

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCA

Periférne substituované subftalocyaníny pre fotodynamickú terapiu s axiálne viazaným
benzocrownom a metylesterom tyrozínu

Bc. INGRID HLBOČANOVÁ

Vedúci diplomovej práce: RNDr. Miloslav Macháček, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2023

Veľmi rada by som chcela na tomto mieste poďakovať školiteľovi a vedúcemu mojej diplomovej práce RNDr. Miloslavovi Macháčkovi, Ph.D. za jeho pomoc a odborné vedenie v rámci vypracovania tejto diplomovej práce a za všetky odborné rady a skúsenosti, ktoré mi predal pri vypracovaní teoretickej a experimentálnej časti tejto práce. Taktiež by som veľmi rada chcela poďakovať za prípravu študovaných látok a skvelú spoluprácu členom vedeckej skupiny prof. PharmDr. Petra Zimčíka, Ph.D z Katedry farmaceutickej chémie a farmaceutickej analýzy (Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova). V neposlednej rade by som chcela taktiež poďakovať Mgr. Magdaléne Kozlíkovej a Mgr. Marii Halaškovej za ich pomoc, čas a trpezlivosť. Veľká vďaka patrí aj celému kolektívu z Katedry biochemických vied za vytvorenie priateľského a vľúdneho pracovného prostredia. Poďakovanie patrí aj mojej rodine a priateľom za ich podporu, ktorú mi poskytovali v priebehu celého štúdia.

„Prehlasujem, že táto diplomová práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka použitá literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som čerpala v rámci spracovania tejto práce, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú správne citované. Táto práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové dňa

.....

Podpis

1 ABSTRAKT

Nádorové ochorenia sa pomaly, ale s istotou stávajú najrozšírenejším ochorením na svete. Malígne stavy postihujú široké spektrum ľudí, ktorí predispozíciu k ochoreniu zdedili geneticky, prípadne boli alebo sú ovplyvnení faktormi vonkajšieho prostredia. Nákladná terapia však predstavuje problém nielen vo vyspelých krajinách, ale hlavne v krajinách tretieho sveta. Financie a dostupnosť predstavujú len časť z problému. Základom je hlavne včasná diagnostika, prevencia pred vznikom tohto typu ochorenia a efektívna terapia.

Vzhľadom na vysokú rozšírenosť a úmrtnosť spojenú s malígnymi ochoreniami, ktoré každoročne stúpajú, sa venuje veľké úsilie predchádzaniu týchto ochorení a správnu a včasnou diagnostikou spojenou so zdravým životným štýlom. Veľká pozornosť sa venuje taktiež aj výskumu a vývoju nových a účinných protinádorových liečiv a terapeutických postupov. Jednou z takýchto moderných a sľubných metód je fotodynamická terapia (PDT).

Jedná sa o selektívnu, minimálne invazívnu klinicky schválenú terapeutickú metódu spojenú s minimálnym výskytom negatívnych vedľajších účinkov v porovnaní s metódami ako chemoterapia, rádioterapia, chirurgické zákroky či ich kombinácie. PDT sa stáva čoraz viac využívanou a uznávanou alternatívou v rámci terapie malígnych či nemalígnych stavov aj vďaka menej finančnej nákladnej liečbe a lepšej dostupnosti terapie. Princípom metódy je lokálne alebo systémové podanie samostatne neaktívnej látky, označovanej ako fotosenzitizér (PS), s následným ožiarením miesta svetlom o vhodnej vlnovej dĺžke a intenzite. Po ožiarení a aktivácii PS spolu s prítomným molekulárnym kyslíkom, ako poslednou hlavnou komponentou, dochádza ku vzniku fotochemickej reakcie s tvorbou vysoko reaktívnych foriem kyslíka. Tie vedú k stavu oxidačného stresu, ktorý spôsobí poškodenie a úmrtie nádorových buniek, poškodenie mikrocirkulácie v mieste nádoru a prípadne taktiež k vzniku imunitnej reakcie organizmu.

