

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

STUDIUM ORIGINÁLNÍCH  
FTALOCYANINOVÝCH FOTOSENSITIZÉRŮ  
NA BUNĚČNÉ ÚROVNI

Disertační práce

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

Hradec Králové 2023

Mgr. Marie Halašková

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala především svému školiteli RNDr. Miloslavu Macháčkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky během celého mého doktorského studia, a především za čas a trpělivost, které mi věnoval. Velké díky patří také prof. PharmDr. Petru Zimčíkovi, Ph.D. a všem členům a kolegům z naší vědecké skupiny (především pak PharmDr. Janu Kollárovi, Ph.D, Mgr. Magdaléně Kozlíkové, RNDr. Monice Rohlíčkové, Bc. Ingrid Hlbočanové, doc. PharmDr. Veronice Novákové, Ph.D., Mgr. Michaele Kolářové, Mgr. Lucii Kočiščíkové a PharmDr. Jířímu Demuthovi, Ph.D.), jak na Katedře biochemických věd, tak na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv za jejich pomoc, spolupráci a přátelský přístup. Děkuji také všem členům z Katedry biochemických věd za jejich pomoc a vytvoření příjemného pracovního prostředí v laboratořích. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za veškerou podporu v průběhu celého doktorského studia. Děkuji také grantovým agenturám za finanční podporu - tato práce vznikla za finanční podpory těchto grantů a projektů: GAUK 1620219, GAČR 19-14758Y, GAČR 20-09212S a projekt START č. CZ.02.2.69/0.0/0.0/19\_073/0016935 a GAUK 1312220.

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 řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne .....

.....

Podpis

## 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 fotosenzitizérů 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 fotosenzitizér, 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 endolyzosomální kompartment, který značně ovlivňoval aktivitu anionických derivátů. Při pH 4.9, které je typické pro intralyzosomální 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 lyzosomů a následné relokalizaci do cytoplazmy. Tento efekt byl silnější u hydrofilních sloučenin, které byly po uvolnění z lyzosomů 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 nekrózou.

Celkové srovnání získaných výsledků potvrzuje významně nižší fotodynamickou aktivitu všech anionických Pc v porovnání s kationickými, za což jsou zodpovědné především nižší pH v lyzosomálním kompartmentu a vazba na albumin. Dále bylo prokázáno, že objemné a rigidní kationické substituenty na periferii (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.

## ABSTRACT

Charles University  
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové  
Department of Biochemical Sciences

**Candidate:** Mgr. Marie Halašková  
**Supervisor:** RNDr. Miloslav Macháček, Ph.D.  
**Title of disertatation thesis:** Study of novel phthalocyanine photosensitizers on cellular level

Photodynamic therapy (PDT) is a clinically approved treatment modality that experienced great progress over the last two decades and that has been used in the treatment of several disorders, including age-related macular degeneration, psoriasis and certain cancers. PDT is based on the combination of three main components: light-sensitive drug (known as a photosensitizer, PS), light of an appropriate wavelength, and oxygen. The light-activated PS reacts with molecular oxygen to produce reactive oxygen species, which can interact with cellular components in a biological environment and trigger a cascade of reactions causing destruction of tumor cells, tumor vasculature and induction of a local inflammatory reaction. The result is a disruption of cell homeostasis leading to the cell death.

Like all the novel treatment modalities, further research is still needed including the development and optimization of PS synthesis in order to increase the efficiency of therapy and minimize side effects. In this project, we decided to carry out an extensive study of the properties of several different PSs from the group of phthalocyanines (Pc) and their aza-analogues (AzaPc). Pcs are characterized by exceptionally good photophysical properties, especially strong absorption in 650-750 nm area and strong singlet oxygen production. These compounds represent a very promising group of PSs suitable for the use in PDT, however their potential application in PDT is often limited by their low solubility in water and strong tendency to aggregate.

In our work, we focused on the evaluation the photodynamic activity and properties of Pcs bearing different charges on a peripheral substituents. The photophysical properties were characterized on a series of anionic and cationic Pcs (hydrophilic and

amphiphilic) and they were studied in terms of photodynamic activity under *in vitro* conditions on malignant and nonmalignant cell lines. All studied derivatives showed minimal toxicity without irradiation and high toxicity upon irradiation (in the order of tens of nM). Solubility and aggregation in the water, effect of pH, binding to serum proteins, interaction with biomembranes and liposomes, subcellular localization and subsequent re-localization after irradiation, as well as morphological changes and the type of cell death were determined for all Pcs.

The subcellular localization of all Pcs was the endolysosomal compartment, which greatly influenced the activity of anionic derivatives. All anionic derivatives were aggregated at pH 4.9 (intralysosomal pH) while all cationic derivatives were not affected by this pH change. The activity of anionic compounds was also strongly suppressed by their binding to serum proteins (predominantly albumin) leading to excited states quenching and decrease of singlet oxygen production. After irradiation, cationic derivatives were rapidly released from lysosomes due to membrane rupture and subsequently relocated to the cytoplasm. The effect seemed to be stronger for hydrophilic compounds that were diffused in cytoplasm after the release from lysosomes, while amphiphilic compounds were localized primarily in the residues of membranous structures. The massive oxidative stress after the activation of Pcs led to severe morphological changes (*e.g.*, condensation of nuclear chromatin, shortening and rounding of mitochondria, reorganization of the cytoskeleton) and to the induction of necrotic or apoptotic cell death with secondary necrosis.

Based on all obtained results, a lower pH in the lysosomal compartment and binding to albumin were responsible for a substantially lower photodynamic activity of anionic Pcs compared to the cationic ones. Furthermore, this work demonstrated that an efficient bulky and rigid arrangement of peripheral cationic substituents efficiently inhibits aggregation, and that increased bulkiness of non-polar substituents on lipophilic part of the molecule of amphiphilic (Aza)Pcs does not improve anchoring into lipid bilayer compared to derivatives with non-bulky substituents that enter membranes almost immediately. Therefore, these PSs have a significant potential in light-triggered drug release from liposomes.

## OBSAH

1 Úvod.....	10
2 Seznam zkratk .....	12
3 Přehled současného stavu řešené problematiky .....	15
3.1 Úvod do fotodynamické terapie .....	16
3.2 Stručná historie fotodynamické terapie.....	17
3.3 Mechanismus fotodynamické terapie.....	18
3.4 Mechanismy buněčné smrti.....	20
3.4.1 Autofagie.....	21
3.4.2 Apoptóza .....	22
3.4.3 Nekróza .....	25
3.4.4 Parthanatos .....	26
3.5 Světlo, kyslík a fotosensitizéry .....	27
3.5.1 Světlo .....	27
3.5.2 Kyslík.....	28
3.5.3 Fotosensitizéry .....	29
3.6 Výhody a omezení.....	32
3.7 Účinky PDT na nádory .....	33
3.7.1 Vliv na nádorové buňky .....	33
3.7.2 Vliv na cévní systém.....	34
3.7.3 Vliv na imunitní systém.....	35
3.8 Fotodynamická terapie v klinické praxi.....	36
4 Cíle práce.....	38
5 Komentáře k pracím .....	40
5.1 Vliv náboje u kationických a anionických ftalocyaninů na jejich fotodynamický účinek.....	42



5.2 Periferně substituované kationické ftalocyaniny jako účinné fotosensitizéry .....	46
5.3 Amfifilní kationické ftalocyaniny pro fotodynamickou terapii nádorů ..	49
5.4 Světlem vyvolané uvolňování látek z liposomů.....	52
6 Souhrnná diskuze .....	54
7 Závěry.....	73
8 Podíl předkladatele na publikacích zahrnutých v disertační práci .....	76
9 Seznam použité literatury .....	79
10 Přehled publikací zahrnutých v disertační práci .....	96
11 Prezentace na konferencích .....	98
12 Přílohy .....	100
12.1 Publikace I.....	101
12.2 Publikace II .....	102
12.3 Publikace III .....	103
12.4 Publikace IV.....	104

## **1 ÚVOD**

Nádorová onemocnění jsou celosvětovým zdravotním problémem a onemocněním s největším dopadem na globální zdraví (dos Santos et al., 2019). Podle WHO jsou nádory celosvětově hlavní příčinou úmrtí a v roce 2020 měla na svědomí téměř 10 milionů úmrtí (Ferlay et al., 2021). Standardní léčebné metody, jako jsou chirurgie, radioterapie a chemoterapie, prokázaly v posledních letech relativně dobrý terapeutický úspěch u různých druhů nádorů. Nicméně, některé problémy, jako jsou rezistentní nádorové buňky, recidiva nebo metastázy, nebyly stále překonány a u mnoha běžných druhů nádorových onemocnění jsou zodpovědné za výskyt závažných nežádoucích účinků (Algorri et al., 2021; Hamblin, 2020). To lze vysvětlit heterogenitou a genetickou složitostí populace nádorových buněk. Tyto překážky vyžadují neustálé hledání nových, bezpečnějších a účinnějších terapeutických přístupů nezbytných pro budoucí léčbu těchto onemocnění.

S rostoucími znalostmi o karcinogenezi, progresi a mechanismech šíření nádorů se podařilo navrhnout a vyvinout několik alternativních terapeutických strategií, jako jsou např. inhibitory angiogeneze, aktivní cílení cytotoxických léčiv, genová terapie, imunoterapie nebo právě PDT (Bergh, 2009; Coventry & Ashdown, 2012). Jde o nekonvenční terapeutickou metodou pro solidní nádory, jejíž koncept je založen na vzájemné dynamické interakci mezi molekulou PS, světlem o specifické vlnové délce a molekulárním kyslíkem ( $^3\text{O}_2$ ). Oproti standardní léčbě poskytuje PDT určité výhody, kterými jsou: selektivita (díky aplikaci světla pouze na léčené místo v těle a vyšší koncentraci PS v nádorových buňkách), PDT nezpůsobuje poškození DNA ani struktur pojivové tkáně, umožňuje opakované léčby a mimo jiné i aktivuje imunologickou odpověď. Účinnost těchto mechanismů závisí na mnoha faktorech - jako jsou mimo jiné typ PS, typ buněk, celková dávka světla a stav okysličení nádoru (Algorri et al., 2021).

Ve srovnání s jinými konvenčními onkologickými technikami má PDT značné výhody, kterými jsou zejména minimální invazivita, dobré kosmetické výsledky a schopnost stimulace imunitního systému. Přestože je tato metoda klinicky schválená, širokého použití PDT nebylo zatím dosaženo, a to především díky omezené účinnosti a neschopnosti světla pronikat do hlubších tkání a prodloužené kožní fotosensitivitě. V současné době je tedy věnována značná pozornost v oblasti vývoje nových PS navržených tak, aby co nejvíce odpovídaly vlastnostem ideálního PS (Rocha, 2015; Vidujith et al., 2022).

## 2 SEZNAM ZKRATEK

$\cdot\text{O}_2^-$	superoxid anion radikál
$\cdot\text{OH}$	hydroxylový radikál
$^1\text{O}_2$	singletový kyslík
$^3\text{O}_2$	molekulární kyslík
AIF	faktor indukující apoptózu ( <i>apoptosis inducing factor</i> )
AK	aktinická keratóza
ALA	5-aminolevulová kyselina ( <i>aminolevulinic acid</i> )
AlOHPC	hydroxyhlinitý Pc
AMD	věkem podmíněná makulární degenerace ( <i>age-related macular degeneration</i> )
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
ATG	<i>autophagy related genes</i>
ATP	adenosintrifosfát
AzaPc	azaftalocyanin
BCC	bazocelulární karcinom
BO	bazická oranž 14
BSA	bovinní sérový albumin
DAMPs	<i>damage-associated molecular patterns</i>
DISC	<i>death-inducing signaling complex</i>
DLI	<i>drug-to-light interval</i>
DOPC	dioloylfosfatidylcholin
DOX	doxorubicin
EC <sub>50</sub>	střední efektivní (terapeutická) koncentrace

EndoG	endonukleasa G
ER	endoplazmatické retikulum
EYPC	fosfatidylcholin získaný z vaječného žloutku
FADD	Fas-asociovaný protein s doménou smrti ( <i>FAS-associated death domain protein</i> )
GA	Golgiho aparát
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxid vodíku
HpD	derivát hematoporfyrinu ( <i>hematoporphyrin derivative</i> )
LDL	lipoproteiny s nízkou hustotou ( <i>low density lipoproteins</i> )
LED	světlo emitující diody ( <i>light emitting diodes</i> )
MOMP	permeabilizace vnější mitochondriální membrány ( <i>mitochondrial outer membrane permeabilization</i> )
mTHPC	<i>m</i> -tetra(hydroxyfenyl)chlorin, temoporfin
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NIR	blízká infračervená oblast světla ( <i>near infrared</i> )
OH <sup>-</sup>	hydroxylový aniont
PAR	poly(ADP-ribosa)
PARP	poly(ADP-riboso)polymerasa I
Pc	ftalocyanin ( <i>phtalocyanine</i> )
PCD	programovaná buněčná smrt ( <i>programmed cell death</i> )
PD	Parkinsonova choroba ( <i>Parkinson's disease</i> )
PDT	fotodynamická terapie ( <i>photodynamic therapy</i> )
PI	jodid propidia ( <i>propidium iodide</i> )
PpIX	protoporfyrin IX

PS	fotosenzitizér ( <i>photosensitizer</i> )
PS*	excitovaný stav PS
ROS	reaktivní formy kyslíku ( <i>reactive oxygen species</i> )
SCC	spinoocelulární karcinom ( <i>squamous cell carcinoma</i> )
SCM	kultivační médium obsahující sérum a další suplementy ( <i>serum containing medium</i> )
SFM	kultivační médium bez obsahu séra ( <i>serum-free medium</i> )
SOD	superoxid dismutasa
TAA <sub>s</sub>	antigeny spojené s nádorem ( <i>tumor-associated antigens</i> )
TC <sub>50</sub>	střední toxická koncentrace
TNF	tumor nekrotizující faktor
TPyzPz	tetrapyrazinoporphyrazin
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor ( <i>vascular endothelial growth factor</i> )
VTP	fotodynamická terapie cílená na cévy ( <i>vascular-targeted PDT</i> )
ZnPc	zinečnatý ftalocyanin
$\Phi_T$	kvantový výtěžek excitovaného tripletového stavu
$\Phi_\Delta$	kvantový výtěžek singletového kyslíku
$\tau_T$	doba života excitovaného tripletového stavu

### **3 PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY**

### 3.1 ÚVOD DO FOTODYNAMICKÉ TERAPIE

Fotodynamická terapie (PDT) přitahuje v posledních letech rozsáhlou pozornost jako minimálně invazivní a vysoce selektivní terapeutická metoda schválená především pro léčbu neoplastických a vaskulárních onemocnění. PDT se běžně používá při léčbě řady nádorových onemocnění jako jsou nádory hlavy a krku, plic, močového měchýře a karcinomů kůže. Úspěšně se také používá v léčbě nenádorových stavů jako je věkem podmíněná makulární degenerace (AMD), psoriáza, ateroskleróza, a prokázala také určitou účinnost při antivirové léčbě herpetických infekcí HSV1 a 2 (*herpes genitalis*, keratitida) či HHV8 (spojený s Kaposiho sarkomem), a infekcí HPV (papilomatóza laryngu). Je složena ze tří základních složek: fotosensitizer (PS; podávaný systémově nebo topicky), světlo (obvykle ve viditelné oblasti, běžně generované laserovými zdroji) a  $^3\text{O}_2$ , který při fotodynamické reakci generuje singletový kyslík ( $^1\text{O}_2$ ) a další vysoce reaktivní formy kyslíku (ROS) (Josefsen & Boyle, 2008; Nowis et al., 2005; Zhang & Li, 2018).

Princip PDT je založen na podání PS v nepřítomnosti světla. Jakmile je dosaženo optimálního poměru PS v nemocné versus zdravé tkáni, následuje aktivace PS vystavením přesně regulované dávce světla, které je cílené přímo na léčenou tkáň. Dávka světla by měla být regulována tak, aby umožnila dodání dostatečného množství energie k aktivaci PS, ale zároveň by tato dávka měla být dostatečně nízká, aby se minimalizovalo poškození okolní zdravé tkáně. Úspěšná léčba PDT spočívá v prodloužené akumulaci PS v nemocné tkáni ve srovnání s rychlejším odstraňováním z normálních zdravých buněk (Josefsen & Boyle, 2008). Podmínkou pro zahájení fotochemické reakce je korelace emisního pásu světelného zdroje s absorpčním pásem PS. PS může být lokalizován v mitochondriích, lyzosomech, endoplazmatickém retikulu (ER), Golgiho aparátu (GA) a plazmatické membráně (Ostańska et al., 2021). Selektivnější vychytávání nádorovými buňkami souvisí s rozdíly ve fyziologii normálních a neoplastických tkání, kdy nádory mají oproti normálním tkáním větší vnitřní objem, permeabilní cévní systém, lipoproteinové receptory, menší extracelulární pH a lymfatickou drenáž (Sobhani & Samadani, 2021).

Mechanismus PDT značně závisí na povaze PS a na intervalu mezi podáním PS a ozářením (DLI, z angl. *drug-to-light interval*).  $\text{DLI} \geq 24$  h umožňuje distribuci PS do



různých tkání v čase ozáření a nádorové buňky jsou zabíjeny převážně fototoxicitou PS uvnitř buněk (buněčná-PDT). Ozáření cílové tkáně při DLI < 30 min nachází PS v cévním systému (vaskulární-PDT) a vede k uzávěru cévního systému nádoru s následnou hypoxií nádoru, nedostatkem živin a smrtí. Při střední DLI nacházející se mezi těmito dvěma intervaly, může být PS také zadržen v endoteliálních buňkách (endoteliální-PDT). PDT není pouze lokální léčba solidních nádorů působením fototoxicity a/nebo okluzí cévního systému nádoru, ale může také stimulovat imunitní systém hostitele, což pak přispívá k eradikaci všech přežívajících nádorových buněk nejen v ozařovaném nádoru, ale také k rozpoznání a zániku nádorových buněk ve vzdálených místech (Lobo et al., 2020).

### **3.2 STRUČNÁ HISTORIE FOTODYNAMICKÉ TERAPIE**

Světlo se v lékařství používá již po tisíciletí. Helioterapie, terapeutické využití slunečního záření, se používala již před 5000 lety. Byla používána již ve starověkém Egyptě, Řecku, Indii a Číně k léčbě kožních onemocnění jako jsou psoriáza, vitiligo, nádory, ale také křivice či psychózy (Ackroyd et al., 2001; Algorri et al., 2021).

Fotodynamická terapie byla poprvé popsána před více než sto lety, kdy Oscar Raab, pracující v laboratoři Hermann von Tappeiner v Německu, učinil náhodný objev – vystavení mikroorganismů (*Paramecium* sp.) světlu v přítomnosti akridinů a příbuzných sloučenin vede k jejich smrti. Když se později zjistilo, že kyslík ve vzduchu je také nezbytný pro tento světlem zprostředkovaný smrtící účinek, vznikl termín “fotodynamická reakce/akce” (Abrahamse & Hamblin, 2016; Kessel, 2004).

Moderní éra PDT začala v 70. letech v USA z velké části díky úsilí Dr. Thomase Doughertyho pracujícího v Roswell Park Cancer Institute v Buffalu, NY. První PS byla ve vodě rozpustná směs porfyrinů nazvaná “hematoporfyrinový derivát” (HpD), později známý jako porfimer sodný (Photofrin<sup>®</sup>), který v roce 1978 Dougherty společně s jeho spolupracovníky předvedl na první sérii pacientů úspěšně léčených pomocí PDT. Bylo analyzováno několik typů nádorů a všechny z nich vykazovaly slibnou odpověď na léčbu. Od té doby bylo provedeno více než 283 PDT studií. V Kanadě v roce 1993 byl porfimer sodný (pod obchodním názvem Photofrin<sup>®</sup>, semi-purifikovaná verze HpD) schválený pro léčbu karcinomu močového měchýře. Později byl porfimer sodný schválen také v ostatních zemích, včetně USA, pro léčbu nádorů jícnu, dýchacích cest a pro léčbu Barretova jícnu. Ačkoliv je dnes porfimer sodný celosvětově stále nejčastěji používaným

PS, má mnoho známých nevýhod zahrnujících mj. kožní fotosensitivitu, která může přetrvávat po týdny či měsíce, a relativně malý absorpční pík při 630 nm, díky čemuž je při použití poněkud neefektivní, a to zejména u objemných nádorů, kde je penetrace světla tkání problematická.

Tyto značné nedostatky vedly k zaměření pozornosti na objevení a vývoj nových a bezpečnějších PS. V roce 2000 byl schválen verteporfin (Visudyne<sup>®</sup>), benzoporfyrinový derivát k léčbě AMD, a roku 2001 temoporfin (Foscan<sup>®</sup>), chlorin pro léčbu nádorů hlavy a krku (Abrahamse & Hamblin, 2016; Algorri et al., 2021; Celli et al., 2010; Cruess et al., 2009).

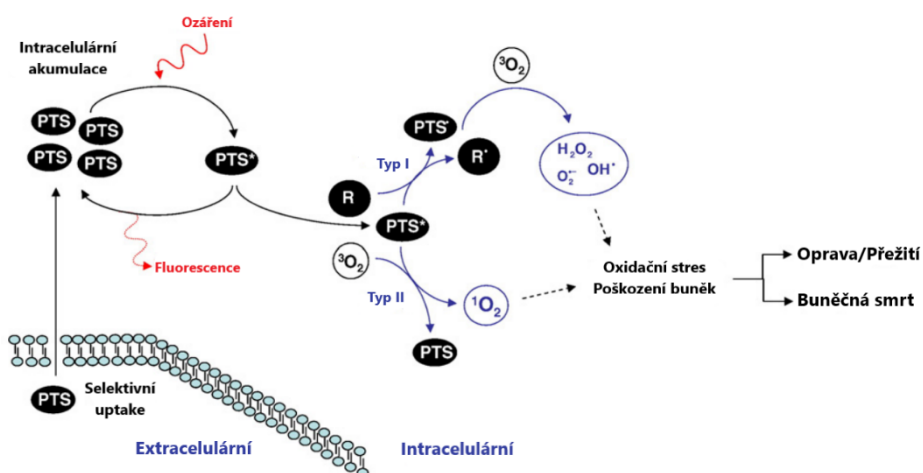
### 3.3 MECHANISMUS FOTODYNAMICKÉ TERAPIE

PDT zahrnuje ozáření PS lokalizovaného v nádoru při vlnové délce, která odpovídá hlavnímu absorpčnímu pásu PS v oblasti delších vlnových délek viditelného světla (typicky červené světlo, které je schopno pronikat tkání do větší hloubky). Ozáření PS světlem vede k absorpci fotonu PS, což má za následek přechod elektronu ze základního stavu ( $S_0$ ) do energeticky vyššího, ale nestabilního singletového excitovaného stavu ( $S_1$ ). Ve většině molekul elektron v  $S_1$  stavu rychle (typicky v řádu několika nanosekund) podléhá relaxaci nazpět na  $S_0$  stav PS. V průběhu jeho přechodu na  $S_0$  produkuje teplo a dochází k emisi fotonu (fluorescence). Nicméně, elektrony v  $S_1$  stavu PS obecně vykazují silnou tendenci podstoupit mezisystémový přechod, ve kterém je energie fotonu redistribuována dvěma nepárovými elektrony se stejnou spinovou orientací. Z tohoto nízkoenergetického, ale déle žijícího tripletového stavu ( $PS^*$ ) mohou elektrony reagovat s  $^3O_2$  a mohou nastat dva typy fotochemických reakcí (Obr. 1).

Při reakci typu I reaguje  $PS^*$  přímo s molekulou substrátu, například s lipidy v buněčné membráně, a dochází k tvorbě volných radikálů, které po následné reakci  $^3O_2$  produkují vysoce reaktivní ROS, jako jsou superoxidový aniontový radikál ( $\cdot O_2^-$ ), hydroxylový radikál ( $HO\cdot$ ) a peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ), které způsobují oxidační poškození tkání vedoucí k lézím.

U reakce typu II reaguje excitovaný  $PS^*$  přímo s  $^3O_2$  za tvorby vysoce reaktivního  $^1O_2$ . Silná reaktivita  $^1O_2$  vůči lipidům, nukleovým kyselinám, proteinům a dalším biochemickým substrátům se odráží v jeho krátkém biologickém poločase a v malé

oblasti účinku v životaschopných buňkách (Broekgaarden et al., 2015; Prazmo et al., 2016).



Obr. 1 Mechanismus působení fotosensitizujících látek v PDT. Převzato z (Buytaert et al., 2007).

Obě fotochemické reakce, typ I i typ II, probíhají současně a jejich poměr závisí na několika parametrech, přičemž nejdůležitější je typ použitého PS a koncentrace  $^3\text{O}_2$  v okolí. Pro většinu PS používaných v PDT představuje fotochemická reakce typu II dominantní proces (Plaetzer et al., 2009). To je důvodem, proč je  $^1\text{O}_2$  považován za hlavní mediátor fototoxicity u PDT. Kvantový výtěžek tvorby  $^1\text{O}_2$  ( $\Phi_\Delta$ ) je jednou z nejdůležitějších vlastností PS a je určen kvantovým výtěžkem ( $\Phi_T$ ) a životností ( $\tau_T$ ) jeho excitovaného tripletového stavu (Calzavara-Pinton et al., 2007). Životnost  $^1\text{O}_2$  je díky jeho reaktivitě velmi krátká (v  $\text{H}_2\text{O}$  3,5  $\mu\text{s}$ , v  $\text{D}_2\text{O}$  68  $\mu\text{s}$ ) a navíc se dramaticky snižuje na 0,2  $\mu\text{s}$  uvnitř buněk v důsledku jeho vysoké reaktivity s biologickými látkami. Tato rychlá reaktivita a krátká životnost omezují jeho distribuci v buňkách a léčba PDT je lokalizovaná pouze v místě produkce  $^1\text{O}_2$  (v průměru asi 10 nm, což odpovídá tloušťce buněčné membrány) (Ormond & Freeman, 2013).

Samotný  $\cdot\text{O}_2^-$  není příliš reaktivní v biologických systémech a není tedy schopný většího oxidačního poškození tkáně. Může ovšem podléhat dismutaci, mj. katalyzované superoxididismutasami (SOD), za vzniku  $\text{H}_2\text{O}_2$ , který může snadno procházet biologickými membránami. Vzhledem k tomu, že poškození  $\text{H}_2\text{O}_2$  není omezeno na jeden buněčný kompartment, je poměrně významný v procesu poškození buněk.  $\cdot\text{O}_2^-$  může také redukovat kovové ionty, konkrétně železité ionty ( $\text{Fe}^{3+}$ ) na železnaté ( $\text{Fe}^{2+}$ ), které katalyzují přeměnu  $\text{H}_2\text{O}_2$  na hydroxylový aniont ( $\text{OH}^-$ ) a  $\text{HO}^\cdot$ . Tato extrémně reaktivní

oxidační činidla iniciují řetězec oxidačních reakcí zodpovědných za poškození tkáně. Tento mechanismus je známý jako Fentonova reakce. Kromě toho může  $\cdot\text{O}_2^-$  reagovat s  $\text{HO}\cdot$  za vzniku  $^1\text{O}_2$  nebo s oxidem dusnatým za vzniku dalších vysoce reaktivních forem, například peroxinitritu ( $\text{OONO}^-$ ) (Castano et al., 2004; Plaetzer et al., 2009).

