

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Supramolekulární interakce zinečnatých ftalocyaninů  
s kukurbiturily pro zvýšení fotodynamického účinku

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

Hradec Králové 2023

Terezie Rubková

Na tomto místě bych chtěla velmi poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce RNDr. Miloslavu Macháčkovi, Ph.D. a konzultantce Mgr. Magdaléně Kozlíkové za odborné vedení, veškerou pomoc, vstřícnost, připomínky, rady, velkou trpělivost a všechnen čas, který mi věnovali. Poděkování patří také vědecké skupině prof. PharmDr. Petra Zimčíka, Ph.D. z Katedry farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy FaF UK a vědecké skupině prof. Ing. Vladimíra Šindeláře, Ph.D. z pracoviště supramolekulární chemie na Ústavu chemie PŘF MUNI za spolupráci a přípravu některých látek. Děkuji též Grantové agentuře České republiky (projekt 20-09212S) za finanční podporu. V neposlední řadě chci poděkovat také celému kolektivu Katedry biochemických věd FaF UK za přátelské pracovní prostředí a příjemnou atmosféru v laboratořích.

„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.....

Podpis:.....

# 1 Obsah

1	Obsah .....	4
2	Úvod.....	6
3	Teoretická část .....	8
3.1	Historie fotodynamické terapie .....	8
3.1.1	Fototerapie a fotochemoterapie .....	8
3.1.2	Rozvoj fotodynamické terapie .....	8
3.1.3	Hematoporfyrin a jeho deriváty .....	9
3.2	Principy a mechanismy fotodynamické terapie .....	12
3.2.1	Distribuce a selektivní akumulace fotosensitizerů.....	12
3.2.2	Světlo .....	14
3.2.3	Kyslík.....	16
3.2.4	Reakce I. a II. typu.....	16
3.2.5	Biologické mechanismy účinku.....	17
3.3	Fotosenzitizéry .....	19
3.3.1	První generace.....	19
3.3.2	Druhá generace .....	20
3.3.3	Ftalocyaniny.....	21
3.3.4	Třetí generace .....	22
3.4	Supramolekulární interakce .....	22
3.4.1	Kukurbiturily .....	23
3.4.2	Supramolekulární komplexy v PDT .....	23
4	Cíle práce .....	25
5	Materiál a metodika .....	26
5.1	Základní vybavení.....	26
5.2	Přístrojové vybavení.....	26
5.3	Chemikálie a reagensy .....	26

5.4	Kultivace buněk .....	27
5.4.1	Buněčná linie HeLa .....	27
5.4.2	Kultivační médium .....	27
5.4.3	Pasážování .....	28
5.5	Počítání buněk.....	29
5.6	Stanovení fototoxicity .....	29
5.6.1	Nasazení buněk na destičky.....	29
5.6.2	Použité fotosenzitizéry.....	30
5.6.3	Přidání fotosenzitizérů na destičku .....	31
5.6.4	Ozařování.....	31
5.7	Test vychytávání neutrální červeně a zpracování výsledků.....	32
5.8	Subcelulární lokalizace .....	33
6	Výsledky .....	34
6.1	CB[7].....	34
6.2	LK3 .....	35
6.3	LK16 .....	36
6.4	LK21 .....	37
6.5	LK23 .....	38
6.6	Subcelulární lokalizace .....	39
6.6.1	LK3 .....	40
6.6.2	LK16.....	41
6.6.3	LK21 .....	43
6.6.4	LK23 .....	45
7	Diskuse.....	46
8	Závěry .....	49
9	Seznam zkratk .....	50
10	Literatura.....	52

## 2 Úvod

Nádorová onemocnění patří mezi nejčastější příčiny úmrtí, a to nejen v České republice, jejich výskyt přitom stále roste. Zvyšující se význam má proto i výzkum týkající se možných diagnostických a terapeutických postupů, pomocí kterých by se tento trend podařilo zvrátit.

První zaznamenané případy nádorů pochází již ze starého Egypta z podobné doby, kdy lidé začali objevovat i terapeutické využití světla jako formy prevence a léčby některých nemocí. Díky náhodnému objevu studenta medicíny Oscara Raaba byly o více než dva tisíce let později položeny základy fotodynamické terapie (PDT), která v následujícím století prošla výrazným vývinem a uplatnila se právě na poli diagnostiky a léčby právě onkologických, ale i dalších onemocnění.

PDT je již od svých počátků slibnou metodou, nyní v jednotlivých odvětvích různou měrou využívanou v cílené protinádorové terapii i paliativní léčbě. Mezi její největší výhody patří selektivita, minimální invazivnost a na rozdíl od velké části běžných možností léčby malignit i aktivace imunitního systému pacienta.

Kladem je také výsledná jednoduchost. Nezbytným základem PDT je kromě kyslíku a světelného záření o vhodné vlnové délce také přítomnost fotosenzitizeru (PS) v buňkách cílové tkáně. Nevýhody PS přímo limitují efektivitu PDT, a vývoj nových PS s lepšími vlastnostmi je proto s pokrokem PDT už od jejích počátků úzce spjat. Ideální PS vykazuje mnoho vlastností (např. schopnost co nejvyšší selektivní akumulace v tumoru, vysoké schopnosti produkce cytotoxických látek, maximální absorpce záření o vlnové délce vhodné pro klinické užití a naopak bez přítomnosti světla by fotodynamickou aktivitu ani vlastní toxicitu vykazovat neměl, snadná eliminace z tkání po PDT, hydrofilní struktura kvůli možnosti systémového podání, neměl by ve vodném prostředí agregovat, apod.). Tyto požadavky však každý PS splňuje pouze do určité míry – právě poslední z jmenovaných jsou problematické např. u ftalocyaninů (Pc), PS druhé generace. Existuje však vícero způsobů, jak tyto nevýhody potlačit či zcela odstranit. Jednou z nich je i supramolekulární interakce mezi nimi a navenek hydrofilními kukurbiturily (CB[n]), molekulami relativně nedávno objevenými,

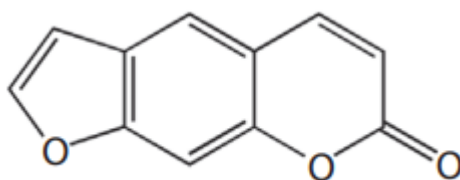
ale o to zajímavějšími. *In vitro* testováním a srovnáním cytotoxicity a subcelulární lokalizace PS tvořenými samotným upraveným Pc a supramolekulárním Pc+CB[n] na nádorové buněčné linii HeLa se zabývá i tato práce.

## 3 Teoretická část

### 3.1 Historie fotodynamické terapie

#### 3.1.1 Fototerapie a fotochemoterapie

S využitím světla jako prevencí onemocnění a terapií nejrůznějších onemocnění se setkáváme již u starověkých civilizací. Fototerapie (tedy užití světelného záření v léčbě nemocí) byla tehdy rozvíjena v Číně, Indii, Egyptě nebo v Řecku, kde i díky Hippokratovi dosáhla v podobě tzv. helioterapie velké popularity. V podobné době se poprvé objevuje i užití fotochemoterapie, pomocí které bylo ve staré Indii léčeno vitiligo. Psoraleny, první známé látky vykazující fotosenzitivní vlastnosti, používali později v jiných formách také Egypťané k léčbě leukodermie (Ackroyd *et al.* 2001, Lee *et al.* 2020).



Obr. 1 Struktura psoralenu (Hamblin *et St. Denis* 2013)

K většímu rozvoji fototerapie přispěl až o mnoho století později dánský lékař Niels Finsen. Ve své práci popsal užití červeného a ultrafialového světla k léčbě neštovic (červené světlo) a kožní tuberkulózy (UV produkované obloukovou lampou), za což v roce 1903 obdržel Nobelovu cenu. Ke klinickému užití psoralenů ve fotochemoterapii došlo ještě později, až v 70. letech 20. století, kdy jimi byla léčena lupénka a následně vitiligo. Uplatnění tyto sloučeniny našly poté i v imunoterapii (Ackroyd *et al.* 2001).

#### 3.1.2 Rozvoj fotodynamické terapie

Celkový koncept fotodynamické terapie (PDT) jako takové je znám více než sto let. První vědecké objevy náhodně učinil student medicíny Oscar Raab pod vedením profesora Hermana von Tappeinera na počátku minulého století v Mnichově. Během jeho experimentů s různými koncentracemi akridinu týkající se rozdílné efektivity v toxicitě *in vitro* a *in vivo* totiž došlo k zajímavému paradoxu – poprvé při nejnižší užití koncentraci přítomné organismy (trepky)



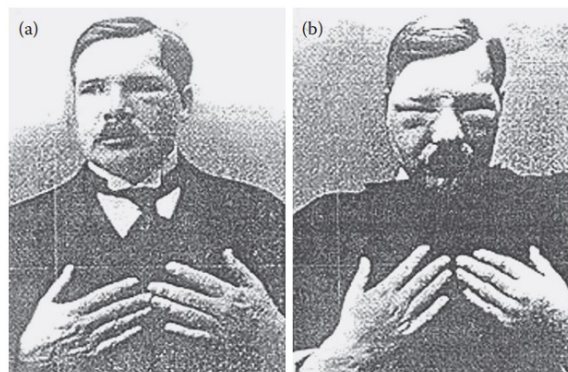
do 1 hodiny 40 minut uhynuly, podruhé však vykazovaly známky života i více než po 16 hodinách. Jediným rozdílem mezi těmito dvěma pokusy byla silná bouřka během prvního experimentu, která zapříčinila odlišné světelné podmínky. Následné experimenty potvrdily předpoklad, že zvýšení toxicity pro mikroorganismy působí právě kombinace akridinu a světla, zatímco ani jedna ze složek sama o sobě takový potenciál nemá (Daniell *et* Hill 1991).

Raab dále vyslovil myšlenku, že pravděpodobněji než světlo vedl k pozorované *in vitro* toxicitě určitý produkt vzniklý přenosem energie. Profesor von Tappeiner v dalších letech výzkum převzal a výrazně posunul. Společně s německým dermatologem Albertem Jesionkem navázal na práci francouzského neurologa Primea, jehož pacient s epilepsií se stal v roce 1900 prvním zaznamenaným příjemcem fotosenzitizéru (PS) i s jeho negativními účinky – orálně podávaný eosin u něj po expozici slunečnímu záření způsobil fotosenzitizaci a dermatitidu. Tento poznatek von Tappeiner a Jesionek využili při léčbě kožních tumorů podáním eosinu a vystavením tkáně bílému světlu pouze na lokální úrovni. Experimenty s různými koncentracemi a kombinacemi s dalšími látkami vedly ve většině případů ke slibným výsledkům. V roce 1904 von Tappeiner s farmakologem a toxikologem Jodlbauerem demonstrovali nutnost přítomnosti kyslíku při fotosenzitizaci a o tři roky později byl jimi poprvé užit termín fotodynamická terapie (PDT) jako popis těchto na kyslíku závislých fotosenzitizačních reakcí (Hamblin *et* St. Denis 2013, Ackroyd *et al.* 2001, Daniell *et* Hill 1991).

### **3.1.3 Hematoporfyrin a jeho deriváty**

Vývoj PDT je výrazně spjatý s objevy týkajícími se PS, v počátcích především s hematoporfyrinem (HP). Tato sytě fialovočervená organická sloučenina (později identifikována jako směs) byla poprvé vytvořena německým chemikem Schererem v roce 1841. Její optické vlastnosti, především fluorescence, však byly popsány až roku 1861 a pojmenování na základě své výrazné barvy získala ještě později (1871). Biologickými účinky HP se zabýval na začátku 20. století Hausmann, který popsal fotosenzitizační změny a fototoxicitu na laboratorních myších a morčatech. Na člověku byl HP poprvé použit v roce 1913 německým lékařem Friedrichem Meyer-Betzem, který sám sobě

injekčně aplikoval 200 mg HP a již během několika minut po ozáření světlem pociťoval na daných místech bolest a vznik otoků. Citlivost ke světlu navíc přetrvala po dobu následujících dvou měsíců (Daniell *et* Hill 1991).



Obr. 2 Friedrich Meyer-Betz s injekčně aplikovaným HP před (a) a po (b) expozici slunečnímu záření (Hamblin *et* St. Denis 2013)

Další důležitý objev týkající se HP učinil roku 1924 Francouz Policard, který pozoroval fluorescenci v experimentálních potkaních sarkomech po ozáření Woodovou lampou ( $\lambda = 365$  nm). Tento jev přisoudil akumulaci HP v nádorové tkáni, jež je klíčová pro diagnostické i terapeutické použití. Toto zjištění následně rozvinuli v Berlíně v roce 1942 Auler s Banzerem, kteří v nádoru prokázali specifickou retenci a kumulaci HP zároveň s lokální fotodynamickou reakcí (nekróza tkáně). Experimenty na skupině zdravých a nemocných myší v následujících letech ukázaly, že HP nemá afinitu ke zdravým tkáním kromě lymfatické, fetální a placentární tkáně, k omentu a k poraněné hojící se tkáni. V pozdějších letech bylo zjištěno, že se HP v porovnání se zdravou tkání sice koncentruje především ve tkáni maligní, avšak akumulace je pozorovatelná i v játrech, ledvinách a slezině – vzhledem k jejich umístění a praktické nemožnosti ozáření však zůstala selektivní eradikace nádorové tkáně možná (Ackroyd *et al.* 2001, Kessel 2019).

Hlavní nevýhodou jinak slibné terapie zůstávala nutnost poměrně vysokých dávek HP a s tím spojené riziko nežádoucí fotosenzitizace a fototoxicity. Průlomem se stal rok 1955, kdy Schwarz a jeho spolupracovníci popsali podstatu HP. Bylo zjištěno, že ve skutečnosti se jedná o směs různých porfyrinů s výrazně odlišnými vlastnostmi a samotný purifikovaný HP má ve skutečnosti jen velmi slabou schopnost kumulace v neoplastické tkáni, na rozdíl od zbývajících součástí

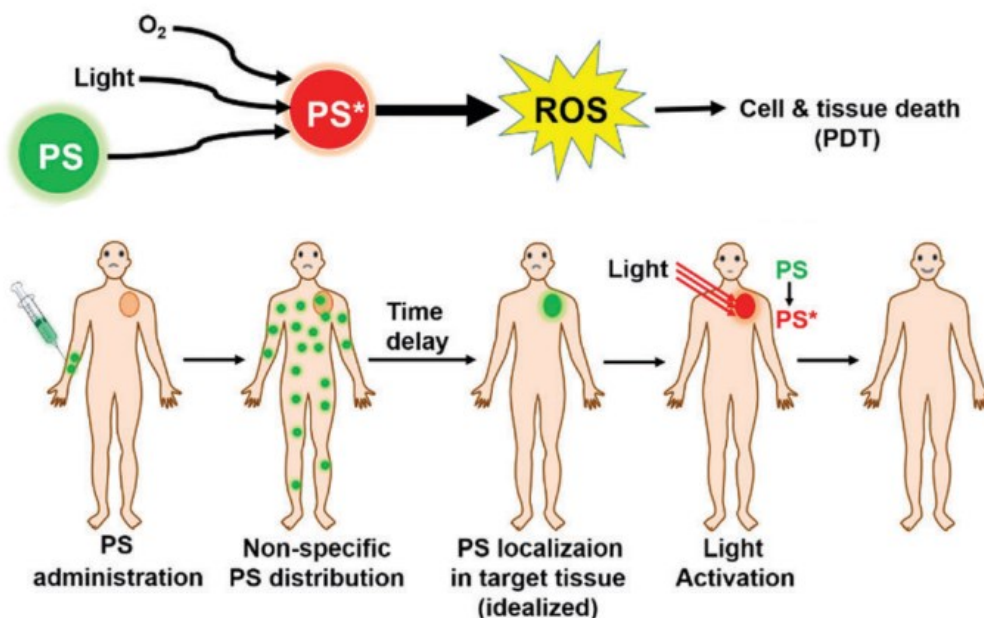
původní směsi. Úpravou této „nehematoporfyrinové“ frakce pomocí kyseliny octové a sírové, acetátu sodného a solného roztoku byl vytvořen tzv. hematoporfyrinový derivát (HpD) – látka s dvojnásobnou fototoxicitou oproti původnímu HP a zároveň s velmi dobrou afinitou k nádorové tkáni. Diagnostické a terapeutické účinky injekčně podaného HpD byly popsány na Mayo Clinic v roce 1960 Lipsonem a Schwarzem, čímž byl opět obnoven hlubší výzkum PDT. Doughertym purifikovaný HpD se pak později stal prvním klinicky schváleným PS pro léčbu onkologických onemocnění pod komerčním názvem Photofrin® (Correia *et al.* 2021, Lee *et al.* 2020, Ackroyd *et al.* 2001, Daniell *et Hill* 1991).