Cieľom tejto práce je zhodnotenie fotodynamickej aktivity, účinnosti a mechanizmu pôsobenia nových syntetizovaných derivátov flalocyanínov, fotosenzitizérov zo skupiny označovaných ako subftalocyaníny (SubPc). Nami študované deriváty sa vyznačujú axiálne viazanými substituentami so štruktúrou benzocrownu a metylesteru tyrozínu. Testovanie prebiehalo *in vitro* na dvoch bunkových líniiach HeLa (ľudské malígne bunky krčka maternice) a SK-MEL-28 (ľudské melanómové nádorové bunky), kedy sa skúmala cytotoxicita po ožiarení

svetlom s vhodnou vlnovou dĺžkou a vlastná toxicita látok. Ďalej prebiehala lokalizácia skúmaných látok v bunke pomocou fluorescenčného mikroskopu, stanovenie typu bunkovej smrti s využitím Annexinu V a sledovanie časového prestupu látok do bunky.

Z výsledkov mojej práce bola zistená veľmi sľubná fotodynamická aktivita štyroch skúmaných látok (3I-SubPc-CE, 3EtS-SubPc-CE, 3EtS-SubPc-Tyr-FB a 3EtS-SubPc-Tyr-Boc) po aktivácii svetlom na oboch bunkových líniiach. Látka 3EtS-SubPc-CE ($EC_{50} = 2,3 \pm 0,7$ nM) a 3I-SubPc-CE ($EC_{50} = 37,8 \pm 7,6$ nM) testované na SK-MEL-28 bunkovej línii sa preukázali ako najúčinnnejšie a to aj v porovnaní s klinicky testovanými a používanými PS. Skúmané látky boli lokalizované v lyzosómoch a adiposómoch. Po ožiarení podliehali bunky apoptickej bunkovej smrti, čo sa prejavilo nárastom luminiscenčného signálu a časovým oneskorením nárastu fluorescenčného signálu. V rámci štúdia časového prestupu látok do bunky sa látka 3EtS-SubPc-CE dostávala do bunky v najvyššom množstve.

Kľúčové slová: fotodynamická terapia, fotosenzitizér, subftalocyaníny, cytotoxicita, bunková smrť, Annexin V, subcelulárna lokalizácia, BCA

2 ABSTRACT

Tumor diseases are slowly but surely becoming the most widespread disease in the world. Malignant conditions affect a wide range of people who inherited a predisposition to the disease genetically, or were influenced by environmental factors. However, expensive therapy is a problem not only in developed countries, but especially in third world countries. Financial aspect and availability are only part of the problem. Early diagnosis, prevention before the onset of this type of disease and effective therapy are the key elements to successful treatment.

Due to the high prevalence and mortality associated with malignant diseases, which are increasing every year, great efforts are devoted to the prevention of these diseases and the correct and timely diagnosis associated with a healthy lifestyle. Great attention is also paid to the research and development of new and effective anti-tumor drugs and therapeutic approaches. One such modern and promising method is photodynamic therapy (PDT).

It's a selective, minimally invasive, clinically approved therapeutic method associated with a minimal occurrence of negative side effects compared to methods such as chemotherapy, radiotherapy, surgery or their combinations. PDT is becoming an increasingly utilized and recognized alternative in the therapy of malignant or non-malignant conditions, thanks to the less expensive treatment and better availability of therapy. The principle of the method is the local or system administration of a separately inactive compound, referred to as a photosensitizer (PS), followed by the irradiation of the tumor with light of a suitable wavelength and intensity. After irradiation and activation of PS together with the presence of molecular oxygen, as the last main component, a photochemical reaction occurs with the formation of highly reactive oxygen species. These species lead to a state of oxidative stress, which causes damage and subsequently death of tumor cells, damage to the tumor vasculature, and even formation of an immune reaction in the body.