Reaktivní molekuly napadají vitální struktury cílových buněk a vedou k jejich buněčné smrti. Obecně jsou známy tři hlavní typy buněčné smrti: nekróza, apoptóza a autofagie, a budou popsány níže (Oniszczuk et al., 2016).

### 3.4 MECHANISMY BUNĚČNÉ SMRTI

Při narušení rovnováhy mezi vznikem ROS a schopností buněk dosáhnout detoxikace nebo opravy poškození dochází k vyvolání tzv. oxidačního stresu a následné aktivaci mechanismů buněčné smrti. Pochopení těchto mechanismů se stále rozvíjí. Nekróza, apoptóza a autofagie patří stále mezi nejznámější a nejčastěji probíhající formy zániku buněk během PDT, ačkoliv se v oblasti PDT objevily i termíny jako nekroptóza, ferroptóza, pyroptóza, parthanatos, nekróza řízená změnami mitochondriální permeability, na lysozomech závislá buněčná smrt, buněčná senescence, mitotická katastrofa nebo imunogenní buněčná smrt (Donohoe et al., 2019).

Na molekulární úrovni je přímá destrukce nádorových buněk PDT způsobena nevratným fotopoškozením životně důležitých subcelulárních cílů, mezi které patří plazmatická membrána a membrány mitochondrií, lyzosomů, GA a ER. Jelikož se většina PS neakumuluje v buněčných jádrech, má PDT obecně mnohem nižší potenciál způsobovat poškození DNA, mutace a karcinogenezi ve srovnání s radioterapií a chemoterapií (např. alkylační činidla). Obecně platí, že intracelulární lokalizace PS se shoduje s primárním místem fotopoškození. Důvodem je, že generovaný  $^1\text{O}_2$  má velmi omezenou schopnost difúze v biologických systémech (Buytaert et al., 2007). Specifické cytotoxické reakce jsou závislé celé řadě podmínek, jako jsou vlastnosti a dávka použitého PS, způsob a dávka ozáření a typ léčených buněk (Yoo & Ha, 2012).

Nekróza (někdy nazývaná „náhodná buněčná smrt“) je neregulovaná forma rychlého nekontrolovaného procesu zániku buněk následkem vystavení závažnému a nevratnému poškození. Naproti tomu různé modalities regulované buněčné smrti jsou velmi komplexní a řízené několika signálními drahami, které mohou být modulovány

farmakologickými nebo genetickými zásahy. K programované buněčné smrti (PCD; geneticky zakódovaná forma) dochází za fyziologických podmínek během embryonálního vývoje a přeměny tkání. PCD může ale být zprostředkována také vnějšími faktory vyvolávajícími poruchy/poškození, které již nemohou být různými adaptivními a reparačními mechanismy buňky napraveny (Buytaert et al., 2007; Donohoe et al., 2019).

### 3.4.1 Autofagie

Autofagie je konzervovaný intracelulární sebedegradující proces, ve kterém jsou buněčné komponenty degradovány lyzosomy, a který zajišťuje buněčnou homeostázu řízením obratu buněčných komponent, a to prostřednictvím omezeného množství vysoce konzervovaných genů (skupina ATG; z angl. *autophagy related genes*). Autofagie je mechanismus přežití s ochrannými funkcemi v mnoha buněčných stresových podmínkách (jako je hladovění, nedostatek růstových faktorů, ER stres či infekce patogeny) prostřednictvím schopnosti recyklovat energii. Tento proces zahrnuje degradaci poškozených organel a dlouho žijících makromolekul, což je nástrojem pro *de novo* syntézy makromolekul jako jsou lipidy, cukry a nukleové kyseliny. Na druhou stranu, autofagie může působit také jako proces PCD v odpovědi na dlouhodobé stresové podmínky způsobující nevratné poškození buňky.

Autofagie je regulována především působením serinových/threoninových kinás – např. mTOR (z angl. *mammalian target of rapamycin*) a AMPK (z angl. *AMP-activated protein kinase*). Oba enzymy jsou schopny detekovat metabolické změny a regulovat autofagickou odpověď na změny metabolismu opačným způsobem. Apikální negativní regulátor autofagie (mTOR) je udržován aktivní v případě vysokého přísunu živin jako inhibitor autofagie a je deaktivován během hladovění. Naopak aktivace AMPK je nutná, jakmile je třeba produkovat novu energii autofagickou cestou (Aredia & Scovassi, 2014; Liang et al., 2016; Oniszczyk et al., 2016).

Obecně rozlišujeme tři typy autofagie: makroautofagie, mikroautofagie a chaperony zprostředkovaná autofagie. Během makroautofagie je cytoplazmatický náklad dodáván do lyzosomu prostřednictvím váčků s dvojitou membránou, zatímco u mikroautofagie jsou cytosolické komponenty přímo vychytávány samotným lyzosomem pomocí invaginace lyzosomální membrány. Chaperony zprostředkovaná autofagie je založena na translokaci cílových proteinů přes lyzosomální membránu v komplexu s

chaperonovými proteiny, které jsou rozpoznávány lyzosomálním membránovým receptorem asociovaným s lyzosomálním membránovým proteinem 2A, což vede k jejich rozvinutí a následné degradaci (Oniszczyk et al., 2016).

Autofagolyzosomální systém je hlavním proteolytickým systémem u savčích buněk. Ačkoliv molekulární mechanismy, kterými ROS modulují autofagii nejsou ještě plně pochopeny, typ ROS, stupeň oxidačního poškození a molekulární cíle mohou ovlivnit výsledek PDT. Role autofagie jako faktoru v PDT-indukované buněčné smrti není dosud jasná, ale existuje několik možností pro její roli ve fotodynamickém procesu. Je známo, že pro-autofagický protein Beclin 1 se váže na Bcl-2. Mnoho PS běžně používaných ve výzkumných a klinických studiích způsobuje fotopoškození Bcl-2 a ztráta jeho funkce by tedy mohla vést k iniciaci autofagie. Může také dojít k autofagické odpovědi na fotopoškození ER a/nebo mitochondrií ve snaze recyklovat poškozené organely (Kessel & Reiners, 2007; Reiners et al., 2010).

### 3.4.2 Apoptóza

Apoptóza je komplexní fyziologický proces, který určuje správné fungování organismu eliminací nežádoucích buněk, aniž by došlo k narušení jejich integrity a vyvolání zánětu. Poškozené apoptotické dráhy hrají roli v patogenezi řady poruch, jako jsou nádorová a degenerativní onemocnění. Apoptóza je primární formou PCD a je regulována různými buněčnými a molekulárními signálními drahami.

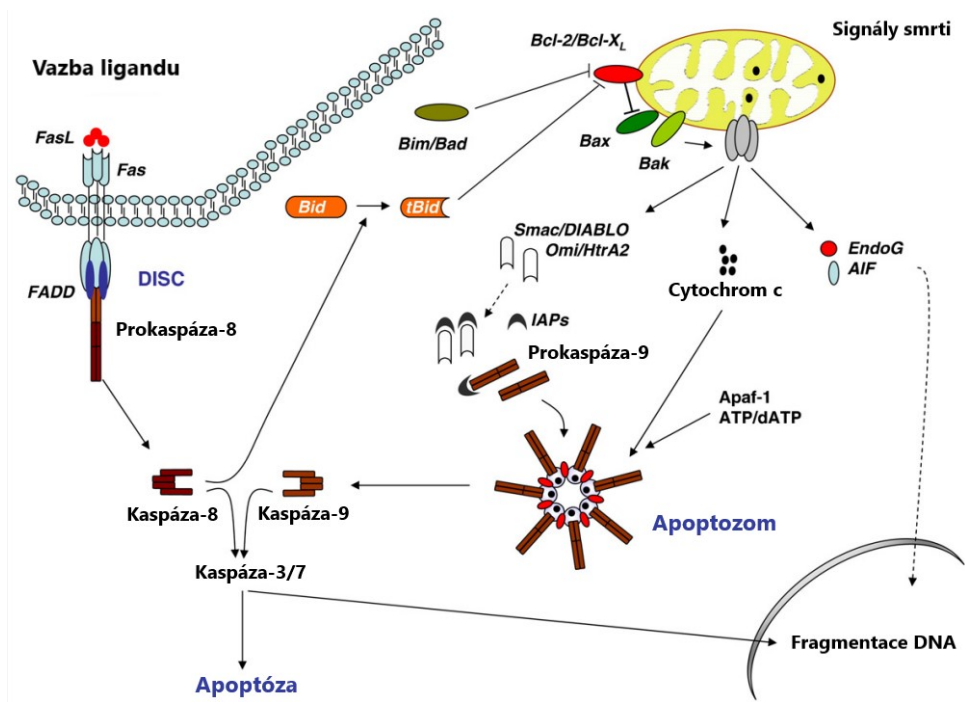
Typickými indikátory apoptózy jsou změny v buněčné morfologii, jako je smršťování buněk, tvorba blebů na buněčném povrchu, kondenzace jaderného chromatinu a fragmentace DNA spouštěná faktorem indukujícím apoptózu (AIF). Proces apoptózy aktivuje specifickou rodinu proteáz známou jako kaspasy (název odvozen od angl. *caspase – cysteinyl aspartate specific protease*). Kaspasy zprostředkovávají apoptózu štěpením široké škály buněčných substrátů, což v konečném důsledku vede k rozpadu odumírajících buněk na apoptotická tělíska a jejich pohlcení sousedními buňkami nebo fagocyty.

V závislosti na typu buněčných organel zapojených do tohoto procesu může apoptóza probíhat podle specifických drah: receptorová dráha (buněčná membrána), mitochondriální dráha (mitochondrie), pseudoreceptorová dráha (T buňky, NK buňky) a

stresem indukovaná sfingomyelin-ceramidová dráha (ER). Společným prvkem všech těchto drah PCD je aktivace kaspasových kaskád, jejichž aktivace spouští řadu biochemických procesů vyvolávajících apoptózu. Hlavními molekulárními mechanismy apoptózy jsou vnější (receptorová) a vnitřní (mitochondriální) dráha (Obr. 2) (Dąbrowski & Arnaut, 2015; Vidujith et al., 2022; Yoo & Ha, 2012).

Činnost **vnější dráhy** je založena na membránových receptorech a ligandech. Mezi různými membránovými receptory bylo identifikováno několik receptorů pro TNF. Po vazbě ligandů smrti (např. FasL, TNF- $\alpha$ , TRAIL) na příslušné receptory smrti (Fas, TNFR1, TRAILR) dochází k interakci s dalšími bílkovinami a přenosem signálu s následnou aktivací iniciačních prokaspas 8 a 10 ve vnější dráze apoptózy. Kaspasa 8 následně proteolyticky aktivuje hlavní efektorové kaspasy 3/7 (Buytaert et al., 2007; Dąbrowski & Arnaut, 2015).

**Vnitřní (mitochondriální) dráha** je aktivována zvýšením ROS, narušením transportu iontů nebo zvýšením koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v cytoplazmě. Zásadním krokem pro vnitřní cestu apoptózy je nevratná a rozsáhlá permeabilizace vnější mitochondriální membrány (MOMP). Primární rolí mitochondrií v apoptotické signální dráze je regulace uvolňování proapoptotických molekul z mezimembránového prostoru mitochondrií do cytosolu. Toto uvolňování je pozitivně regulováno proapoptotickými proteiny z Bcl-2 rodiny jako jsou BAX (z angl. *Bcl-2 associated X protein*), BAK (z angl. *Bcl-2 antagonist killer 1*), BIM (z angl. *Bcl-2 interacting mediator of cell death*), BID (z angl. *BH3 interacting-domain death agonist*), PUMA (z angl. *p53 upregulated modulator of apoptosis*), a negativně regulováno antiapoptotickými proteiny Bcl-2 rodiny jako jsou Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, A1 a MCL1 (Carneiro & El-Deiry, 2020; Galluzzi et al., 2018). Jakmile jsou proapoptotické proteiny aktivovány, dochází k jejich oligomerizaci, inserci do mitochondriální membrány a tvorbě kanálů, prostřednictvím kterých cytochrom c (klíčový protein elektronového transportního řetězce mitochondrií) a další proteiny (Omi/HtrA2, Smac/DIABLO) unikají do cytosolu. Cytosolický cytochrom c po vazbě na Apaf-1 (z angl. *apoptotic protease-activating factor 1*) a v přítomnosti ATP/dATP vede k aktivaci prokaspasy 9 a následné tvorbě apoptosomu – heptamerní komplex spouštějící aktivaci iniciační kaspasy 9, která opět proteolyticky zpracovává a aktivuje efektorové kaspasy 3/7 (Buytaert et al., 2007; Dąbrowski & Arnaut, 2015).



Obr. 2 Dvě hlavní dráhy vedoucí k aktivaci efektorových kaspas. Převzato z (Buytaert et al., 2007).

Aktivace efektorových kaspas má za následek morfologické a biochemické změny typické pro apoptotickou buněčnou smrt, jako jsou internukleosomální fragmentace DNA, tvorba membránových blebů a smršťování buněk.

Ačkoliv PDT primárně aktivuje dráhy apoptózy závislé na kaspasách, mechanismy zodpovědné za fotooxidační poškození vyvolávají také apoptózu na kaspasách nezávislou. Ta je způsobena uvolňováním AIF a endonukleasy G z mitochondrií a jejich následnou translokací do jádra vedoucí přímo k rozsáhlé fragmentaci DNA. Několik studií uvádí, že PDT může indukovat uvolňování jak cytochromu c, tak AIF, a je tedy schopna zacílit na různé buňky. Kaspasou 8 zprostředkované štěpení cytosolického proapoptotického proteinu Bid poskytuje molekulární spojení mezi vnějšími a vnitřními apoptotickými cestami (Buytaert et al., 2007; Yoo & Ha, 2012).



### 3.4.3 Nekróza

Nekróza je rychlá a náhlá smrt buňky postihující velké frakce buněčných populací, která je charakterizovaná pyknotickým jádrem, cytoplazmatickým otokem, destrukcí organel a porušením plazmatické membrány. Tyto závažné změny následně vedou k rozpadu buněk, uvolnění cytoplazmatického obsahu do extracelulárního prostoru a vyvolání zánětu (Mroz, et al., 2011b). Předpokládá se, že nekróza je konečným výsledkem bioenergetické katastrofy vyplývající z vyčerpání ATP na hodnotu, která je neslučitelná s přežitím buněk (Buytaert et al., 2007).

Základní formát buněčné smrti způsobené PDT přechází v nekrózu s PS lokalizovaným v plazmatické membráně a lyzosomech. Biochemická cesta vedoucí k nekróze po PDT však nebyla dosud identifikována. Hlavní složkou v propagační a exekuční fázi této buněčné smrti jsou  $\text{Ca}^{2+}$  a ROS, které vedou k poškození lipidů, proteinů a DNA, a způsobují tak narušení buněčných organel i integrity buňky. Poškozené a umírající buňky spouštějí prozánětlivé signální kaskády, dochází k aktivnímu uvolňování zánětlivých cytokinů a vylévání jejich buněčného obsahu při lýze buňky (Oniszczyk et al., 2016; Vidujith et al., 2022).

Po dvě desetiletí byla apoptóza považována za standartní formu buněčné smrti během vývoje, homeostázy, infekce a patogeneze, zatímco nekróza byla většinou považována za „náhodnou“ buněčnou smrt, která se vyskytuje v odpovědi na různé fyzikálně-chemické podněty. Nedávné genetické důkazy, stejně jako objev chemických inhibitorů nekrózy, tento pohled značně změnily a odhalily existenci více různých drah regulované nekrózy. Regulovaná nekróza je definována jako geneticky kontrolovaný proces buněčné smrti, který nakonec vede k úniku buněčného obsahu (Berghe et al., 2014). Nekróza tedy může být dobře kontrolovaná a programovaná, a je výsledkem rozsáhlého přenosu signálů mezi biochemickými a molekulárními událostmi na různých buněčných úrovních. Apoptóza funguje jako výchozí mechanismus buněčné smrti, zatímco k nekróze dojde pouze tehdy, pokud selže aktivace kaspas. Nekroptóza je programovaná forma nekrotické buněčné smrti, která probíhá např. prostřednictvím FasL, TNF či TRAIL (Oniszczyk et al., 2016; Vidujith et al., 2022).

### 3.4.4 Parthanatos

Parthanatos je forma regulované buněčné smrti řízená hyperaktivací poly(ADP-ribose)polymerasy 1 (PARP). Zdá se, že parthanatos se vyskytuje nejen jako důsledek vážného alkylačního poškození DNA, ale také jako reakce na oxidační stres, hypoxii, hypoglykémii nebo zánětlivé signály (Galluzzi et al., 2018).

Parthanatos je vyvolána podněty, které indukují poškození DNA, jako je ultrafialové záření, alkylační činidla či ROS, které nadměrně aktivují PARP, která je zapojená do opravy DNA. Tato hyperaktivace PARP indukuje masivní polyADPribosylaci proteinů, ochuzující buňky o  $\text{NAD}^+$  a ATP a vedoucí k energetické katastrofě. Hyperaktivace PARP navíc zvyšuje tvorbu poly(ADP-ribose) (PAR), která indukuje translokaci AIF mitochondrií do jádra, kde vyvolává jadernou fragmentaci prostřednictvím dosud neznámého mechanismu (Soriano et al., 2017).

AIF je flavoprotein syntetizovaný v cytosolu jako prekurzor a poté je importován jako zralá forma do mezimembránového prostoru mitochondrií, kde reguluje důležité mitochondriální biochemické reakce. Během parthanatos dochází k přeměně AIF na jeho rozpustnou formu tAIF a její následnou translokaci do jádra, kde podporuje kondenzaci chromatinu a degradaci vysokomolekulární DNA prostřednictvím endonukleas a DNAs (Aredia & Scovassi, 2014).

PARP je nukleární enzym důležitý pro regulaci buněčné homeostázy a zachování genomové stability za fyziologických podmínek. Mezi řadou dalších možných rolí je známo, že PARP reguluje genovou expresi a amplifikaci, buněčnou diferenciaci, buněčné dělení, maligní transformaci, replikaci DNA, mitochondriální funkce a buněčnou smrt. Podílí se na onemocněních jako jsou mrtvice, infarkt myokardu či Parkinsonova choroba (PD). Za fyziologických podmínek je PARP důležitý pro opravu DNA, genomickou stabilitu a transkripci. Při patologických stavech, které způsobují závažný genomický stres jako je ischemicko-reperfuční poškození, zánět, infarkt myokardu, glutamátová excitotoxicita a PD, vede nadměrná aktivace PARP k buněčné smrti (David et al., 2009; Fatokun et al., 2014). PARPs mohou být aktivovány několika stresovými stimuly, včetně poškození DNA, a interagovat s více efekty buněčné smrti. PARP je inaktivován kaspasami pouze v rámci apoptotických drah, zatímco zůstává aktivní a syntetizuje vysoké množství PAR působící jako signální molekuly pro některé formy buněčné smrti (parthanatos, nekroptóza a autofagie).

Průběh parthanatos je spojený s biochemickými událostmi rychlé aktivace PARP, syntézou a akumulací PAR, mitochondriální depolarizací, nukleární translokací AIF (k níž dochází časně) a v pozdní fázi také s možnou aktivací kaspas, ačkoliv ta není „povinná“ a nelze ji tedy chránit pan-kaspasovými inhibitory (např. bocaspartyf-fmk nebo Z-VAD-fmk). Tato vlastnost proto odlišuje parthanatos od apoptózy závislé na kaspasách, která bez účasti příslušných kaspas nemůže probíhat. Dalším rozdílem od apoptózy je, že parthanatos neindukuje tvorbu apoptotických tělísek ani nezpůsobuje drobnou fragmentaci DNA. Parthanatos naopak vyvolává rozsáhlou fragmentaci jaderné DNA. Stejně jako nekróza, parthanatos zahrnuje ztrátu integrity buněčné membrány, ale na rozdíl od nekrózy není doprovázena otokem buněk (Fatokun et al., 2014).

## **3.5 SVĚTLO, KYSLÍK A FOTOSENSITIZÉRY**

### **3.5.1 Světlo**

Často používanými světelnými zdroji jsou lampy s filtry, diody a řada luminiscenčních a superluminiscenčních LED diod či různé typy laserů. Prvními světelnými zdroji používanými v PDT byly nekoherentní světelné zdroje (např. konvenční obloukové lampy), které jsou bezpečné, snadné na používání a levné. Světelné diody a xenonové lampy jsou nyní běžně používanými zdroji pro dermatologické aplikace. Nicméně dnes jsou již častěji používány spíše lasery. Ty produkují vysokoenergetické monochromatické světlo specifické vlnové délky s úzkou šířkou excitačního pásma pro konkrétní PS. Laserové světlo lze zaostřit a prostřednictvím optického vlákna dodat přímo do cílové tkáně.

Ideální typ světla pro PDT by měl mít následující vlastnosti: vhodná absorpce PS pro získání vysokého  $\Phi_{\Delta}$ , vysoká penetrace kůží, a odpovídající dávka ozáření a jeho trvání. Vlnové délky používané v PDT jsou v červené nebo infračervené oblasti elektromagnetického záření. Penetrace viditelného světla tkání se zvyšuje směrem k blízké infračervené (NIR) oblasti. Zatímco světlo z modré oblasti (400 nm) umožňuje průnik tkání asi 1 mm, červené světlo může proniknout tkáněmi do hloubky 0,5 až 1 cm, což mj. umožňuje osvětlení hlouběji uložených lézí. Aby došlo k fotobiologické reakci, světlo musí být absorbováno PS. To je možné, pokud vlnová délka světla odpovídá

maximu absorpčního spektru daného PS (Mahmoud, 2016; Nowis et al., 2005; Ostańska et al., 2021).

Průnik světla do nádorové tkáně je velmi komplexní, jelikož světlo se zde může odrážet, rozptylovat nebo absorbovat. Rozsah těchto procesů závisí na typu tkáně a vlnové délce světla. Absorpce světla je způsobena především endogenními chromofory vyskytujícími se ve tkáních, jako je hemoglobin, myoglobin a cytochromy, které mohou redukovat fotodynamický proces tím, že konkurují PS v procesu absorpce aktivujícího záření. Absorpce světla tkáněmi klesá s rostoucí vlnovou délkou, což znamená, že delší vlnové délky světla (červené světlo) pronikají tkání účinněji. Oblast mezi 600 a 1200 nm se proto často nazývá “optické okno tkáně” (Allison & Sibata, 2010; Correia et al., 2021). Kratší vlnové délky (< 600 nm) mají menší penetraci tkání (jsou více absorbovány), což má za následek zvýšenou kožní fotosensitivitu, pokud v této oblasti absorbuje také PS ukládající se v kůži. Na druhou stranu, delší vlnové délky (> 850 nm) nemají dostatek energie k následné excitaci  $^3\text{O}_2$  do jeho singletového stavu a k produkci dostatečného množství ROS. Z toho důvodu se je pro PDT nejvhodnější světlo v rozsahu vlnových délek cca 600 až 850 nm. Tento rozsah se mj. nazývá “fototerapeutické okno” (Yoon et al., 2013).

### 3.5.2 Kyslík

$^3\text{O}_2$  je další klíčová složka PDT. ROS jsou obecně malé, krátce žijící a vysoce reaktivní molekuly tvořené neúplnou jedno-elektronovou redukcí kyslíku. ROS zahrnují kyslíkové anionty, volné radikály a peroxidy. Nízké hladiny ROS jsou normálně redukovány neenzymatickými a enzymatickými antioxidačními činidly jako jsou např. glutathion, thioreodoxin, SOD, katalasa a peroxidasy. Vysoké hladiny ROS, které nejsou detoxikovány těmito buněčnými antioxidačními systémy vedou ke vzniku oxidačního stresu (Scherz-Shouval & Elazar, 2007).

Oxidační stres produkovaný v průběhu PDT je zodpovědný za komplexní kaskádu oxidačních reakcí cílených na mnoho biomakromolekul jako jsou DNA, lipidy nebo proteiny. Zbytky proteinových aminokyselin tyrosinu, tryptofanu, methioninu, histidinu a cysteinu jsou díky jejich reaktivitě některými z hlavních cílů ROS. Oxidace tyrosinových zbytků je zvláště významná kvůli jejich účasti v intracelulárních signálních drahách, a může vést k tvorbě dityrosinových dimerů. Nenasycené mastné kyseliny z

buněčných membrán a dalších intracelulárních membránových organel (např. ER), mohou podléhat reakcím za vzniku hydroperoxidů lipidů vedoucí ke změnám fluidity a permeability membrán (nebo jejich narušení) a zastavení buněčného cyklu. Také nukleotidy DNA (zejména guanin) mohou být oxidovány ROS, což může vést k porušení řetězce nebo zesíťování DNA-DNA nebo DNA-proteinů, a následně k buněčné smrti (Calzavara-Pinton et al., 2007; Castano et al., 2004; Sakharov et al., 2003).

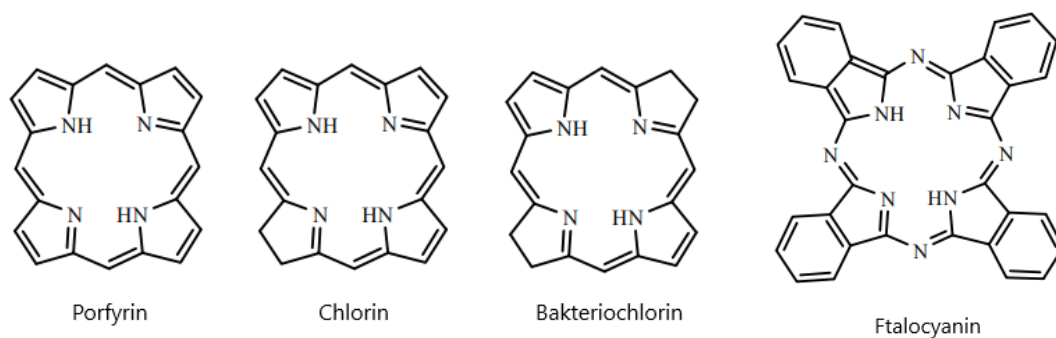
Koncentrace kyslíku se může významně lišit mezi různými nádory, a dokonce i mezi různými oblastmi stejného nádoru v závislosti na hustotě jeho cévního systému. Monitorování tkáňové oxygenace v průběhu i po skončení PDT je důležité pro pochopení základních fyziologických mechanismů a světelné dozimetrie. Jeho cílem je (na základě změn v dostupnosti kyslíku v průběhu a po skončení ozáření) předpovědět účinnost PDT (Woodhams et al., 2007), kdy zejména u hlouběji lokalizovaných solidních nádorů, které jsou často charakterizovány svým anoxickým mikroprostředím, může být nedostatek kyslíku limitující faktor (Yang et al., 2010).

