a poruch jako jsou například věkem podmíněná makulární degenerace, psoriáza či některé druhy nádorových onemocnění. PDT je založena na kombinaci tří základních složek: léčiva citlivého na světlo (známé jako fotosensitizer, PS), světla o vhodné vlnové délce a kyslíku. Světlem aktivovaný PS reaguje s molekulárním kyslíkem za vzniku reaktivních forem kyslíku, jež v biologickém prostředí interagují s buněčnými složkami a spouštějí kaskádu reakcí, které způsobují biochemické poškození buňky, cévního systému nádoru a indukci lokální zánětlivé reakce. Výsledkem je významné narušení homeostázy buňky vedoucí k procesu buněčné smrti.

Jako všechny nově navržené způsoby léčby, i v této oblasti je stále zapotřebí další výzkum, včetně vývoje a optimalizace syntézy nových PS pro zvýšení účinnosti terapie a zároveň minimalizace vedlejších účinků. V této práci jsme se rozhodli provést rozsáhlé studium vlastností několika různých PS ze skupiny ftalocyaninů (Pc) a jejich aza-analogů (AzaPc). Pc se vyznačují velmi dobrými fotofyzikálními vlastnostmi, zejména silnou absorpcí v oblasti 650-750 nm a silnou produkcí singletového kyslíku. Tyto sloučeniny představují velmi nadějnou skupinu PS vhodnou pro použití v PDT, nicméně jejich potenciální využití v PDT mnohdy omezuje jejich nízká rozpustnost ve vodě a silná tendence k agregaci.

V naší práci jsme se zaměřili na sledování fotodynamické aktivity a vlastností Pc nesoucích rozdílné náboje periferních substituentů. U série anionických a kationických Pc (hydrofilních i amfifilních) byly charakterizovány jejich fotofyzikální vlastnosti, a byly hodnoceny z hlediska fotodynamické aktivity v podmínkách *in vitro* na nádorových i nenádorových buněčných liniích. Všechny studované deriváty vykazovaly minimální toxicitu

bez ozáření, a zároveň vysokou toxicitu po aktivaci světlem o vhodné vlnové délce (v řádu desítek nM). Byla sledována jejich rozpustnost a agregace ve vodném prostředí, vliv změny pH prostředí, vazba na sérové proteiny, interakce s biologickými membránami a liposomy, subcelulární lokalizace i následná relokalizace po ozáření, a také morfologické změny a typ buněčné smrti.

Primárním místem lokalizace všech Pc v buňkách byl endolyzozomální kompartment, který značně ovlivňoval aktivitu anionických derivátů. Při pH 4.9, které je typické pro intralyzozomální prostředí, byly všechny anionické deriváty agregovány, zatímco kationické deriváty nebyly touto změnou pH ovlivněny. Aktivita anionických sloučenin byla také silně potlačena jejich vazbou na sérové proteiny (zejména albumin) vedoucí ke zhášení excitovaných stavů PS a snížené tvorbě singletového kyslíku. Po aktivaci kationických derivátů dochází kvůli narušení membrány k jejich rychlému uvolnění z lyzozomů a následné relokalizaci do cytoplazmy. Tento efekt byl silnější u hydrofilních sloučenin, které byly po uvolnění z lyzozomů rozptýleny volně v cytoplazmě, na rozdíl od amfifilních Pc lokalizovaných primárně ve zbytcích membránových struktur. Masivní oxidativní stres po aktivaci Pc vedl k závažným morfologickým změnám (kondenzace jaderného chromatinu, zkrácení a zakulacení mitochondrií, reorganizace cytoskeletu) a k indukci nekrotické či apoptotické buněčné smrti se sekundární nekrotizací.

Celkové srovnání získaných výsledků potvrzuje významně nižší fotodynamickou aktivitu všech anionických Pc v porovnání s kationickými, za což jsou zodpovědné především nižší pH v lyzozomálním kompartmentu a vazba na albumin. Dále bylo prokázáno, že objemné a rigidní kationické substituenty na periférii (Aza)Pc účinně inhibují agregaci, a také že zvětšování nepolárních substituentů na lipofilní části molekuly amfifilních (Aza)Pc nezlepšuje jejich uchycení do lipidové dvojvrstvy, v porovnání s deriváty s neobjemnými substituenty vstupujícími do membrán téměř okamžitě. Díky tomu jsou tyto PS vhodné pro potenciální využití při světlem spouštěném uvolňování látek z liposomů.