The aim of this work is to evaluate the photodynamic activity, efficiency and mechanism of action of novel phthalocyanine derivatives, photosensitizers from the group referred to as subphthalocyanines (SubPc). The studied derivatives are axially substituted with benzocrown or tyrosine methyl ester moieties. The experiments were carried out *in vitro* on two cell lines: HeLa (human cervical carcinoma) and SK-MEL-28 (human melanoma). Cytotoxicity after light irradiation with a suitable wavelength and intrinsic toxicity of the compounds were investigated. Furthermore, the subcellular localization assessed by fluorescence microscopy,

determination of the type of cell death using Annexin V and the monitoring of the cellular uptake were evaluated as well.

Based on obtained results, very promising photodynamic activity of the four investigated SubPcs (3I-SubPc-CE, 3EtS-SubPc-CE, 3EtS-SubPc-Tyr-FB and 3EtS-SubPc-Tyr-Boc) was found after irradiation on both cell lines. 3EtS-SubPc-CE ($EC_{50} = 2.3 \pm 0.7$ nM) and 3I-SubPc-CE ($EC_{50} = 37.8 \pm 7.6$ nM) tested on SK-MEL-28 cell line proved to be the most effective even in comparison with clinically used PS. Studied compounds were localized in lysosomes and adiposomes. After irradiation, the cell lines underwent apoptotic cell death, which was manifested by the increase in luminescence signal and the delay of the increase in fluorescence signal. As part of the cellular uptake, 3EtS-SubPc-CE was found to be taken up in the highest amount by the cells.

Key words: photodynamic therapy, photosensitizer, subphthalocyanines, cytotoxicity, cell death, Annexin V, subcellular localization, BCA

3 OBSAH

1	ABSTRAKT	4
2	ABSTRACT.....	6
3	OBSAH.....	8
4	ÚVOD.....	11
5	TEORETICKÁ ČASŤ	13
5.1	Fotodynamická terapia	13
5.2	História fotodynamickej terapie	14
5.3	Mechanizmus fotodynamickej terapie.....	15
5.4	Klinická aplikácia	16
5.5	Svetlo	17
5.6	Kyslík.....	18
5.7	Fotosenzitizéry.....	18
5.7.1	1.generácia.....	20
5.7.2	2. Generácia.....	21
5.7.3	3.generácia.....	21
5.7.4	Ftalocyaníny	21
5.7.5	Subftalocyaníny.....	23
5.8	Bunková smrť	24
5.8.1	Apoptóza	24
5.8.2	Nekróza	26
5.8.3	Autofágia	26
5.8.4	Pyroptóza.....	26
5.8.5	Metódy stanovenia	27
6	CIEĽE PRÁCE	28

7	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	29
7.1	Základné vybavenie pre prácu s bunkovými líniami.....	29
7.2	Prístrojové vybavenie	29
7.3	Chemikálie a reagenty.....	30
7.4	Bunkové kultúry	32
7.4.1	Bunková línia HeLa.....	32
7.4.2	Bunková línia SK-MEL-28	33
7.4.3	Kultivačné médium	34
7.4.4	Inkubácia buniek	35
7.4.5	Bunková pasáž.....	36
7.4.6	Stanovenie počtu životaschopných buniek.....	37
7.4.7	Nasadzovanie buniek na experiment.....	38
7.5	Študované fotosenzitizéry.....	39
7.5.1	Nasadzovanie látok.....	41
7.6	Cytotoxické metódy	42
7.6.1	Fotoaktivácia látok	42
7.6.2	„Dark“ toxicita	43
7.7	Stanovenie viability buniek pomocou neutrálnej červene	44
7.8	Stanovenie bunkovej smrti	45
7.9	Časový profil prestupu skúmaných látok do buniek	48
7.10	Stanovenie množstva bielkovín	49
7.11	Hodnotenie výsledkov	50
7.12	Subcelulárna lokalizácia skúmaných látok	51
8	VÝSLEDKY	52
8.1	Stanovenie cytotoxicity	52
8.1.1	Bunky SK-MEL-28	52
8.1.2	HeLa bunky	58