### 3.5.3 Fotosensitizéry

PS jsou syntetické nebo přírodní látky využívající energii absorbovaného světla pro tvorbu ROS skrze fotoreakce (Li, et al., 2019a). Většina PS používaných v nádorové terapii je založena na tetrapyrrolové struktuře, která je podobná protoporfyrinové prostetické skupině nacházející se přirozeně v biomelukulách hemu, chlorofylu a bakteriochlorofylu (Abrahamse & Hamblin, 2016).

**Ideální PS** pro léčbu solidních nádorů by měl absorbovat světlo s vysokou molární absorpcí při vlnové délce nacházející se ve fototerapeutickém okně tkáně (Gierlich et al., 2020). V ideálním případě by měl být PS netoxický, neměl by generovat toxické nebo mutagenní katabolity, měl by vykazovat nízkou až nulovou toxicitu v nepřítomnosti světla, a naopak silnou fototoxicitu v ozářené cílové tkáni. Ideální PS by měl navíc být také komerčně dostupnou, chemicky čistou a fotostabilní sloučeninou, s vysokým  $\Phi_T$ , mít vysokou účinnost produkce ROS, dobrou selektivitu vůči nádorovým buňkám, absorbovat při vlnových délkách s hlubší penetrací do tkání. Dále by se měl rychle eliminovat z organismu a poskytovat více cest pro podání (orální, intravenózní, intratumorální nebo inhalační) (Huang et al., 2008; Weijer et al., 2015).

Mnoho PS používaných v PDT jsou porfyriny nebo jejich redukované deriváty jako jsou chloriny, bakteriochloriny a benzoporfyriny, jejichž základ tvoří tetrapyrolový makrocyklus nacházející se také v hemové skupině u hemoglobinu a v chlorofylech (Obr. 3). Tyto molekuly vykazují silnou absorpci okolo 400 nm (Soretův pás) a slabší absorpční pásma mezi 500 a 800 nm (Q pásy) (Yano et al., 2011). Mezi další nejčastěji používané PS patří ftalocyaniny (Pc), PS druhé generace podobné porfyrinům sestávající ze čtyř isoindolových jednotek spojených azamethinovým můstkem. Mají vynikající nejen. fotofyzikální a fotochemické vlastnosti: jednoduchou syntézu a možnost modifikace za účelem změny hydrofility, vysokou fotostabilitu i chemickou stabilitu, silnou absorpce při dlouhých vlnových délkách (650-750 nm) a vysoký  $\Phi_{\Delta}$  (Calixto et al., 2016; Yano et al., 2011). S vhodným centrálním atomem, jako je zinek, hliník nebo křemík, vykazuje Pc mnoho dalších optimálních vlastností, které splňují výše uvedené požadavky ideálního PS. Nicméně Pc mají dva hlavní nedostatky: nízkou rozpustnost ve vodě a tendenci k agregaci. Většina nesubstituovaných Pc je špatně rozpustná ve vodě a běžných organických rozpouštědlech. Agregace pak vede ke ztrátě PDT aktivity a fluorescence. Způsob, jak překonat tyto nedostatky, spočívá v modifikaci struktury, použitím vhodného transportního systému nebo přidáním vhodného kosolventu ke snížení agregace (Jiang et al., 2014).



Obr. 3 Základní struktury fotosenzitizérů. Převzato z (Ormond & Freeman, 2013).

K PS takzvané **první generace** se řadí HpD a jeho purifikovaná a komerčně dostupná verze porfimer sodný (Photofrin<sup>®</sup>), které se vyskytují jako komplexní směs monomerních, dimerních a oligomerních struktur. Porfimer sodný absorbuje světlo slabě při 630 nm, a také efektivní pronikání světla o této vlnové délce do tkáně je malé (2 - 3 mm), což limituje aplikovatelnost především na povrchové nádory. Jeho dlouho

trvající kožní fototoxicita přetrvává 6-10 týdnů a během tohoto období je zapotřebí se vyhnout slunečnímu záření a silnému umělému světlu. I přes tyto nedostatky poskytuje porfimer sodný vysoký  $\Phi_{\Delta} = 0.89$  indikující efektivní generaci  $^1\text{O}_2$ . Ukázalo se, že HpD má schopnost lokalizovat se primárně v nádorech a v kombinaci s červeným světlem vykazuje významné tumorocidní účinky. V roce 1976 byla provedena první klinická PDT s použitím HpD u pacientů s karcinomem močového měchýře a kůže. V roce 1993 se jeho purifikovaná frakce porfimer sodný stala prvním PS schváleným pro PDT u recidivujícího, povrchového papilárního karcinomu močového měchýře, a stále patří mezi nejpoužívanější a nejstudovanější PS (Hamblin, 2020; Ormond & Freeman, 2013; Triesscheijn et al., 2006).

Vlastnosti nežádoucí kožní fotosensitivity, nízká absorpce v červené oblasti viditelného spektra stejně jako komplexní směsi vznikající během syntézy vedly k zaměření se na vylepšení a následný vznik PS **druhé generace**. V roce 1999 získal schválení pro léčbu rakovinných lézí PS druhé generace ALA (Levulan<sup>®</sup>). Samotná ALA nemá žádný fotosensitivní účinek, ale jedná se o přírodní prekurzor v biosyntéze hemu. Jde o tzv. proléčivo, u kterého dochází k enzymatické přeměně na PpIX, který má fotosensitivní vlastnosti. Nevýhodou ALA je, že je silně hydrofilní, a proto těžko proniká přes neporušenou kůži, buněčné membrány nebo biologické bariéry, jako je žaludek a střevní stěny. To vedlo k vývoji několika alkylesterů ALA. MALA (Metvix<sup>®</sup>) byl schválen v Evropské unii (EU) v roce 2001 pro léčbu AK a BCC. Mnohem účinnějším PS se později stal temoporfin (Foscan<sup>®</sup>), který byl v EU v témže roce schválen pro paliativní léčbu nádorů hlavy a krku. Sulfonovaný hydroxyhlinitý Pc (Photosens<sup>®</sup>) se používá v Rusku k léčbě nádorů žaludku, kůže, rtů, dutiny ústní a prsu. Nicméně jeho kožní fototoxicita trvá po několik týdnů (Bourré et al., 2002; Donohoe et al., 2019; Ormond & Freeman, 2013; Triesscheijn et al., 2006). Křemičitý ftalocyanin 4 (Pc4) byl testován jako topicky aplikovaný PS pro různé kožní malignity a dokončil fázi IA-IIA klinických studií pro kožní T-buněčný Non-Hodgkinův lymfom (Clinical Trials, 2019; Hamblin, 2020). Tisíce pacientů již bylo léčeno PDT za použití PS první i druhé generace u různých pokročilých novotvarů a prokázaly velké zlepšení kvality jejich života a prodloužení přežití. Navzdory všem výhodám má ale PDT i řadu omezení v léčbě nádorů, zejména díky nízké selektivitě PS. Ideální systém podání PS u PDT by měl zajistit selektivní akumulaci v nádorových tkáních a dodání terapeutických koncentrací PS do cílového místa s malou nebo žádnou akumulací v necílených buňkách. Nicméně, většina

PS je neselektivně přijímána všemi buněčnými typy, což je příčinou jejich výskytu nejen v nádorových buňkách, ale také v buňkách normálních, zdravých tkání. Tato situace vedla k vývoji **třetí generace PS** – deriváty PS druhé generace připojené nebo inkorporované na různé chemické nosiče umožňující jejich cílení, jako jsou sacharidy, peptidy, lipoproteiny s nízkou hustotou (LDL), polymery, nanočástice nebo monoklonální protilátky (Kamarulzaman et al., 2011; Mokwena et al., 2018).

Samotné PDT nabízí určitou nádorovou selektivitu a specifitu díky ozařování pouze maligní tkáně. Navíc je známo, že PS (zejména amfifilní a lipofilní molekuly) mají díky jejich interakci s LDL přednostní akumulaci v nádorech, které mají nadměrně exprimované LDL receptory. Díky tomu, lze dosáhnout významných zlepšení léčby PDT pomocí strategií **cílených ligandem**. Je obecně přijímáno, že vyšší a specifitější akumulace PS v nádoru zvýší destrukci nádoru a zároveň zabrání fotosensitivitě kůže.

Cílení ligandem může zajistit efektivní dodání podaného PS do mikroprostředí nádorových buněk. Po intravenózním podání je PS konjugovaný s ligandem přítomen v cirkulaci po přiměřenou dobu tak, aby byla umožněna extravazace skrze endoteliální fenestrace nádorových krevních cév. Po akumulaci je cílicí skupina rozpoznána receptory nadměrně exprimovanými na povrchu nádorových buněk, nebo jiných stromálních buněk, což vede k endocytózou zprostředkované internalizaci PS. Po fúzi cílicího ligandu a/nebo nosiče pro dodání léčiva dochází k destabilizaci endosomů a PS se uvolňuje do cytosolu s následnou redistribucí do dalších organel. Nicméně PS může zůstat zachycený v endolysosomálním kompartmentu až do doby ozáření. Po určitém čase (DLI), který typicky odpovídá době umožňující nejvyšší nádorovou akumulaci, je provedeno ozáření nádoru (Gierlich et al., 2020).

### 3.6 VÝHODY A OMEZENÍ

PDT má několik výhod oproti konvenčním přístupům k léčbě nádorových onemocnění. První generace PS způsobuje zvýšenou fotosensitivitu kůže. Při správném používání však PDT nemá žádné dlouhodobé vedlejší účinky. Je také méně invazivní než chirurgické zákroky a lze ji provádět ambulantně. Kromě samotného nádoru může PDT zničit také s ním spojený cévní systém, což výrazně přispívá k destrukci nádoru. PDT může být aplikována přímo a přesně v cílové tkáni díky její duální selektivitě: přirozená vlastnost některých PS akumulovat se přednostně v nádorové tkáni a ozáření světlem



aplikované výhradně v cílové tkáni. Kromě výše zmíněného lze PDT opakovat několikrát ve stejném umístění, na rozdíl od radioterapie, po zhojení zanechává pouze malé nebo žádné jizvy a je obvykle levnější než ostatní terapie nádorových onemocnění.

Stejně jako jiné terapeutické přístupy má i PDT určitá omezení. K fotodynamickému efektu dochází selektivně v ozařované oblasti, což velmi ztěžuje jeho použití u rozsáhlých metastáz při aktuálně dostupných technologických přístupech. Pro vytvoření fotodynamického efektu je rozhodující tkáňová oxygenace, což znamená, že nádory obklopené nekrotickou tkání nebo hustou nádorovou hmotou mohou vést k neúčinné PDT. Hluboké nádory (špatně dostupné bez chirurgického zákroku) mohou být obtížně léčitelné kvůli nízké penetraci viditelného světla do tkáně, a proto je přesnost ozáření cílové tkáně nejdůležitějším bodem při zvažování PDT jako možnosti léčby (Calixto et al., 2016; Correia et al., 2021; Rocha, 2015).

### **3.7 ÚČINKY PDT NA NÁDORY**

Byly identifikovány tři odlišné (ale vzájemně související) mechanismy, které přispívají k pozorovatelnému zmenšení (a častému vymizení) nádorů při léčbě PDT. V prvním případě může ROS tvořené během PDT zabíjet nádorové buňky přímo apoptózou a/nebo nekrózou. PDT také poškozuje cévní systém spojený s nádorem, což vede k tkáňovému nedostatku kyslíku a živin a následné smrti nádorových buněk. A v posledním případě může PDT aktivovat imunitní odpověď proti nádorovým buňkám. Tyto tři mechanismy se vzájemně ovlivňují a kombinace všech těchto složek je nezbytná pro optimální dlouhodobé vyléčení nádorů, zejména nádorů schopných metastázovat (Castano et al., 2005; Yoo & Ha, 2012).

#### **3.7.1 Vliv na nádorové buňky**

PDT je schopna do určité míry eliminovat nádorové buňky přímo a snížit počet klonogenních nádorových buněk. Bylo publikováno, že během PDT může docházet až k přibližně 72% snížení počtu klonogenních buněk bezprostředně po ozáření. Smrt nádorových buněk se zdá být kinetický proces, protože počet klonogenních buněk dále klesá jako funkce času po PDT. PDT indukuje zároveň apoptózu, nekrózu i autofagii na cílových nádorových buňkách. Jednotlivé mechanismy buněčné smrti se mohou

v ozařované tkáni v různém poměru vyskytovat současně v závislosti na typu a dávce PS a v závislosti na poškozených buněčných organelách, což je dáno intracelulární lokalizací PS (Buytaert et al., 2007; Gunaydin et al., 2021). Přímý cytotoxický účinek na nádorové buňky může být podpořen protokoly s dlouhou DLI (> 24 h), aby se umožnila selektivní akumulace PS v nádorových buňkách vzhledem k okolnímu prostředí zdravé tkáně a cévnímu systému, což přispívá ke zvýšení selektivity léčby (Castano et al., 2005).

### **3.7.2 Vliv na cévní systém**

Kromě oxidativního poškození nádorových buněk vede aplikace PDT často k destrukci nádorové mikrovaskulatury, což vede k přerušení dodávky kyslíku a živin, a následně pak ke smrti nádorových buněk (Abels, 2004). Základní mechanismy vaskulárních účinků PDT se u různých PS značně liší. PDT způsobuje konstriktci cév, propustnost cév pro makromolekulární látky, adhezi leukocytů a následně vznik trombu. Všechny tyto účinky souvisí s aktivací krevních destiček, uvolňováním tromboxanu a poškozením vaskulárního endotelu. PDT může také prostřednictvím inhibice vzniku nebo uvolňování oxidu dusnatého endotelem vyvolávat konstrukci cév (Castano et al., 2005).

Tyto změny v cévním systému mohou způsobit jak pozitivní, tak negativní účinky. Na jedné straně může takové poškození cévního systému nádoru vést k tkáňové hypoxii, nedostatku živin a případnému hladovění a smrti nádorových buněk. Na straně druhé mohou buňky v hypoxickém stavu stimulovat vylučování proangiogenních faktorů jako je VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor) a spouštět angiogenezi.

Selektivním zacílením na existující krevní cévy a/nebo inhibicí tvorby nových krevních cév lze proto dosáhnout vysoké léčebné účinnosti. V posledních letech se vaskulárně cílené PDT dostalo značné pozornosti kvůli jejímu potenciálnímu pokroku v léčbě nádorů, což dále stimuluje klinický vývoj PS cílených na cévy (Gunaydin et al., 2021; Wang et al., 2013).

Fotodynamická terapie cílená na cévy (VTP) je charakterizovaná velmi krátkým DLI, typicky 0-30 minut po injekci PS, který by měl mít rychlou clearance, a tudíž by mohl mít minimální selektivitu vůči nádorovým buňkám. Při tomto unikátním přístupu dochází k ozařování cíleného místa světlem, zatímco PS stále cirkuluje v cévním systému

a způsobují tak vaskulární poškození prostřednictvím drah zprostředkovaných LDL-receptory a vedou k trombóze a okluzi cév.

I když mnoho PS vykazuje selektivitu vůči nádorovým buňkám a jsou ideální pro buněčnou-PDT, VTP je stále rostoucím předmětem zájmu. VTP byla primárně používána pro léčbu neovaskulárních lézí (např. AMD) a kožních kapilárních malformací (např. *nevus flammeus*). V poslední době byla VTP zprostředkovaná také Pd-bakteriochlorofylovými deriváty (např. padaporfin známý jako Tookad<sup>®</sup>, a padeliporfin – WST11, Tookad<sup>®</sup> Soluble) zkoumána pro kurativní nebo paliativní léčbu solidních nádorů (příkladem je rakovina prostaty a ledvin) cílením na cévní systém nádoru (Betrouni et al., 2011; Huang et al., 2008).

### 3.7.3 Vliv na imunitní systém

Ideální nádorová terapie by měla způsobovat lokální regresí a eradikaci nádoru, stejně jako navození systémové protinádorové imunity, která by mohla účinně eradikovat i vzdálené metastázy bez toxicity pro normální zdravé tkáně. Protinádorová imunitní odpověď, která je spuštěna formou sterilního zánětu, představuje důležitý proces při post-PDT odstranění léčené malignity. Několik různých studií na myších ukázaly, že aktivace imunitního systému po PDT je nezbytná pro úplnou eradikaci nádoru. Smrt nádorových buněk, ke které dochází přímo v důsledku fotochemického poškození nebo v důsledku hypoxie/anoxie a hyponutrice zprostředkované vaskulárním přerušením, je klíčovou prekurzorovou událostí pro protinádorovou imunitní odpověď.

PDT-léčené nádorové buňky umírají v důsledku některého z typů buněčné smrti, jako jsou nekróza, apoptóza, nekroptóza či autofagie. Ve všech režimech buněčné smrti se uvolňují intracelulární molekuly, které po svém uvolnění působí jako DAMPs (z angl. *damage-associated molecular patterns*). DAMPs jsou intracelulární molekuly normálně „skryté“ v živých buňkách, které mají odlišné vlastnosti. Předpokládá se, že DAMPs zprostředkovávají možnou imunogenicitu umírajících buněk. Uvolněné molekuly obsahují také s nádorem spojené antigeny (TAAs), které jsou jinak chráněny před rozpoznáním imunitními buňkami, a proto jsou až do uvolnění neimunogenní. V souladu s tím, extracelulární DAMPs a TAAs upozorňují buňky vrozeného a adaptivního imunitního systému na blížící se zánik buňky a na přítomnost maligní tkáně a následně pak spouštějí sterilní imunitní odpověď cílenou na odstranění nádoru léčeného PDT.

Hlavní výhodou onkoimunologických drah spouštěných během PDT léčby je, že tyto dráhy mohou vyvolat protinádorovou imunitní odpověď zprostředkovanou antigen-specifickými T-lymfocyty i proti vzdáleným nádorovým buňkám, které nebyly vystaveny PDT (Broekgaarden et al., 2015; Mroz, et al., 2011a).

### **3.8 FOTODYNAMICKÁ TERAPIE V KLINICKÉ PRAXI**

Klinické využití PDT v terapii se datuje zhruba před 40 lety, ale pokrok vědy v této metodě předběhl pokrok v jejich klinických aplikacích. V mnoha literaturách byla prokázána účinnost PDT u kožních malignit jako slibná léčebná metoda a v některých případech, například u rakoviny plic, jako adjuvantní a paliativní metoda. Ačkoli se zdá, že navrhování metod k překonání omezení, jako je fotosensitivita, špatná penetrace světla, nízká selektivita k nádorovým buňkám a systémová toxicita, je účinné z hlediska účinnosti PDT, tak pro rozšířenější aplikace je zapotřebí více randomizovaných klinických studií (Sobhani & Samadani, 2021).

Klinická PDT je prováděna ve dvou krocích: 1) Aplikace. PS je podáván systémově (intravenózně/orálně) nebo topicky. Cílem je, aby se PS následně lokalizoval v cílové lézi ve vyšší koncentraci než v normální tkáni. 2) Ozáření. Světlo je směřováno na cílovou oblast tkáně/léze. Dozimetrie světla představuje důležitou problematiku, kterou musí lékař nebo klinický (lékařský) fyzik zvládnout. Mezi podáním a ozářením musí být období, které umožní distribuci a lokalizaci PS v buňkách/tkáních cílové léze (DLI).

PDT lze použít i v rámci multidisciplinárního přístupu. Může být začleněna do schématu kombinované terapie, která má být použita v přímé kombinaci nebo až následně po chemoterapii či operaci. V určitých případech může být použita jako neoadjuvantní terapie ke zmenšení nádoru před chirurgickým zákrokem. Také může být použita v časném stádiu několika typů novotvarů, a v neposlední řadě lze PDT použít u lokálně pokročilých stádií mnoha typů nádorů za účelem zmírnění symptomů (Moghissi et al., 2015).

Mezi čtyři nejčastěji klinicky používané PS patří HpD, porfimer sodný, kyselina 5-aminolevulinová (ALA), která je prekurzorem mitochondriálně produkovaného PS protoporfyrinu IX (PpIX), a temoporfin. Všechny tyto PS spojuje značná úroveň kožní

fototoxicity, která je způsobená dlouho trvající eliminací z tkání po systémovém podání a rozsáhlou retencí PS v kůži (Weijer et al., 2015).

Hlavním cílem PDT je selektivní destrukce cílové tkáně. Tento koncept byl aplikován v různých terapeutických oblastech včetně onkologie, kde terapeutické cíle zahrnují nemetastazované solidní nádory přístupné světlu. Jednou z nejúspěšnějších aplikací PDT je léčba nemelanomových kožních nádorů, jako jsou bazocelulární karcinom (BCC) nebo spinocelulární karcinom (SCC), a prekancerózní léze jako aktinická keratóza (AK) (Ibbotson, 2010). ALA (Levulan<sup>®</sup>), methylester ALA (Metvixia<sup>®</sup>) a hydrochlorid ALA (Ameluz<sup>®</sup>) jsou běžně používanými PS pro PDT AK (Sobhani & Samadani, 2021). Pro závažná oční onemocnění jako je AMD a myopická choroidální neovaskularizace je v současnosti používán klinicky schválený PS verteporfin (Visudyne<sup>®</sup>). Porfimer sodný (Photofrin<sup>®</sup>) byl prvním PS schváleným pro klinické použití u PDT pro léčbu nádorů močového měchýře, a později také pro léčbu nádorů plic, jícnu, žaludku, děložního čípku, stejně jako pro cervikální dysplazie. Dalším PS, který získal schválení byl temoporfin (Foscan<sup>®</sup> či Foslip<sup>®</sup>), široce používán k léčbě pokročilého SCC hlavy a krku a je také studovaný pro léčbu nádorů prsu, slinivky břišní a prostaty. Talaporfin (Laserphyrin<sup>®</sup>), byl schválen v Japonsku pro léčbu nádorů plic, ale byl také používán u pacientů s časným stádiem nádorů hlavy a krku a prochází fází II klinických studií pro léčbu kolorektálních novotvarů a jaterních metastáz. Existují také další léčiva schválená pro PDT, například pro léčbu kožního T-buněčného lymfomu (SGX<sub>301</sub>) a rakoviny žlučových cest (LUZ<sub>11</sub>) (dos Santos et al., 2019).

## **4 CÍLE PRÁCE**

- Stanovení fotodynamické aktivity nových fotosensitizerů ze skupiny ftalocyaninů a jejich aza-analogů. Stanovení toxicity *in vitro* po expozici aktivujícímu záření a vlastní toxicity PS v absenci světelného záření. Hodnocení toxicity primárně na lidské nádorové linii karcinomu děložního čípku (HeLa), ale i na dalších nádorových a nenádorových buněčných liniích.
- Stanovit rychlost prostupu (časový profil) studovaných látek do buněk.
- Určit primární cíl lokalizace PS v buňkách pomocí fluorescenčních sond specifických pro jednotlivé buněčné organely metodou fluorescenční nebo konfokální mikroskopie.
- Charakterizovat změny v buněčné morfologii metodami světelné, fluorescenční a konfokální mikroskopie.
- Stanovit typ buněčné smrti vyvolaný fotodynamickou reakcí a monitorování zániku buněk v reálném čase.
- Porovnat vlastnosti studovaných látek mezi sebou a objasnit vliv struktury, periferní substituce a náboje na fotodynamickou aktivitu.
- Ověřit vliv pH, vazby na sérové proteiny, interakce s membránami, rozdílů v lokalizaci a následné relokizace po ozáření na fotodynamickou účinnost těchto látek.
- Porovnat účinnost nových PS s vybranými klinicky používanými PS.
- U vybraných látek odhalit důležité faktory, které mohou ovlivnit jejich použití při světle spouštěném uvolňování látek z liposomů.

## **5 KOMENTÁŘE K PRACÍM**

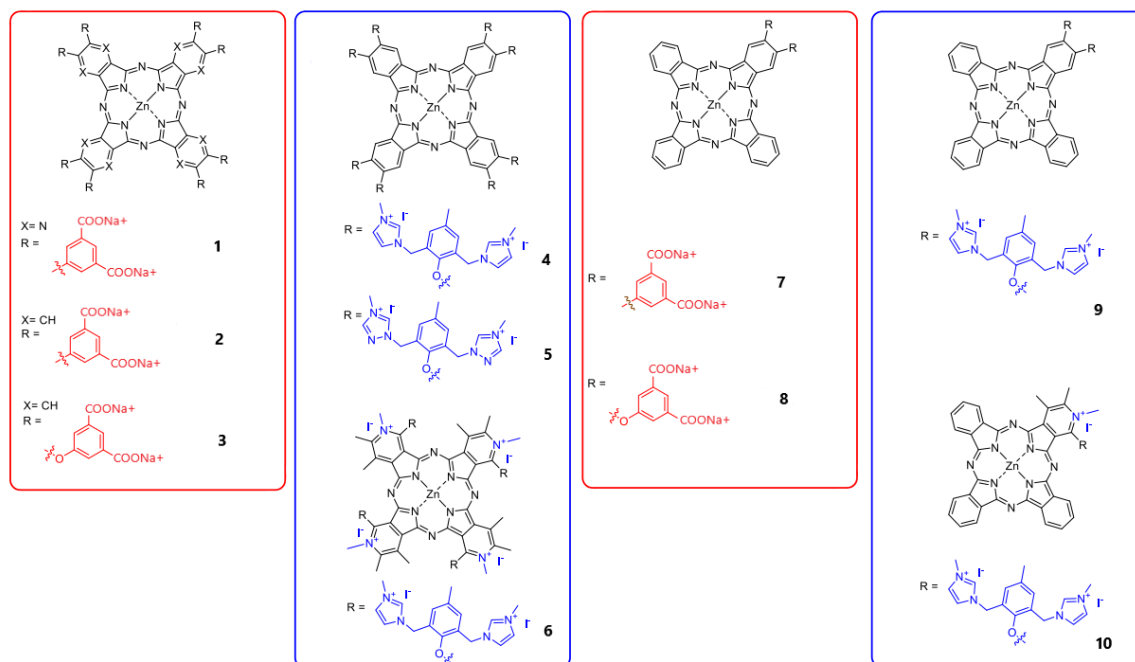


Tato disertační práce je předkládána jako komentovaný soubor čtyř prací. Všechny tyto práce byly publikovány v mezinárodních impaktovaných časopisech. Uvedené publikace jsou původní experimentální práce zaměřené na syntézu a hodnocení fotodynamické aktivity originálních fotosensitizerů na bázi ftalocyaninů a jejich dusíkatých analogů, azaftalocyaninů (AzaPc), ve fotodynamické terapii nádorových onemocnění.

## 5.1 VLIV NÁBOJE U KATIONICKÝCH A ANIONICKÝCH FTALOCYANINŮ NA JEJICH FOTODYNAMICKÝ ÚČINEK

Kollár J, Macháček M, Halašková M, Lenčo J, Kučera R, Demuth J, Rohlíčková M, Hasoňová K, Miletín M, Nováková V, Zimčík P. **Cationic versus Anionic Phthalocyanines for Photodynamic Therapy: What a Difference the Charge Makes.** *Journal of Medicinal Chemistry*. 2020; vol. 63, s. 7616-7632.