Právě Dougherty *et al.* provedli v roce 1978 první preklinické testy PDT na 25 lidských pacientech. HpD byl podán intravenózně v množství 2,5 a 5 mg/kg, jako zdroj světla byla použita xenonová lampa o výkonu 5 000 mW produkující záření o  $\lambda = 600-700$  nm a pacienti byli tomuto záření vystaveni 24-168 hodin po podání PS. Takto léčené maligní léze zahrnovaly karcinomy prsu, tračnicku, prostaty, endometria, maligní melanom, dlaždicobuněčný karcinom (SCC), bazocelulární karcinom (BCC) a také chondrosarkom, angiosarkom a *mycosis fungoides*. Kladné výsledky PDT se objevily i v případech, kde konvenční léčba selhala – celkem 98 ze 113 lézí vykazovalo úplnou regresi, 13 parciální a pouze 2 zůstaly bez odpovědi. Související nežádoucí účinky (citlivost k slunečnímu záření, erytém, edém a v několika případech až nekróza pokožky) se pak snižovaly prodloužením intervalu mezi podáním PS a expozicí záření alespoň na 3 dny (Ackroyd *et al.* 2001, Daniell *et Hill* 1991).

Testování v následujících letech pokračovalo. Jedním z důležitých objevů se stala identifikace singletového kyslíku ( $^1\text{O}_2$ ) jakožto hlavní cytotoxické komponenty produkované světelným zářením dopadajícím na porfyrin během PDT. Poznatky o eradikaci vaskularizace tumoru po ozáření vedly mj. k odklonu od původního využití PDT k léčbě vlhké makulární degenerace sítnice. V roce 1991 došlo k přesnější identifikaci součástí HpD, složeného z porfyrinových monomerů, dimerů a vyšších oligomerů spojených etherovými můstky. Purifikovaný HpD zbavený monomerních porfyrinů byl poté v roce 1995 pod názvem Photofrin® schválen americkou FDA jako vůbec první PS pro klinické využití. PDT se tak zařadila mezi dostupné terapie v onkologické léčbě nejrůznějších typů nádorů (Kessel 2019, Ackroyd *et al.* 2001).

## 3.2 Principy a mechanismy fotodynamické terapie

Třemi klíčovými prvky fotodynamické terapie jsou fotosenzitivní látka (fotosenzitizér – PS), světelné záření o specifické vlnové délce a molekulární kyslík ( $^3\text{O}_2$ ). Po (nejčastěji) systémovém parenterálním anebo lokálním podání PS dochází k jeho nespecifické distribuci a následně v cílové tkáni k jeho specifické kumulaci, která je v ideálním případě co největší. Když uplyne dostatečně dlouhá inkubační doba, cílová tkáň je ozářena světlem o vhodné vlnové délce, což vede k excitaci PS a tím ke startu fotochemických reakcí v tkáni. Pokud dojde k mezisystémovému přechodu, excitovaný PS v tripletovém stavu ( $^3\text{PS}^*$ ) se může buď vrátit do základního stavu vyzářením světelné energie, nebo interaguje s okolními molekulami, čímž iniciuje vznik  $^1\text{O}_2$  a dalších vysoce reaktivních forem kyslíku (ROS). Tyto pochody souhrnně nazýváme jako fotodynamické reakce (PDR), které ve svém důsledku vedou různými mechanismy v cílové tkáni k poškození a buněčné smrti (Karges 2022, Correia *et al.* 2021).



Obr. 3 Schématické znázornění PDT (Li *et al.* 2021, upraveno)

### 3.2.1 Distribuce a selektivní akumulace fotosenzitizérů

Efektivita PDT závisí na mnoha faktorech. Mezi ty hlavní patří struktura a vlastnosti samotného PS, s tím přímo související lokalizace (až na subcelulární úrovni) a jeho celkové množství v léčené tkáni. I proto je rychlá maximální selektivní akumulace v tumoru zároveň se zlepšováním možností aplikace

s distribucí významnou součástí ve vývoji dalších PS (Garland *et al.* 2009, Konan *et al.* 2002).

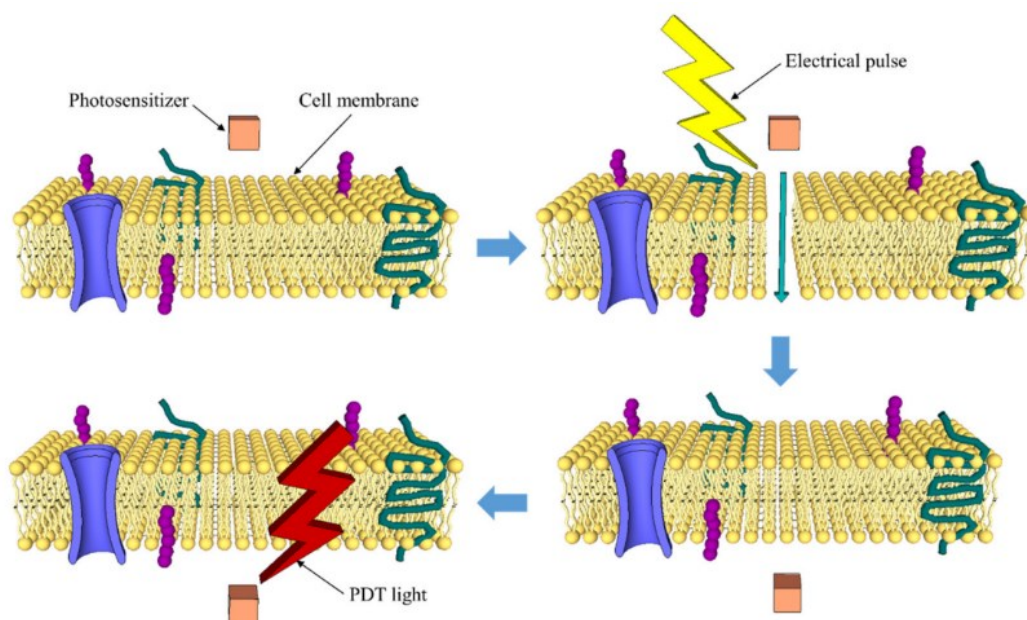
Distribuce především hydrofobních PS je možná např. pomocí konjugace s nejrůznějšími nosiči, pomocí liposomů, polymerních nosičů apod. Přímé specifické cílení na nádorovou tkáň umožňují např. monoklonální protilátky. I bez nich však PS vykazují různou míru specifity – pro preferenční kumulaci PS v tumorové tkáni existuje více vysvětlení. Jak již bylo naznačeno, příjem cílovými buňkami a následná subcelulární lokalizace PS je ovlivněna jeho nábojem, lipofilitou a celkovou strukturou (Konan *et al.* 2002).

Celkový náboj molekuly PS je rozhodující při interakcích s buněčnými membránami, které mají náboj negativní. Pozitivně nabitě PS tedy budou membránami prostupovat snadněji než PS negativně nabitě, které v případě nekompensování takového náboje lipofilitou prostupují spíše za pomoci endocytózy, a lokalizovány tak bývají v rámci lyzozomů. Naopak kationické PS mohou pasivním transportem difundovat přímo přes buněčnou membránu, a v závislosti na míře pozitivního náboje se tak preferenčně lokalizují buď na cytoplazmatické membráně, membránách Golgiho aparátu, mitochondrií a endoplazmatického retikula (ER; méně pozitivně nabitě), anebo uvnitř mitochondrií (PS s větším kladným nábojem). Samotný charakter náboje tedy do jisté míry určuje i subcelulární lokalizaci (van Straten *et al.* 2017).

Další faktor, lipofilita, ovlivňuje distribuci každého xenobiotika v těle. Při systémovém podání PS dochází v krevním řečišti k vazbě na proteinový nosič – hydrofilní PS se většinou váží na albumin, amfifilní na HDL a lipofilní dovnitř lipidového jádra LDL. Ukázalo se, že nádorové buňky vykazují abnormálně vysoký počet LDL receptorů, což může vést přímo k receptorově zprostředkované endocytóze molekul PS. Ovlivněna je i jejich subcelulární lokalizace. Nejvíce efektivními PS se ukazují být právě ty s relativně hydrofobní strukturou, které rychle difundují do buněk nádoru a subcelulárních struktur jako např. mitochondrie či ER. Hydrofobnost takových molekul však zároveň značně ztěžuje jejich intravenózní podání. I proto může být transport PS do cílových tkání ulehčen a zefektivněn využitím liposomů (Roguin *et al.* 2019, Abrahamse *et Hamblin* 2016, Garland *et al.* 2009, Juarranz *et al.* 2008).

Významnou roli hraje také celková struktura molekuly PS – prostorové uspořádání nábojů, konformace a další vlastnosti PS významně ovlivňují jeho příjem buňkami. Pro selektivní akumulaci v nádorech jsou důležitá také vlastní specifika takových tkání. Nádory jsou kvůli svému rychlému růstu typické značně pozměněnou vaskularizací, zvýšenou cévní permeabilitou, slabým zásobením lymfatickými cévami a velkým intersticiálním prostorem, v němž se shromažďují především hydrofilní PS, které jsou jinak dovnitř neoplastických buněk přijímány jen okrajově skrze pinocytózu nebo endocytózu. Zároveň v tomto prostoru panuje významně kyselejší prostředí (průměrné pH = 6,5) než v normálních tkáních (pH = 7,5), což u většiny PS, které jsou slabými kyselinami, zvyšuje jejich absorpci nádorovými buňkami. Podpořit příjem látky cílovými buňkami lze i např. pomocí elektroporace (Correia *et al.* 2021, van Straten *et al.* 2017, Garland *et al.* 2009).

Pro každý PS a typ tumoru existuje specifická doba od podání, při které je množství akumulovaného PS uvnitř nádoru nejvyšší. Nejde však vždy automaticky o dobu, kdy je v každém případě zahajováno ozařování (Garland *et al.* 2009).



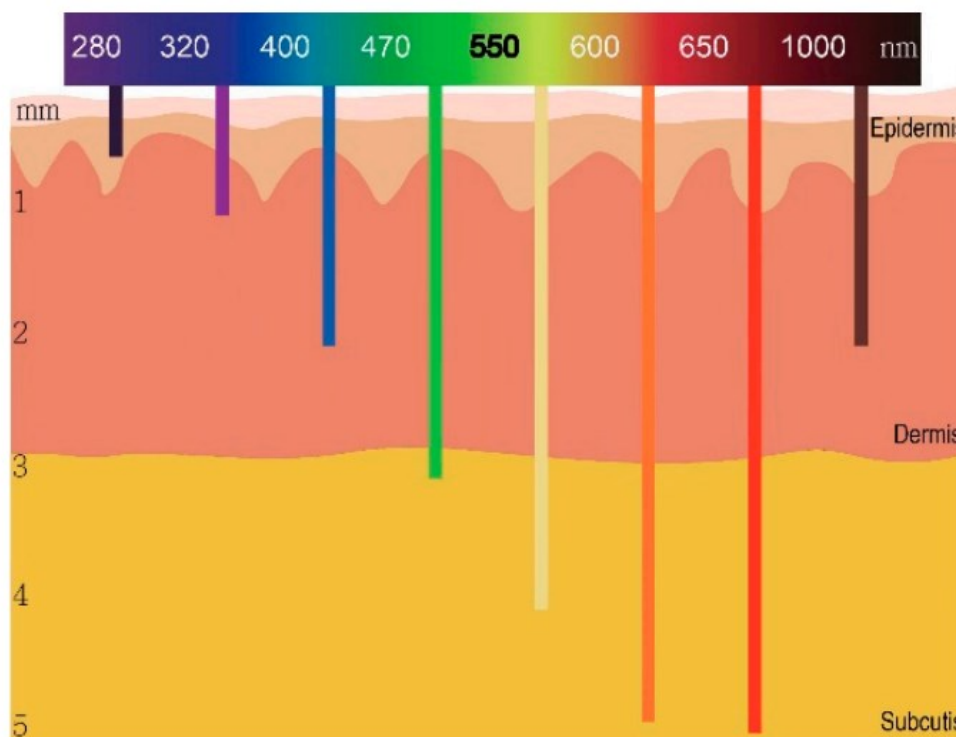
Obr. 4 Elektroporace v PDT (Correia *et al.* 2021)

### 3.2.2 Světlo

Terapeutická efektivita PDT dále závisí na vlastnostech její druhé klíčové součásti – totiž světelného záření, které je nutné pro excitaci PS. Světlo jednak musí

projít tkáněmi do potřebné hloubky, jednak musí být schopné na místě aktivovat přítomný PS (van Straten *et al.* 2017).

Hloubka světelné penetrace je závislá na optických vlastnostech tkáně (absorpce, rozptyl, odraz) a vlnové délce ( $\lambda$ ) světla. Světlo o  $\lambda$  v oblasti přibližně 600-800 nm prochází tkáněmi nejlépe. Při  $\lambda < 600$  nm je totiž absorbováno a neproniká dostatečně hluboko, při  $\lambda > 800$  nm zase neposkytuje dostatečné množství energie pro excitaci kyslíku a následnou produkci ROS. V PDT je tedy nejvyužívanější toto rozmezí vlnových délek (tzv. fototerapeutické okno) – ani tak však světlo většinou neprostoupí dále než na vzdálenost několika mm (Correia *et al.* 2021, Li *et al.* 2018, Abrahamse *et Hamblin* 2016, MacDonald *et Dougherty* 2001).



Obr.5 Závislost hloubky světelné penetrace kůže na vlnové délce světla (Lee *et al.* 2020)

PS se v tkáni nachází ve svém základním singletovém stavu. Poté, co absorbuje světelné záření ve formě fotonu, se dostává do excitovaného singletového stavu ( $^1PS^*$ ), který je však velmi nestabilní. Během několika nanosekund může  $^1PS^*$  přebytečnou energii vyzářit buď skrze emisi světla (fluorescence využívaná v diagnostice a monitoringu), nebo produkcí tepla,

a tím se vrátit do svého základního energetického stavu. Může ale dojít i k mezisystémovému přechodu, kterým se molekula  $^1\text{PS}^*$  dostane do stabilnějšího tripletového stavu ( $^3\text{PS}^*$ ). I v tomto případě je následně možné navrácení do základního stavu pomocí emise fotonu ve formě fosforescence. Delší životnost  $^3\text{PS}^*$  (až několik desítek  $\mu\text{s}$ ) umožňuje i přímý přenos energie na molekulární kyslík ( $^3\text{O}_2$ ) či interakce s okolními biomolekulami (Correia *et al.* 2021).

### 3.2.3 Kyslík

Molekulární kyslík je posledním klíčovým prvkem a zároveň jednou z hlavních limitací PDT – bez jeho přítomnosti totiž PDR nemohou dále probíhat. Koncentrace  $^3\text{O}_2$  se liší mezi různými typy, ale dokonce i mezi odlišnými částmi nádorů, a to v závislosti na míře jejich vaskularizace. Buňky v hypoxických částech tumorů s koncentracemi  $^3\text{O}_2$  nižšími než 5 % jsou vůči PDT rezistentní. Úbytek  $^3\text{O}_2$  v tkáni nastává také v průběhu PDT z důvodu tvorby ROS a terapií způsobeného poškození cévního zásobení tumoru. Byly sice provedeny pokusy se zvyšováním oxygenace pomocí hyperbarické oxygenoterapie, ovšem s neuspokojivými výsledky. Testování přímého (pomocí  $^3\text{O}_2$  nosičů) a nepřímého (pomocí enzymu katalasy a intracelulárního  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) přivedení  $^3\text{O}_2$  do nádoru mělo lepší výsledky a přímá metoda je i běžně využívána. Měření oxygenace tkání v reálném čase je tedy významnou možností pro optimalizaci PDT a její vyšší efektivitu (Correia *et al.* 2021, van Straten *et al.* 2017, MacDonald *et Dougherty* 2001).