8.2	Bunková smrť	64
8.3	„Uptake“ látok	69
8.4	Subcelulárna lokalizácia	69
8.4.1	Lyzosómy	70
8.4.2	Adiposómy	74
9	DISKUSIA	77
10	ZÁVER	83
11	POUŽITÉ SKRATKY	84
12	POUŽITÁ LITERATÚRA	87

4 ÚVOD

Témou „Periférne substituované subftalocyaníny pre fotodynamickú terapiu s axiálne viazaným benzocrownom alebo metylesterom tyrozinu“ nadväzujem na svoju experimentálnu bakalársku prácu, kde som sa zaoberala štúdiom (aza)ftalocyanínov. Samotná téma bakalárskej, a taktiež aj diplomovej práce ma zaujala, lebo predstavuje nádejnú perspektívnu metódu v liečbe malígnych či nemalígnych ochorení.

Fotodynamická terapia (PDT) je perspektívnou klinicky schválenou metódou s minimálnou invazivitou a toxicitou pre organizmus jedinca, spolu s minimom vedľajších nežiaducich účinkov. Uplatnenie tejto terapie sa týka hlavne liečby mikrobiálnych ochorení alebo nádorov pažeráka, žalúdka, maternice či kože, kedy sa vhodnou kombináciou troch komponent, potencuje sľubný cytotoxický efekt. Týmito tromi spomínanými zložkami využívanými v PDT je svetlo (o vhodnej vlnovej dĺžke), ďalej kyslík (ako podklad pre tvorbu cytotoxických produktov) a v neposlednom rade fotosenzitizér (PS). Samostatne sú tieto zložky netoxické, ale ich kombináciou je možné doceliť fotochemickú reakciu v tkanive, s tvorbou reaktívnych foriem kyslíka (ROS) a ďalších cytotoxických medziproduktov, pôsobiacich na nádorové bunky a okolité tkanivo, vedúcich k navodeniu imunitnej odozvy organizmu.

V úvode teoretickej časti práce sa venujem základom fotodynamickej terapie, histórii vzniku, mechanizmu pôsobenia, praktickému a klinickému využitiu a popisom jednotlivých súčastí terapie (PDT) ako je svetlo, kyslík a vývoju samotných PS. V neposlednej rade sa zaoberám typmi bunkovej smrti, ktoré nám približujú mechanizmus umierania buniek spojených s faktormi prostredia prispievajúcimi k ich zániku.

Experimentálna časť obsahuje zoznam metodík a ich stručný popis, ktoré sa využili pri príprave a práci v rámci krokov stanovujúcich cytotoxicitu skúmaných látok, typ bunkovej smrti, subcelulárnej lokalizácii, či metóde časového prestupu látok do bunky. V závere sú zobrazené výsledky získané experimentálnou prácou a porovnané s doposiaľ vykonanými stanoveniami v základnom či klinickom výskume získaných z vedeckých publikácií.

V teoretickej a experimentálnej časti práce som sa najviac zamerala na vývoj, výskum a experimentálne testovanie PS, ktoré predstavujú jednu z najdôležitejších a základných súčastí PDT. Študované PS sa aplikovali k nádorovým bunkám a selektívne akumulovali v ich

cieľových štruktúrach. Po ožiarení svetlom o vhodnej vlnovej dĺžke a intenzite spolu s kyslíkom došlo k fotodynamickej reakcii vedúcej ku vzniku cytotoxických molekúl pôsobiacich na nádorové bunky. S využitím ďalších metód bolo možné posúdenie aktivity a toxického účinku na vybraných bunkových líniách.