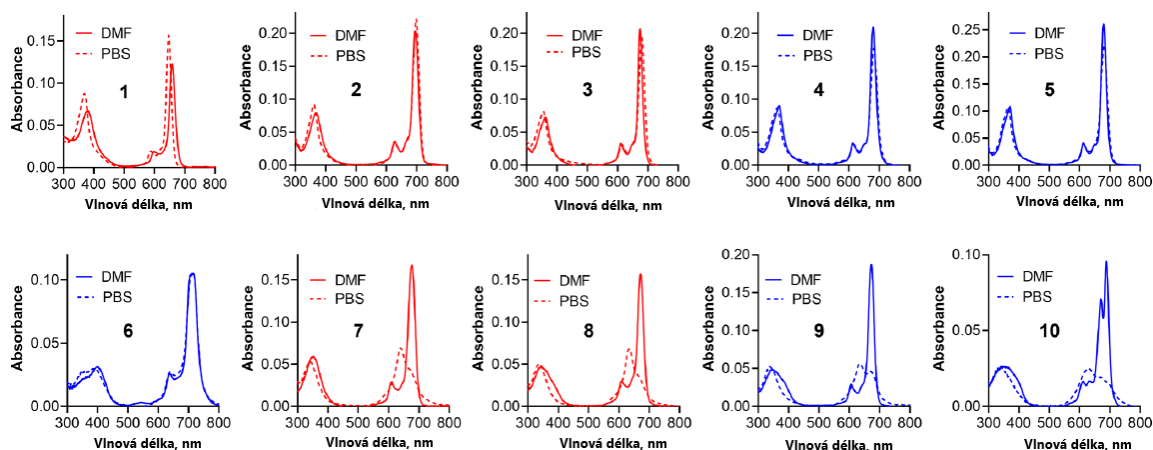
Tato studie byla zaměřena na řadu kationických a anionických Pc vhodných pro PDT a zkoumala jejich fotofyzikální, fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti. Cílem této práce bylo nalézt parametry a faktory, které mohou vysvětlit podstatný rozdíl v aktivitě mezi Pc nesoucími kladné a záporné náboje na periferních substituentech. Do studie bylo zahrnuto deset různých zinečnatých Pc rozdělených do čtyř skupin, a to anionické hydrofilní (1-3), kationické hydrofilní (4-6), anionické amfifilní (7 a 8) a kationické amfifilní (9 a 10) (viz Obr. 4).



Obr. 4 Struktury studovaných sloučenin 1-10. Červeně jsou značené anionické látky a modře kationické, přičemž látky 1-6 jsou symetrické hydrofilní deriváty a látky 7-10 jsou nesymetrické amfifilní deriváty.

Design studovaných sloučenin byl primárně motivován snahou udržet hydrofilní molekuly plně monomerní ve vodných roztocích, proto byla zvolena substituce karboxylátovými funkčními skupinami nebo kvarterními aminoskupinami, které Pc plně monomerizují (Choi et al., 2004; Makhseed et al., 2013). Všechny hydrofilní sloučeniny (**1-6**) a anionické amfifilní Pc (**7, 8**) byly plně rozpustné ve vodě a PBS i při vysokých koncentracích (> 1 mM). Na druhou stranu, u amfifilních kationických Pc **9** a **10** byla pozorována mnohem nižší rozpustnost (~100  $\mu\text{M}$ ) a docházelo k jejich precipitaci v kultivačním médiu nad touto koncentrací.

Absorpční spektra všech studovaných derivátů (Obr. 5) v DMF byla typická pro monomerní stav Pc, s intenzivním Q-pásem mezi 670-690 nm a B-pásem přibližně v oblasti 350-370 nm. Zvýšená polarita a iontová síla v prostředí PBS vyvolala agregaci u všech amfifilních sloučenin (**7-10**), zatímco u všech hydrofilních Pc (**1-6**) byl v PBS zachován plně monomerní charakter.



Obr. 5 Absorpční spektra **1-10** v DMF a v PBS o koncentraci 1  $\mu\text{M}$ .

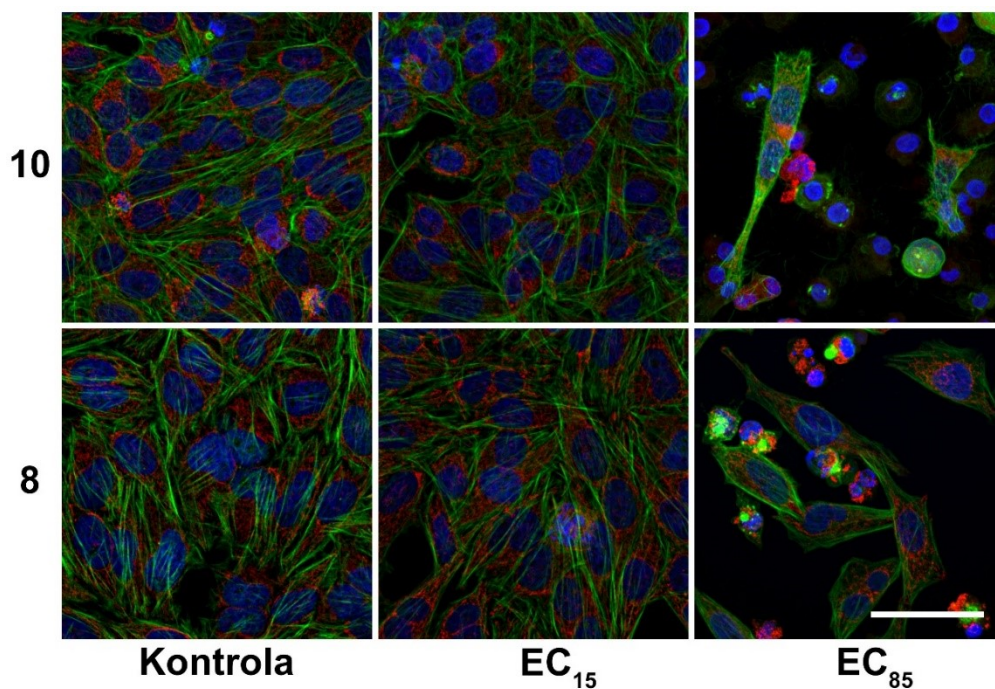
*In vitro* experimenty byly prováděny na buněčných liniích HeLa, MCF-7 a HCT-116 a vyšší fotodynamickou aktivitu vykazovaly kationické Pc na všech buněčných liniích ( $\text{EC}_{50} \sim 3\text{-}50 \text{ nM}$ ) v porovnání s anionickými Pc ( $\text{EC}_{50} \sim 0.3 - 10 \mu\text{M}$ ). Hlavními faktory přispívajícími k obecně nižší fotodynamické aktivitě anionických Pc byly nízké pH prostředí a vazba na sérové proteiny (především sérový albumin).

Náboj u anionických sloučenin není stabilní a při nižších hodnotách pH mohou karboxylátové skupiny ztrácet náboj (asociace protonu – vodíkového kationtu), který je zodpovědný za monomerizaci molekul repulzními silami. Ukázalo se, že při pH 5, které

je typické pro lyzozomální prostředí, jsou všechny anionické Pc agregovány, což vede k podstatnému snížení fotodynamické aktivity bez ohledu na to, zda jsou navázány na bovinní sérový albumin (BSA) či ne. Tato skutečnost byla potvrzena také slabým fluorescenčním signálem v lyzosomech, který se podstatně zvýšil po jejich prasknutí a zvýšení pH v důsledku změny prostředí. Naopak, kationické deriváty, které mají stabilní náboj (kvaternizované aminoskupiny), nebyly změnou pH významně ovlivněny.

Velmi důležitý vliv na aktivitu testovaných Pc měla také vazba na BSA. Silná vazba s vysokými hodnotami asociační konstanty byla pozorována primárně u anionických hydrofilních derivátů **1-3** a mírně slabší vazbu vykazovaly také anionické amfifilní deriváty **7** a **8**. U kationických derivátů **4-6** nebyla pozorována žádná interakce s BSA a u amfifilních kationických derivátů **9** a **10** byla jen velmi slabá. Navíc, kationické amfifilní deriváty **9** a **10** mají za biologických podmínek mnohem větší preferenci lokalizovat se přednostně v biomembránách než v BSA, což bylo potvrzeno pozorováním jejich signálu v buňkách, kdy se tyto deriváty po prasknutí lyzosomů relokaly na membrány. Naproti tomu, po uvolnění z lyzosomů byl signál anionických amfifilních derivátů **7** a **8** detekován volně v cytoplazmě. Po rychlém uvolnění kationických derivátů z lyzosomů docházelo k jejich relokaci do cytoplazmy a poškození dalších organel. Tento proces začal ve velmi krátkém čase po zahájení ozařování. Na základě získaných hodnot  $EC_{50}$  se tento efekt zdá být výraznější u hydrofilních sloučenin (**4-6**), které jsou po uvolnění z lyzosomů rozptýleny v cytoplazmě ( $^1O_2$  může snadno poškodit všechny organely v okolí), zatímco u amfifilních látek **9** a **10** lokalizovaných primárně ve zbytcích membránových struktur je poškození způsobené produkcí  $^1O_2$  lokalizováno především na membrány.

Morfologické změny a pokles počtu živých buněk byly snadno detekovány při vyšší dávce PS odpovídající  $IC_{85}$  (Obr. 6). Kationické sloučeniny indukovaly kondenzaci jaderného chromatinu a pyknózu v mrtvých buňkách, slabým fluorescenčním signálem mikrofilament a difúzním, stěží detekovatelným signálem mitochondrií (sonda MitoTracker), což naznačuje rychlou buněčnou smrt jakou je nekróza. Na druhou stranu, anionické sloučeniny indukovaly různé fenotypy mrtvých buněk obsahujících fragmentaci jádra nebo pyknózu, depolymerovaná nebo reorganizovaná mikrofilamenta a změny v morfologii mitochondrií (difuzního signálu sondy MitoTracker nebo zkrácené a zaoblené mitochondrie). To naznačuje pomalejší smrt buňky s probíhajícími buněčnými procesy, pravděpodobně apoptózou.



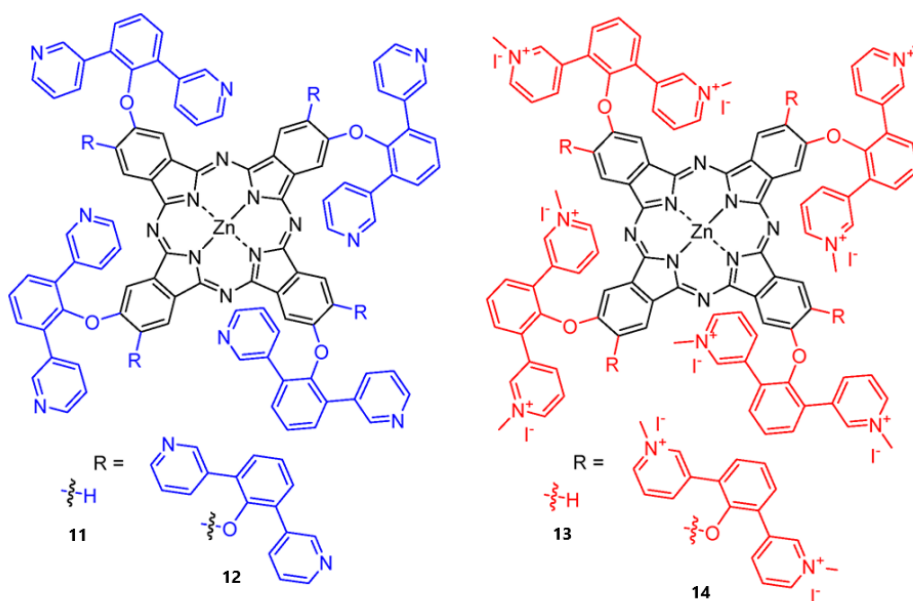
Obr. 6 Morfologické změny buněk 24 h po ozáření ( $\lambda > 570 \text{ nm}$ ,  $11.2 \text{ J cm}^{-2}$ ) po inkubaci s amfifilní anionickou **8** a amfifilní kationickou **10** o koncentracích odpovídajících  $EC_{15}$  a  $EC_{85}$ . Modrá – jádra, červená – mitochondrie, zelená – F-aktin (mikrofilamenta). Měřítka odpovídá  $50 \mu\text{m}$ .

Výsledky této studie na sérii deseti sloučenin nesoucích kladné nebo záporné náboje různě rozmístěné na periferii makrocyklu potvrdily očekávaný rozdíl mezi anionickými a kationickými (Aza)Pc z hlediska jejich fotodynamické aktivity na buňkách. Bylo potvrzeno, že nižší pH v endolysosomálním kompartmentu a vazba na albumin jsou zodpovědné za výrazně nižší fotodynamickou aktivitu anionických derivátů, zejména hydrofilních.

## 5.2 PERIFERNĚ SUBSTITUOVANÉ KATIONICKÉ FTALOCYANINY JAKO ÚČINNÉ FOTOSENSITIZÉRY

Halašková M, Rahali A, Almeida-Marrero V, Macháček M, Kučera R, Jamoussi B, Torres T, Nováková V, de la Escosura A, Zimčík P. **Peripherally Crowded Cationic Phthalocyanines as Efficient Photosensitizers for Photodynamic Therapy.** *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 2021; vol. 12, s. 502-507.

Hlavní motivací tohoto projektu bylo zhodnocení, jak je rigidita periferních substituentů zásadní pro dosažení vysoké účinnosti PDT. Za tímto účelem byly navrženy a syntetizovány periferně substituované Pc **11**, **12**, **13**, **14** (viz Obr. 7) obsahující 8 nebo 16 pyridylových zbytků (neutrální nebo kvarternizované).

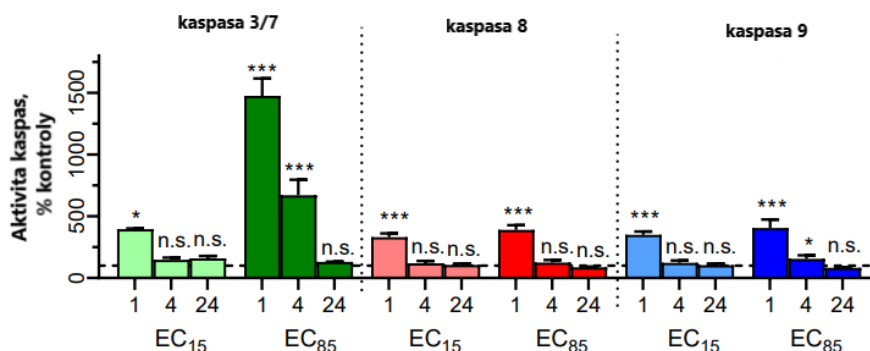


Obr. 7 Struktury zkoumaných periferně substituovaných zinečnatých Pc **11-14**.

Kvaternizované kationické deriváty **13** a **14** ve vodě vůbec neagregovaly a nejen že si zachovaly své dobré fotofyzikální vlastnosti, ale byly schopné vysoké fotodynamické aktivity na buněčných liniích HeLa, MCF-7 a EA.hy926 s velmi nízkými hodnotami  $EC_{50}$ . Oba Pc vykazovaly největší aktivitu proti MCF-7 buňkám s hodnotami  $EC_{50} \sim 49$  nM po aktivaci světlem. Současně si zachovaly nízkou toxicitu bez ozáření ( $TC_{50} > 600$   $\mu$ M) poskytující tak velmi dobré fototerapeutické indexy ( $TC_{50}/EC_{50}$ )

1409 a 5691 (pro **13** a **14**). U nekvaternizovaných derivátů **11** a **12** docházelo k precipitaci nad 1  $\mu\text{M}$  v kultivačním médiu bez jakékoli detekovatelné toxicity vůči HeLa buňkám jak v přítomnosti, tak v nepřítomnosti světla. Toto chování je důsledkem jejich zvýšené tendence k agregaci ve vodných roztocích, a proto tyto sloučeniny nebyly dále hodnoceny.

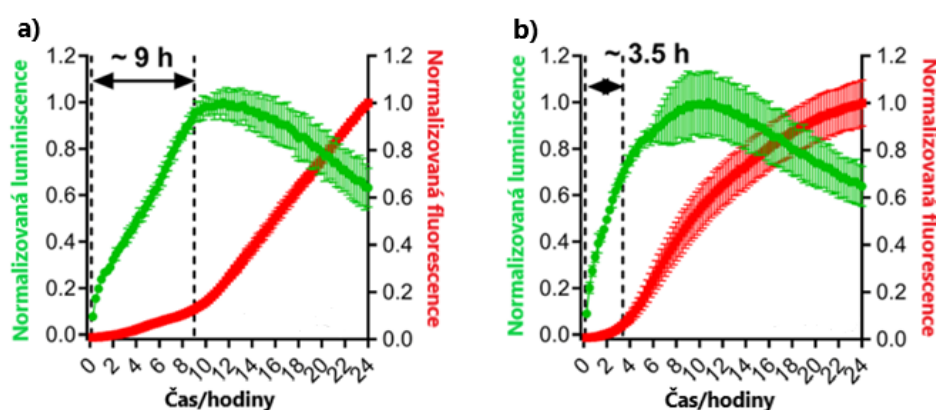
Primárním místem lokalizace PS v buňkách jsou lyzozomální váčky. Bohužel, u obou sloučenin (**13** i **14**) dochází během fotoaktivace v buňkách k jejich rychlému zhášení a společně s jejich poměrně rychlou relokací do cytoplazmy tak není jejich detekce v jejich primární subcelulární lokalizaci (endosomy a lyzosomy) snadná. Současně tato rapidní relokace vede k oxidačnímu poškození i ostatních buněčných komponent vedoucí k vyvolání buněčné smrti. Po ozáření buněk dochází také k aktivaci iniciačních kaspas 8 a 9 a současně i exekučních kaspas 3/7 následkem enzymového štěpení prokaspas. Hodnocení kaspasové aktivity bylo založeno na měření luminiscentních signálů v časech 1, 4 a 24 h po fotodynamické aktivaci PS (Obr. 8).



Obr. 8 Aktivita kaspas 3/7 (zelená), 8 (červená) a 9 (modrá) pro **14** v různých časech po ozáření.

Výsledky *in vitro* experimentů ukázaly, že hlavní cestou zániku buněk je apoptóza, která je následovaná sekundární nekrózou na rozdíl od situace *in vivo*, kde signály na povrchu apoptotických buněk podporují jejich vychytávání fagocyty prostřednictvím fagocytózy a současně tak indukují protizánětlivou odpověď (Sachet, 2017). Monitorování zániku buněk v reálném čase bylo umožněno použitím annexin V luciferasových fúzních proteinů a fluorescenční sondy s afinitou k DNA. Expozice fosfatidylserinu na vnější stranu cytoplazmatické membrány byla detekována jako zvýšení luminiscenčního signálu a začala ihned po ozáření. V důsledku ztráty integrity membrán (cytoplazmatické i jaderné), která je typická pro pozdní stádia apoptózy *in vitro*

(sekundární nektróza) nebo nekrotickou buněčnou smrt, dochází ke zvýšení fluorescence. Zpoždění nárůstu signálu fluorescence umožňuje rozlišení mezi apoptózou (následovanou sekundární nektrózou – pozorovanou jako výrazné zpoždění) a primární nektrózou pozorovanou jako krátké nebo chybějící zpoždění nárůstu fluorescence (Kupcho et al., 2019). Obě studované sloučeniny způsobovaly po fotodynamické aktivaci jak indukci apoptózy, tak i známky sekundární nektrózy. Při nižší dávce Pc byl nárůst fluorescence detekován 9 h po aktivaci světlem, zatímco vyšší dávky Pc vedly k nárůstu již během 3,5 h po aktivaci díky rozsáhlému a rychlému poškození buněk (Obr. 9).



Obr. 9 Detekce buněčné smrti v reálném čase pomocí Annexinu V (zelená) a DNA-vazebné sondy (červená) pro 14 o koncentracích  $EC_{15}$  (a) a  $EC_{85}$  (b).

Tato práce potvrdila, že rigidní uspořádání objemných periferních kationických substituentů na aromatickém jádře Pc účinně inhibuje agregaci (nejen v organických rozpouštědlech, ale také ve vodě), a udržuje tak molekuly PS výhradně v monomolekulárním stavu, který je velmi důležitý pro zajištění dobrých fotofyzikálních vlastností a vysoké fotodynamické aktivity.

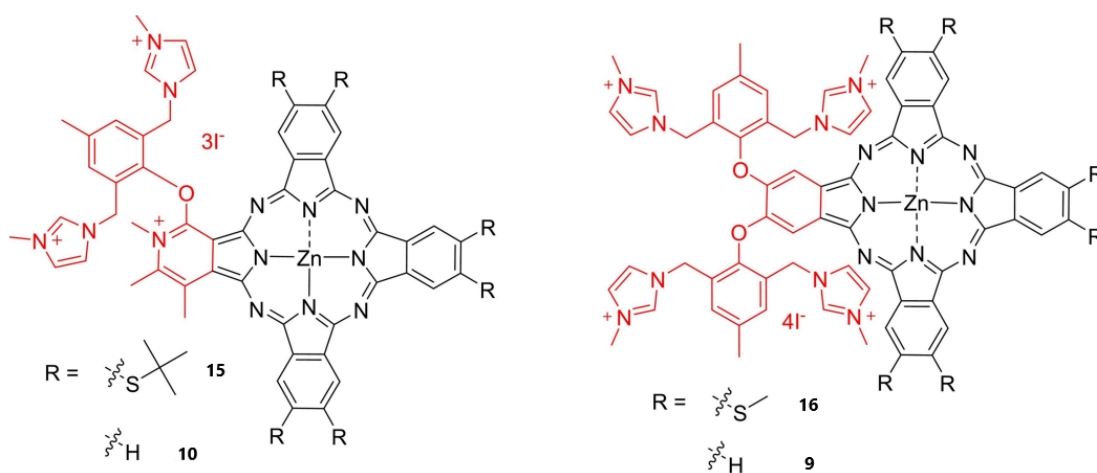


### 5.3 AMFIFILNÍ KATIONICKÉ FTALOCYANINY PRO FOTODYNAMICKOU TERAPII NÁDORŮ

Halašková M, Kostelanský F, Demuth J, Hlbočanová I, Miletín M, Zimčík P, Macháček M, Nováková V. **Amphiphilic Cationic Phthalocyanines for Photodynamic Therapy of Cancer.** *ChemPlusChem.* 2022; 87.

Tato práce byla zaměřena na studium amfifilních kationických Pc kombinujících nabitě skupiny na hydrofilní části makrocyklu, zatímco lipofilní část makrocyklu není substituovaná, nebo nese alkylsulfanylové skupiny. Její cílem bylo syntetizovat tyto amfifilní nabitě Pc navržené podle nejnovějších poznatků o vztazích mezi strukturou a aktivitou, studovat jejich fotofyzikální vlastnosti, porovnat jejich interakci s liposomy, které jsou považovány za jednoduchý model biologické membrány, a posoudit jejich biologickou aktivitu *in vitro* na různých buněčných liniích.

Amfifilního charakteru cílových (Aza)Pc **9**, **10**, **15** a **16** (Obr. 10) bylo dosaženo substitucí nabitými skupinami pouze jedné čtvrtiny makrocyklu (hydrofilní část), zatímco tři čtvrtiny makrocyklu zůstaly nesubstituované, nebo nesou alkylsulfanylové skupiny (lipofilní část). Sloučeniny **9** a **10** byly zkoumány již dříve v předchozí studii (viz kapitola 6.1, (Kollár et al., 2020)) a jsou zde použity především pro porovnání vlivu substituce – tato práce byla zaměřena především na hlubší výzkum zcela nových sloučenin **15** a **16**.

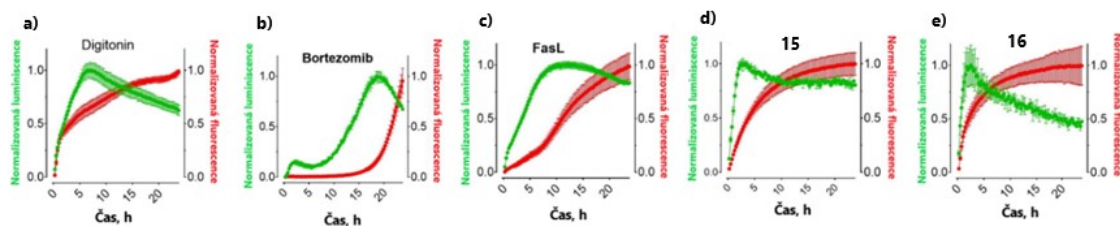


Obr. 10 Struktury zcela nových studovaných sloučenin **15** a **16** v porovnání se sloučeninami **9** a **10** publikovanými již dříve naší skupinou (Kollár et al., 2020).

Fotofyzikální vlastnosti syntetizovaných sloučenin **15** a **16** dobře korespondovaly s vlastnostmi (Aza)Pc **9** a **10** – sloučeniny vykazovaly vysokou produkci  $^1\text{O}_2$  ( $\Phi\Delta = 0.38 - 0.46$  v DMSO) a dobré kvantové výtěžky fluorescence ( $\Phi F = 0.21 - 0.26$  v DMSO). Byl však pozorován významný rozdíl v interakci těchto Pc s lipidovými membránami. Na rozdíl od sloučenin **9** a **10**, které vstupovaly do lipidové dvojvrstvy téměř okamžitě, byla kinetika vstupu **15** a **16** substituovaných alkylsulfanylovou skupinou pomalá. Plné monomerizace v membráně však bylo po určité době dosaženo. Studium interakce s liposomy odhalilo, že i deriváty s objemnými substituenty (tercbutylsulfanylový substituent) jsou schopny vstupovat do biomembrán, a lze je tedy použít v dalším vývoji nových PS.

Pomalejší interakce s biomembránami neměla zásadní negativní vliv na fotodynamický účinek *in vitro*. Sloučeniny **15** a **16** byly charakterizovány vynikajícími hodnotami  $\text{EC}_{50}$  v rozsahu desítek nM na všech buněčných liniích (HeLa, MCF-7 a HCT-116) a byly tak srovnatelné s hodnotami  $\text{EC}_{50}$  látek **9** a **10**. Sloučeniny byly lokalizovány především v endolyzozomálním kompartmentu, a díky jejich amfifilnímu charakteru také v cytoplazmatické membráně. Po ozáření buněk došlo k současnému zvýšení aktivit exekučních (kaspasa 3/7) i iniciačních kaspas vnější (kaspasa 8) a vnitřní (kaspasa 9) dráhy. To je způsobeno buď nespecifickou aktivací proteasami uvolněnými z poškozených lyzozomů, nebo současným výskytem signálů intracelulárního stresu (endolyzozomální lokalizace PS) a extracelulárních stresových signálů (lokalizace PS v cytoplazmatické membráně) vedoucích k zániku buňky.