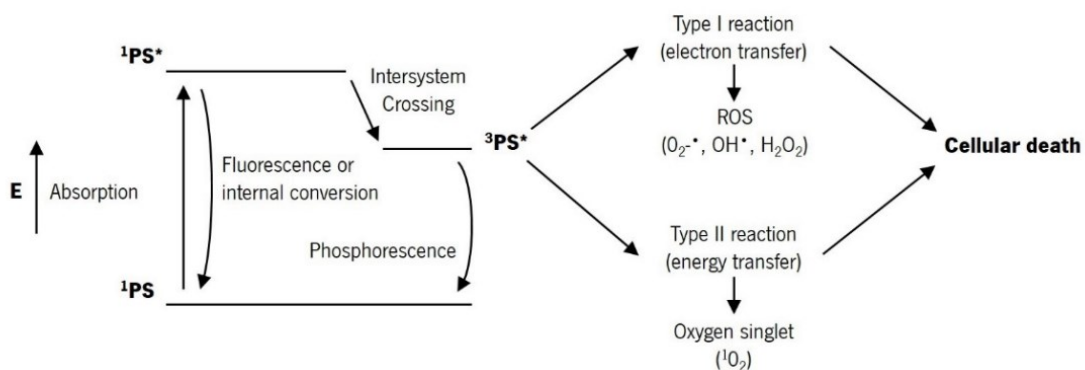
### 3.2.4 Reakce I. a II. typu

Jak již bylo zmíněno, ozářením je PS excitován do  $^1\text{PS}^*$ , který poté může přejít do stavu tripletového.  $^3\text{PS}^*$  je následně již schopen (kromě jiného) iniciovat dva typy reakcí (MacDonald *et Dougherty* 2001).

Při reakcích I. typu dochází k přenosu elektronů nebo protonů:  $^3\text{PS}^*$  interaguje s okolním organickým substrátem za vzniku radikálových kationtů a aniontů, které reagují s přítomným  $^3\text{O}_2$ , čímž dojde k postupné produkci ROS (např.  $\cdot\text{O}_2^-$ ,  $\text{HO}\cdot$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). U většiny PS s tetrapyrolovou strukturou (s výjimkou bakteriochlorinů) však převažuje reakce II. typu. Při ní je energie z  $^3\text{PS}^*$  předávána přímo na molekulu  $^3\text{O}_2$ , což vede ke vzniku vysoce reaktivního  $^1\text{O}_2$ . Produkty



I. i II. typu reakce přímo reagují s biomolekulami ve svém blízkém okolí – např. poškození aminokyselin zapříčiňuje nefunkčnost proteinů, peroxidace lipidů vede k perforaci buněčných membrán. Velkou roli zde hraje subcelulární lokalizace PS. Vzniklý  $^1\text{O}_2$  zodpovědný za většinu poškození má totiž velmi malou stabilitu (s dobou života 10-320 ns), jež mu umožňuje účinkovat jen v okruhu přibližně 20 nm od místa jeho vzniku. Tato skutečnost společně s aktivací po lokálním ozáření přispívají ke specifitě a dobré kontrolovatelnosti PDT (Correia *et al.* 2021, Lee *et al.* 2020, van Straten *et al.* 2017, Abrahamse *et Hamblin* 2016).



Obr. 6 Upravený Jablonského diagram znázorňující fotofyzikální mechanismus PDT (Correia *et al.* 2021)

### 3.2.5 Biologické mechanismy účinku

Je popsáno několik hlavních mechanismů, skrze které během PDT dochází k destrukci nádorové tkáně. Velkou roli v tom, který mechanismus bude převažovat, hraje především subcelulární lokalizace PS. Důležité jsou ale i další faktory (koncentrace PS, světelné záření nebo interval mezi podáním PS a ozářením). Zatímco *in vitro* je obecně hlavním procesem buněčná smrt, *in vivo* se k ní v závislosti na užitém léčebném režimu významně přidávají destrukce vaskularizace tumoru a imunitní odpověď organismu (Correia *et al.* 2021, Abrahamse *et Hamblin* 2016, MacDonald *et Dougherty* 2001).

- **Poškození cytoskeletu**

Stejně jako chemoterapie i PDT je schopna účinně ničit mikrotubuly a mikrofilamenta nádorových buněk. V cytosolu lokalizované PS jsou schopné

mikrotubuly ničit přímo skrze produkci  $^1\text{O}_2$ , u ostatních jde o poškození nepřímé. Terapií např. se zinečnatými ftalocyaniny jsou mikrotubuly výrazně alterovány a buněčný cyklus je zastaven, což vede až k buněčné smrti (Juarranz *et al.* 2008).

#### ▪ Apoptóza, nekróza a autofagie

Lepšími induktory programované buněčné smrti (hl. apoptózy) jsou PS lokalizované v mitochondriích než ty v cytoplasmatické membráně (u zde lokalizovaných PS převažuje nekróza). Nekrotická buněčná smrt se obecně často uplatňuje také v případě, kdy je tumor ozařován velkou dávkou světla s vysokou intenzitou (Correia *et al.* 2021, Juarranz *et al.* 2008, MacDonald *et Dougherty* 2001).

#### ▪ Destrukce vaskularizace tumoru

Poškození vaskularizace nádorů je důležitá v úspěšné léčbě a dlouhodobé efektivitě PDT – cévy totiž zajišťují přísun výživy a kyslíku a zároveň jsou hlavní cestou pro šíření nádorových buněk k tvorbě metastáz. U mnoha PS byla prokázána schopnost vyvolat vasokonstrikci s vytvořením trombu. Následná hypoxie a nedostatek živin ústí až v inhibici nádorového bujení. PS se také mohou koncentrovat nejen nádorových buňkách, ale i v buňkách cévního endotelu, což po ozáření vede k narušení cévní stěny, zastavení zásobení, a tím i zde k buněčné smrti v tumoru. Poškození endoteliálních buněk cév navíc pozitivně ovlivňuje imunitní systém (Correia *et al.* 2021, Juarranz *et al.* 2008).

#### ▪ Imunologická reakce

Na rozdíl od původních předpokladů se ukázalo, že PDT vícero cestami významně stimuluje imunitní odpověď organismu, a to nejen v podobě aktivace systému, ale také imunosupresí, která se projevuje především při topické terapii. Většinou však PDT imunitní systém aktivuje – nekróza, poškození cév, změny integrity tkání a homeostázy vedou k rozvoji zánětlivé reakce. Produkované prozánětlivé cytokiny, růstové a tumor-nekrotizující faktory a jiné proteiny stimulují buňky imunitního systému, což může vést ke specifické systémové imunitní odpovědi na nádorové buňky pomocí cytotoxických T lymfocytů, které pak po těle delší dobu kolují (Correia *et al.* 2021, Juarranz *et al.* 2008).

### 3.3 Fotosenzitizéry

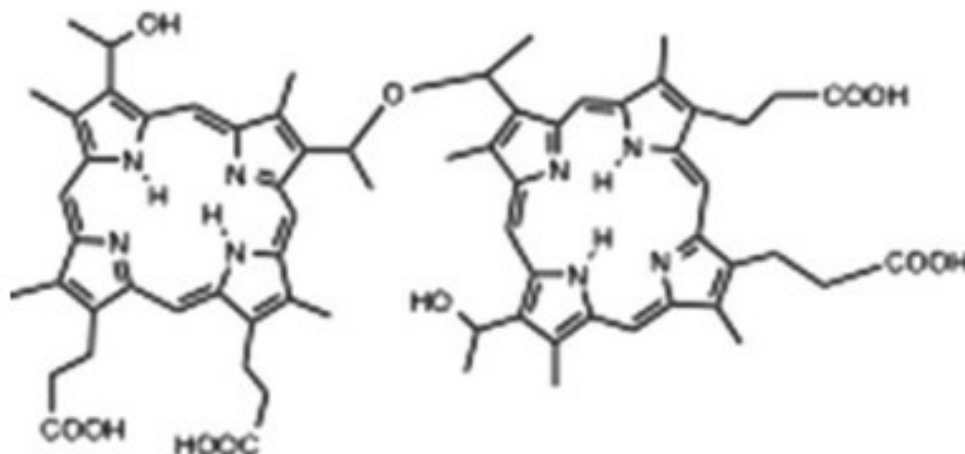
Jak již bylo řečeno, PS jsou společně s kyslíkem a světlem klíčovými elementy PDT. Jejich vlastnosti celou terapii významně ovlivňují. Jde o látky schopné po excitaci zářením vhodné vlnové délky iniciovat skrze transfer energie, elektronů či vodíku vznik cytotoxických látek. PS ideální pro klinickou praxi by se měl preferenčně kumulovat v nádorové tkáni, mít nízkou (nejlépe žádnou) aktivitu při absenci světla. Naopak by měl vykazovat vysokou schopnost PDR a produkce  $^1\text{O}_2$  s dalšími ROS v přítomnosti světla – absorpční maximum by měl mít při vlnových délkách umožňujících dobrý prostup záření tkání, nejlépe tedy ve fototerapeutickém okně. Po terapii by měl být rychle ze zdravých tkání eliminován kvůli minimalizaci nežádoucích účinků. PS by dále měl být chemicky čistou látkou, která je dobře připravitelná a skladovatelná. V současné době probíhá klinické a preklinické testování velkého množství PS (Correia *et al.* 2021, Dobson *et al.* 2018, Li *et al.* 2018, Abrahamse *et Hamblin* 2016).

#### 3.3.1 První generace

Do první generace PS se řadí první pro klinické využití schválený a dlouhou dobu nejpoužívanější porfyrinový fotosenzitizér – porfimer sodný (známý pod komerčním názvem Photofrin<sup>®</sup>). Tento purifikovaný HpD složený z porfyrinových oligomerů a dimerů však kromě pro PDT pozitivních vlastností vykazuje i několik nedostatků, jako je např. nutnost relativně vysokých dávek, absorpční maximum při krátké vlnové délce ( $\lambda = 630 \text{ nm}$ ; snižující schopnost většího průchodu záření tkáněmi), anebo zvýšenou akumulaci v kůži znamenající prodloužení fotosenzitivity pokožky na 6 až 8 týdnů po skončení PDT (Konan *et al.* 2002).

Porfimer sodný je v současné době klinicky schválen v celosvětovém měřítku. Mezi jeho hlavní aplikace patří případy plicních, endobronchiálních a obstrukčních jícnových karcinomů, stavy vysokého stupně dysplazie Barrettova jícnu nebo např. pouze lokální využití při léčbě žaludečního karcinomu v Japonsku

či karcinomu močového měchýře v Kanadě (Karges 2022, Correia *et al.* 2021, van Straten *et al.* 2017).



Obr. 7 Struktura Photofrinu<sup>®</sup> (Abrahamse *et Hamblin* 2016)

### 3.3.2 Druhá generace

I kvůli fotosenzitivitě pokožky a dalším nevýhodám vyskytujícím se u PS první generace byly stále zkoumány a vyvíjeny jiné látky s potenciálem nových vhodných PS pro PDT. Cílem těchto PS byl získání lepších vlastností: absorpce záření o vyšších vlnových délkách, větší specifita a afinita k nádorové tkáni, větší produkce  $^1\text{O}_2$  a dalších ROS a také snížení vedlejších negativních účinků, týkajících se právě především získané fotosenzitivity kůže po terapii. Druhou generaci PS již tvoří chemicky čisté syntetizované sloučeniny, strukturně často podobné tetrapyrrolovému jádru porfyrinů. Patří sem např. nové porfyrinové deriváty, chloriny, texafyriny, ftalocyaniny, porfyceny a PS odvozené od  $\delta$ -aminolevulové kyseliny (ALA) (Lee *et al.* 2020, Garland *et al.* 2009, Konan *et al.* 2002).

Chloriny a bakteriochloriny jsou skupinami látek, jež mají zastoupení mezi klinicky schválenými i testovanými PS. Významný je např. temoporfin (Foscan<sup>®</sup>) užívaný v EU k léčbě nádorů hlavy, krku a SCC, nebo talaporfin (Laserphyrin<sup>®</sup>) schválený v Japonsku pro léčbu glioblastomu a časných fází rakoviny plic. Za bakteriochloriny lze jmenovat např. derivát padeliporfin (Tookad<sup>®</sup>) se slibnými výsledky pro léčbu nádorů prostaty (Karges 2022, van Straten *et al.* 2017, Abrahamse *et Hamblin* 2016).

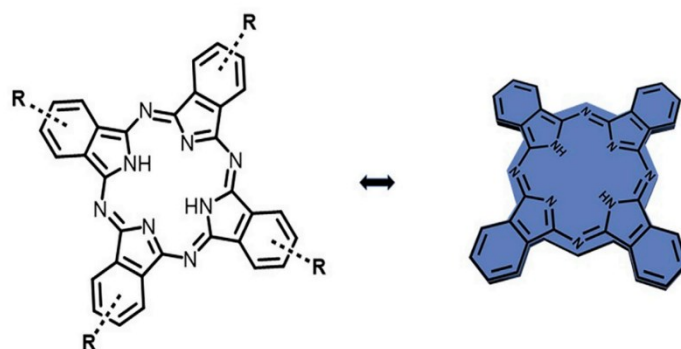
Další skupinou PS jsou látky odvozené od ALA, která je jako proléčivo dostupná sama o sobě (Levulan<sup>®</sup>) nebo jako její 10% nanoemulze ve formě hydrogelu (Ameluz<sup>®</sup>). Posledním PS z této skupiny, jež je celosvětově schválený především pro léčbu BCC a SCC (v USA pouze pro aktinickou keratózu), je methyl-ALA (Metvix<sup>®</sup>, Metvixia<sup>®</sup>) (Karges 2022, Lee *et al.* 2020).

Texafyriny i porfyceny mají pozitivní výsledky prozatím v rámci předběžných a klinických testů. Příkladem může být LuTex<sup>®</sup>, texafyrin s rychlou a vysoce selektivní akumulací v nádorových tkáních (Garland *et al.* 2009).

### 3.3.3 Ftalocyaniny

Ftalocyaniny (Pc) mají pro PDT optimální fotofyzikální i fotochemické vlastnosti. Jejich nevýhodou je nízká rozpustnost a sklon k agregaci ve vodném prostředí, čemuž však lze zabránit vhodnou substitucí. Vlastnosti Pc jsou dále výrazně ovlivněny přítomností centrálního iontu kovu. Zatímco Pc bez centrálního atomu, s kobaltem, niklem nebo mědí produkují pouze omezené množství <sup>1</sup>O<sub>2</sub> a dalších ROS, Pc se zinkem, hliníkem či křemíkem v tomto směru vykazují pro PDT výrazné zlepšení (Lan *et al.* 2019, Garland *et al.* 2009).

Pc byly objeveny náhodně během průmyslové výroby ftalimidu roku 1928 ve Skotsku. Jde o syntetické analogy porfyrinu, konkrétně o tetraazoporfyrinové deriváty, mající rozsáhlý konjugovaný systém. Díky svým fotofyzikálním vlastnostem se ukázaly být velmi dobře využitelné v PDT – nejlépe absorbují světlo o vlnových délkách v blízké IR oblasti ( $\lambda_{\max}$  kolem 670 nm), mají vysokou fotostabilitu a v porovnání s porfyriny dokáží více produkovat <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Variabilita v možnostech substitucí a úprav makrocyklu zase umožňuje zlepšení jejich fotochemických vlastností. Prodloužením systému konjugovaných vazeb (např. připojením benzenů za vzniku naftalocyaninu) dochází k absorpci při ještě delších vlnových délkách, koordinací s ionty diamagnetických kovů, např. zinku, u nich lze při PDT dosáhnout dlouhotrvajícího <sup>3</sup>PS\* s efektivnější produkcí ROS (Kollar *et al.* 2020, Cheng *et al.* 2019, Li *et al.* 2018).