Výskum a vývoj sa zameriava hlavne na optimalizáciu vlastností klinicky používaných PS. Testovaním aktivity vybraných PS som sa v praktickej časti svojej diplomovej práce zaoberala aj ja.

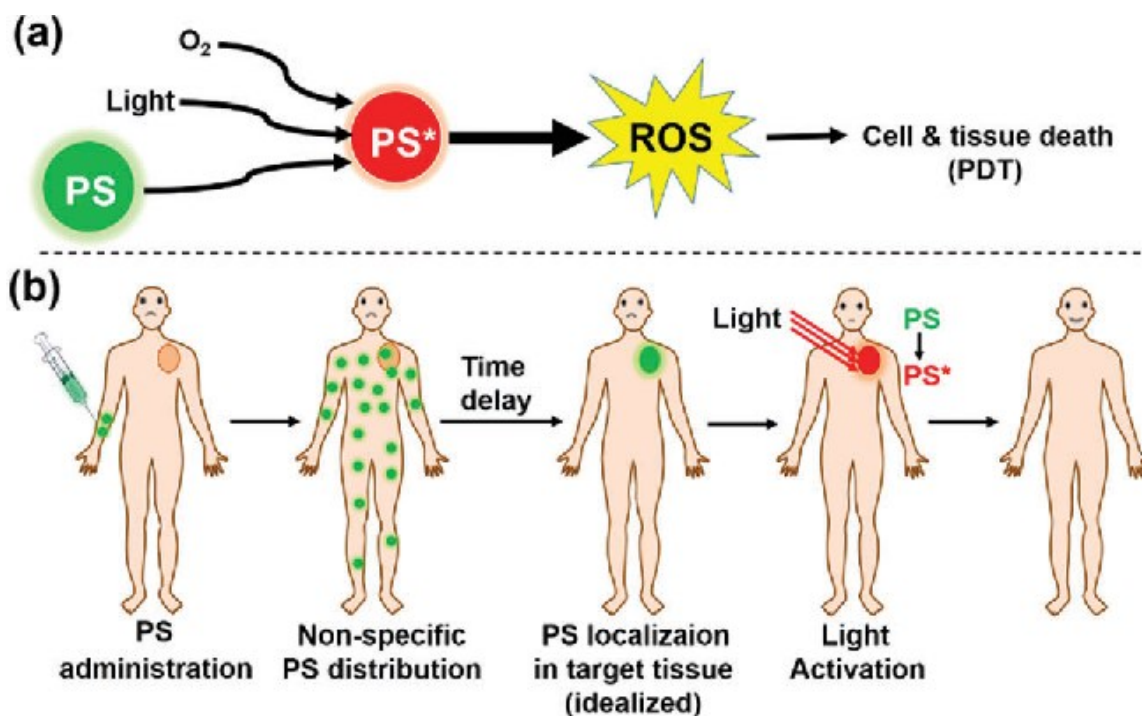
Cieľom tejto práce bolo *in vitro* posúdenie a vyhodnotenie fotodynamickej aktivity nových syntetizovaných PS sledovanie časového prestupu látok do buniek, so stanovením bielkovín, ďalej určenie typu bunkovej smrti a na záver subcelulárne lokalizovanie látok v bunkách. Výsledky a závery tejto práce sa môžu využiť k prehĺbeniu a rozšíreniu vedomostí o týchto študovaných látkach, prípadne ďalším aplikovaním a testovaním *in vivo* podmienkach optimalizácii ich účinnosti.