K objasnění, zda k zániku buněk dochází nekrotickou nebo apoptotickou cestou, bylo stejně jako u předchozích látek použito monitorování procesu buněčné smrti v reálném čase (Obr. 11). Pro přesnější rozlišení mezi těmito cestami byly spolu s (Aza)Pc **15** a **16** hodnoceny také pozitivní kontroly – digitonin (induktor nekrózy dezintegrací membrány), bortezomib (induktor vnitřní dráhy apoptózy) a FasL (induktor vnější dráhy apoptózy). Obě sloučeniny **15** a **16** vykazovaly nárůst luminiscence s okamžitým nárůstem fluorescence ukazující na převážně nekrotickou buněčnou smrt po ozáření (obdobně, jako tomu bylo po použití digitoninu).



Obr. 11 Monitorování procesu buněčné smrti v reálném čase vazbou Annexinu V (zelená) a DNA-vazebné sondy (červená). Pozitivní kontroly pro nekrózu (a), vnitřní cestu apoptózy (b), vnější cestu apoptózy (c); sloučeniny **15** (d) a **16** (e) o koncentracích  $EC_{85}$ .

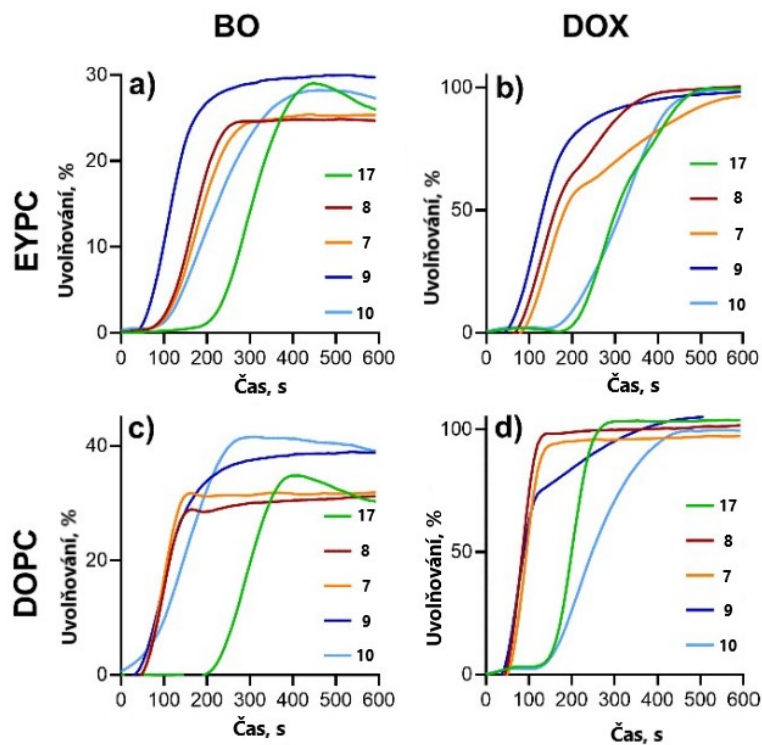
Výsledky této studie prokázaly, že zvýšená lipofilita nepolární části amfifilní molekuly použitím objemných lipofilních substituentů nemusí zákonitě vést ke zlepšenému vmezeření do lipidové dvojvrstvy. Naopak, deriváty bez objemných lipofilních funkčních skupin vstupují do lipidových dvojvrstev téměř okamžitě, a proto se zdají být vhodnějšími kandidáty pro budoucí návrh PS pro PDT – zvláště u aplikací, kde by bylo vhodné použít kratší DLI.

## 5.4 SVĚTLEM VYVOLANÉ UVOLŇOVÁNÍ LÁTEK Z LIPOSOMŮ

Kolářová M, Kočišćáková L, Kollár J, Kozlíková M, Halašková M, Rohlíčková M, Kostelanský F, Miletín M, Nováková V, Macháček M, Zimčík P. **Amphiphilic phthalocyanines as a tool for a light-triggered drug release from liposomes.** V recenzním řízení v *Journal of Materials Chemistry B*. 2023.

Tato práce byla zaměřena na studium pěti amfifilních (Aza)Pc (anionické **7** a **8**, kationické **9** a **10**, a hlinitý derivát **17**, který je komerčně dostupným a široce studovaným PS) a jejich vzájemné srovnání k odhalení důležitých faktorů, které mohou ovlivnit jejich použití při světlem spouštěném uvolňování léčiv z liposomů. Byly připraveny dva druhy liposomů složené buď z EYPC (fosfatidylcholin získaný z vaječného žloutku) s cholesterolem (molární poměr 55:45; složení odpovídá komerčně dostupné liposomální formě doxorubicinu známého pod obchodním označením Myocet®) nebo z DOPC (dioleoylfosfatidylcholin) s cholesterolem (molární poměr 60:40) se záměrem porovnat efekt míry nasycení mastných kyselin ve struktuře fosfolipidů. K monitorování uvolňování látek z liposomů byla použita dvě modelová fluorescenční „léčiva“ – BO (bazická oranž 14) a DOX (doxorubicin).

Všechny amfifilní PS dobře vstupovaly do lipidových dvojvrstev liposomů s následnou monomerizací agregátů PS. Po ozáření laserem (685 nm, 400 mW·cm<sup>-2</sup>) byly schopny efektivně uvolňovat léčiva z liposomů během několika minut (Obr. 12). Poločasy jejich uvolňování silně závisely na produkci <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (Zn > Al), jejich úrovni agregace a absorpenci při vlnové délce záření 685 nm.



Obr. 12 Světlem spouštěné uvolňování BO (a, c) a DOX (b, d) z EYPC (a, b) nebo DOPC (c, d) liposomů s testovanými PS v poměru 50:1 (PS:lipidy). Ozáření: 685 nm, 400 mWcm<sup>-2</sup>.

Výsledky experimentů ukázaly, že BO se během uvolňování z liposomů rozkládá působením PS, a není proto vhodná jako modelové „lčivo“ pro tento typ experimentů. Na druhou stranu, DOX se ukázal být plně stabilní během uvolňování. Světlem spouštěné uvolňování z DOPC liposomů bylo rychlejší než z EYPC liposomů díky zvýšenému počtu dvojných vazeb v mastných kyselinách (intenzivnější peroxidace fosfolipidů). Tato studie potvrdila vysoký potenciál amfifilních Pc v této aplikaci.

## **6 SOUHRNNÁ DISKUZE**

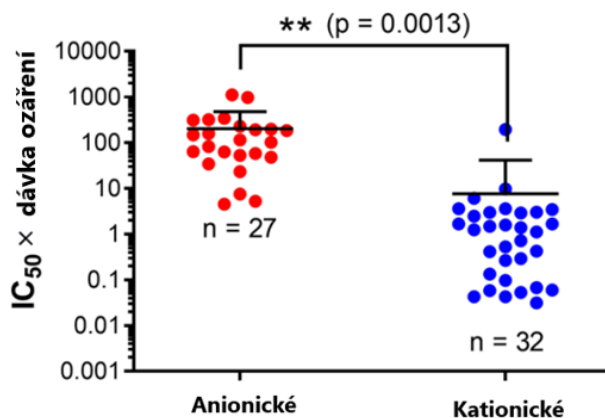
Pro PDT byla testována a klinicky schválena řada různých makrocyclů: porfyriny, chloriny, bakteriochloriny a Pc. Poslední zmiňované jsou zvláště zajímavou skupinou látek, která se vyznačuje zejména optimálními fotofyzikálními vlastnostmi (jako jsou silná absorpce kolem 700 nm a dobrá produkce  $^1\text{O}_2$ ) a možností variabilní substituce makrocyclu (periferní a axiální – v případě některých centrálně koordinovaných atomů), která může vylepšit fyzikálně-chemické vlastnosti. Pc jsou aromatické heterocykly, které se skládají ze čtyř isoindolových podjednotek spojených atomy dusíku a jsou schopny koordinovat iont kovu ve středu molekuly. Přítomnost a povaha daného centrálního kovového iontu silně ovlivňuje vlastnosti Pc – např. efektivnost mezisystémového přechodu a životnost tripletových stavů, čímž ovlivňuje účinnost tvorby  $^1\text{O}_2$ . Tyto Pc komplexy jsou obecně považovány za PS s výrazně vyšším potenciálem ve srovnání s jejich analogy bez přítomnosti kovů. Nejvyužívanějšími jsou komplexy Pc s hliníkem (příkladem je Photosens<sup>®</sup>), se zinkem (Photocyanine) a s křemíkem (Pc4).

Charakteristickým problémem u mnoha Pc je však jejich hydrofobní planární makrocyclus, který má, zejména ve vodě, tendenci silně agregovat, což vede ke snížení nebo dokonce k eliminaci produkce  $^1\text{O}_2$ , a tedy i ztrátě fotodynamické aktivity Pc. Řešením je navázání ve vodě rozpustných substituentů (především nabitých), které mohou agregaci výrazně snížit na základě elektrostatických odpudivých sil. Možnost modifikací na periférii Pc makrocyclu umožňuje měnit míru hydrofility celé molekuly, což umožňuje syntetizovat PS s různou fotodynamickou aktivitou, způsoby prostupu do buněk, intracelulární lokalizací, rychlostí penetrace tkáněmi a vylučování organismem (Brilkina et al., 2019; Li, et al., 2019a; Roguin et al., 2019).

### **Vliv náboje ve vodě rozpustných ftalocyaninů na jejich fotodynamickou aktivitu**

Dlouhodobé pozorování fotodynamických vlastností různých Pc publikovaných nejen naší výzkumnou skupinou, ale také jinými výzkumníky odhalilo podstatné rozdíly mezi anionickými (obsahující např. karboxylátové nebo sulfátové funkční skupiny) a kationickými (obsahující především kvarterní amoniové skupiny) Pc. Analýza téměř šedesáti souborů dat publikovaných v literatuře tuto hypotézu podporuje a naznačuje systematicky významné rozdíly v aktivitě. Ty ukazují, že anionické Pc jsou obecně mnohem méně aktivní než kationické Pc (Obr. 13), což může podstatně ovlivnit výběr

vhodných substituentů v racionálním návrhu nově syntetizovaných PS s vylepšenými fotodynamickými vlastnostmi.



Obr. 13 Srovnání fotodynamických aktivit *in vitro* u anionických (červená) a kationických (modrá) Pc publikovaných v literatuře (Kollár et al., 2020).

Biologické prostředí je velmi komplexní systém složený především z mnoha biomolekul, se kterými přicházejí PS do styku a mohou s nimi interagovat. Nejdůležitějšími z nich jsou sérové proteiny a lipidové dvojvrstvy buněčných membrán, které mohou podstatně ovlivnit stav agregace, fotofyzikální vlastnosti i farmakokinetiku PS, a následně konečný fotodynamický efekt. Z toho důvodu byl zkoumán efekt nejhojnějšího sérového proteinu albuminu (v našem případě šlo o BSA) a interakce studovaných Pc s lipidovou dvojvrstvou liposomů.

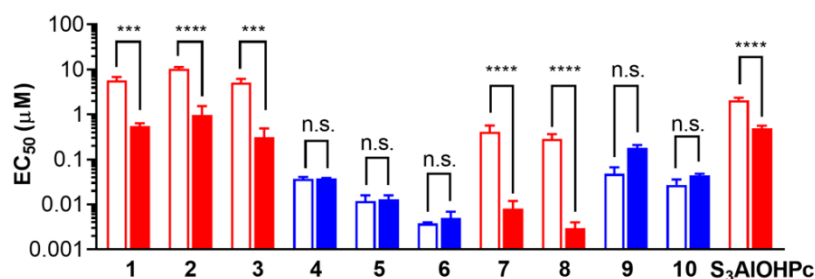
Albumin úzce souvisí s regulací plazmatického osmotického tlaku a s transportem řady endogenních a exogenních sloučenin. Mnoho studií potvrdilo, že albumin se podílí na poskytování výživy nádorům. Albuminové receptory, které jsou nadměrně exprimovány na nádorových buňkách, usnadňují akumulaci, distribuci a degradaci albuminu v nádorových tkáních. Vzhledem ke svému potenciálu pro zvýšenou permeabilitu a retenční efekt byl albumin široce zkoumán jako všestranný nanosvič pro dodávání léčiv prostřednictvím kovalentní konjugace nekovalentních interakcí (Lan et al., 2016; Li, et al., 2019b; Wang et al., 2018). Albuminy (navzdory jejich relativně nízkému izoelektrickému bodu přibližně 4.7) jsou dobře známé tím, že silně vážou kyselá léčiva hlavně do kladně nabitých vazebných míst tvořených převážně bazickými aminokyselinovými zbytky lysinu, argininu a histidinu (Zsila et al., 2011). Proteiny mají



jedno nebo více míst pro vazbu Pc, která ovlivňuje distribuci, metabolismus i molekulární formu PS, a může měnit jejich fotofyzikální a fotochemické vlastnosti (Lang et al., 2004).

Vazba na BSA zháší excitované stavy anionických Pc, kdy zejména v případě tetrapyrazinoporfyrazinu (TPyzPz) je tento proces důležitou deaktivací cestou. Jak bylo nedávno prokázáno nejen pro sulfonovaný zinečnatý TPyzPz a 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfofenyl)porfyrin a další Pc i porfyriny, vazba na BSA stericky omezuje účinnou difúzi  $^3\text{O}_2$  k makrocyklu vedoucí ke snížení zhášení tripletových stavů kyslíkem. Prostorové uspořádání po vazbě Pc na BSA vede také k chemickému zhášení produkovaného  $^1\text{O}_2$  reakcí s BSA, jakožto nejbližší dostupnou molekulou. Po reakci s BSA se  $^1\text{O}_2$  do okolního roztoku neuvolňuje v dostatečném množství a poškození ostatních biomolekul a organel v buňkách se tak výrazně snižuje (Macháček et al., 2016b).

S ohledem na silnou vazbu anionických Pc na BSA, byla fotodynamická aktivita všech Pc zkoumána také v médiu bez obsahu séra (SFM), u kterého byly získány statisticky významné rozdíly v hodnotách  $\text{EC}_{50}$  (Obr. 14). U anionických sloučenin **1-3** byla získaná aktivita přibližně desetkrát vyšší. Obdobně tomu bylo u derivátů **7** a **8** (téměř o 2 řády nižší  $\text{EC}_{50}$ ) či klinicky využívaného sulfonovaného hydroxyhlinitého Pc (Photosens<sup>®</sup>). Na druhou stranu, u kationických Pc nebyl pozorován žádný statisticky významný rozdíl aktivitě. Při použití SFM se také zvýšilo produkované množství  $^1\text{O}_2$  a účinek na buněčné organely byl proto destruktivnější. Tento efekt je dále podpořen dobrými vazebnými vlastnostmi anionických amfifilních derivátů **7** a **8** k biomembránám v nepřítomnosti BSA, kde  $^1\text{O}_2$  může snadno ničit lipidy v nejbližším okolí, a vysvětluje tak extrémně lepší fotodynamickou aktivitu těchto Pc v SFM oproti SCM.



Obr. 14 Hodnoty  $\text{EC}_{50}$  Pc **1-10** a AIOHPc na buněčné linii HeLa v SCM (prázdné sloupce) a SFM (vyplněné sloupce). Kationické deriváty – modrá, anionické deriváty – červená (Kollár et al., 2020).

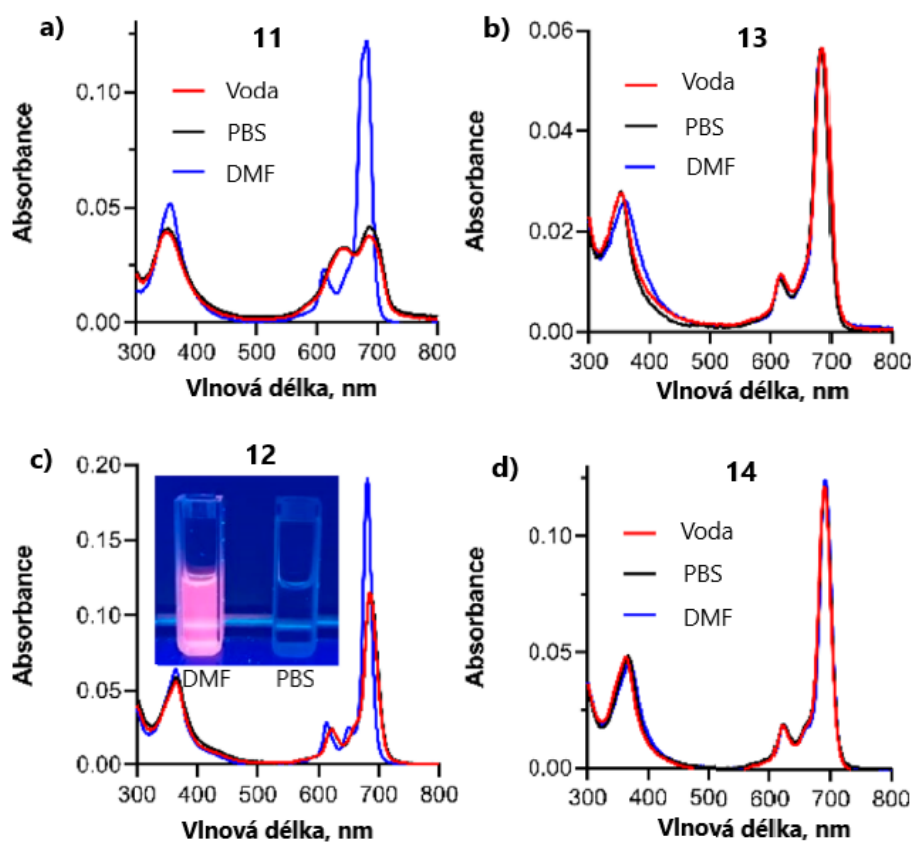
Všechny výše zmíněné studované sloučeniny byly lokalizované v endolyzozomálním kompartmentu po 12 h inkubaci, což je v souladu s dříve publikovanými studiemi naší výzkumné skupiny zaměřenými na *in vitro* hodnocení PS (Kollár et al., 2019; Macháček, et al., 2016a; Macháček, et al., 2016b). Hydrofilní kationtové i aniontové sloučeniny byly lokalizovány výhradně v lyzosomech, zatímco všechny amfifilní sloučeniny byly kromě lyzozomů detekovány také v buněčné membráně. Lokalizace PS v buňce určuje primární cíl oxidačního poškození buňky po ozáření. Stejně tak je důležitá i případná relokalizace PS v průběhu ozařování, protože PS dále produkuje  $^1\text{O}_2$  i v těchto dalších oblastech buňky. Hydrofilní kationtové Pc 4–6 se po ozáření relokalizovaly do cytoplazmy a poškozovaly další buněčné organely. Podobné chování bylo již dříve popsáno pro Pc 6 (Macháček, et al., 2016a).

Jodid propidia (PI) je fluorescenční interkalační činidlo (neschopné procházet neporušenými buněčnými membránami), které bylo použito k hodnocení rychlosti a rozsahu poškození ozařovaných buněk během ozařování a během prvních minut po ozáření. Poškození buněk působením aniontového hydrofilního Pc 2 nebylo dostatečné k vyvolání rozsáhlého poškození membrán, což bylo demonstrováno neschopností PI obarvit buňky a jádra ve většině buněk ani 45 min po ozáření. Výrazně vyšší prostup PI do buněk vyvolal aniontový amfifilní Pc 8, u kterého bylo barvení PI detekovatelné 15 min po ozáření. Kationické sloučeniny vyvolávaly mnohem rychlejší a závažnější poškození. Kationické hydrofilní Pc 5 i amfifilní Pc 10 indukovaly oxidační poškození, které umožnilo PI prostupovat do cytoplazmy již během prvních 5 min ozařování.

Objemné nabitě substituenty na periférii Pc jsou nezbytné pro snížení agregace, která by jinak vedla ke ztrátě fotodynamické aktivity. To ovšem nemusí být dostatečné ve vodním prostředí, kde jsou  $\pi$ - $\pi$  interakce mezi planárními a silně hydrofobními Pc jádry mimořádně silné. Řešením mohou být různé povrchově aktivní látky nebo nosičové systémy, avšak ty mohou ztěžovat hodnocení *in vitro* i praktické využití (Chow et al., 2016; Lau et al., 2014; Lucky et al., 2015). V nedávných studiích s 14 se ukázalo, že je vysoce účinný v produkci ROS po imobilizaci na proteinových krystalech viru tabákové mozaiky pro použití jako heterogenní katalyzátory v kontinuálních oxidačních procesech (Anaya-Plaza et al., 2019).

Všechny připravené Pc 11 – 14 vykazovaly absorpční spektra v DMF typická pro monomerní sloučeniny (Obr. 15). Absorpční spektra nekvaternizovaných Pc ve vodném

prostředí se významně lišila od těch v DMF. U Pc **11** docházelo ve vodním prostředí k silné agregaci a významnému snížení intenzity Q-pásu, zatímco u Pc **12** bylo zaznamenáno pouze mírné snížení jeho intenzity a z PBS nebo vodních roztoků nebyla emitována žádná fluorescence (Obr. 15c). Absorpční spektra kvaternizovaných Pc **13** a **14** byla charakteristická pro monomerní formu, kdy se spektra v PBS dokonale překrývala se spektry v DMF a na rozdíl od **12** byla zachována silná emise fluorescence. Tvar absorpčních spekter se nezměnil ani při koncentraci 100  $\mu\text{M}$ , což ukazuje na velmi účinnou inhibici agregace Pc tímto extrémně rigidním uspořádáním kvaternizovaných periferních substituentů. Tento plně monomerní stav **13** a **14** ve vodním prostředí je zásadním předpokladem pro získání dobrých PDT vlastností *in vitro* a potenciálně i *in vivo*.



Obr. 15 Absorpční spektra sloučenin **11** (a), **12** (c), **13** (b) a **14** (d) ve vodě (červená), PBS (černá) a DMF (modrá) o koncentraci 1  $\mu\text{M}$ . c) Fluorescence roztoků **12** v DMF a PBS ( $\lambda_{\text{exc}} = 366 \text{ nm}$ ) (Halašková et al., 2021).

V porovnání s klinicky schválenými PS vykazují obě studované kationické sloučeniny **13** a **14** výrazně lepší výsledky (nižší hodnoty  $\text{EC}_{50}$ ) než sulfonovaný

hydroxyhlinitý Pc, který byl schválen v klinické praxi v Rusku pod názvem Photosens<sup>®</sup>, a vyznačuje se zejména vysokým stupněm hydrofility, pomalým buněčným vychytáváním, lokalizací v lyzosomech a relativně nízkou fotodynamickou aktivitou (Brilkina et al., 2019). Hodnoty EC<sub>50</sub> stanovené naší výzkumnou skupinou za stejných experimentálních podmínek byly vyšší než 2 μM pro všechny testované buněčné linie.

Kvaternizované sloučeniny **13** a **14** se akumulují v endolyzosomalním kompartmentu v množství 0.26 a 0.50 nmol/mg proteinu (po 12 h inkubaci), což je srovnatelné s ostatními multikationickými Pc diskutovanými v kapitole 6.1 (Kollár et al., 2020). U obou Pc docházelo během fotoaktivace k jejich rychlé relokizaci do cytoplazmy se současným oxidačním poškozením dalších buněčných komponent a následně i k vyvolání buněčné smrti.

Celá řada studií odhalila důležité vztahy mezi strukturou a aktivitou v rodině Pc a dosud bylo popsáno mnoho sloučenin s optimálními fotofyzikálními vlastnostmi, jako jsou  $\Phi_{\Delta}$  a silná absorpce v NIR (Mehraban & Freeman, 2015; Nováková et al., 2018). Nicméně při přechodu do *in vitro* (nebo dokonce *in vivo*) oblasti studia mnoho z těchto nadějných derivátů ztrácí svou požadovanou funkci, a to převážně díky jejich agregaci ve vodním prostředí. Ukázalo se, že substituce nabitými periferními substituenty v rigidním uspořádání je účinný způsob monomerizace, dokonce i v pufrch a buněčných kultivačních médiích. Další možností je použití axiálně substituovaných Pc, jejichž axiální ligandy stericky zabraňují vzájemnému přiblížení makrocyclů (Ghazal et al., 2017; Huang et al., 2004; Macháček, et al., 2016a).

Existují však i jiné faktory než jen agregace, které mohou ovlivnit aktivitu PDT *in vitro* a potažmo i *in vivo*. Vzhledem k místu působení může být velmi přínosná i optimální interakce PS s buněčnými komponenty (tedy např. snadné ukotvení do lipidové dvojvrstvy). Z tohoto pohledu mohou mít Pc s amfifilním charakterem vyšší aktivitu *in vitro* také díky delší době života <sup>1</sup>O<sub>2</sub> v lipidovém prostředí (životnost <sup>1</sup>O<sub>2</sub> ve vodě je 3.5 μs, zatímco v biomembránách je udávána v desítkách μs) (Ehrenberg et al., 1998; Ogilby, 2010). Většina publikovaných ve vodě rozpustných neagregujících Pc jsou však symetrické vysoce nabitě sloučeniny, což není dobrý předpoklad pro jednoduchou interakci s lipidovými dvojvrstvami.

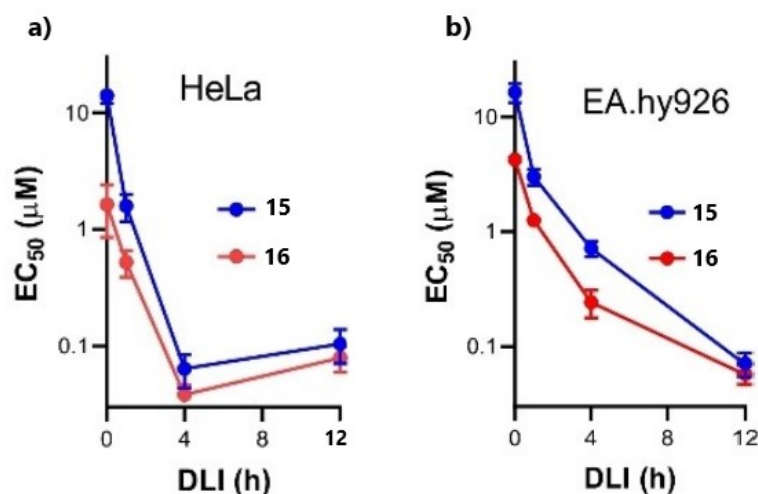
Vlastnosti nově připravených amfifilních makrocyclů **15** a **16** kombinující kationickou hydrofilní a lipofilní část s alkylsulfanylovými skupinami byly porovnávány

s analogickými amfifilními (Aza)Pc s nesubstituovanou lipofilní částí makrocyklu (**9** a **10**) (Kollár et al., 2020). Periferní alkylsulfanylové skupiny měly pozitivní vliv na fotofyzikální vlastnosti u **15** a **16**, jejichž Q-pásky byly posunuty bathochromně o cca 25 - 30 nm ve srovnání s **9** a **10**. Společnou vlastností všech těchto derivátů bylo zachování rozpustnosti ve vodě díky kladným nábojům, nicméně jejich absorpční spektra ve vodním prostředí byla typická pro agregované formy.