Obr. 8 Struktura Pc (Cheng *et al.* 2019)

### 3.3.4 Třetí generace

Třetí generace fotosenzitizérů přišla s dalšími pokroky ve výzkumu a úpravě látek (často PS druhé generace), které by následně měly ještě lepší fyzikální, chemické a terapeutické vlastnosti – především specifickou akumulaci v neoplastické tkáni, a tedy zároveň vyšší efektivnost při PDT. Snahou bylo také překonání přetrvávající fotosenzitivity kůže po PDT a umožnění systémové distribuce i těm PS, u kterých je pro jejich hydrofobní charakter obtížná. Toho bylo docíleno především konjugací PS s pomocnými biomolekulami a nosiči – nano-částicemi, liposomy, protilátkami. Specifické cílení PS do nádorové tkáně umožňuje snížení nutné dávky PS, a tím i další snížení nežádoucích účinků. Pro použití výhodná je také skutečnost, že se většinou jedná o PS absorbující záření o vlnových délkách blízkých IR, což umožňuje lepší penetraci světla do tkáně (Roguin *et al.* 2019, Dobson *et al.* 2018, von Straten *et al.* 2017, Hong *et al.* 2016, Juarranz *et al.* 2008).

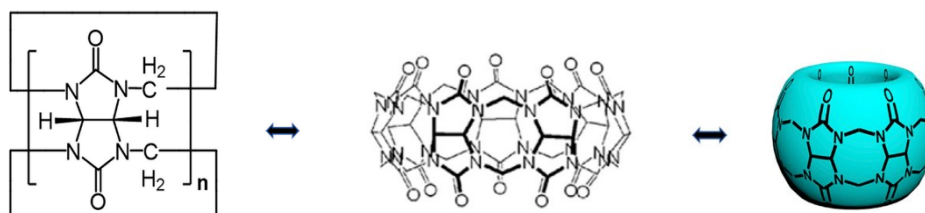
## 3.4 Supramolekulární interakce

Systémy na bázi supramolekulárních nekovalentních interakcí mají velký význam a potenciál v diagnostice a terapii nádorů již nějakou dobu. Především jejich schopnost transportu a selektivní aktivace až v cílovém místě, tedy uvnitř nádorových buněk, je pro tyto účely činí mimořádnými, a to obzvláště v porovnání s rozšířenými možnostmi v nádorových terapiích, které se ovšem potýkají s nespecifitou a cytotoxicitou i pro zdravé buňky a tkáně. Makrocyclické

hostitelské molekuly mohou být vhodným nosičem, stabilizátorem nebo prvkem zajišťujícím lepší biologickou dostupnost léčiv. Supramolekulární chemie se tak přímo stala i součástí vývoje nových PS, jež by dokázaly ještě lépe překonávat problémy spojené s těmi dosavadními při jejich použití v PDT (Cheng *et al.* 2019, Li *et al.* 2018, Bolfarini *et al.* 2014).

### 3.4.1 Kukurbiturily

Kukurbiturily (CB[n] – „n“ označuje počet podjednotek) jsou robustní makrocyclické sloučeniny, někdy nazývané také jako „makrocyclické kontejnery“. Prvními, kdo tuto látku kondenzační reakcí glykourilu s formaldehydem v kyselém prostředí syntetizovali, byl Behrend *et al.* v roce 1905. Její výjimečná struktura (hydrofobní dutina se dvěma elektronegativními karbonylovými portály po obou stranách) však byla popsána až v roce 1981, kdy také pro podobnost s dýní dostala své jméno. Další homology CB[n] však byly izolovány a přesně identifikovány až na přelomu 20. a 21. století. Pro své unikátní vlastnosti (silnou afinitu a vazebnou schopnost, nízkou toxicitu, vysokou chemickou stabilitu, možnost zlepšení rozpustnosti ve vodném prostředí pomocí kyselin, alkalických kovů či připojením funkčních skupin), univerzálnost a snadnou přípravu se i přes svou krátkou historii staly významnou součástí supramolekulární chemie např. ve formě cílených protinádorových transportních systémů. Tvoří komplexy s nejrůznějšími organickými i anorganickými sloučeninami, a to včetně Pc využívaných v PDT (Kashyap *et al.* 2021, Cheng *et al.* 2019, Koc *et Tuncel* 2017).



Obr. 9 Struktura CB[n] (Cheng *et al.* 2019, upraveno)

### 3.4.2 Supramolekulární komplexy v PDT

Supramolekulární komplexy CB[n] mají v PDT uplatnění z více důvodů. Nejen, že zlepšují fotostabilitu i optické vlastnosti molekuly, ale také ve vodném

prostředí zabraňují agregaci hydrofobních látek. V PDT jsou tyto makrocyclické supramolekulární systémy využívány také ve vývoji nových PS schopných aktivace (fluorescence, fotodynamické či antimikrobní aktivity) i deaktivace přímo v místě určení, a tedy v dalším zefektivnění celé terapie, příp. diagnostiky (Yuan *et al.* 2020, Chen *et al.* 2017, Koc *et Tuncel* 2017).

Pc (a tedy i zinečnaté Pc) jsou hydrofobními PS, což sice zlepšuje jejich schopnost vstupu do nádorových buněk, zároveň je tím však zhoršena možnost jejich systémového podání. Ve vodném prostředí dochází navíc k nežádoucí agregaci, které lze zabránit např. vhodnou substitucí Pc a následným vytvořením komplexu s navenek hydrofilními CB[n], což kromě oslabení agregace zlepšuje i schopnost fluorescence a produkce  $^1\text{O}_2$  takto připravenými PS. Na druhou stranu, vzhledem k velké hydrofilní struktuře dochází ke snížení vstupu takových molekulárních komplexů dovnitř buněk (Kociscakova *et al.* 2023).



## 4 Cíle práce

- Stanovení *in vitro* fototoxicity vybraných zinečnatých ftalocyaninů a jejich supramolekulárních komplexů s CB[7] na buněčné linii HeLa
- Určení subcelulární lokalizace
- Porovnání účinnosti a zhodnocení

## **5 Materiál a metodika**

### **5.1 Základní vybavení**

- sterilní serologické pipety různých velikostí (Eppendorf, Německo)
- sterilní Pasteurovy pipety (Brand, Německo)
- sterilní laboratorní sklo (Simax, Česká republika)
- sterilní kultivační plast (TPP, Švýcarsko)
- sterilní plastové špičky různých velikostí (Eppendorf)
- mikrozkmavky různých velikostí (Eppendorf)
- Bürkerova komůrka (Brand)
- sterilní plastové vaničky (Eppendorf)
- sterilní 96jamkové mikrotitrační destičky (TPP)
- sterilní Petriho misky se skleněným dnem (WillCo Wells, Nizozemsko)

### **5.2 Přístrojové vybavení**

- chladnička s mrazákem (Liebherr, Švýcarsko)
- vodní lázeň (Memmert, Německo)
- laminární boxy (EuroClone, Itálie)
- elektronický pipetovací nástavec (Eppendorf)
- buněčný inkubátor s termostatem (Esco, Singapurská republika)
- mikroskop Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Japonsko)
- elektronická automatická multikanálová pipeta (Eppendorf)
- automatické pipety různého rozsahu (Eppendorf)
- xenonová lampa (Newport, USA)
- čtečka mikrotitračních destiček Tecan Infinite 200Pro (Tecan, Švýcarsko)
- fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse Ti-E (Nikon) s sCMOS kamerou Andor Zyla 5.5 (Andor Technology, Velká Británie) a fluorescenčním zdrojem pE-300 white CoolLED (CoolLED Ltd., Velká Británie)

### **5.3 Chemikálie a reagensie**

- kultivační médium DMEM (Lonza, Belgie)
- fetální bovinní sérum (FBS; Sigma, Německo)

- roztok penicilin/streptomycin (Lonza)
- HEPES pufr (Sigma)
- ultraglutamin I (Lonza)
- PBS pufr (Sigma)
- roztok trypsin-EDTA (Lonza)
- 0,4% trypanová modř (Sigma)
- 3% roztok peroxidu vodíku (Fluka, Sigma)
- neutrální červeň (Sigma)
- fixační roztok (1% CaCl<sub>2</sub> v 0,5% HCHO v H<sub>2</sub>O)
- lyzační roztok (1% CH<sub>3</sub>COOH v 50% EtOH v H<sub>2</sub>O)
- fotosensitizéry (vědecká skupina prof. Zimčíka, FaF UK)
- CB[7] (vědecká skupina prof. Šindeláře, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno)
- bezsérové kultivační médium (SFM; Lonza, Belgie)
- fluorescenční sondy Hoechst 33342, MitoTracker™ Green FM, LysoTracker™ Green DND-22 (Molecular Probes, USA)

## 5.4 Kultivace buněk

### 5.4.1 Buněčná linie HeLa

Pro veškeré experimenty byly použity buňky HeLa. Jedná se o nádorovou buněčnou linii, která vznikla odebráním cervikálních buněk onkologické pacientky Henrietty Lacks v roce 1951. Díky svým výjimečným vlastnostem se HeLa buňky staly důležitou součástí nejen na poli výzkumu nádorových onemocnění (Lucey *et al.* 2009, Masters 2002).

### 5.4.2 Kultivační médium

Pro zajištění vhodných podmínek je nutné použití média se správným obsahem požadovaných látek. Ke kultivaci HeLa buněk a všechny experimenty s nimi bylo použito DMEM medium (500 ml) obohacené o 50 ml FBS, 5 ml HEPES pufru, 5 ml roztoku antibiotik a 10 ml ultraglutaminu I. Celá příprava

kultivačního média vždy probíhá za striktně sterilních podmínek v laminárním boxu.

### 5.4.3 Pasážování

Médium se uchovává v chladničce, PBS při laboratorní teplotě a trypsin v mrazáku. Před každou prací s nimi se proto nechávají dostatečně dlouhou dobu nahřát ve vodní lázni temperované na 37 °C.

Po době dostatečně dlouhé na to, aby buňky v souvislé vrstvě pokryly dno kultivační lahve, je vždy nutné je zpasážovat. Zpravidla se jedná o 3 až 4 dny, po kterých buňky téměř zaplní dno kultivační lahve (z 80-90 %). Principem pasážování jako takového je přenesení části buněk ze staré kultury (kultivační lahve) do nové, ve které je čerstvé médium a dostatek prostoru pro další buněčné dělení a růst. Proces pasážování je důležitý především kvůli udržení životaschopnosti buněk a zajištění stejných podmínek pro buňky při *in vitro* experimentech. Nezbytností je pak dodržení přísně sterilních podmínek, práce v laminárním boxu a zabránění kontaminace jednotlivých reagentů i buněk samotných.

Před pasážováním jako takovým je potřeba dát do vodní lázně temperované na 37 °C nahřát lahev s připraveným médiem, lahev s PBS a zkumavku s roztokem trypsinu. Zároveň je nutná kontrola samotné buněčné kultury a zda v ní není přítomná kontaminace, což se před každým pasážováním provádí mikroskopicky.

Dalším krokem je odebrání starého média z kultivační lahve (v našem případě lahev o ploše 75 cm<sup>2</sup>) s buňkami. Následně je její dno dvakrát opatrně opláchnuto 5 ml PBS. Poté se Pasteurovou pipetou do lahve přidá 1 ml roztoku trypsinu a zavřená lahev se umístí na maximálně 5 minut do buněčného inkubátoru (37 °C), díky čemuž dojde k oddělení buněk ode dna lahve.

Po uplynutí několika minut se pod mikroskopem zkontroluje oddělení buněk ode dna kultivační lahve – jsou pozorovatelné pohybující se shluky buněk. Do lahve se následně přidá 9 ml kultivačního média, což inaktivuje přítomný trypsin tak, aby nedošlo k poškození buněk. Buněčné shluky jsou následně resuspendovány opakovaným (10×) nasátím suspenze pipetou a jejím rychlým vypuštěním proti dnu kultivační lahve, čímž se dosáhne vzniku homogenní buněčné suspenze. Část

z ní se poté pipetou odebere a přeneso do nové lahve s 15 ml čerstvého média. Množství suspenze, které je přeneseno, závisí na stavu buněk zjištěném na začátku pasážování mikroskopicky a dle růstu v předchozích pasážích. Zbytek buněk ve staré kultivační lahvi se používá pro experimenty (počítání buněk, nasazení mikrotitrační destičky). Suspenze se v nové lahvi promíchá s médiem opětovným nasátím a vypuštěním, lahev se uzavře a přeneso se do buněčného inkubátoru. Zde se pak buňky za standardních podmínek kultivují až do další pasáže.

## **5.5 Počítání buněk**

Pro zjištění životaschopnosti buněk se provádí jejich počítání v Bürkerově komůrce. Jde o nezbytný krok pro nasazení správné koncentrace buněk např. na mikrotitrační destičky na další experimenty. K počítání se buňky smísí s roztokem trypanové modři v poměru 1:1. Díky aktivnímu transportu tohoto barviva ven z živých buněk zůstávají obarvené pouze mrtvé buňky, které takového transportu nejsou schopné. V Bürkerově komůrce jsou tedy živé a mrtvé buňky dobře odlišitelné.

Do zkumavky se nejprve napipetuje 100  $\mu$ l roztoku 0,4% trypanové modři, ke které se přidá stejné množství dobře resuspendované buněčné suspenze. Celý obsah zkumavky je následně důkladně promíchán. Pipetou se z něj poté po krátké inkubaci přeneso na každou půlku Bürkerovy komůrky 10  $\mu$ l. Na závěr se vzorek mikroskopicky zhodnotí a počet živých buněk se uvádí jako počet buněk v 1 ml suspenze.

## **5.6 Stanovení fototoxicity**

### **5.6.1 Nasazení buněk na destičky**

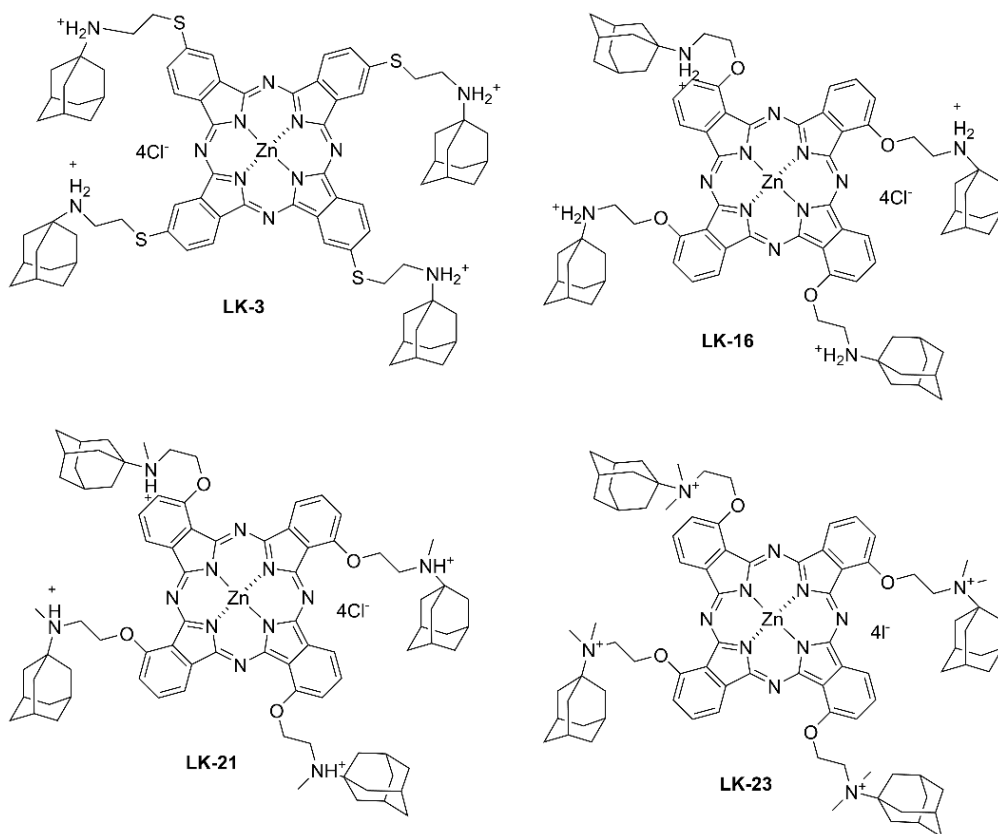
Nasazení buněk do mikrotitrační destičky probíhá opět za sterilních podmínek v laminárním boxu.