5 TEORETICKÁ ČASŤ

5.1 Fotodynamická terapia

Fotodynamická terapia (PDT; z ang. *photodynamic therapy*) je modernou, neinvazívnou a vysoko selektívnou formou terapie, ktorá nachádza uplatnenie v liečbe nenádorových ochorení ako aj terapii malígnych stavov rôznej etiológie a lokalizácie. Techniku PDT je možné využiť v paralelnej aplikácii spolu s inými terapeutickými protokolmi v rámci liečby nádorových stavov. Oblasť aplikácie a využitia sú širokospektrálne. PDT sa najviac využíva v onkológii, dermatológii, urológii či gynekológii. Využitie tejto terapie zahŕňa tri základné komponenty, a to zdroj žiarenia, fotosenzitizér (PS) a molekulárny kyslík ($^3\text{O}_2$). Základ terapie sa opiera o aplikovanie netoxického PS, ktorý sa selektívne akumuluje do oblasti nádoru s následným ožiarovaním tohto miesta svetlom o špecifickej vlnovej dĺžke. Výsledok vedie ku generalizovanému oxidačnému stresu vďaka produkcii reaktívnych foriem kyslíka (ROS), ktoré v tkanive aktivujú mechanizmy bunkovej smrti a vedú k rozvratu homeostázy prostredia a systémovej imunitnej reakcii organizmu spolu s poškodením cievneho zásobenia, spôsobeného zvýšenou agregáciou trombocytov (Kwiatkowski *et al.*, 2018, Li *et al.*, 2019, Donohoe *et al.*, 2019, Warriar *et al.*, 2021, Akimoto, 2016).

Princíp PDT sa začal využívať už pred tisíckami rokov v starovekej indickej, čínskej či egyptskej civilizácii v rámci fototerapie kožných ochorení ako vitiligo, psoriáza a rakovina kože. V roku 1900 sa preukázal cytotoxický efekt v kombinácii s akridínovými farbivami po svetelnej expozícii. Približne v tom istom čase sa podarilo vedcovi Nielsovi Ryberg Finsenovi vyliečiť kiahne a kožnú tuberkulózu s využitím červeného a modrého svetla, za čo následne dostal Nobelovu cenu. V roku 1904 sa taktiež podarilo profesorovi von Tappeinerovi ako prvém uviesť termín „fotodynamickéj účinnosti“ opisujúci interakciu špecifickej chemickej látky, svetla a kyslíku. Najväčší prelom v oblasti PDT nastal ku koncu 20. storočia, kedy v Inštitúte pre rakovinu v Roswell Parku (konkrétne v roku 1978) Dr. Dougherty s kolegami začal rozsiahle klinické testovanie. Tento výskum priniesol odpovede na mnohé otázky spojené s toxicitou a rozsahom účinnosti hladín liečiv, a taktiež na aplikáciu PDT v kombináciu s rádioterapiou, chemoterapiou či imunoterapiou (Li *et al.*, 2020, Prazmo *et al.*, 2016, Cengel *et al.*, 2016).



Obrázok 1 Princíp fotodynamickej terapie. a) *Light* (svetlo), PS (PS v základnom stave), PS* (PS v excitovanom stave), ROS (reaktívne formy kyslíka), *cell & tissue death* (bunková smrť a poškodenie tkaniva), PDT (fotodynamická terapia) b) *PS administration* (podanie PS), *Non-specific PS distribution* (nešpecifické distribuovanie fotosenzitizéra v organizme), *time-delay* (časové oneskorenie), *PS localization in target tissue (idealized)* (lokalizácia fotosenzitizéra v cieľnom tkanive), *light activation* (aktivácia svetlom), *light* (svetlo), PS→PS* (aktivácia fotosenzitizéra). Prevzaté z (Li *et al.*, 2018).