Výsledky *in vitro* hodnocení prokázaly vysokou fotodynamickou aktivitu **15** a **16** nezávislou na typu nádorové buněčné linie a získané hodnoty  $EC_{50}$  dobře korelovaly s fotodynamickou aktivitou strukturně blízkých **9** a **10** (Kollár et al., 2020). Ukázalo se, že nesubstituovaná jádra (Aza)Pc **9** a **10** vedou ke statisticky významně vyšší aktivitě pravděpodobně díky jejich lepšímu a rychlejšímu zabudování do lipidových membrán. Tento rozdíl je však relativně malý a nevyklučuje tak potenciální použití sloučenin **15** a **16** v PDT léčbě vzhledem k jejich velmi nízkým  $EC_{50}$ , které jsou srovnatelné nebo dokonce lepší než u již klinicky schválených PS (verteporfin, temoporfin, PpIX, AlOHPc).

Sloučeniny byly charakterizovány vynikajícími hodnotami  $EC_{50}$  v řádu desítek nM, které byly závislé na DLI a dosáhly „plató fáze“ po 4 hodinách. Fotodynamická aktivita **15** a **16** (HeLa buňky, DLI = 12 h) byla podobná, přičemž **16** ( $EC_{50} = 79 \pm 20$  nM) byla mírně účinnější než **15** ( $EC_{50} = 105 \pm 34$  nM).

PDT může být cílená také proti krevním cévám (VTP), které zásobují nádor živinami a kyslíkem a zároveň z něho odvádějí odpadní produkty (Chen et al., 2006). Z tohoto důvodu byla hodnocena fotodynamická aktivita také proti buněčné linii EA.hy926 (endoteliální buňky). S klesající DLI vykazovaly oba PS sníženou fotodynamickou účinnost (Obr. 16), ale i bez preinkubace (DLI = 0 h) byly **15** a **16** schopny vyvolat fototoxicitu s hodnotami  $EC_{50} = 16,37 \pm 3,11$   $\mu$ M a  $4,22 \pm 0,19$   $\mu$ M. Zvyšující se DLI vede k výrazně zvýšeným fotodynamickým účinkům (vyšší množství PS vychytaného buňkami). Dobře vyvážená lipofilita a schopnost interakce s biomembránami tak řadí tyto deriváty mezi perspektivní PS nejen pro klasický přístup PDT, ale i pro VTP.



Obr. 16 Závislost hodnot  $EC_{50}$  u sloučenin **15** a **16** na DLI na buněčné linii cervikálního karcinomu (HeLa; a) a endoteliální buněčné linii EA.hy926 (b) (Halašková et al., 2022).

Obě sloučeniny (**15** a **16**) byly lokalizovány především v endolyzosomálním kompartmentu, pravděpodobně důsledkem jejich pasivního transportu do buňky endocytózou, protože jejich velká molekulová hmotnost a náboj znemožňuje vstup do buňky volnou difúzí nebo aktivním transportem pomocí transportérů. Jejich amfifilní charakter však umožnil také jejich lokalizaci v cytoplazmatické membráně (Kollár et al., 2020).

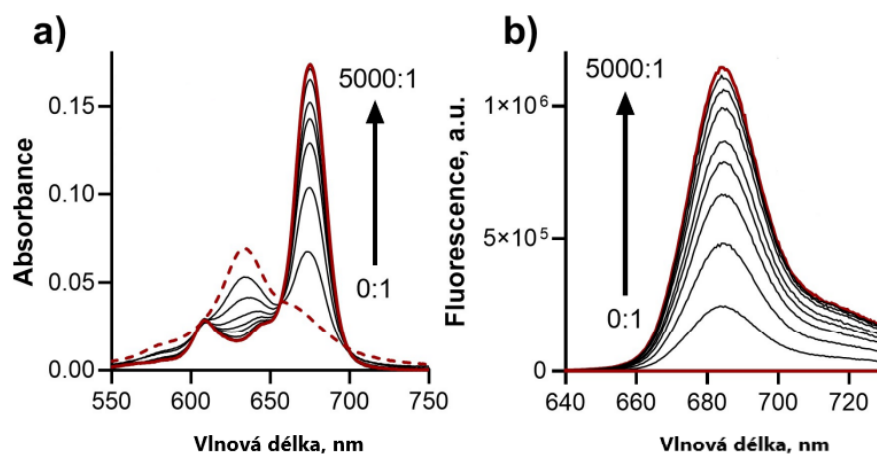
### Světlem vyvolané uvolňování látek z liposomů

Liposomy jsou sférické částice složené z fosfolipidové dvojvrstvy, které mohou inkorporovat lipofilní látky (a tedy i léčiva) ve svých lipidových membránách nebo hydrofilní látky ve vnitřním prostoru částice a dopravovat je do cílových míst (např. nádory). Prodloužení doby cirkulace liposomů v krevním řečišti a zvýšení jejich účinnosti může být ovlivněno jejich vlastnostmi (fluidita lipidové dvojvrstvy, náboj, velikost, povrchová hydratace) modifikovány. Díky své velikosti jde o tzv. pasivní nosičový systém, který je založený na zesíleném permeačním a retenčním efektu. Zároveň poskytuje ochranu přenášenému léčivu před jeho rozkladem enzymy nebo nepříznivému působení prostředí (např. v endosomech/lyzosomech). Liposomy konjugované s ligandem jsou cílené na receptory, které jsou nadměrně exprimovány na nádorových buňkách, aby došlo ke snížení vedlejších účinků léčiv zvýšením jejich selektivního dodání do cílové tkáně (Fathi & Oyelere, 2016; Gabizon et al., 2006; Jerjes et al., 2020).

Světlem spouštěné uvolňování léčiva z liposomů způsobené tvorbou  $^1\text{O}_2$  díky PS obsaženému v liposomální membráně je jedním z perspektivních přístupů, jak omezit toxicitu cytostatických chemoterapeutik. Srovnání dvou liposomálních formulací odhalilo vyšší náchylnost k světlem vyvolanému uvolňování u částic, které obsahovaly alkylové řetězce s větším počtem dvojných vazeb. V průběhu lipoperoxidace vyvolané oxidačním stresem mohou produkované hydroperoxydestabilizovat lipidovou dvojvrstvu, která následně vede k uvolnění přenášeného léčiva (Lovell et al., 2011; Massiot et al., 2017, 2019).

V předchozích studiích bylo prokázáno, že díky zanedbatelné životnosti  $^1\text{O}_2$  v PBS, může pouze PS inkorporovaný do liposomální dvojvrstvy narušit liposomy, a být tak úspěšně použit při světlem vyvolaném uvolňování látek (Macháček et al., 2018). Vysoce hydrofilní PS, které neinteragují s biomembránami, byly proto neúčinné při indukci uvolňování látek z liposomů. Naopak u silně lipofilních PS bylo ukotvení do předem vytvořených liposomů často extrémně dlouhé (v řádu hodin) (Zimčík et al., 2007), nebo vyžadovalo přidání PS již během tvorby liposomů, což následně omezuje jejich manipulaci na světle (Carter et al., 2014). Pro tuto studii byly proto zvoleny asymetrické amfifilní Pc obsahující vysoce hydrofilní substituenty nesoucí náboj (kladný nebo záporný). Lipofilní část makrocyclu tak zajišťuje spontánní ukotvení do liposomální membrány pouze jednoduchým smícháním liposomů (ty již mohou obsahovat léčivo) s roztokem PS. Hydrofilní část pak umožňuje rozpustnost ve vodném prostředí, a tudíž také rovnoměrné rozložení v celé liposomální suspenzi.

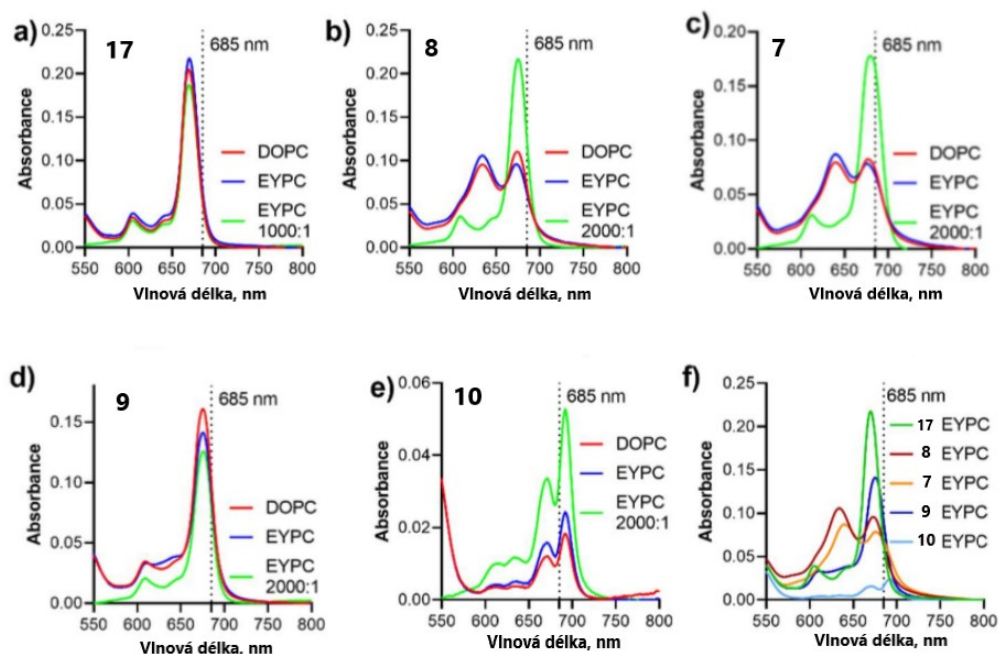
Obecně se uvádí, že po interakci lipofilních PS s lipidovou dvojvrstvou dochází k jejich monomerizaci, a činí je tím fotodynamicky aktivní (Ghosh et al., 2019; López Zeballos et al., 2012). To bylo testováno titrací studovaných PS v roztoku PBS s liposomy, kde byly pozorovány typické změny absorpčních spekter s výskytem ostrého Q-pásu (pro 7–10) spolu se zvýšením fluorescence indikující úspěšnou inzerci PS do lipidové dvojvrstvy a následnou monomerizaci (Obr. 17).



Obr. 17 Změny absorpčního spektra (a) a intenzity fluorescence (b) u **8** v PBS ( $c = 1 \mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 608 \text{ nm}$ ) po přidání EYPC liposomů o různém poměru EYPC:PS (Kolářová et al., 2023).

$^1\text{O}_2$  produkovaný po ozáření je nejdůležitějším prvkem zodpovědným za peroxidaci fosfolipidů v liposomech a následně i pro světlem spuštěného uvolnění přenášené látky. Všechny studované zinečnaté (Aza)Pc (**7-10**) byly schopny silně produkovat  $^1\text{O}_2$  s  $\Phi_{\Delta}$  kolem 0,4 (pro hlinitý Pc **17** byla  $\Phi_{\Delta} = 0,2$ ), což naznačuje jejich dobrý potenciál pro tuto aplikaci. Intenzita produkce  $^1\text{O}_2$  je však ovlivněna také úrovní agregace v roztoku a samozřejmě schopností absorpce světla při excitační vlnové délce. Všechny tyto faktory přispěly k rozdílům v uvolňování modelového „léčiva“. Ze studovaných PS se zdál jako nejúčinnější kationický Pc **9**, zatímco sulfonovaný Pc **17** byl účinný nejméně, což bylo způsobeno pravděpodobně jeho nižší produkcí  $^1\text{O}_2$ . Současně zůstávaly anionické deriváty s karboxylátovými skupinami **7** a **8** významně agregovány v roztoku PBS po přidání DOPC i EYPC liposomů v poměru lipid:PS 50:1, což vysvětluje schopnost pomaleji uvolňovat přenášenou modelovou látku v porovnání s kationickým Pc **9** (Obr. 18).





Obr. 18 a-e) Absorpční spektra **17** a **7-10** v PBS po přidání DOPC (červená) a EYPC (modrá) liposomů v poměru lipid:PS 50:1. Spektra látek po úplném navázání do EYPC v poměru lipid:PS 2000:1 pro **7-10** a 1000:1 pro **17**, (zelená). f) Spektra všech PS v EYPC liposomech v poměru lipid:PS 50:1 (Kolářová et al., 2023).

Liposomy jsou často považovány za jednoduché modely biomembrán, které mohou být cílem řady lipofilních nebo amfifilních PS a jiných léčiv (Matos et al., 2012). Studium interakce syntetizovaných Pc s lipidovou dvojvrstvou je proto velmi důležité. U hydrofilních sloučenin **1-6** nebyly po přidání DOPC liposomů pozorovány žádné změny v absorbančním nebo fluorescenčním spektru. Tato skutečnost byla nedávno potvrzena naší vědeckou skupinou pro kationický Pc **6** (Macháček et al., 2018). Tato publikace popisuje přístup světlem spouštěného uvolňování modelových „léčiv“ z předem vytvořených liposomů za použití nově syntetizovaného kationického amfifilního Pc **9**. U tohoto PS dochází ve vodním prostředí po jednoduchém smíchání s čistými liposomy obsahujícími modelové „léčivo“ ke spontánnímu začlenění do lipidové dvojvrstvy, zatímco u kationického hydrofilního Pc **6** k tomuto včlenění nedochází. To umožňuje následné uvolnění modelového „léčiva“ (DOX nebo BO) po ozáření NIR světlem. Přidání liposomů k roztoku agregovaných amfifilních (Aza)Pc **7-10** vede také k jejich monomerizaci (amfifilní deriváty vstupují lipofilní částí makrocyklu do liposomální dvojvrstvy, což vede k separaci jednotlivých molekul) a na rozdíl od vazby na BSA byla tato monomerizace úspěšná i pro kationické Pc **9** a **10** (Kolářová et al., 2023).

V této studii bylo zjištěno, že BO není optimální modelovou sloučeninou pro monitorování světlem spouštěného uvolňování látek z liposomů kvůli jeho citlivosti na oxidaci ROS vytvořenými působením světla na studované PS. Dochází k téměř dvoutřetinovému poklesu koncentrace BO. Z toho důvodu není příliš vhodnou modelovou sloučeninou pro budoucí experimenty tohoto typu i přes její rozsáhlé využití v jiných studiích. Nicméně byla také použita v následujících experimentech pro potvrzení trendů získaných z experimentů s DOX. Tato studie potvrdila vysoký potenciál amfifilních Pc (7-10) při světlem vyvolaném uvolňování z DOPC a EYPC liposomů, zejména těch s vysokou tvorbou  $^1\text{O}_2$  a dobrou interkalací do lipidové dvojvrstvy (Pc 9).

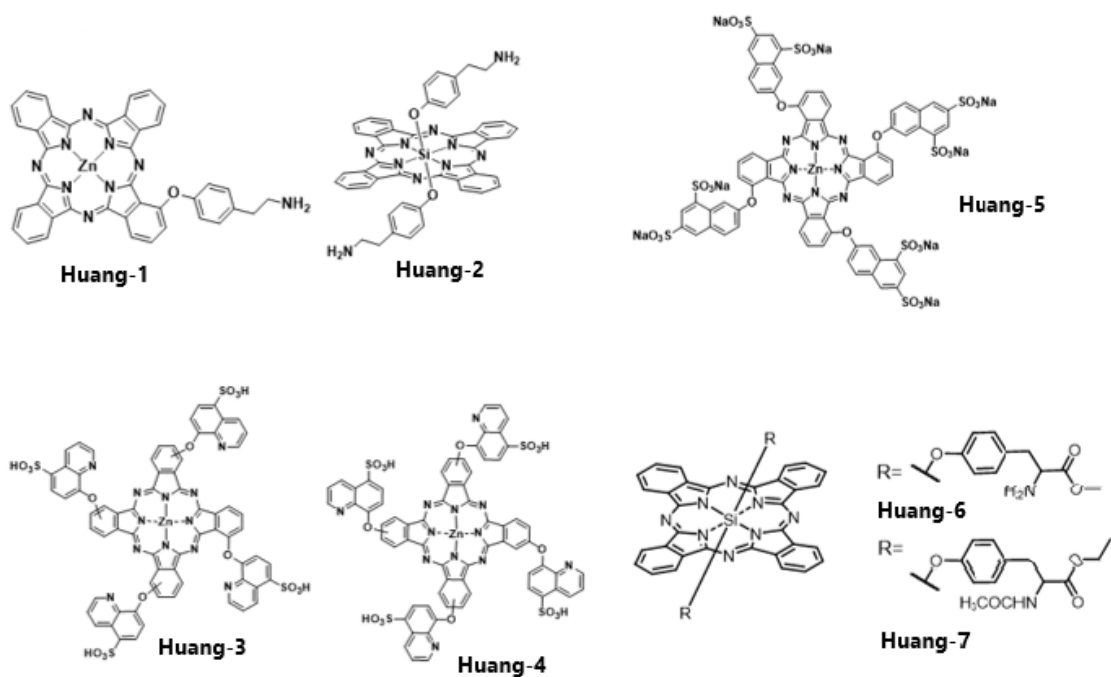
### **Srovnání *in vitro* fotodynamické aktivity rozsáhlé série PS**

Srovnání fotodynamických aktivit různých PS uváděných v literatuře je typicky komplikováno rozdílnými podmínkami při hodnocení jejich aktivity *in vitro*, jako je ozáření (druh a energie světelného zdroje, excitační vlnové délky atd.), inkubační doba, buněčná linie, testy životaschopnosti a různá interpretace výsledků. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli pro přímé *in vitro* porovnání fotodynamické aktivity různých PS za zcela stejných experimentálních podmínek. Byla shromážděna velká série již dříve publikovaných Pc (anionické, kationické, nenabitě, hydrofilní, lipofilní, amfifilní, axiálně substituované) od různých špičkových výzkumných skupin. Společně s látkami syntetizovanými naší výzkumnou skupinou byla u této série PS hodnocena jejich fotodynamická aktivita za stejných experimentálních podmínek na buněčných liniích HeLa, MCF-7 a SK-MEL-28 (dosud nepublikovaná data).

Výzkum série tetra(3,4-pyrido)porfyrinů (TPyPz) substituovaných hydrofilními substituenty odhalil důležitý vztah mezi strukturou a aktivitou pro jejich použití v PDT. Kationický derivát TPyPz 6 s 12 náboji a unikátním prostorovým uspořádáním syntetizovaný naší výzkumnou skupinou vykazoval výjimečně účinnou fotodynamickou aktivitu s hodnotami  $\text{EC}_{50}$  typicky pod 5 nM, účinnější a méně toxický než kterýkoliv z klinicky schválených PS pro PDT (Macháček et al., 2016a). Příklady celosvětově klinicky používaných PS jsou chlorin temoporfin (Senge & Brandt, 2011), derivát benzoporfyrinu verteporfin (Cruess et al., 2009), PpIX (aktivní forma široce používaného proléčiva ALA a jejich esterů) (Kennedy & Pottierb, 1992) a AlOHPc (sulfonovaný hydroxyhlinitý Pc, který je v Rusku schválen od roku 2001 pro PDT pod obchodním názvem Photosens<sup>®</sup> (Lukyanets, 1999; Ormond & Freeman, 2013)) Přímé srovnání jejich fotodynamických

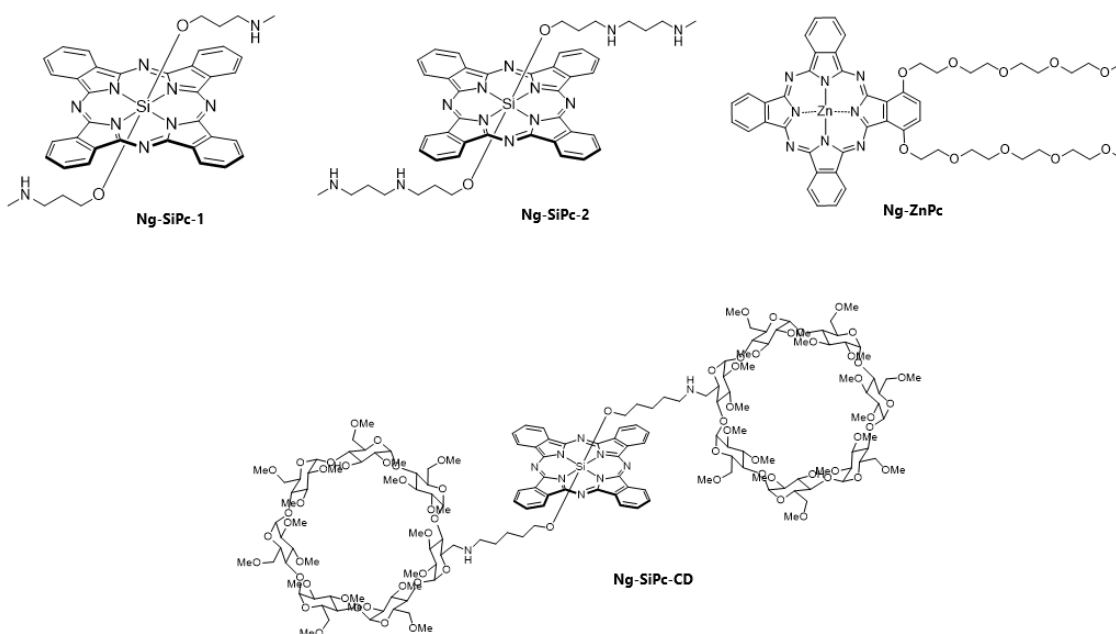
vlastností odhalilo, že aktivita klesala v následujícím pořadí: verteporfin ~ temoporfin > Pp IX > AlOHPc.

Srovnatelně vysoké fototoxicity byly potvrzeny také u dvou křemičitých Pc axiálně substituovaných L-tyrosinovými (**Huang-6**) a N-acetyl-L-tyrosinovými skupinami (**Huang-7**) (Sun et al., 2017), které byly syntetizovány výzkumnou skupinou jejíž vedoucím je prof. Jian-Dong Huang (Fuzhou University, Čína) (Obr. 19). Prostřednictvím této axiální modifikace bylo účinně sníženo agregační chování Pc díky sterické zábraně. Křemičité Pc vykazovaly vysoké fotodynamické aktivity in vitro s hodnotami  $EC_{50}$  až pod 3 nM (HeLa), což jsou jedny z nejnižších hodnot publikovaných pro PS. Další zajímavé látky syntetizované touto výzkumnou skupinou jsou anionické zinečnaté tetrasulfonované Pc (Lan et al., 2016). Derivát **Huang-3** substituovaný v neperiferních  $\alpha$  pozicích makrocyklu vykazoval přibližně  $11\times$  vyšší účinnost ( $EC_{50} = 1,004 \pm 0,2955 \mu\text{M}$ ) než jeho analog **Huang-4** substituovaný v periferních  $\beta$  polohách ( $EC_{50} = 11,568 \pm 3,235 \mu\text{M}$ ), což bylo způsobeno především jeho nižší tendencí k agregaci. Podobných hodnot  $EC_{50}$  jako u tetra- $\alpha$ -substituovaného Pc bylo dosaženo také u zinečnatého oktasulfonovaného Pc **Huang-5** (Li et al., 2015), kdy zavedení osmi ve vodě vysoce rozpustných sulfonátů poskytuje příznivé vlastnosti pro PDT. Velmi dobrých výsledků bylo dosaženo i u dvou Pc nesoucích substituenty na bázi 2-fenylethan-1-aminu připojených skrze kyslíkový můstek (Peng et al., 2017) – mono- $\alpha$ -substituovaný zinečnatý Pc **Huang-1** a axiálně disubstituovaný křemičitý Pc **Huang-2**. Obě sloučeniny vykazovaly velmi vysoké toxicity po ozáření s  $EC_{50}$  v řádu desítek nM.



Obr. 19 Struktury PS poskytnuté skupinou prof. Huang. Převzato z (Lan et al., 2016; Li et al., 2015; Peng et al., 2017; Sun et al., 2017).

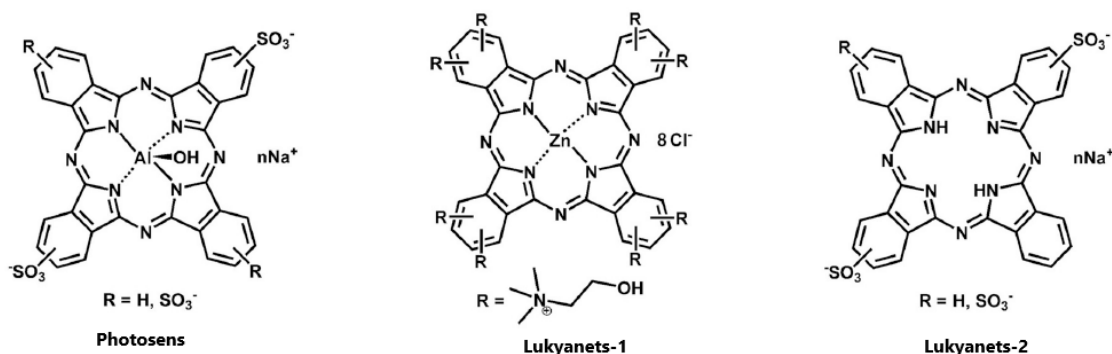
Další skupina axiálně substituovaných Pc připravená skupinou jejíž vedoucím je prof. Dennis Kee-pui Ng (Chinese University of Hong-Kong) (Obr. 20) prokázala také velmi dobré výsledky. Vysoká fotodynamická aktivita dipegylovaného zinečnatého Pc **Ng-ZnPc** (Liu et al., 2008) dosahovala hodnot  $EC_{50} = 0,0170 \pm 0,0054 \mu\text{M}$  může být přisuzována jejich vysokému buněčnému uptaku a nízké tendenci k agregaci ve vodných roztocích, což podporuje tvorbu ROS uvnitř buněk. Dvojice křemičitých Pc axiálně substituovaných alifatickými aminovými jednotkami s odlišnou délkou (Jiang et al., 2011) dosahovala hodnot  $EC_{50} 0,0492 \pm 0,0260 \mu\text{M}$  pro **Ng-SiPc-1** a  $0,0817 \pm 0,0299 \mu\text{M}$  pro **Ng-SiPc-2** na HeLa buňkách, potvrzující, že delší řetězec nezvyšuje *in vitro* fototoxicitu Pc. Posledním z této série byl křemičitý Pc **Ng-SiPc-CD** se dvěma axiálními permethylovanými  $\beta$ -cyklodextrinovými skupinami (Lau et al., 2011) s hodnotou  $EC_{50} = 0,1901 \pm 0,1162 \mu\text{M}$ . Všechny tyto axiální substituenty mohou značně snížit tendenci k agregaci vedoucí k vyšším fotodynamickým aktivitám.



Obr. 20 Struktury PS poskytnuté skupinou prof. Ng. Převzato z (Jiang et al., 2011; Lau et al., 2011; Liu et al., 2008).