Nejprve se výsledek z předchozího kroku (počet živých buněk v 1 ml) použije pro výpočet poměru buněčné suspenze a kultivačního média tak, aby bylo zajištěno

konstantní množství buněk na destičkách, a zároveň tedy i konstantní podmínky a reprodukovatelnost následujících experimentů. Ve sterilní plastové vaničce se dobře smíchá dané množství kultivačního média a buněčné suspenze. Vzniklá naředěná buněčná suspenze se pomocí elektronické automatické multikanálové pipety přenesla do 96-jamkové mikrotitrační destičky v objemu 100  $\mu$ l na jamku. Výsledné množství HeLa buněk v jedné jamce činí 7 500 buněk. Takto připravená destička se nechá 24 hodin inkubovat v laboratorním buněčném inkubátoru za standardních podmínek (37  $^{\circ}$ C, 5 % CO<sub>2</sub> a konstantní vysoká humidita).

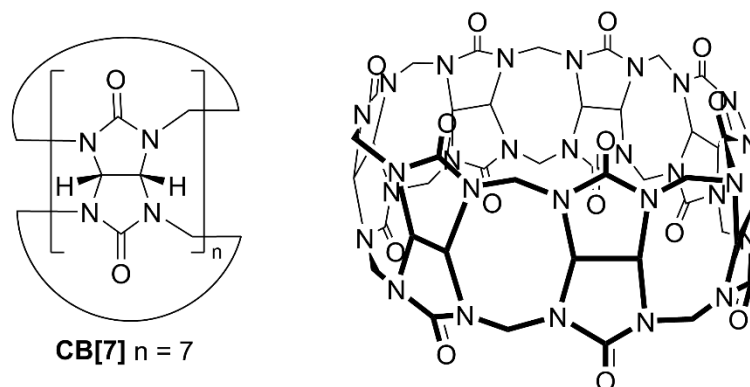
### 5.6.2 Použité fotosenzitizéry

Strukturní základ zkoumaných PS tvoří ftalocyaniny s centrálním atomem zinku. Substituovány jsou skupinami na bázi 1-aminoadamantylu. Spojovací můstky se mezi jednotlivými deriváty liší stupněm alkylation aminoskupiny. U látky LK3 se periferní substituenty na bázi adamantylu váží přes atom síry, u ostatních PS přes kyslík.



Obr. 10 Struktura užitých Pc

Supramolekulární komplex s těmito Pc byl vytvořen pomocí CB[7] – navenek hydrofilním molekulám s elektronegativními karbonyly a hydrofobní dutinou, která k adamantylovým skupinám vykazuje silnou afinitu.



Obr. 11 Struktura CB[7]

### 5.6.3 Přidání fotosenzitizérů na destičku

Po jednodenní inkubaci je nejprve potřeba vyměnit pomocí automatické multikanálové pipety v celé destičce kultivační médium v jamkách, které obsahují kontrolní buňky (neovlivněné kontroly a pozitivní kontroly, ke kterým bude následně přidána letální dávka peroxidu vodíku). Ke zbylým buňkám na destičce jsou přidány fotosenzitizéry v požadovaných koncentracích, které se předem připraví naředěním zásobních roztoků za použití média ve sterilních zkumavkách. Před přidáním studované látky se z dané jamky odsaje 100  $\mu$ l média. Následně se stejné množství připraveného pracovního roztoku PS přidá. Jamky pro experimenty jsou vybírány uprostřed destičky. Poslední sloupec jamek je pak využit jako pozitivní kontrola – k buňkám zde se přidává letální dávka  $H_2O_2$ . Následně se řádně označená destička inkubuje 12/24 hodin za standardních podmínek v buněčném inkubátoru.

Veškerá práce s fotosenzitivními látkami probíhá bez přístupu přímého světla v co největším šeru, aby nedošlo k jejich předčasné fotoaktivaci.

### 5.6.4 Ozařování

Po inkubaci se celá destička opláchne za sterilních podmínek a k buňkám je přidáno čisté kultivační médium (100  $\mu$ l na jamku). Výměna media probíhá těsně před tím, než je destička přemístěna pod xenonovou lampu (výkon nastaven

na 400 W;  $\lambda > 570$  nm; 12,4 mW/cm<sup>2</sup>), pod kterou je ozařována po dobu 15 minut (11,2 J/cm<sup>2</sup>). Poté se destička vrací do inkubátoru na dalších 24 hodin.

## 5.7 Test vychytávání neutrální červeně a zpracování výsledků

Metoda zjišťování životaschopnosti buněk s pomocí neutrální červeně (NR) patří mezi jednu z nejvyužívanějších. Na rozdíl od většiny předchozích kroků probíhá v nesterilním laboratorním prostředí.

Před přidáním roztoku NR je potřebné provést oplach buněk čerstvým médiem, a to dle potřeby až třikrát. Takováto výměna media je (podobně jako výměna před ozařováním) důležitá především kvůli odstranění případných zbytků PS v mediu, v tomto případě pro možné falešné zvýšení absorbance při vyhodnocení.

V plastové vaničce je dále smícháno potřebné množství kultivačního média s daným množstvím zásobního roztoku NR, tak aby finální koncentrace v jamce byla 30 µg/ml. Elektronickou multikanálovou automatickou pipetou se poté do každé jamky pipetuje 100 µl připraveného roztoku a takto připravená destička se na 2 hodiny přemísťuje do buněčného inkubátoru.

Po uplynutí inkubační doby se odstraní médium obsahující NR a elektronickou multikanálovou pipetou se do každé jamky přidá 90 µl fixačního roztoku. Za laboratorní teploty se pak buňky nechají 15 minut fixovat. Následně se z destičky fixační roztok odstraní a buňky se dvakrát opláchnou 90 µl PBS. Poté se již přidává lyzační roztok, opět v množství 90 µl na jamku. Destička s tímto roztokem se nechává 30 minut lyzovat při laboratorní teplotě na deskové třepačce.

Po kompletní lýze buněk je každá jamka spektrofotometricky proměřena při vlnové délce 540 nm čtečkou mikrotitračních destiček Tecan Infinite 200 Pro. Po odečtení signálu pozitivních kontrol (buňky usmrcené letální dávkou peroxidu vodíku – pozadí) je životaschopnost buněk uváděna jako procenta neovlivněné kontroly.



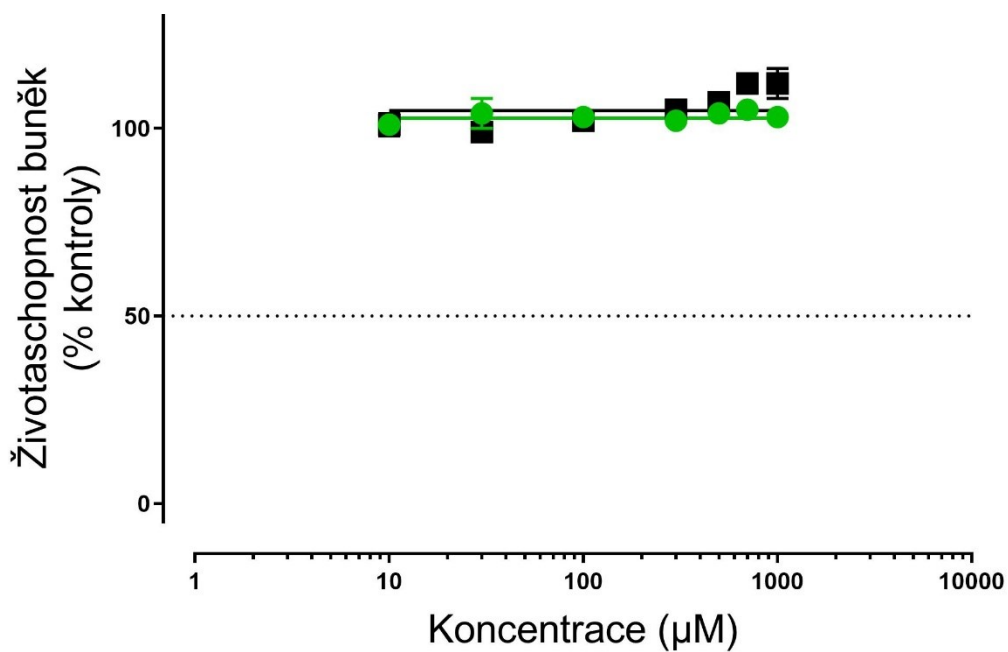
## 5.8 Subcelulární lokalizace

Určení subcelulární lokalizace zkoumaných PS probíhá pomocí fluorescenční mikroskopie. Pro nasazení buněk se používá Petriho miska se skleněným dnem vhodná pro konfokální mikroskopii, do které se buňky přenesou v množství  $1,8 \times 10^4$  buněk/Petriho misku, a pak se 24 hodin inkubují za standardních podmínek v buněčném inkubátoru. Následně je k nim přidán zkoumaný PS v koncentraci  $1 \mu\text{M}$  a inkubace dalších 12 hodin pokračuje. Buňky jsou poté označeny fluorescenčními sondami –  $0,4 \mu\text{M}$  LysoTracker<sup>TM</sup> Blue DND-22 pro značení lyzosomů (obecně kyselých organel),  $0,4 \mu\text{M}$  MitoTracker<sup>TM</sup> Green FM ke značení mitochondrií a  $10 \text{ nM}$  Hoechst 33342 k označení jader. Buňky se dále nechají se sondami 20 min inkubovat, opláchnou se dvakrát PBS a po přidání SFM se pozorují pod fluorescenčním mikroskopem. Ozařovány jsou LED zdrojem nastaveným na 50 % výkonu a zobrazení jednotlivých buněčných částí probíhá pomocí FITC, Cy5 a DAPI filtrů. Fotografie pořízené chlazenou sCMOS kamerou při plném rozlišení se zpracovávají softwarem NIS Elements AR 4.20.01.

## 6 Výsledky

### 6.1 CB[7]

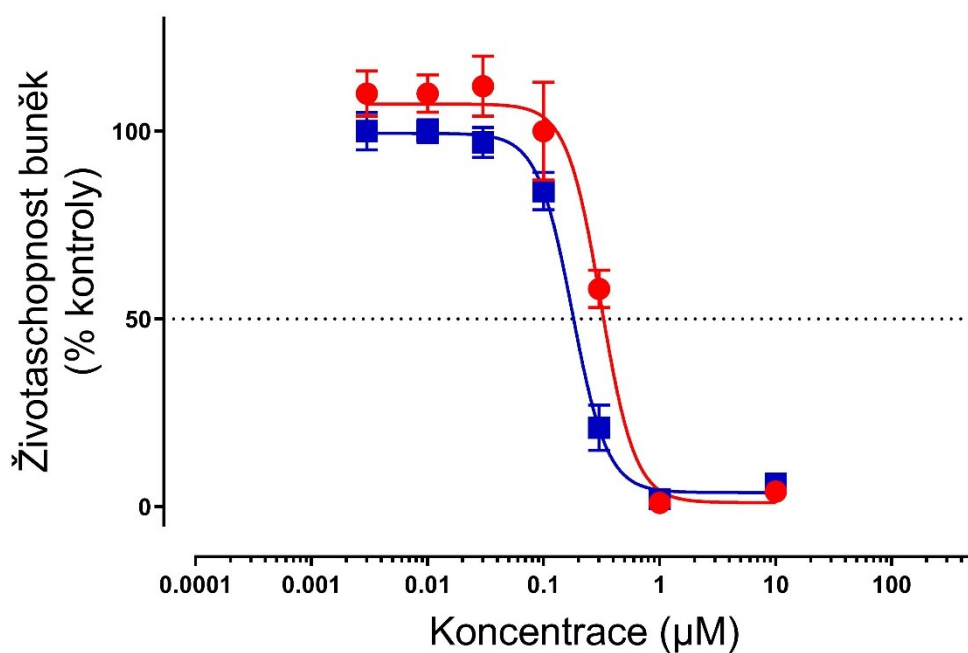
Toxicita CB[7] použitého následně pro tvorbu supramolekulárních komplexů s Pc byla nejprve samostatně zjištěna v rozmezí koncentrací 10 – 1000  $\mu\text{M}$  v a bez přítomnosti aktivačního světla.



Obr. 12 Graf živoschopnosti HeLa buněk v závislosti na koncentraci CB[7], s kterým byly inkubovány. Fototoxicita (zelená) ani toxicita bez ozáření (černá) nebyla u CB[7] v celém použitém koncentračním rozmezí zaznamenána.

## 6.2 LK3

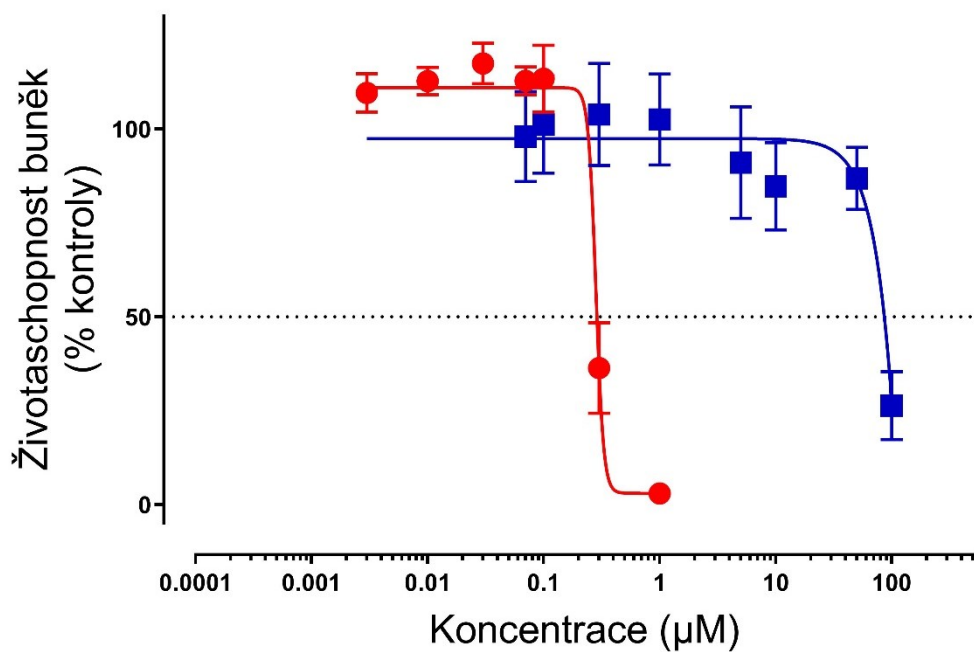
Pro zjištění toxicity látky LK3 po ozáření byly v případě samotného Pc i jeho supramolekulárního komplexu s CB[7] použity stejné koncentrace v rozmezí 0,003 – 10  $\mu\text{M}$ . Ze získaných hodnot následně stanovená střední efektivní koncentrace ( $\text{EC}_{50}$ ) odpovídá  $0,303 \pm 0,011 \mu\text{M}$  pro samotnou LK3 a  $0,176 \pm 0,012 \mu\text{M}$  pro kombinaci LK3 a CB[7].