5.2 História fotodynamickej terapie

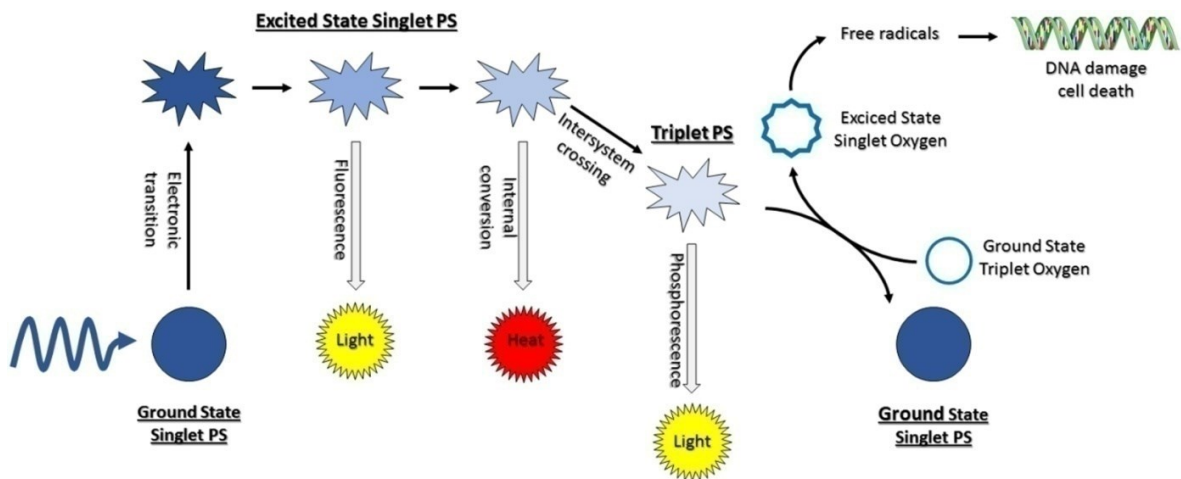
Staroveké civilizácie už pred tisíckami rokov kombinovali rôzne rastliny so slnečným žiarením na liečbu rôznych kožných ochorení. Prvýkrát experimentálne pozorovaným bol v roku 1900, študentom medicíny, Oscarom Raabom účinok akridínovej červenej a svetla, ktorý sa preukázal ako toxický na druh prvoka označovanom ako *Paramecium* sp. Približne pred viac ako 100 rokmi sa podarilo Hermann von Tappeinerovi zaviesť termín fotodynamickej akcie, ako opisu reakcia závislosti kyslíka po fotosenzibilizácii. Poznamenal, že v neprítomnosti kyslíka, farbivo a samotné svetlo nespôsobilo bunkovú smrť. Pokračovaním vo vývoji konceptu PDT sa mu nakoniec podarilo opísať prvé prípady u ľudí pomocou eozínu, ako PS, na ošetrovanie rôznych druhov ochorení kože. V priebehu rokov sa objavilo mnoho PS, ale najviac študovaným činidlom bol hematoporfyrin skúmaný Meyer Betzom. Intravenózne podanie hematoporfyrinu viedlo k jeho pomalému odstráneniu z tkaniva, čo spôsobovalo predĺženie fototoxicity u pacienta. V roku 1990 Kennedy a kol. uviedli použitie 5-aminolevulátu (ALA) a

viditeľného svetla pre topickú PDT liečbu kože. ALA bolo revolučná, pretože ľahko prenikla poškodeným respektíve abnormálnym stratum corneum a rýchlo sa odstraňovala z organizmu. Klinické využitie PDT na kontrolu malignít u veľkej podskupiny pacientov prvýkrát úspešne demonštroval Thomas Dougherty so spolupracovníkmi v roku 1978. Úpravou už známeho hematoporfirinu kyselinou sírovou a kyselinou octovou získali derivát hematoporfirinu (HpD). Dvadsaťpäť pacientov s refrakternými alebo recidivujúcimi nádormi bolo liečených HpD a červeným svetlom, pričom v závere štúdie dosiahli 86,7% mieru kompletnej a čiastočnej odozvy na liečbu (Sun *et al.*, 2022, Rkein & Ozog, 2014, Dougherty *et al.*, 1998).