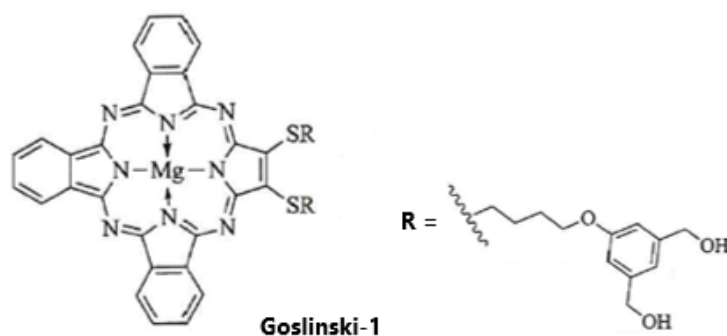
Do studie bylo zahrnuto dále porovnání fotobiologických vlastností klinicky schváleného PS AlOHPc (Photosens<sup>®</sup>) a dvou nových sloučenin **Lukyanets-1** (autory nazývaný Cholosens) a **Lukyanets-2** (autory nazývaný Phthalosens) (Obr. 21) získaných od Dr. Sci. Evgeny A. Lukyanetse (Scientific Research Institute of Organic Intermediates and Dyes, Moskva, Rusko) (Brilkina et al., 2019). AlOHPc je sulfonovaný hlinitý Pc, který se vyznačuje vysokým stupněm hydrofility, pomalým buněčným vychytáváním, lokalizací v lyzosomech a nejnižší fotodynamickou aktivitou ( $EC_{50} = 2.07 \pm 0,29 \mu\text{M}$ ) ze všech derivátů získaných v rámci této rozsáhlé mezinárodní spolupráce, a byl již několikrát diskutován výše. **Lukyanets-1** je oktacholinový zinečnatý Pc (kationická sloučenina s významným nábojem), účinněji vstupuje do buněk, kromě lyzosomů je lokalizován i v Golgiho aparátu a vykazuje významný inhibiční účinek na životaschopnost buněk po ozáření ( $EC_{50} = 0.148 \pm 0,045 \mu\text{M}$ ). Nejvyšší fotodynamickou aktivitu z této trojice derivátů prokázal **Lukyanets-2** s hodnotami  $EC_{50} = 0,085 \pm 0,007 \mu\text{M}$ , což je bezkovový di- až tri- sulfonovaný analog AlOHPc (ten je di- až tetra-sulfonovaný). Vyznačuje se nejvyšší rychlostí buněčného vychytávání (vyšší lipofilita – molekula je amfifilní) přes vnější buněčnou membránu a lokalizací v buněčné membráně, v lyzosomech i Golgiho aparátu. Obecně, ve srovnání s AlOHPc, zajistily tyto změny

fyzikálně-chemických vlastností u **Lukyanets-1** a **Lukyanets-2** zvýšení jejich účinnosti *in vitro* a naznačují tak vhodnost těchto nových látek pro klinickou praxi.



Obr. 21 Struktury PS poskytnuté skupinou Dr. Lukyanetse. Převzato z (Brilkina et al., 2019).

Tato série látek obsahovala i jednoho zástupce s centrálním atomem hořčíku poskytnutý skupinou jejíž vedoucím je prof. Tomasz Goslinski (Medical University of Karol Marcinkowski in Poznań, Polsko) (Mlynarczyk et al., 2016). Tento sulfanylový tribenzoporphyrin **Goslinski-1** substituovaný na periférii dendrimerickými skupinami (Obr. 22) dosahoval v našich experimentálních podmínkách hodnot  $EC_{50} = 0.107 \pm 0,001 \mu M$ .

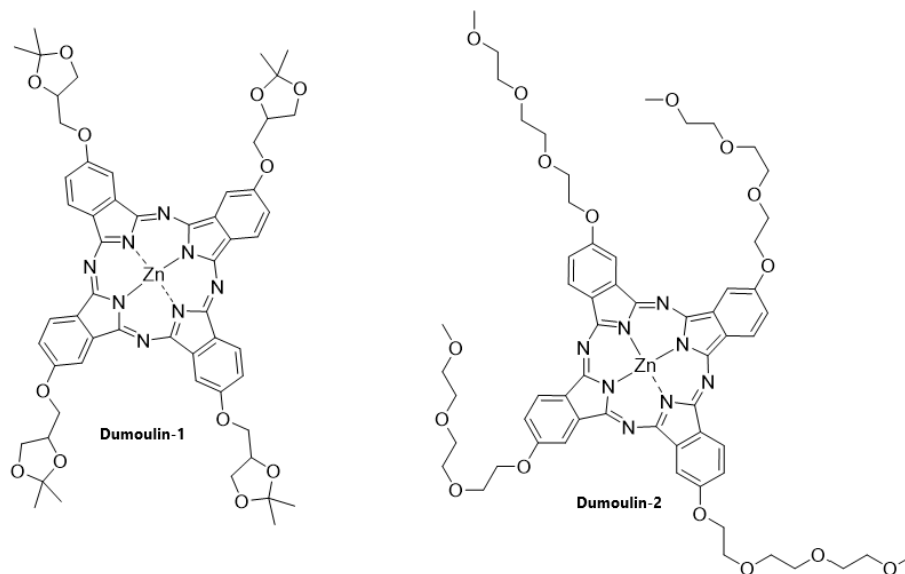


Obr. 22 Struktura PS poskytnutá skupinou jejíž vedoucím je prof. Goslinski. Převzato z (Mlynarczyk et al., 2016).

Několik nových slibných zinečnatých (Aza)Pc určených pro PDT bylo syntetizováno skupinou jejíž vedoucím je prof. Saad Makhseed (Kuwait University). Vynikajících fotodynamických výsledků bylo u nejúčinnějšího PS **Makhseed-1** dosaženo díky jeho rigidnímu prostorovému uspořádání kvaternizovaných triazolových skupin nad a pod Pc jádrem, kde tyto triazolové zbytky tvořily dva „kationtové kruhy“

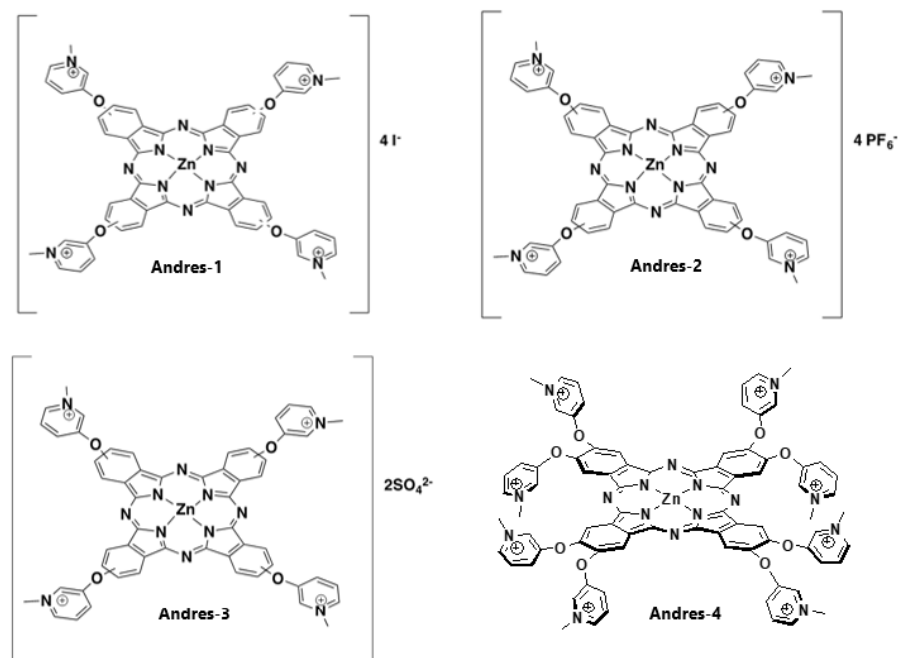
nad a pod rovinou hydrofobního makrocyclu chrání její proti agregaci. Fotodynamická aktivita **Makhseed-1** na HeLa buňkách měla hodnoty  $EC_{50} = 0,012 \pm 0,004 \mu\text{M}$ , což je několikanásobně lepší než nejlépe fungující klinicky schválené PS (AlOHPc, verteporfin, temoporfin, PpIX) za stejných experimentálních podmínek. Účinná inhibice agregace rigidními kationickými substituenty může být velmi účinným nástrojem pro návrh vysoce aktivních PS (Ghazal et al., 2017). Podobných výsledků bylo dosaženo i u zinečnatého Pc **Makhseed-2** nesoucího šestnáct kvaternizovaných imidazolových skupin na periferii, vykazující také vynikající fotodynamickou aktivitu ( $EC_{50} = 36.7 \pm 1,78 \text{ nM}$ ) (Makhseed et al., 2013). Velmi zajímavým se ukázal být také vývoj nových neagregujících (Aza)Pc nesoucí sacharidové substituenty na periferii makrocyclu **Makhseed-3** ( $\alpha$  poloha) nebo **Makhseed-4** ( $\beta$  poloha). Jedinečné prostorové uspořádání cukerných jednotek poskytuje plně monomerní chování ve vodném prostředí. Tyto látky se však vyznačují velmi nízkou toxicitou po ozáření. Díky vysoce polární povaze bylo totiž dosaženo extrémně nízkého prostupu těchto látek do buněk. *In vitro* hodnocení těchto derivátů ukázalo jejich potenciál pro použití jako extracelulární fluorescenční sondy (Husain et al., 2020). Poslední je skupina tří neiontových amfifilních zinečatých Pc substituovaných na periferii maltózou (**Makhseed-5**), glukózou (**Makhseed-6**) a polyethylenglykolem (**Makhseed-7**), která vykazuje výsledky srovnatelné s klinicky schváleným AlOHPc, tedy s  $EC_{50}$  2 až 5  $\mu\text{M}$ , i přes to, že jde o látky s tendencí k agregaci ve vodném prostředí (dosud nepublikované výsledky).

Z výzkumné skupiny jejíž vedoucím je Dr. Fabienne Dumoulin (Acibadem University, Istanbul, Turecko) byly hodnoceny dva zinečnaté Pc. **Dumoulin-1** nesoucí substituenty na bázi 1,3-dioxolanu (Zorlu et al., 2009) i polypegylovaný Pc **Dumoulin-2** (Pehlivan et al., 2019) (Obr. 23) vykazovaly podobnou fotodynamickou aktivitu s hodnotami  $EC_{50} < 0,7 \mu\text{M}$  na HeLa buňkách, které jsou srovnatelné například s PpIX (produkt klinicky schváleného proléčiva ALA) za stejných experimentálních podmínek.



Obr. 23 Struktury PS poskytnuté skupinou pod vedením Dr. Dumoulin. Převzato z (Pehlivan et al., 2019; Zorlu et al., 2009).

Prof. Tomás Torres & Dr. Andres de la Escosura (Universidad Autónoma de Madrid, Španělsko) nám kromě sloučenin **11-14** diskutovanými v kapitole 6.2 poskytli i skupinu čtyř zinečnatých okta-kationických Pc derivátů **Andres-1-4** (Anaya-Plaza et al., 2017) (Obr. 24), které dosahovaly velmi dobrých hodnot  $EC_{50} < 0,06 \mu M$ .



Obr. 24 Struktura sloučeniny poskytnutá Dr. Andresem. Převzato z (Anaya-Plaza et al., 2017).



## **7 ZÁVĚRY**

- Nejaktivnějšími látkami se po vystavení světlu obecně ukázaly být kationické deriváty (Aza)Pc, a to na všech použitých nádorových liniích. Zároveň si zachovaly velmi nízkou toxicitu bez přítomnosti světla.
- Rychlost prostupu studovaných látek do buněk byla rychlá v prvních hodinách a poté se snížila během 12 h inkubace.
- Primárním cílem subcelulární lokalizace PS v buňkách byl endolysosomální systém, amfifilní deriváty byly lokalizovány i v cytoplazmatické membráně. U hydrofilních derivátů docházelo během ozáření k jejich relokaci do cytoplazmy.
- Fotodynamický efekt vyvolaný po aktivaci PS způsoboval morfologické změny buněk způsobené masivním oxidačním stresem. Po aktivaci PS dochází k prasknutí lysosomálních membrán a uvolnění jejich obsahu do cytoplazmy s následným poškozením ostatních buněčných komponent.
- Fotodynamická aktivace anionických PS indukovala apoptotickou buněčnou smrt, zatímco u kationických derivátů docházelo převážně k nekrotickému typu buněčné smrti. Výjimkou byly kationické Pc s objemnými a rigidními periferními substituenty (**13** a **14**), které indukovaly apoptózu.
- Celkové srovnání potvrdilo významně nižší fotodynamickou aktivitu anionických PS v porovnání s kationickými. Zavedení objemných a rigidních substituentů na periferii Pc účinně inhibuje agregaci a zajišťuje tak vysoké fotodynamické aktivity. Použití objemných lipofilních substituentů u amfifilních PS nemusí zlepšovat uchycení do lipidové dvojvrstvy. Naopak, u derivátů bez těchto substituentů je vstup do lipidové dvojvrstvy téměř okamžitý.
- Nízké intralysosomální pH a silná vazba na proteiny výrazně snižuje produkci  $^1\text{O}_2$  anionických PS a je důvodem jejich nižší fotodynamické aktivity ve srovnání s kationickými (Aza)Pc.
- Studované PS vykazovaly velmi dobré fotodynamické vlastnosti srovnatelné, nebo dokonce lepší, s klinicky schválenými PS jako jsou verteporfin, temoporfin, PpIX (produkt ALA) a AlOHPc.

- Amfifilní Pc dobře vstupovaly do lipidových dvojvrstev liposomů a prokázaly vysoký potenciál při světlem spouštěném uvolňování látek z liposomů. U DOPC liposomů docházelo po aktivaci světlem k rychlejšímu uvolňování léčiv z liposomů ve srovnání s EYPC liposomy kvůli vyššímu počtu dvojných vazeb v mastných kyselinách.

## **8 PODÍL PŘEDKLADATELE NA PUBLIKACÍCH ZAHRNUTÝCH V DISERTAČNÍ PRÁCI**

(I) Kollár J, Macháček M, Halašková M, Lenčo J, Kučera R, Demuth J, Rohlíčková M, Hasoňová K, Miletín M, Nováková V, Zimčík P. **Cationic versus Anionic Phthalocyanines for Photodynamic Therapy: What a Difference the Charge Makes.** *Journal of Medicinal Chemistry*. 2020; vol. 63, s. 7616-7632.

- kultivace buněčných linií HeLa, HCT-116, MCF-7
- stanovení fototoxicity a toxicity bez ozáření
- stanovení prostupu látek do buněk v čase
- podílení se na přípravě preparátů pro subcelulární lokalizaci
- podílení se na přípravě preparátů pro sledování morfologických změn

(II) Halašková M, Rahali A, Almeida-Marrero V, Macháček M, Kučera R, Jamoussi B, Torres T, Nováková V, de la Escosura A, Zimčík P. **Peripherally Crowded Cationic Phthalocyanines as Efficient Photosensitizers for Photodynamic Therapy.** *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 2021; vol. 12, s. 502-507.

- kultivace buněčných linií HeLa, MCF-7, 3T3, EA.hy926
- stanovení fototoxicity a toxicity bez ozáření
- stanovení časového profilu prostupu látek do buněk
- měření aktivity kaspas 3/7, 8 a 9 luminiscenční metodou
- monitorování procesu buněčné smrti v reálném čase

(III) Halašková M, Kostelanský F, Demuth J, Hlbočanová I, Miletín M, Zimčík P, Macháček M, Nováková V. **Amphiphilic Cationic Phthalocyanines for Photodynamic Therapy of Cancer.** *ChemPlusChem*. 2022; 87.

- kultivace buněčných linií HeLa, MCF-7, HCT-116, EA.hy926
- stanovení fototoxicity a toxicity bez ozáření

- stanovení časového profilu prostupu látek do buněk
- měření aktivity kaspas 3/7, 8 a 9 luminiscenční metodou
- monitorování procesu buněčné smrti v reálném čase

(IV) Kolářová M, Kočišćáková L, Kollár J, Kozlíková M, Halašková M, Rohlíčková M, Kostelanský F, Miletín M, Nováková V, Macháček M, Zimčík P. **Amphiphilic phthalocyanines as a tool for a light-triggered drug release from liposomes.** V recenzním řízení v *Journal of Materials Chemistry B*. 2023.

- příprava a charakterizace liposomů
- studium interakce PS s liposomy
- podílení se na přípravě manuskriptu

## **9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

Abels, C. (2004). Targeting of the vascular system of solid tumours by photodynamic therapy (PDT). *Photochemical and Photobiological Sciences*, 3, 765–771. <https://doi.org/10.1039/b314241h>

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

Ackroyd, R., Kelty, C., Brown, N. & Reed, M. (2001). The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 74(5), 656–669. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2001\)0740656thopap2.0.co2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2001)0740656thopap2.0.co2)

Algorri, J. F., Ochoa, M., Roldán-Varona, P., Rodríguez-Cobo, L. & Miguel López-Higuera, J. (2021). Photodynamic Therapy: A Compendium of Latest Reviews. *Cancers*, 13(4447). <https://doi.org/10.3390/cancers>

Allison, R. R. & Sibata, C. H. (2010). Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 7, 61–75. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2010.02.001>

Anaya-Plaza, E., Aljarilla, A., Beaune, G., Nonappa, Timonen, J. V. I., de la Escosura, A., Torres, T. & Kostianen, M. A. (2019). Phthalocyanine–Virus Nanofibers as Heterogeneous Catalysts for Continuous-Flow Photo-Oxidation Processes. *Advanced Materials*, 31(39). <https://doi.org/10.1002/adma.201902582>

Anaya-Plaza, E., van de Winckel, E., Mikkilä, J., Malho, J. M., Ikkala, O., Guliás, O., Bresolí-Obach, R., Agut, M., Nonell, S., Torres, T., Kostianen, M. A. & de la Escosura, A. (2017). Photoantimicrobial Biohybrids by Supramolecular Immobilization of Cationic Phthalocyanines onto Cellulose Nanocrystals. *Chemistry - A European Journal*, 23(18), 4320–4326. <https://doi.org/10.1002/chem.201605285>

Aredia, F. & Scovassi, A. I. (2014). Poly(ADP-ribose): A signaling molecule in different paradigms of cell death. *Biochemical Pharmacology*, 92, 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.06.021>

Bergh, J. (2009). Quo vadis with targeted drugs in the 21st century? *Journal of Clinical Oncology*, 27(1), 2–5. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.18.8342>



Berghe, T. vanden, Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H. & Vandennebeele, P. (2014). Regulated necrosis: The expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15, 135–147. <https://doi.org/10.1038/nrm3737>

Betrouni, N., Lopes, R., Puech, P., Colin, P. & Mordon, S. (2011). A model to estimate the outcome of prostate cancer photodynamic therapy with TOOKAD soluble WST11. *Physics in Medicine and Biology*, 56, 4771–4783. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/56/15/009>

Bourré, N., Rousset, N., Thibaut, S., Eléouet, S., Lajat, Y. & Patrice, T. (2022). PDT effects of m-THPC and ALA, phototoxicity and apoptosis. *Apoptosis*, 7, 221–230. <https://doi.org/10.1023/A:1015391415150>

Brilkina, A. A., Dubasova, L. V., Sergeeva, E. A., Pospelov, A. J., Shilyagina, N. Y., Shakhova, N. M. & Balalaeva, I. V. (2019). Photobiological properties of phthalocyanine photosensitizers Photosens, Holosens and Phthalosens: A comparative in vitro analysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 191, 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.12.020>

Broekgaarden, M., Weijer, R., van Gulik, T. M., Hamblin, M. R. & Heger, M. (2015). Tumor cell survival pathways activated by photodynamic therapy: a molecular basis for pharmacological inhibition strategies. *Cancer and Metastasis Reviews*, 34, 643–690. <https://doi.org/10.1007/s10555-015-9588-7>

Buytaert, E., Dewaele, M. & Agostinis, P. (2007). Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1776, 86–107. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2007.07.001>

Calixto, G. M. F., Bernegossi, J., de Freitas, L. M., Fontana, C. R., Chorilli, M. & Grumezescu, A. M. (2016). Nanotechnology-based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: A review. *Molecules*, 21(342). <https://doi.org/10.3390/molecules21030342>

Calzavara-Pinton, P. G., Venturini, M. & Sala, R. (2007). Photodynamic therapy: Update 2006 Part 1: Photochemistry and photobiology. *Journal of the European Academy*

of Dermatology and Venereology, 21, 293–302. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2006.01902.x>

Carneiro, B. A. & El-Deiry, W. S. (2020). Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 17(7), 395–417. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0341-y>

Carter, K. A., Shao, S., Hoopes, M. I., Luo, D., Ahsan, B., Grigoryants, V. M., Song, W., Huang, H., Zhang, G., Pandey, R. K., Geng, J., Pfeifer, B. A., Scholes, C. P., Ortega, J., Karttunen, M. & Lovell, J. F. (2014). Porphyrin-phospholipid liposomes permeabilized by near-infrared light. *Nature Communications*, 5:3546. <https://doi.org/10.1038/ncomms4546>

Castano, A. P., Demidova, T. N. & Hamblin, M. R. (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: Part one - Photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1, 279–293. [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00007-4](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00007-4)

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

Celli, J. P., Spring, B. Q., Rizvi, I., Evans, C. L., Samkoe, K. S., Verma, S., Pogue, B. W. & Hasan, T. (2010). Imaging and photodynamic therapy: Mechanisms, monitoring, and optimization. *Chemical Reviews*, 110(5), 2795–2838. <https://doi.org/10.1021/cr900300p>

Chen, B., Pogue, B., Hoopes, P. & Hasan, T. (2006). Vascular and cellular targeting for photodynamic therapy. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.*, 16(4), 279–305. <https://doi.org/doi:10.1615/critreveukargeneexpr.v16.i4.10>

Choi, C. F., Tsang, P. T., Huang, J. D., Chan, E. Y. M., Ko, W. H., Fong, W. P. & Ng, D. K. P. (2004). Synthesis and in vitro photodynamic activity of new hexadeca-carboxy phthalocyanines. *Chemical Communications*, 2236–2237. <https://doi.org/10.1039/b405868b>

Chow, S. Y. S., Lo, P. C. & Ng, D. K. P. (2016). An acid-cleavable phthalocyanine tetramer as an activatable photosensitizer for photodynamic therapy. *Dalton Transactions*, 45(33), 13021–13024. <https://doi.org/10.1039/c6dt02283a>

Clinical Trials, 2019. Silicon Phthalocyanine 4 and Photodynamic Therapy in Stage IA-IIA Cutaneous T-Cell Non-Hodgkin Lymphoma. Study: NCT01800838. U.S. National Library of Medicine. [online]. [cit. 2023-04-26]. Dostupné z: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01800838?cond=Silicon+Phthalocyanine+4&draw=2&rank=1>

Correia, J. H., Rodrigues, J. A., Pimenta, S., Dong, T. & Yang, Z. (2021). Photodynamic therapy review: Principles, photosensitizers, applications, and future directions. *Pharmaceutics*, 13(1332). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091332>

Coventry, B. J. & Ashdown, M. L. (2012). Complete clinical responses to cancer therapy caused by multiple divergent approaches: A repeating theme lost in translation. *Cancer Management and Research*, 4(1), 137–149. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S31887>

Cruess, A. F., Zlateva, G., Pleil, A. M. & Wirostko, B. (2009). Photodynamic therapy with verteporfin in age-related macular degeneration: A systematic review of efficacy, safety, treatment modifications and pharmacoeconomic properties. *Acta Ophthalmologica*, 87, 118–132. <https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.2008.01218.x>

Dąbrowski, J. M. & Arnaut, L. G. (2015). Photodynamic therapy (PDT) of cancer: From local to systemic treatment. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 14(10), 1765–1780. <https://doi.org/10.1039/c5pp00132c>

David, K. K., Andrabi, S. A., Dawson, T. M. & Dawson, V. L. (2009). Parthanatos, A messenger of death. *Frontiers in Bioscience*, 14, 1116–1128. <https://doi.org/10.2741/3297>

Donohoe, C., Senge, M. O., Arnaut, L. G. & Gomes-da-Silva, L. C. (2019). Cell death in photodynamic therapy: From oxidative stress to anti-tumor immunity. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1872(188308). <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.07.003>

dos Santos, A. F., De Almeida, D. R. Q., Terra, L. F., Baptista, M. S. & Labriola, L. (2019). Photodynamic therapy in cancer treatment - an update review. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*, 5(25). <https://doi.org/10.20517/2394-4722.2018.83>

Ehrenberg, B., Anderson, J. L. & Foote, C. S. (1998). Kinetics and Yield of Singlet Oxygen Photosensitized by Hypericin in Organic and Biological Media. *Photochemistry and Photobiology*, 68(2), 135–140. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1998.tb02479.x>

Fathi, S. & Oyelere, A. K. (2016). Liposomal drug delivery systems for targeted cancer therapy: is active targeting the best choice? *Future Med. Chem.*, 8(17), 2091–2112.