Obr. 13 Graf znázorňující životoschopnost HeLa buněk v závislosti na vzrůstající koncentraci látky LK3 (červená) a LK3+CB[7] (modrá)

### 6.3 LK16

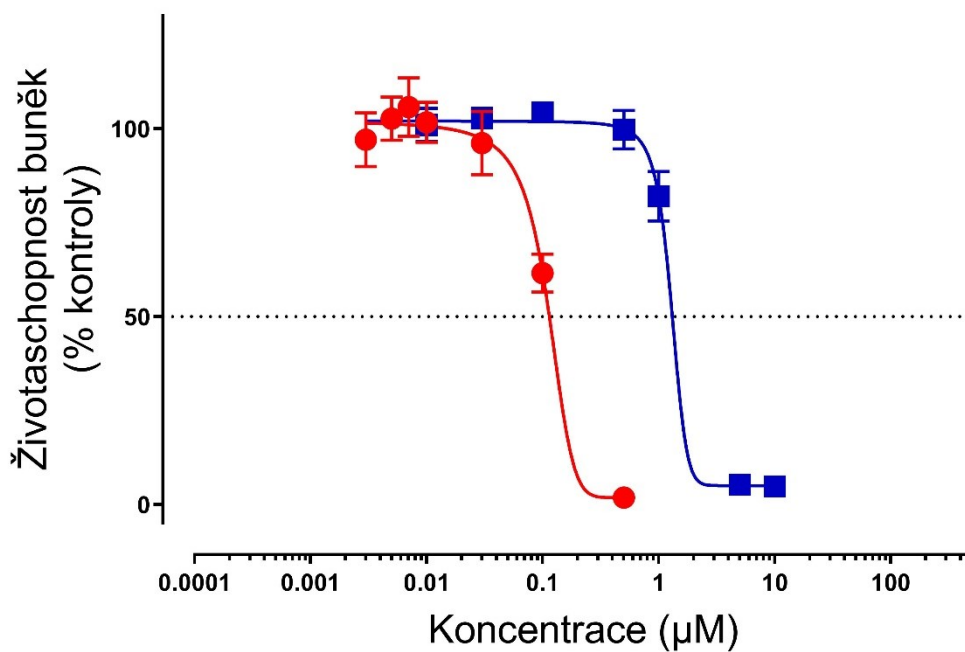
Totoxicita látky LK16 po ozáření byla zkoumaná ve dvou koncentračních rozmezích – samotná LK16 mezi 0,003 a 1  $\mu\text{M}$ , supramolekulární interakce mezi LK16 a CB[7] v rozmezí 0,07 a 100  $\mu\text{M}$ . Hodnota výsledné  $\text{EC}_{50}$  u LK16 vyšla  $0,268 \pm 0,021 \mu\text{M}$  a v případě LK16+CB[7] na  $52,15 \pm 25,12 \mu\text{M}$ .



Obr. 14 Graf závislosti životaschopnosti HeLa buněk na koncentracích látky LK16 (červená) a LK16+CB[7] (modrá)

## 6.4 LK21

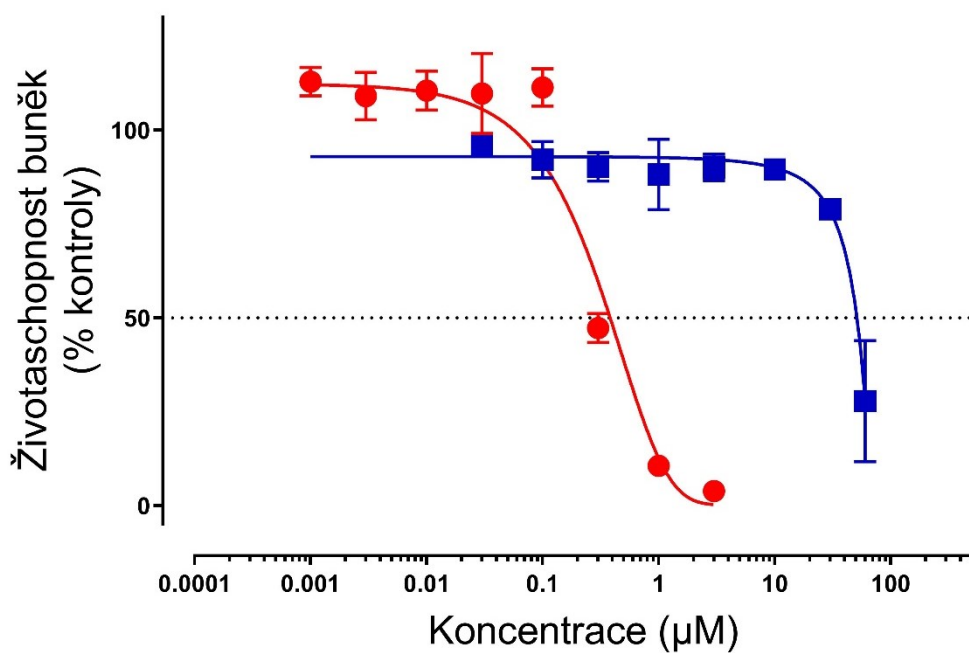
Stanovení totoxicity látky LK21 po ozáření proběhlo v koncentračním rozmezí 0,003 – 0,5  $\mu\text{M}$  (pro samotnou LK21) a 0,1 – 50  $\mu\text{M}$  (pro LK21+CB[7]). Ze získaných hodnot stanovená  $\text{EC}_{50}$  vyšla pro LK21  $0,124 \pm 0,029 \mu\text{M}$ , pro LK21+CB[7]  $1,52 \pm 0,42 \mu\text{M}$ .



Obr. 15 Graf závislosti životaschopnosti HeLa buněk na koncentracích látky LK21 (červená) a LK21+CB[7] (modrá)

## 6.5 LK23

Cytotoxicita samotné látky LK23 po ozáření byla zjišťována v rozmezí koncentrací 0,001 – 3  $\mu\text{M}$ , cytotoxicita supramolekulární interakce LK23 s CB[7] po ozáření v rozmezí 0,3 – 60  $\mu\text{M}$ . Jejich  $\text{EC}_{50}$  byly stanoveny na  $0,288 \pm 0,010 \text{ uM}$  pro LK23 a  $48,90 \pm 1,81 \text{ }\mu\text{M}$  pro LK23+CB[7].



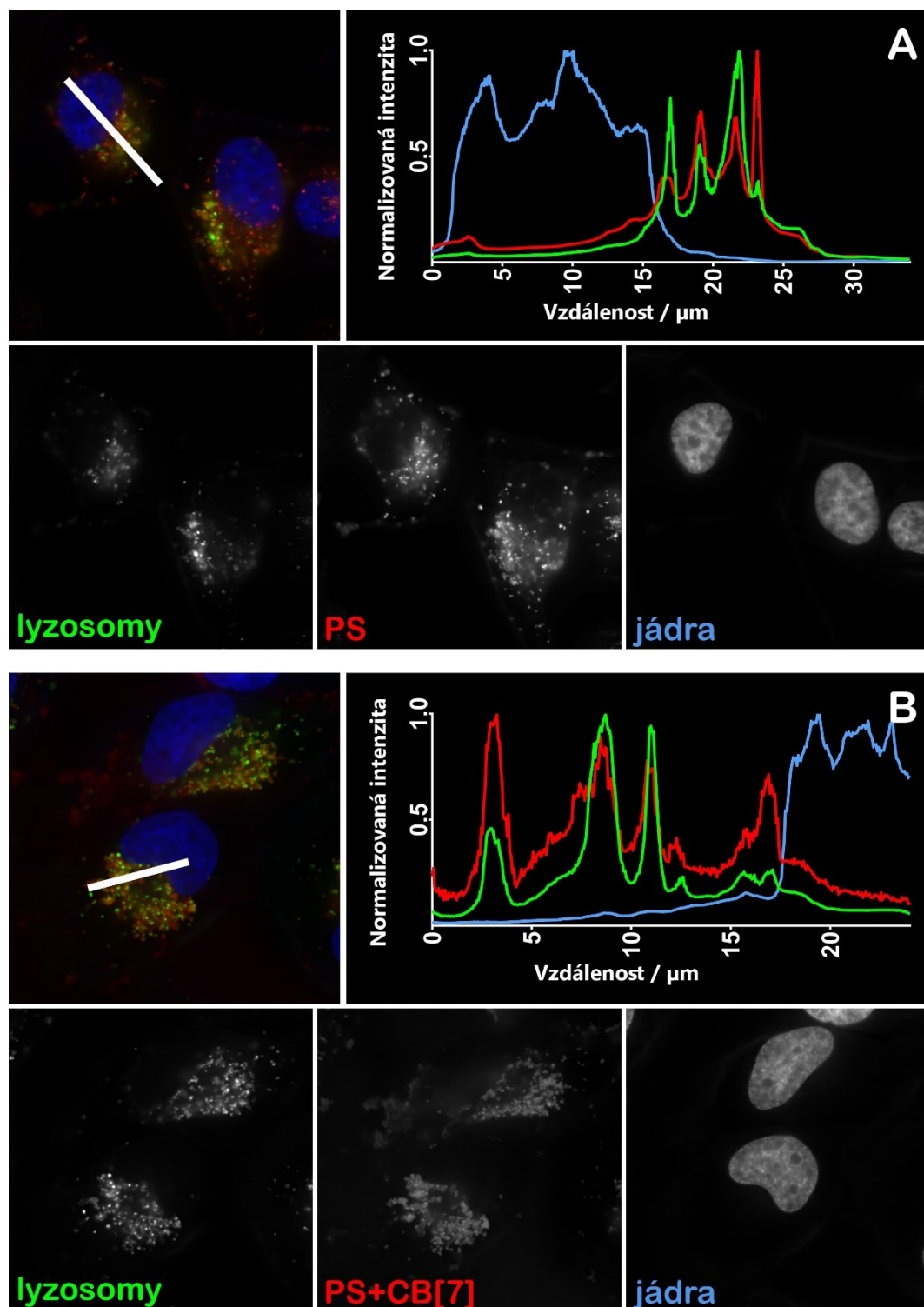
Obr. 16 Graf životaschopnosti HeLa buněk v závislosti na užití koncentraci LK23 (červená) a LK23+CB[7] (modrá)

## 6.6 Subcelulární lokalizace

Fluorescenčními sondami značené HeLa buňky byly dokumentovány za použití filtrů (DAPI, FITC, Cy5). Fotografie vlevo nahoře vedle grafů intenzity fluorescence (v Obr. 17 – Obr. 22) jsou překryté fluorescenční kanály – viditelné je zde jádro (modrá), lyzosomy (zelená) a umístění použitého PS (červená). Fotografie v řadě pod ním jsou pořízeny s použitím filtrů a představují jejich zobrazení jednotlivě: lyzosomy (vlevo dole) za použití filtru FITC, vlastní fluorescence PS (dole uprostřed) pozorována filtrem Cy5 a jádra (vpravo dole) pod filtrem DAPI.

Z fotografií je patrné, že všechny zkoumané látky se nacházejí v lyzosomech, jejichž signály se kryjí se signály PS. Látky LK16 a LK21 se navíc lokalizovaly i v mitochondriích (Obr. 20 a Obr. 22).

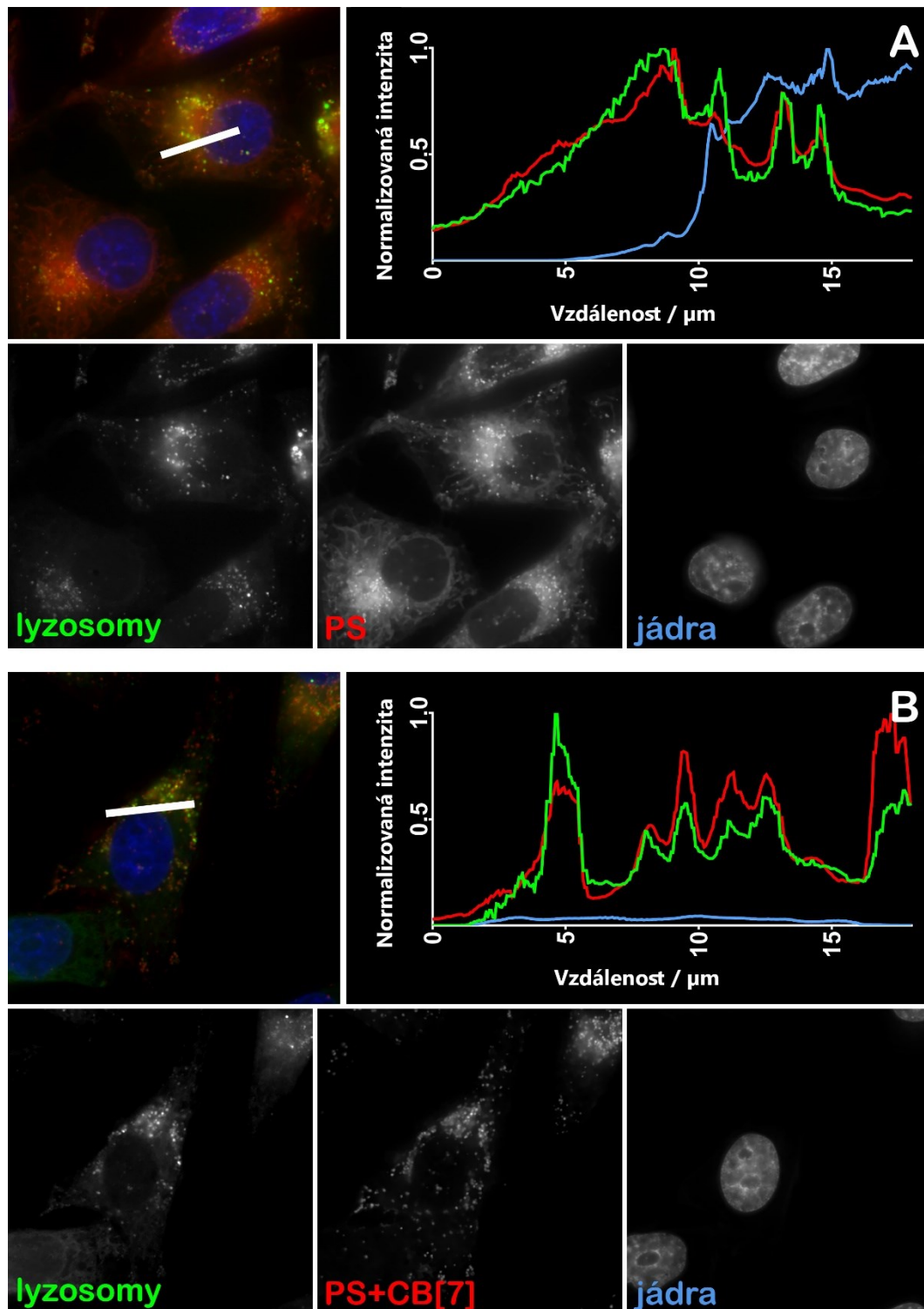
### 6.6.1 LK3



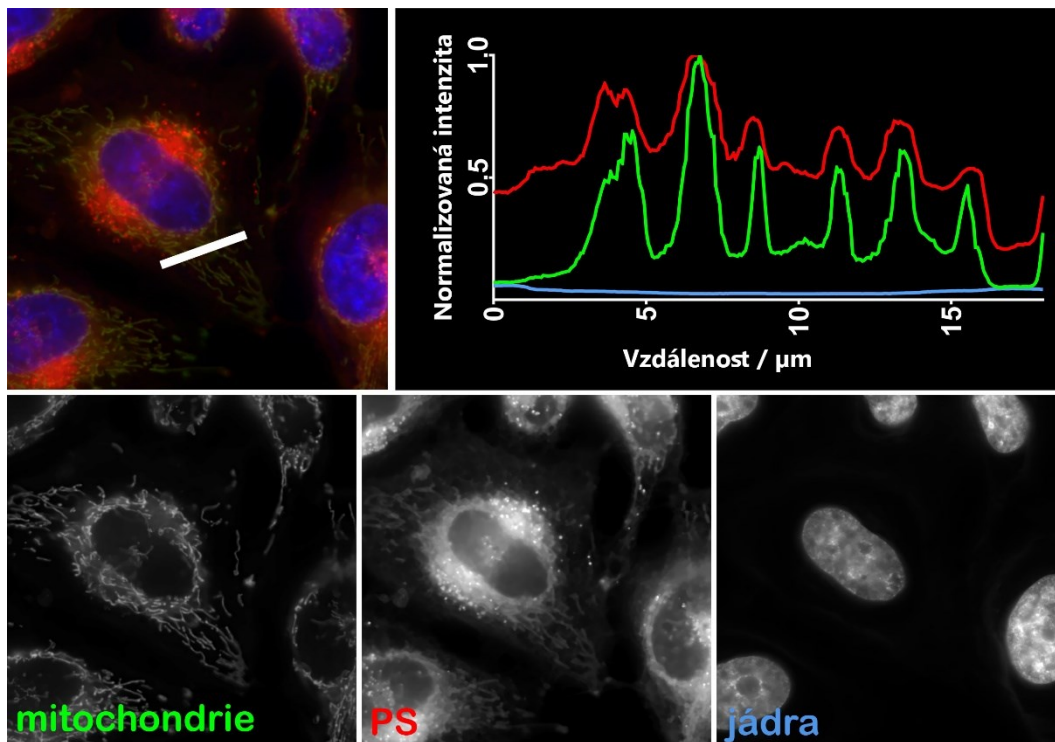
Obr. 17 Zobrazení subcelulární lokalizace LK3 (A) a LK3+CB[7] (B) pomocí fluorescenční mikroskopie



## 6.6.2 LK16

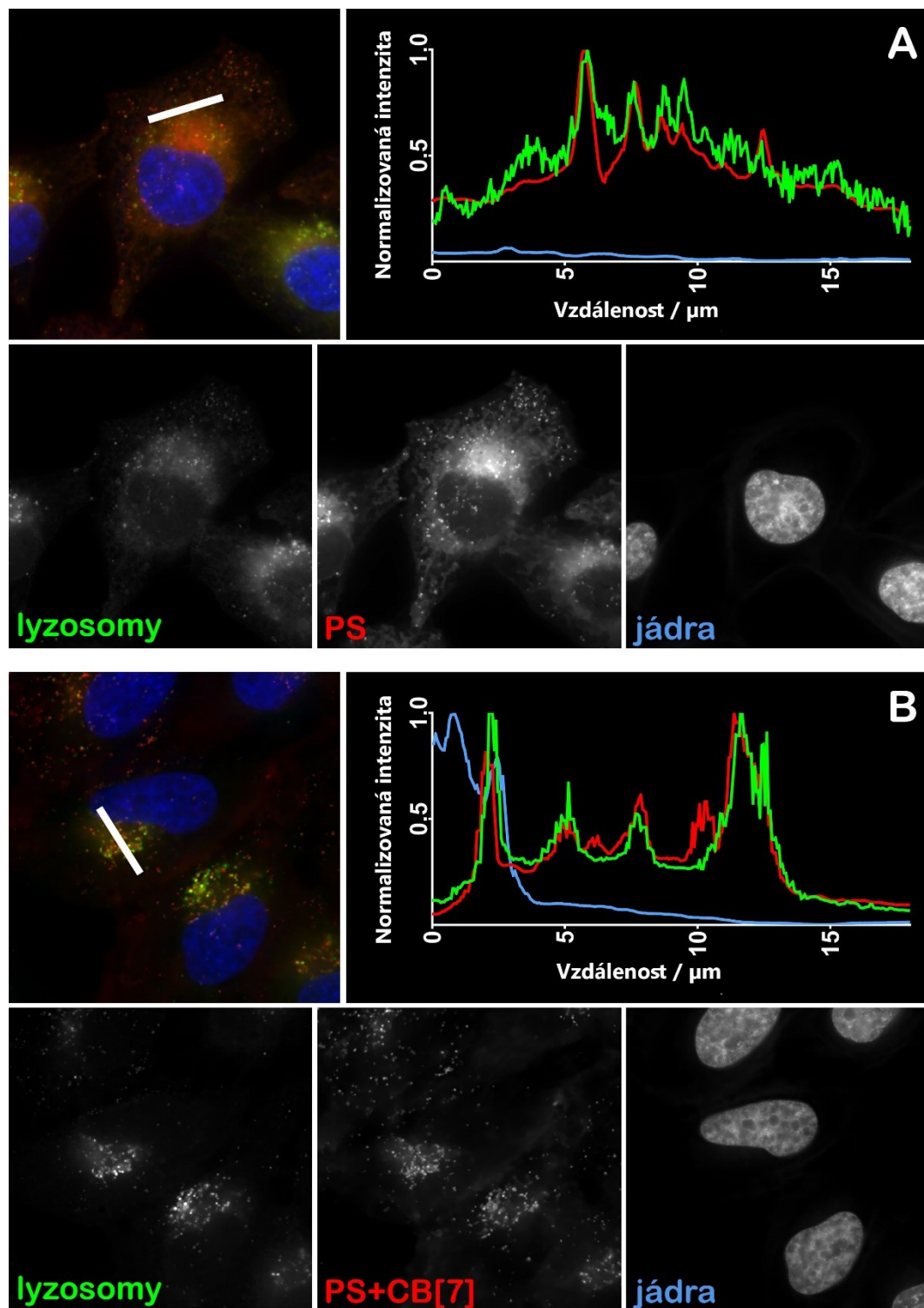


*Obr. 18 Subcelulární lokalizace LK16 (A) a LK16+CB[7] (B) pomocí fluorescenční mikroskopie*

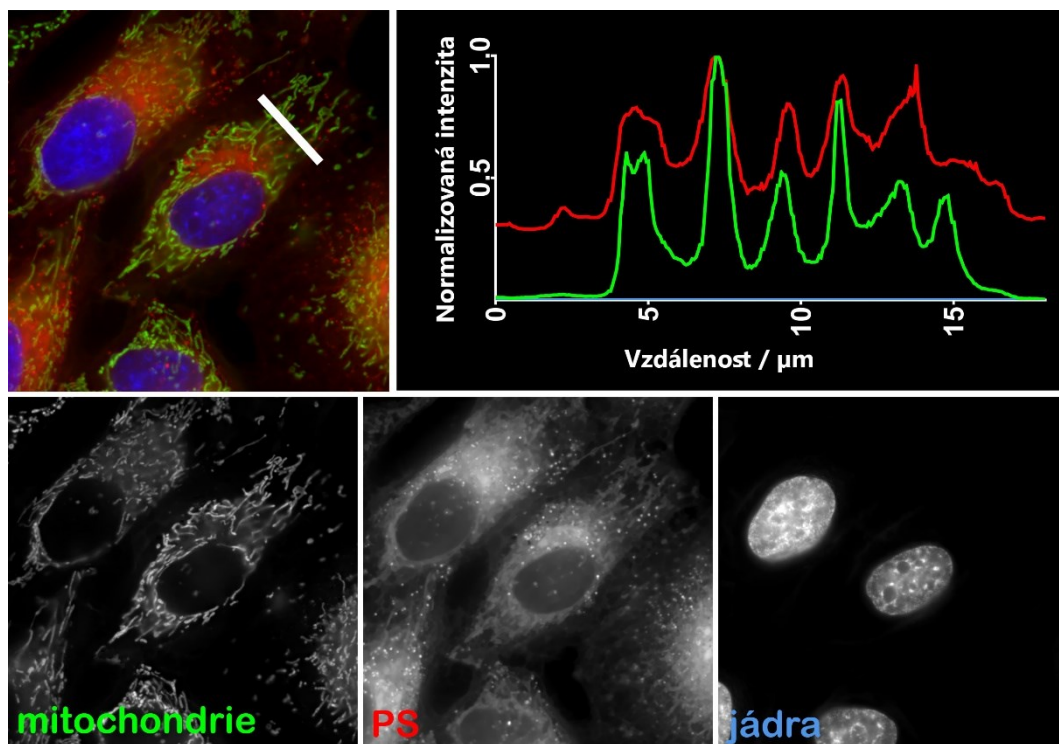


*Obr. 19 Zobrazení subcelulární lokalizace LK16 v mitochondriích pomocí fluorescenční mikroskopie*

### 6.6.3 LK21

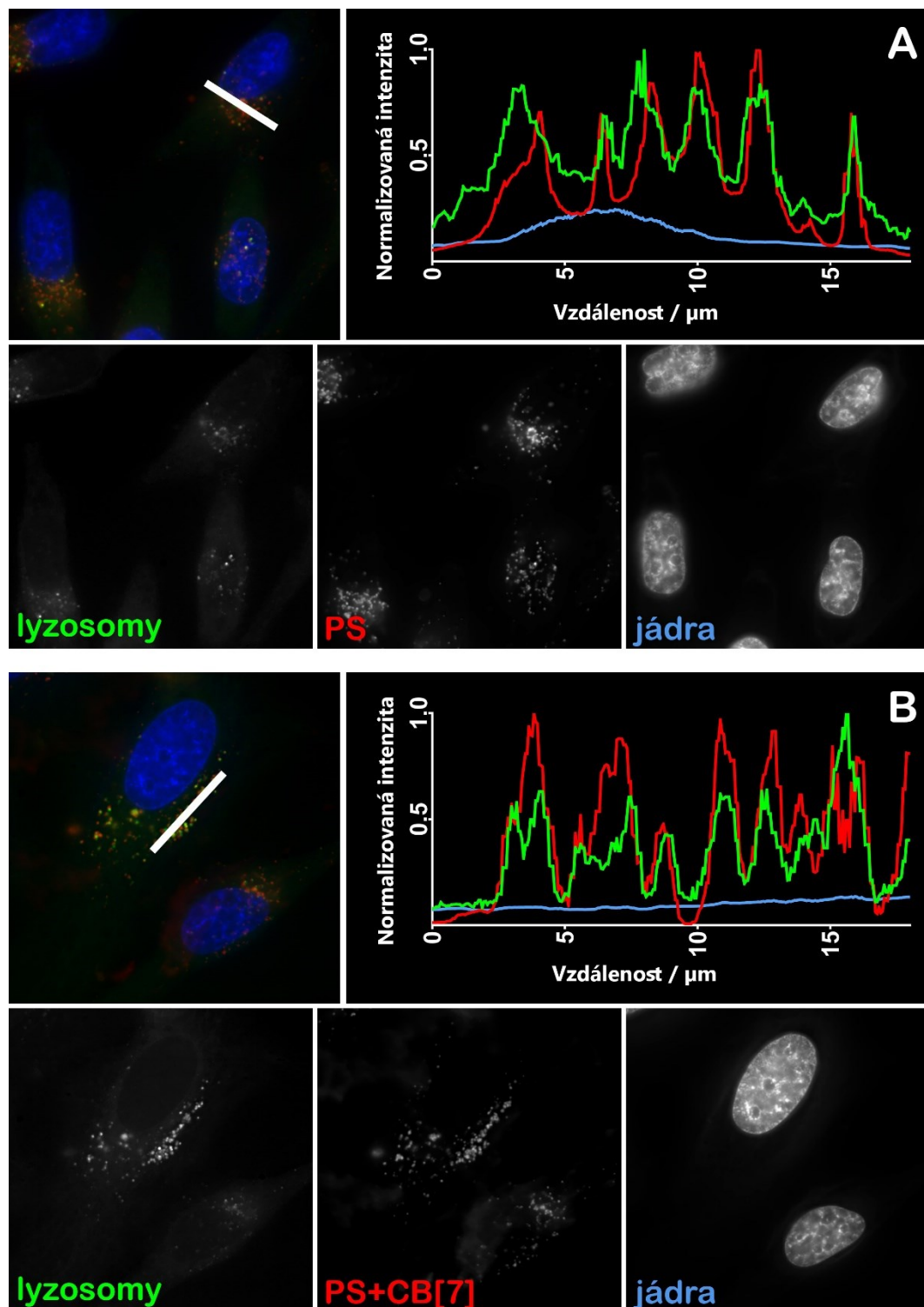


Obr. 20 Subcelulární lokalizace LK21 (A) a LK+CB[7] (B) pomocí fluorescenční mikroskopie



*Obr. 21 Zobrazení subcelulární lokalizace LK21 v mitochondriích pomocí fluorescenční mikroskopie*

#### 6.6.4 LK23



Obr. 22 Subcelulární lokalizace LK23 (A) a LK23+CB[7] (B) pomocí fluorescenční mikroskopie

## 7 Diskuse

Vzhledem k závažnosti onkologických onemocnění a stálému nedostatku efektivních, a především dostupných metod léčby je výzkum v této oblasti jedním z těch nejrozsáhlejších. PDT bezesporu patří mezi slibné a v některých odvětví již rozšířené možnosti terapie a ačkoli její koncept byl objeven již před více než sto lety, obzvláště v posledních desetiletích prošla velkým vývojem. Pro svou vysokou selektivitu, minimální invazivnost a ve výsledku i jednoduchost má potenciál zařadit se mezi běžné nádorové terapie. Jednou z překážek, které tomuto stojí v cestě, je nedostatek vhodných PS s vlastnostmi, které by takové širší využití umožnily (Brown *et al.* 2004).

Pc jsou významnou skupinou PS druhé generace. Oproti předchozím PS vykazují vyšší stabilitu, maximálně absorbují záření ve fototerapeutickém okně ( $\lambda = 600\text{-}800\text{ nm}$ ) a mají velmi vysokou schopnost produkce  $^1\text{O}_2$ . Vhodnou úpravou v jejich struktuře lze navíc jejich vlastnosti dále zlepšovat – např. zinečnaté ftalocyaniny (ale i jiné Pc s centrálním atomem diamagnetického kovu) zůstávají delší dobu v  $^3\text{PS}^*$ , a jsou tak schopné vyšší produkce ROS. Nevýhodou však zůstává slabší selektivita k nádorové tkáni, a především nízká rozpustnost a náchylnost k agregaci. Jedním z možných řešení, kterým lze těmto negativům předejít, je jejich spojení s látkami (nosiči), jež tomu zabrání. Kromě liposomů, polymerních micel apod. se do popředí dostávají také komplexy na bázi supramolekulárních interakcí (Lamch *et al.* 2016).

CB[n] představují poměrně mladou skupinu látek s širokým spektrem aplikací. Díky svým unikátním vlastnostem nachází využití v supramolekulární chemii jako hostitelské molekuly mnoha látek – léčiv, sacharidů, peptidů, proteinů apod., kterým supramolekulární interakce zajišťuje např. zlepšení vlastností, schopnost aktivace, degradace a katalýzy či cílenou distribuci do místa určení v organismu. CB[n] mezi ostatními makrocycly užívanými k podobným účelům vynikají obzvláště nízkou toxicitou (v koncentračním rozmezí užitém v této práci na buňkách HeLa nebyla vůbec zaznamenána) a silnou vazebnou schopností. Velmi stabilní komplexy tvoří mj. i s adamantany (Cheng *et al.* 2019, Assaf *et al.* 2015, Girek *et al.* 2014).

Látky zkoumané v této práci jsou tvořeny ftalocyaninovým jádrem s koordinačně vázaným centrálním atomem zinku substituovaným periferně čtyřmi skupinami na bázi právě 1-aminoadamantylu, ke kterým mají CB[n] silnou afinitu. Všechny tyto PS byly syntetizovány vědeckou skupinou prof. PharmDr. Petra Zimčíka, Ph.D na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Vlastnosti mezi jednotlivými CB[n] homology se poměrně výrazně liší. Použitý CB[7], v našem případě syntetizovaný vědeckou skupinou prof. Ing. Vladimíra Šindeláře, Ph.D. na Ústavu chemie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně, patří v současné době k těm nejvyhledávanějším, a to především pro svou dobrou rozpustnost ve vodném prostředí, vhodnou velikost hydrofobní dutiny a výraznou afinitu k žádaným látkám (Koc *et Tuncel* 2017, Assaf *et Nau* 2015). Díky všem těmto vlastnostem tvoří s námi použitými Pc stabilní supramolekulární komplexy v poměru 4:1 vhodné pro využití v PDT.