Fatokun, A. A., Dawson, V. L. & Dawson, T. M. (2014). Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. *British Journal of Pharmacology*, 171, 2000–2016. <https://doi.org/10.1111/bph.2014.171.issue-8>

Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A. & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*, 149(4), 778–789. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>

Gabizon, A. A., Shmeeda, H. & Zalipsky, S. (2006). Pros and cons of the liposome platform in cancer drug targeting. *Journal of Liposome Research*, 16(3), 175–183. <https://doi.org/10.1080/08982100600848769>

Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. v., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation*, 25, 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>

Ghazal, B., Machacek, M., Shalaby, M. A., Novakova, V., Zimcik, P. & Makhseed, S. (2017). Phthalocyanines and Tetrapyrizinoporphyrazines with Two Cationic Donuts: High Photodynamic Activity as a Result of Rigid Spatial Arrangement of Peripheral Substituents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(14), 6060–6076. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00272>

Ghosh, S., Carter, K. A. & Lovell, J. F. (2019). Liposomal formulations of photosensitizers. *Biomaterials*, 218(119341). <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119341>

Gierlich, P., Mata, A. I., Donohoe, C., Brito, R. M. M., Senge, M. O. & Gomes-Da-Silva, L. C. (2020). Ligand-Targeted Delivery of Photosensitizers for Cancer Treatment. *Molecules*, 25(5317). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25225317>

Gunaydin, G., Gedik, M. E. & Ayan, S. (2021). Photodynamic Therapy—Current Limitations and Novel Approaches. *Frontiers in Chemistry*, 9(691697). <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.691697>

Halašková, M., Kostelanský, F., Demuth, J., Hlbočanová, I., Miletín, M., Zimčík, P., Macháček, M. & Nováková, V. (2022). Amphiphilic Cationic Phthalocyanines for Photodynamic Therapy of Cancer. *ChemPlusChem*, 87(9). <https://doi.org/10.1002/cplu.202200133>

Halašková, M., Rahali, A., Almeida-Marrero, V., Machacek, M., Kucera, R., Jamoussi, B., Torres, T., Novakova, V., De La Escosura, A. & Zimcik, P. (2021). Peripherally Crowded Cationic Phthalocyanines as Efficient Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 12(3), 502–507. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.1c00045>

Hamblin, M. R. (2020). Photodynamic Therapy for Cancer: What's Past is Prologue. *Photochemistry and Photobiology*, 96(3), 506–516. <https://doi.org/10.1111/php.13190>

Huang, J. D., Wang, S., Lo, P. C., Fong, W. P., Ko, W. H. & Ng, D. K. P. (2004). Halogenated silicon(IV) phthalocyanines with axial poly(ethylene glycol) chains. Synthesis, spectroscopic properties, complexation with bovine serum albumin and in vitro photodynamic activities. *New Journal of Chemistry*, 28(3), 348–354. <https://doi.org/10.1039/b307934a>

Huang, Z., Xu, H., Meyers, A. D., Musani, A. I., Wang, L., Tagg, R., Barqawi, A. B. & Chen, Y. K. (2008). Photodynamic Therapy for Treatment of Solid Tumors—Potential and Technical Challenges. *Technology in Cancer Research and Treatment*, 7(4), 309–320. [www.tcrt.org](http://www.tcrt.org)

Husain, A., Ganesan, A., Machacek, M., Cervený, L., Kubat, P., Ghazal, B., Zimcik, P. & Makhseed, S. (2020). Dually directional glycosylated phthalocyanines as extracellular red-emitting fluorescent probes. *Dalton Transactions*, 49(28), 9605–9617. <https://doi.org/10.1039/d0dt01180k>

Ibbotson, S. H. (2010). An overview of topical photodynamic therapy in dermatology. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 7, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2009.12.001>

Jerjes, W., Theodossiou, T. A., Hirschberg, H., Høgset, A., Weyergang, A., Selbo, P. K., Hamdoon, Z., Hopper, C. & Berg, K. (2020). Photochemical internalization for intracellular drug delivery. From basic mechanisms to clinical research. *Journal of Clinical Medicine*, 9(528). <https://doi.org/10.3390/jcm9020528>

Jiang, X. J., Yeung, S. L., Lo, P. C., Fong, W. P. & Ng, D. K. P. (2011). Phthalocyanine-polyamine conjugates as highly efficient photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(1), 320–330. <https://doi.org/10.1021/jm101253v>

Jiang, Z., Shao, J., Yang, T., Wang, J. & Jia, L. (2014). Pharmaceutical development, composition and quantitative analysis of phthalocyanine as the photosensitizer for cancer photodynamic therapy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87, 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.05.014>

Josefsen, L. B. & Boyle, R. W. (2008). Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. *Metal-Based Drugs*, 2008. <https://doi.org/10.1155/2008/276109>

Kamarulzaman, E. E., Benachour, H., Barberi-Heyob, M., Frochot, C., Wahab, H. A., Guillemin, F. & Vanderesse, R. (2011). Vascular-Targeted Photodynamic Therapy (VTP). *Advances in Cancer Therapy*. Hala Gali-Muhtasib. *Advances in Cancer Therapy*, InTech, pp.99-122, 978-953-307-703-1. [ff10.5772/22935ff](https://doi.org/10.5772/22935ff). [ffhal-00602275f](https://doi.org/10.5772/22935ff)

Kennedy, J. C. & Pottier, R. H. (1992). Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol*, 14, 275–292. [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(92\)85108-7](https://doi.org/10.1016/1011-1344(92)85108-7)

Kessel, D. (2004). Photodynamic therapy: From the beginning. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1, 3–7. [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(04\)00003-1](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(04)00003-1)

Kessel, D. & Reiners, J. J. (2007). Apoptosis and autophagy after mitochondrial or endoplasmic reticulum photodamage. *Photochemistry and Photobiology*, 83(5), 1024–1028. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2007.00088.x>

Kolářová, M., Kočišćáková, L., Kollár, J., Kozlíková, M., Rohlíčková, M., Kostelanský, F., Miletín, M., Nováková, L., Macháček, M. & Zimčík, P. (2023). Amphiphilic phthalocyanines as a tool for a light-triggered drug release from liposomes. *Journal of Materials Chemistry B*. V recenzním řízení.

Kollár, J., Machacek, M., Halaskova, M., Lenco, J., Kucera, R., Demuth, J., Rohlickova, M., Hasonova, K., Miletin, M., Novakova, V. & Zimcik, P. (2020). Cationic Versus Anionic Phthalocyanines for Photodynamic Therapy: What a Difference the Charge Makes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(14), 7616–7632. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00481>

Kollár, J., Machacek, M., Jancarova, A., Kubat, P., Kucera, R., Miletin, M., Novakova, V. & Zimcik, P. (2019). Effect of bovine serum albumin on the photodynamic activity of sulfonated tetrapyrazinoporphyrazine. *Dyes and Pigments*, 162, 358–366. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.10.051>

Kupcho, K., Shultz, J., Hurst, R., Hartnett, J., Zhou, W., Machleidt, T., Grailer, J., Worzella, T., Riss, T., Lazar, D., Cali, J. J. & Niles, A. (2019). A real-time, bioluminescent annexin V assay for the assessment of apoptosis. *Apoptosis*, 24(1–2), 184–197. <https://doi.org/10.1007/s10495-018-1502-7>

Lan, W. L., Liu, F. R., Ke, M. R., Lo, P. C., Fong, W. P., Ng, D. K. P. & Huang, J. D. (2016). The effects of formulation and serum albumin on the in vitro photodynamic activity of zinc(II) phthalocyanines substituted with sulfonated quinolineoxy groups. *Dyes and Pigments*, 128, 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2016.01.031>

Lang, K., Mosinger, J. & Wagnerová, D. M. (2004). Photophysical properties of porphyrinoid sensitizers non-covalently bound to host molecules; models for photodynamic therapy. *Coordination Chemistry Reviews*, 248, 321–350. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.02.004>

Lau, J. T. F., Lo, P. C., Fong, W. P. & Ng, D. K. P. (2011). Preparation and photodynamic activities of silicon(IV) phthalocyanines substituted with permethylated  $\beta$ -cyclodextrins. *Chemistry - A European Journal*, 17(27), 7569–7577. <https://doi.org/10.1002/chem.201100621>

Lau, J. T. F., Lo, P. C., Jiang, X. J., Wang, Q. & Ng, D. K. P. (2014). A dual activatable photosensitizer toward targeted photodynamic therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57, 4088–4097. <https://doi.org/10.1021/jm500456e>

Li, X., de Zheng, B., Peng, X. H., Li, S. Z., Ying, J. W., Zhao, Y., Huang, J. D. & Yoon, J. (2019a). Phthalocyanines as medicinal photosensitizers: Developments in the last five years. *Coordination Chemistry Reviews*, 379, 147–160. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.08.003>

Li, X., Jeong, K., Lee, Y., Guo, T., Lee, D., Park, J., Kwon, N., Na, J. H., Hong, S. K., Cha, S. S., Huang, J. D., Choi, S., Kim, S. & Yoon, J. (2019b). Water-soluble phthalocyanines selectively bind to albumin dimers: A green approach toward enhancing tumor-targeted photodynamic therapy. *Theranostics*, 9(22), 6412–6423. <https://doi.org/10.7150/thno.35210>

Li, X. S., Ke, M. R., Zhang, M. F., Tang, Q. Q., Zheng, B. Y. & Huang, J. D. (2015). A non-aggregated and tumour-associated macrophage-targeted photosensitiser for photodynamic therapy: A novel zinc(ii) phthalocyanine containing octa-sulphonates. *Chemical Communications*, 51(22), 4704–4707. <https://doi.org/10.1039/c4cc09934f>

Liang, L., Bi, W., & Tian, Y. (2016). Autophagy in photodynamic therapy. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 15(4), 885–889. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v15i4.31>

Liu, J. Y., Jiang, X. J., Fong, W. P. & Ng, D. K. P. (2008). Highly photocytotoxic 1,4-dipeglylated zinc(ii) phthalocyanines. Effects of the chain length on the in vitro photodynamic activities. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 6(24), 4560–4566. <https://doi.org/10.1039/b814627f>

Lobo, A. C. S., Gomes-Da-Silva, L. C., Rodrigues-Santos, P., Cabrita, A., Santos-Rosa, M. & Arnaut, L. G. (2020). Immune responses after vascular photodynamic therapy



with redaporfin. *Journal of Clinical Medicine*, 9(104).  
<https://doi.org/10.3390/jcm9010104>

López Zeballos, N. C., García Vior, M. C., Awruch, J. & Dixelio, L. E. (2012). An exhaustive study of a novel sulfur-linked adamantane tetrasubstituted zinc(II) phthalocyanine incorporated into liposomes. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 235, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2012.02.022>

Lovell, J., Jin, C., Huynh, E., Jim, H., Kim, C., Rubinstein, J., Chan, W., Cao, W., Wang, L. & Zheng, G. (2011). Porphysome nanovesicles generated by porphyrin bilayers for use as multimodal biophotonic contrast agents. *Nature Mater*, 10, 324–332. <https://doi.org/10.1038/nmat2986>

Lucky, S. S., Soo, K. C. & Zhang, Y. (2015). Nanoparticles in photodynamic therapy. *Chemical Reviews*, 115, 1990–2042. <https://doi.org/10.1021/cr5004198>

Lukyanets, E. A. (1999). Phthalocyanines as Photosensitizers in the Photodynamic Therapy of Cancer. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 3(6–7), 424–432. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-1409\(199908/10\)3:6/7<424::aid-jpp151>3.0.co;2-k](https://doi.org/10.1002/(sici)1099-1409(199908/10)3:6/7<424::aid-jpp151>3.0.co;2-k)

Macháček, M., Carter, K. A., Kostelanský, F., Miranda, D., Seffouh, A., Ortega, J., Šimůnek, T., Zimčík, P. & Lovell, J. F. (2018). Binding of an amphiphilic phthalocyanine to pre-formed liposomes confers light-triggered cargo release. *Journal of Materials Chemistry B*, 6(44), 7298–7305. <https://doi.org/10.1039/c8tb01602j>

Macháček, M., Demuth, J., Čermák, P., Vavrečková, M., Hrubá, L., Jedličková, A., Kubát, P., Šimůnek, T., Nováková, V. & Zimčík, P. (2016a). Tetra(3,4-pyrido)porphyrazines Caught in the Cationic Cage: Toward Nanomolar Active Photosensitizers. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(20), 9443–9456. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01140>

Macháček, M., Kollár, J., Miletín, M., Kučera, R., Kubát, P., Šimůnek, T., Nováková, V. & Zimčík, P. (2016b). Anionic hexadeca-carboxylate tetrapyrzino-porphyrzine: Synthesis and in vitro photodynamic studies of a water-soluble, non-aggregating photosensitizer. *RSC Advances*, 6(12), 10064–10077. <https://doi.org/10.1039/c5ra25881b>

Mahmoud, H. A. (2016). The Journey of PDT Throughout History: PDT from Pharos to Present. In *Photodynamic Medicine: From Bench to Clinic: Vol. Chapter 1* (pp. 1–21). <https://doi.org/10.1039/9781782626824-00001>

Makhseed, S., Machacek, M., Alfadly, W., Tuhl, A., Vinodh, M., Simunek, T., Novakova, V., Kubat, P., Rudolf, E. & Zimcik, P. (2013). Water-soluble non-aggregating zinc phthalocyanine and in vitro studies for photodynamic therapy. *Chemical Communications*, 49(95), 11149–11151. <https://doi.org/10.1039/c3cc44609c>

Massiot, J., Makky, A., Di Meo, F., Chapron, D., Trouillas, P. & Rosilio, V. (2017). Impact of lipid composition and photosensitizer hydrophobicity on the efficiency of light-triggered liposomal release. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 19(18), 11460–11473. <https://doi.org/10.1039/c7cp00983f>

Massiot, J., Rosilio, V. & Makky, A. (2019). Photo-triggerable liposomal drug delivery systems: from simple porphyrin insertion in the lipid bilayer towards supramolecular assemblies of lipid-porphyrin conjugates. *Journal of Materials Chemistry B*, 7(11), 1805–1823. <https://doi.org/10.1039/C9TB00015A>

Matos, C., Moutinho, C. & Lobão, P. (2012). Liposomes as a model for the biological membrane: Studies on daunorubicin bilayer interaction. *Journal of Membrane Biology*, 245(2), 69–75. <https://doi.org/10.1007/s00232-011-9414-2>

Mehraban, N. & Freeman, H. S. (2015). Developments in PDT sensitizers for increased selectivity and singlet oxygen production. *Materials*, 8(7), 4421–4456. <https://doi.org/10.3390/ma8074421>

Mlynarczyk, D. T., Lijewski, S., Falkowski, M., Piskorz, J., Szczolko, W., Sobotta, L., Stolarska, M., Popenda, L., Jurga, S., Konopka, K., Düzgüneş, N., Mielcarek, J. & Goslinski, T. (2016). Dendrimeric Sulfanyl Porphyrazines: Synthesis, Physico-Chemical Characterization, and Biological Activity for Potential Applications in Photodynamic Therapy. *ChemPlusChem*, 81(5), 460–470. <https://doi.org/10.1002/cplu.201600051>

Moghissi, K., Dixon, K. & Gibbins, S. (2015). A Surgical View of Photodynamic Therapy in Oncology: A Review. *The Surgery Journal*, 1, e1–e15. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1565246>

Mokwena, M. G., Kruger, C. A., Ivan, M. T. & Heidi, A. (2018). A review of nanoparticle photosensitizer drug delivery uptake systems for photodynamic treatment of lung cancer. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 22, 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.03.006>

Mroz, P., Hashmi, J. T., Huang, Y. Y., Lange, N. & Hamblin, M. R. (2011a). Stimulation of anti-tumor immunity by photodynamic therapy. *Expert Review of Clinical Immunology*, 7(1), 75–91. <https://doi.org/10.1586/eci.10.81>

Mroz, P., Yaroslavsky, A., Kharkwal, G. B. & Hamblin, M. R. (2011b). Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers*, 3, 2516–2539. <https://doi.org/10.3390/cancers3022516>

Nováková, V., Donzello, M. P., Ercolani, C., Zimcik, P. & Stuzhin, P. A. (2018). Tetrapyrazinoporphyrazines and their metal derivatives. Part II: Electronic structure, electrochemical, spectral, photophysical and other application related properties. *Coordination Chemistry Reviews*, 361, 1–73. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.01.015>

Nowis, D., Makowski, M., Stokłosa, T., Legat, M., Issat, T. & Gołąb, J. (2005). Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta Biochimica Polonica*, 52(2), 339–352. Epub 2005 Jun 25. PMID: 15990919

Ogilby, P. R. (2010). Singlet oxygen: There is indeed something new under the sun. *Chemical Society Reviews*, 39(8), 3181–3209. <https://doi.org/10.1039/b926014p>

Oniszczyk, A., Wojtunik-Kulesza, K. A., Oniszczyk, T. & Kasprzak, K. (2016). The potential of photodynamic therapy (PDT)—Experimental investigations and clinical use. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 83, 912–929. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.07.058>

Ormond, A. B. & Freeman, H. S. (2013). Dye sensitizers for photodynamic therapy. *Materials*, 6, 817–840. <https://doi.org/10.3390/ma6030817>

Ostańska, E., Aebisher, D. & Bartusik-Aebisher, D. (2021). The potential of photodynamic therapy in current breast cancer treatment methodologies. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 137). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111302>

Pehlivan, E., Ek, Y., Topkaya, D., Tazebay, U. & Dumoulin, F. (2019). Effect of PVP formulation on the in vitro photodynamic efficiency of a photosensitizing phthalocyanine. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 23(11), 1587–1591. doi: 10.1142/S108842461950189X

Peng, X. H., Chen, S. F., Zheng, B. Y., Zheng, B. De, Zheng, Q. F., Li, X. S., Ke, M. R. & Huang, J. D. (2017). Comparison between amine-terminated phthalocyanines and their chlorambucil conjugates: Synthesis, spectroscopic properties, and in vitro anticancer activity. *Tetrahedron*, 73(4), 378–384. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2016.12.017>

Plaetzer, K., Krammer, B., Berlanda, J., Berr, F. & Kiesslich, T. (2009). Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: Fundamental aspects. *Lasers in Medical Science*, 24, 259–268. <https://doi.org/10.1007/s10103-008-0539-1>

Prazmo, E. J., Kwaśny, M., Łapiński, M. & Mielczarek, A. (2016). Photodynamic therapy as a promising method used in the treatment of oral diseases. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 25(4), 799–807. <https://doi.org/10.17219/acem/32488>

Reiners, J. J., Agostinis, P., Berg, K., Oleinick, N. L. & Kessel, D. (2010). Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy. *Autophagy*, 6(1), 7–18. <https://doi.org/10.4161/auto.6.1.10220>

Rocha, L. G. B. (2015). Development of a novel photosensitizer for Photodynamic Therapy of cancer. Doctoral thesis in Pharmaceutical Sciences. Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra.

Roguin, L. P., Chiarante, N., García Vior, M. C. & Marino, J. (2019). Zinc(II) phthalocyanines as photosensitizers for antitumor photodynamic therapy. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 114(105575). <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2019.105575>

Sachet, M., Liang, Y. Y. & Oehler, R. (2017). The immune response to secondary necrotic cells. *Apoptosis*, 22, 1189–1204. doi: 10.1007/s10495-017-1413-z

Sakharov, D. V., Bunschoten, A., van Weelden, H. & Wirtz, K. W. A. (2003). Photodynamic treatment and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress result in different patterns

of cellular protein oxidation. *European Journal of Biochemistry*, 270, 4859–4865. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03885.x>

Scherz-Shouval, R. & Elazar, Z. (2007). ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends in Cell Biology*, 17(9), 422–427. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.07.009>

Senge, M. O. & Brandt, J. C. (2011). Temoporfin (Foscan®, 5,10,15,20-Tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin) - A second-generation photosensitizer. *Photochemistry and Photobiology*, 87(6), 1240–1296. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2011.00986.x>

Sobhani, N. & Samadani, A. A. (2021). Implications of photodynamic cancer therapy: an overview of PDT mechanisms basically and practically. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, 33:34. <https://doi.org/10.1186/s43046-021-00093-1>

Soriano, J., Mora-Espí, I., Alea-Reyes, M. E., Pérez-García, L., Barrios, L., Ibáñez, E. & Nogués, C. (2017). Cell death mechanisms in Tumoral and Non-Tumoral human cell lines triggered by photodynamic treatments: Apoptosis, necrosis and parthanatos. *Scientific Reports*, 7(41340). <https://doi.org/10.1038/srep41340>

Sun, Q., Zheng, B. Y., Zhang, Y. H., Zhuang, J. J., Ke, M. R. & Huang, J. D. (2017). Highly photocytotoxic silicon(IV) phthalocyanines axially modified with L-tyrosine derivatives: Effects of mode of axial substituent connection and of formulation on photodynamic activity. *Dyes and Pigments*, 141, 521–529. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2017.03.004>

Triesscheijn, M., Baas, P., Schellens, J. H. M. & Stewart, F. A. (2006). Photodynamic therapy in oncology. *The Oncologist*, 11, 1034–1044. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.11-9-1034>

Vidujith, A. V. A., Jayasinghe, C. D., Costa, M. D. P. De. & Senthilnithy, R. (2022). Photodynamic Therapy: An Overview and Insights into a Prospective Mainstream Anticancer Therapy. *JOTCSA*, 9(3), 821–848. <https://doi.org/10.18596/jotcsa>

Wang, W., Moriyama, L. T. & Bagnato, V. S. (2013). Photodynamic therapy induced vascular damage: An overview of experimental PDT. *Laser Physics Letters*, 10(023001). <https://doi.org/10.1088/1612-2011/10/2/023001>

Wang, Y., Zheng, K., Xuan, G., Huang, M. & Xue, J. (2018). Novel pH-sensitive zinc phthalocyanine assembled with albumin for tumor targeting and treatment. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 7681–7695. <https://doi.org/10.2147/IJN.S181199>

Weijer, R., Broekgaarden, M., Kos, M., van Vught, R., Rauws, E. A. J., Breukink, E., van Gulik, T. M., Storm, G. & Heger, M. (2015). Enhancing photodynamic therapy of refractory solid cancers: Combining second-generation photosensitizers with multi-targeted liposomal delivery. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 23, 103–131. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2015.05.002>

Woodhams, J. H., MacRobert, A. J. & Bown, S. G. (2007). The role of oxygen monitoring during photodynamic therapy and its potential for treatment dosimetry. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 6, 1246–1256. <https://doi.org/10.1039/b709644e>

Yang, L., Wei, Y., Xing, D. & Chen, Q. (2010). Increasing the efficiency of photodynamic therapy by improved light delivery and oxygen supply using an anticoagulant in a solid tumor model. *Lasers in Surgery and Medicine*, 42, 671–679. <https://doi.org/10.1002/lsm.20951>

Yano, S., Hirohara, S., Obata, M., Hagiya, Y., Ogura, S. ichiro, Ikeda, A., Kataoka, H., Tanaka, M. & Joh, T. (2011). Current states and future views in photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 12, 46–67. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2011.06.001>

Yoo, J. O. & Ha, K. S. (2012). New Insights into the Mechanisms for Photodynamic Therapy-Induced Cancer Cell Death. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 295, pp. 139–174). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394306-4.00010-1>

Yoon, I., Li, J. Z. & Shim, Y. K. (2013). Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. *Clinical Endoscopy*, 46, 7–23. <https://doi.org/10.5946/ce.2013.46.1.7>

Zhang, Q. & Li, L. (2018). Photodynamic combinational therapy in cancer treatment. *JBUON*, 23(3), 561–567. ISSN: 1107-0625

Zimčik, P., Miletin, M., Kopecky, K., Musil, Z., Berka, P., Horakova, V., Kucerova, H., Zbytovska, J. & Brault, D. (2007). Influence of aggregation on interaction of lipophilic, water-insoluble azaphthalocyanines with DOPC vesicles. *Photochemistry and Photobiology*, 83(6), 1497–1504. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2007.00193.x>

Zorlu, Y., Ermeydan, M. A., Dumoulin, F., Ahsen, V., Savoie, H. & Boyle, R. W. (2009). Glycerol and galactose substituted zinc phthalocyanines. Synthesis and photodynamic activity. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 8(3), 312–318. <https://doi.org/10.1039/b817348f>

Zsila, F., Bikadi, Z., Malik, D., Hari, P., Pechan, I., Berces, A. & Hazai, E. (2011). Evaluation of drug-human serum albumin binding interactions with support vector machine aided online automated docking. *Bioinformatics*, 27(13), 1806–1813. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr284>

## **10 PŘEHLED PUBLIKACÍ ZAHRNUTÝCH V DISERTAČNÍ PRÁCI**



- (I) Kollár J, Macháček M, Halašková M, Lenčo J, Kučera R, Demuth J, Rohlíčková M, Hasoňová K, Miletín M, Nováková V, Zimčík P. **Cationic versus Anionic Phthalocyanines for Photodynamic Therapy: What a Difference the Charge Makes.** *Journal of Medicinal Chemistry*. 2020; vol. 63, s. 7616-7632. [IF<sub>2021</sub> = 8.039]
- (II) Halašková M, Rahali A, Almeida-Marrero V, Macháček M, Kučera R, Jamoussi B, Torres T, Nováková V, de la Escosura A, Zimčík P. **Peripherally Crowded Cationic Phthalocyanines as Efficient Photosensitizers for Photodynamic Therapy.** *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 2021; vol. 12, s. 502-507. [IF<sub>2021</sub> = 4.632]
- (III) Halašková M, Kostelanský F, Demuth J, Hlbočanová I, Miletín M, Zimčík P, Macháček M, Nováková V. **Amphiphilic Cationic Phthalocyanines for Photodynamic Therapy of Cancer.** *ChemPlusChem*. 2022; 87. [IF<sub>2021</sub> = 3.210]
- (IV) Kolářová M, Kočiščáková L, Kollár J, Kozlíková M, Halašková M, Rohlíčková M, Kostelanský F, Miletín M, Nováková V, Macháček M, Zimčík P. **Amphiphilic phthalocyanines as a tool for a light-triggered drug release from liposomes.** V recenzním řízení v *Journal of Materials Chemistry B*. 2023.

## **11 PREZENTACE NA KONFERENCÍCH**

- (I) Halašková M, Kollár J, Hasoňová K, Zimčík P, Šimůnek T, Macháček M. ***In vitro* evaluation of photodynamic activity of the novel hydrophilic and amphiphilic anionic (aza)phthalocyanine derivatives for treatment of tumorous diseases.** *ESP-IUPB WORLD CONGRESS, 17th International Congress on Photobiology, 18th Congress of the European Society for Photobiology*; 25. – 30. srpna 2019, Barcelona, Španělsko.
- (II) Halašková M, Kollár J, Zimčík P, Macháček M. **Novel photodynamically active hydrophilic and amphiphilic anionic (aza)phthalocyanine derivatives for treatment of tumorous diseases.** *10. Postgraduální & postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK*; 22. – 23. ledna 2020, Hradec Králové, Česká republika.
- (III) Halašková M, Zimčík P, Macháček M. **Evaluation of peripherally crowded cationic phthalocyanines for photodynamic therapy.** *11. Postgraduální & postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK*; 27. – 28. ledna 2021, Hradec Králové, Česká republika.
- (IV) Halašková M, Kollár J, Zimčík P, Macháček M. **Photobiological properties of the most active phthalocyanines from international cooperation as photosensitizers for photodynamic therapy.** *12. Postgraduální & postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK*; 1. – 2. února 2022, Hradec Králové, Česká republika.
- (V) Halašková M, Torres T, Nováková V, de la Escosura A, Zimčík P, Macháček M. **Biological evaluation of peripherally crowded cationic phthalocyanines as photosensitizers for photodynamic therapy of tumors.** *International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-12)*. 10. – 15. července 2022; Madrid, Španělsko.

## **12 PŘÍLOHY**

## 12.1 PUBLIKACE I

Kollár J, Macháček M, Halašková M, Lenčo J, Kučera R, Demuth J, Rohlíčková M, Hasoňová K, Miletín M, Nováková V, Zimčík P. **Cationic versus Anionic Phthalocyanines for Photodynamic Therapy: What a Difference the Charge Makes.** *Journal of Medicinal Chemistry*. 2020; vol. 63, s. 7616-7632.

## 12.2 PUBLIKACE II

Halašková M, Rahali A, Almeida-Marrero V, Macháček M, Kučera R, Jamoussi B, Torres T, Nováková V, de la Escosura A, Zimčík P. **Peripherally Crowded Cationic Phthalocyanines as Efficient Photosensitizers for Photodynamic Therapy.** *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 2021; vol. 12, s. 502-507.

### 12.3 PUBLIKACE III

Halašková M, Kostelanský F, Demuth J, Hlbočanová I, Miletín M, Zimčík P, Macháček M, Nováková V. **Amphiphilic Cationic Phthalocyanines for Photodynamic Therapy of Cancer.** *ChemPlusChem.* 2022; 87.

## 12.4 PUBLIKACE IV

Kolářová M, Kočiščíková L, Kollár J, Kozlíková M, Halašková M, Rohlíčková M, Kostelanský F, Miletín M, Nováková V, Macháček M, Zimčík P. **Amphiphilic phthalocyanines as a tool for a light-triggered drug release from liposomes.** V recenzním řízení v *Journal of Materials Chemistry B*. 2023.