Studované látky se kromě stupně alkylace aminoskupiny ve spojovacím můstku substituentu na bázi adamantylu liší i atomem, přes který se tento substituent ke ftalocyaninovému jádru váže. U LK16, LK21 a LK23 se jedná o kyslík, u LK3 o síru. Kvalitativní odlišnost tohoto atomu může nezanedbatelně ovlivňovat absorpci záření, a tedy i výslednou efektivitu PDT (Kociscakova *et al.* 2023).

Důležitou roli v typu buněčného poškození a celkové účinnosti hraje (především vzhledem k velmi krátké životnosti  $^1\text{O}_2$  a ROS) také subcelulární lokalizace PS, která byla u zkoumaných látek zjišťována pomocí fluorescenční mikroskopie. Obecně se dá říci, že hydrofobní PS s méně zápornými náboji snadněji difundují skrz cytoplazmatickou membránu, méně hydrofobní s větším záporným nábojem jsou nádorovými buňkami přijímány častěji endocytózou. Subcelulární lokalizace PS je jedním z faktorů, které významně ovlivňují typ následné buněčné smrti – umístění v lysosomech a mitochondriích, které vykazují PS užitá v této práci, přispívá obzvláště k apoptóze (Abrahamse *et Hamblin* 2016, Castano *et al.* 2005, Wood *et al.* 1997).

Fotodynamická aktivita testovaných látek byla zkoumána na lidské cervikální nádorové buněčné línii HeLa kultivované za standardních podmínek.

Nejlepších výsledků pro použití v PDT zde dosáhla látka LK16, jejíž  $EC_{50}$  odpovídá  $0,124 \pm 0,029 \mu\text{M}$ . Mírně překvapivě nebylo prokázáno zlepšení efektivity PDT pomocí supramolekulární interakce s CB7, a to i přesto, že skrze ni byla zajištěna lepší rozpustnost a plně monomerní stav PS ve vodném prostředí. Lepšího výsledku oproti samotnému Pc bylo dosaženo pouze u testované LK3+CB7, jejíž  $EC_{50}$  ( $0,176 \pm 0,012 \mu\text{M}$ ) je nižší než  $EC_{50}$  samotné LK3 ( $0,303 \pm 0,011 \mu\text{M}$ ).

Supramolekulární interakce jakožto prostředky k vytvoření *in vitro* i *in vivo* ideálního PS jsou již nějakou dobu předmětem výzkumu. Jedna z prvních prací zabývajících se tímto tématem byla publikována v roce 2008, kdy se Mohantymu *et al.* podařilo nekovalentními vazbami spojit substituovaný porfyrin s CB[7] v poměru 1:4. V jiných studiích s některými fotosenzitivními barvivy (např. methylenovou modří) a CB[7] ve stechiometrickém poměru 1:1 bylo prokázáno zvýšení životnosti  $^3\text{PS}^*$ . Liu *et al.* podobným způsobem syntetizovali supramolekulu tvořenou substituovaným porfyrinem a CB[8], čímž bylo úspěšně zamezeno agregaci porfyrinu. Navíc se tím zlepšila efektivita PDT díky vyšší produkci  $^1\text{O}_2$ , která zde byla zaznamenána. V roce 2016 byla u dalšího supramolekulárního PS (dvě molekuly toluidinová modří konjugované s biotinem uvnitř CB[8]) popsána schopnost zapnutí/vypnutí aktivity stejně jako zvýšení stability látky díky jejímu uzavření v hydrofobní dutině kukurbiturilu (Yang *et al.* 2020, Robinson-Duggon *et al.* 2018, Liu *et al.* 2014, Mohanty *et al.* 2008).



## 8 Závěry

- Po zjištění cytotoxicity samotného CB[7] (u něho nebyla po ozáření zaznamenána žádná toxicita až do 1 mM koncentrace) byla na buněčné linii HeLa dále testována cytotoxicita jednotlivých zinečnatých ftalocyaninů a jejich supramolekulárních komplexů s CB[7] o různých koncentracích. Ze získaných výsledků se pro každou z použitých látek stanovila  $EC_{50}$ .
- Pomocí fluorescenčních sond byla mikroskopicky zjištěna subcelulární lokalizace daných PS, a to především v lysosomech a v případě látek LK 16 a LK21 (pouze bez přítomnosti CB[7]) také v mitochondriích.
- LK3+CB[7] se ze zkoumaných supramolekulárních látek ukázala být nejefektivnější s  $EC_{50} = 0,176 \pm 0,012 \mu\text{M}$ . Kromě této látky však supramolekulární interakce u všech ostatních vedla k nižší fotodynamické aktivitě, a to navzdory zlepšení fyzikálních vlastností a zachování plně monomerního stavu ve vodném prostředí. Pro PDT nejlepších výsledků ze všech testovaných látek dosáhla samotná LK21 s  $EC_{50} = 0,124 \pm 0,029 \mu\text{M}$ .

## 9 Seznam zkratek

ALA	$\delta$ -aminolevulová kyselina
BCC	bazocelulární karcinom (bazaliom)
CB[n]	kukurbit[n]uril
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
EC <sub>50</sub>	střední efektivní koncentrace
ER	endoplasmatické retikulum
EtOH	ethanol
FBS	fetální bovinní sérum
HDL	<i>high-density lipoproteins</i>
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina
HP	hematoporfyrin
HO·	hydroxylový radikál
HpD	hematoporfyrinový derivát
IR	infračervené záření
LDL	<i>low-density lipoproteins</i>
MAL	methylester kyseliny 5-aminolevulinové
MT	mikrotubuly
NR	neutrální červeň
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	singletový kyslík
<sup>3</sup> O <sub>2</sub>	molekulární kyslík
·O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	superoxidový radikál
PBS	fosfátem pufovaný solný roztok
PDR	fotodynamická reakce

PDT	fotodynamická terapie
PENSTREP	penicilin/streptomycin
Pc	ftalocyaniny
PS	fotosenzitizér
$^1\text{PS}^*$	excitovaný fotosenzitizér v singletovém stavu
$^3\text{PS}^*$	excitovaný fotosenzitizér v tripletovém stavu
ROS	reaktivní formy kyslíku
SFM	bezserové kultivační médium
SCC	dlaždicobuněčný karcinom (spinaliom)
UV	ultrafialové záření

## 10 Literatura

Abrahamse, H., Hamblin, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochemical Journal* [online], 2016, 473(4), 347–364. ISSN 1470-8728. <https://doi.org/10.1042/BJ20150942>.

Ackroyd, R., Kelty, C., Brown, N. and Reed, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology* [online], 2001, 74(5), 656-669. ISSN 1751-1097. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2001\)0740656THOPAP2.0.CO2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2001)0740656THOPAP2.0.CO2).

Assaf, K. I., Nau, W. M. Cucurbiturils: from synthesis to high-affinity binding and catalysis. *Chemical Society Reviews* [online], 2015, 44(2), 394–418. ISSN 1460-4744. <https://doi.org/10.1039/C4CS00273C>.

Bolfarini, G. C., Siqueira-Moura, M. P., Demets, G. J. F., Tedesco, A. C. Preparation, characterization, and in vitro phototoxic effect of zinc phthalocyanine cucurbit[7]uril complex encapsulated into liposomes. *Dyes and Pigments* [online], 2014, 100, 162–167. ISSN 1873-3743. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2013.08.018>.

Brown, S. B., Brown, E. A., Walker, I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *The Lancet Oncology* [online], 2004, 5(8), 497–508. ISSN 1474-5488. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(04\)01529-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(04)01529-3).

Castano, A. P., Demidova, T. N., & Hamblin, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* [online], 2004, 1(4), 279–293. ISSN 1572-1000. [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00007-4](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00007-4).

Correia J. H, Rodrigues J. A, Pimenta S., Dong T., Yang Z. Photodynamic therapy review: principles, photosensitizers, applications, and future directions. *Pharmaceutics* [online], 2021, 13(9), 1332. ISSN 1999-4923. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091332>.

Daniell, M. D., Hill, J. S. A history of photodynamic therapy. *ANZ Journal of Surgery* [online], 1991, 61(5), 340–348. ISSN 1445-2197. <https://doi.org/10.1111/j.1445-2197.1991.tb00230.x>.

- Dobson, J., de Queiroz, G. F., Golding, J. P. Photodynamic therapy and diagnosis: principles and comparative aspects. *The Veterinary Journal* [online], 2018, 233, 8–18. ISSN 2589-160X. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.11.012>.
- Garland, M. J., Cassidy, C. M., Woolfson, D., Donnelly, R. F. Designing photosensitizers for photodynamic therapy: strategies, challenges and promising developments. *Future Medicinal Chemistry* [online], 2009, 1(4), 667–691. ISSN 1756-8927. <https://doi.org/10.4155/fmc.09.55>.
- Girek, B., Sliwa, W. Noncovalent assemblies of cationic porphyrins with cage macrocycles. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* [online], 2015, 81, 35–48. ISSN 1573-1111. <https://doi.org/10.1007/s10847-014-0454-y>.
- Hamblin, M. R., St. Denis, T., ed. History and fundamentals of photodynamic therapy. In: Hamblin, M. R., Huang, Y.-Y. *Handbook of photomedicine* [online]. 20130318. CRC Press, 2014, s. 35-42. ISBN 978-1-4398-8470-6.
- Hong, E. J., Choi, D. G., Shim, M. S. Targeted and effective photodynamic therapy for cancer using functionalized nanomaterials. *Acta Pharmaceutica Sinica B* [online], 2016, 6(4), 297–307. ISSN 2211-3843. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.01.007>.
- Chen, L., Bai, H., Xu, J.-F., Wang, S., Zhang, X. Supramolecular porphyrin photosensitizers: controllable disguise and photoinduced activation of antibacterial behavior. *ACS Applied Materials & Interfaces* [online], 2017, 9(16), 13950–13957. ISSN 1944-8252 . <https://doi.org/10.1021/acsami.7b02611>.
- Cheng, H. B., Zhang, Y. M., Liu, Y, Yoon, J. Turn-on supramolecular host-guest nanosystems as theranostics for cancer. *Chem* [online]. 2019, 5(3), 553-574. ISSN 2451-9294 <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2018.12.024>.
- Karges J., Clinical development of metal complexes as photosensitizers for photodynamic therapy of cancer. *Angewandte Chemie International Edition* [online], 2022, 61(5), e202112236. ISSN 0570-0833. <https://doi.org/10.1002/anie.202112236>.

Kashyap A, Ramasamy E, Ramalingam V, Pattabiraman M. Supramolecular control of singlet oxygen generation. *Molecules* [online], 2021, 26(9), 2673. ISSN 1420-3049. <https://doi.org/10.3390/molecules26092673>.

Kessel D. Photodynamic therapy: a brief history. *Journal of Clinical Medicine* [online], 2019, 8(10), 1581. ISSN 2077-0383. <https://doi.org/10.3390/jcm8101581>.

Koc, A., Tuncel, D. Supramolecular assemblies of cucurbiturils with photoactive,  $\pi$ -conjugated chromophores. *Israel Journal of Chemistry* [online], 2017, 58(3-4), 334–342. ISSN 1869-5868. <https://doi.org/10.1002/ijch.201700114>.

Kollar, J., Machacek, M., Halaskova, M., Lenco, J., Kucera, R., Demuth, J., Rohlickova, M., Hasonova, K., Miletin, M., Novakova, V., Zimcik, P. Cationic versus anionic phthalocyanines for photodynamic therapy: what a difference the charge makes. *Journal of Medicinal Chemistry* [online], 2020, 63(14), 7316-7632. ISSN 1520-4804. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00481>.

Konan, Y. N., Gurny, R., Allémann, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [online], 2002, 66(2), 89–106. ISSN 1873-2682. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(01\)00267-6](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(01)00267-6).

Kociscakova, L., Rando, C., Kozlikova, M., Machacek, M., Novakova, V., Sindelar, V., Zimcik, P. Monomerization of phthalocyanines in water via their supramolecular interactions with cucurbiturils. *The Journal of Organic Chemistry* [online], 2023, 88(2), 988-1002. ISSN 1520-6904. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.2c02413>.

Lamch, Ł., Kulbacka, J., Pietkiewicz, J., Rossowska, J., Dubińska-Magiera, M., Choromańska, A., Wilk, K. A. Preparation and characterization of new zinc(II) phthalocyanine — Containing poly(l-lactide)-b-poly(ethylene glycol) copolymer micelles for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [online], 2016 160, 185–197. ISSN 1873-2682. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.04.018>.

Lan, M., Zhao, S., Liu, W., Lee, C.-S., Zhang, W. J., Wang, P. F. Photosensitizers for photodynamic therapy. *Advanced Healthcare Materials* [online], 2019, 8(13), 1900132. ISSN 2192-2659. <https://doi.org/10.1002/adhm.201900132>.

Lee C.N, Hsu R., Chen H., Wong T.W. Daylight photodynamic therapy: an update. *Molecules* [online], 2020, 25(21), 5195. ISSN 1420-3049. <https://doi.org/10.3390/molecules25215195>.

Li, X., Lee, S., & Yoon, J. Supramolecular photosensitizers rejuvenate photodynamic therapy. *Chemical Society reviews* [online], 2018, 47(4), 1174–1188. ISSN 1460-4744. <https://doi.org/10.1039/C7CS00594F>.

Liu, Y., Huang, Z., Liu, K., Kelgtermans, H., Dehaen, W., Wang, Z., Zhang, X. Porphyrin-containing hyperbranched supramolecular polymers: enhancing  $^1\text{O}_2$ -generation efficiency by supramolecular polymerization. *Polymer Chemistry* [online], 2014, 5(1), 53–56. ISSN 1759-9962. <https://doi.org/10.1039/C3PY01036H>.

Lucey, B. P., Nelson-Rees, W. A., Hutchins, G. M. Henrietta Lacks, HeLa cells and cell culture contamination. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* [online], 2009, 133(9), 1463-1467. ISSN 0003-9985. <https://doi.org/10.5858/133.9.1463>.

MacDonald, I. J., Dougherty, T. J. Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* [online], 2001, 05(02), 105–129. ISSN 1099-1409. <https://doi.org/10.1002/jpp.328>.

Masters, J. HeLa cell 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nature Reviews Cancer* [online], 2002, 2, 315-319. ISSN 1474-1768. <https://doi.org/10.1038/nrc775>.

Mohanty, J., Bhasikuttan, A. C., Choudhury, S. D., Pal, H. Noncovalent Interaction of 5,10,15,20-Tetrakis(4-N-methylpyridyl)porphyrin with Cucurbit[7]uril: A Supramolecular Architecture. *The Journal of Physical Chemistry B* [online], 2008, 112(35), 10782–10785. ISSN 1520-5207. <https://doi.org/10.1021/jp806012t>

Robinson-Duggon, J., Pérez-Mora, F., Dibona-Villanueva, L., & Fuentealba, D. (2018). Potential applications of cucurbit [n] urils inclusion complexes in photodynamic therapy. *Israel Journal of Chemistry*, 58(3-4), 199-214. ISSN 1869-5868. <https://doi.org/10.1002/ijch.201700093>.

Yang, K., Zhang, Z., Du, J., Li, W., & Pei, Z. Host–guest interaction based supramolecular photodynamic therapy systems: a promising candidate in the battle

against cancer. *Chemical Communications* [online], 2020, 56(44), 5865-5876. ISSN 1364-548X. <https://doi.org/10.1039/D0CC02001J>.

Yuan, B., Wu, H., Wang, H., Tang, B., Xu, J.-F., Zhang, X. Self-degradable supramolecular photosensitizer with high photodynamic therapeutic efficiency and improved safety. *Angewandte Chemie International Edition* [online], 2021, 60, 706-710. ISSN 0570-0833. <https://doi.org/10.1002/anie.202012477>.

Wood SR, Holroyd JA, Brown SB. The subcellular localization of Zn(II) phthalocyanines and their redistribution on exposure to light. *Photochemistry and Photobiology* [online], 1997, 65(3), 397-402. ISSN 1751-1097. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1997.tb08577.x>.