5.3 Mechanizmus fotodynamickej terapie

Základom mechanizmu PDT je aplikovanie PS, ktorý sa cielene lokalizuje v nádorovom tkanive a jeho účinnosť je aktivovaná a podporená svetlom o vhodnej vlnovej dĺžke spolu s prítomným molekulárnym kyslíkom. Ako výsledok sa sledujú fotochemické a fotobiologické procesy vedúce k ireverzibilnému poškodeniu nádoru a jeho okolia. Fotodynamická reakcia je chemický proces podporený žiarením so spotrebou $^3\text{O}_2$ označované ako fotochemické deje I. typu a II. typu (Dougherty *et al.*, 1998).

Základný singletový stav molekuly PS má dva elektróny s opačným spinom, ktoré sú umiestené v čo najvýhodnejšom energetickom orbitále. Následkom absorpcie fotónov s vhodnou vlnovou dĺžkou a kvantovou energiou dochádza u jedného z týchto elektrónov k jeho prechodu na orbitál s vyššou energiou. V excitovanom singletovom stave je nestabilný, preto prebytočnú časť svojej energie stratí emisiou fotónu (fluorescencia) alebo tvorbou tepla. Ďalšia z možností prechodu je označovaná ako „medzisystémový prechod“, kedy excitovaný singletový PS vytvára stabilný tripletový stav. Životnosť tohto stavu v porovnaní so sigletovým je dostatočne dlhá nato, aby dochádzalo k zrážkam s $^3\text{O}_2$ a prenosu energie. To vedie ku vzniku singletového kyslíka ($^1\text{O}_2$) a PS v základnom stave. Tento proces je označovaný ako fotochemická reakcia typu II. Fotochemická reakcia typu I spôsobuje prenos energie z excitovaného PS, ktoré vo finále tvoria ROS. ROS ďalej získavajú alebo darujú svoje elektróny a vedú k produkcii H_2O_2 či $\text{HO}\cdot$, a následne k oxidačnému stresu a deštrukcii nádorových buniek (Abrahamse & Hamblin, 2016, Kwiatkowski *et al.*, 2018, Donohoe *et al.*, 2019).



Obrázok 2 Mechanizmus fotodymanickej terapie. *Ground state singlet PS* (základný singletový stav PS), *Electronic transition* (prenos elektrónov), *Excited state singlet PS* (excitovaný singletový stav PS), *Fluorescence* (fluorescencia), *Light* (svetlo), *Internal conversion* (vnútrotnú prechod), *Heat* (teplo), *Intersystem crossing* (medzisystémový prechod), *Triplet PS* (tripletový stav PS), *Phosphorescence* (fosforescencia), *Free radicals* (voľné radikály), *Ground state singlet PS* (základný singletový stav PS), *Excited state singlet oxygen* (excitovaný singletový stav kyslíka), *Ground state triplet oxygen* (základný tripletový stav kyslíka) a *DNA damage cell death* (poškodenie DNA a bunková smrť). Prevzaté (Kwiatkowski *et al.*, 2018).

5.4 Klinická aplikácia

PDT sa úspešne používa v dermatologickej oblasti, kde lekári využívajú túto technológiu na liečbu širokého spektra dermatologických stavov, vrátane skorých nemelanómových karcinómov kože, aktinických keratóz, akné alebo psoriázy. Ďalšie malignity s povrchovými nádormi, ktoré umožňujú ľahký prístup k povrchovo aplikovaným zdrojom svetla, zahŕňajú karcinómy hlavy a krku a spinocelulárne karcinómy ústnej dutiny. Hoci chirurgická liečba s adjuvantnou chemoterapiou alebo rádioterapiou zostáva súčasným štandardom starostlivosti v rámci terapie nádorov, PDT je cennou alternatívou pre pacientov s povrchovými recidívami po operácii a podporných terapiách, kde sa ďalší chirurgický zákrok neodporúča kvôli riziku morbidít. Ako arzenál v možnostiach liečby je PDT potenciálne silná, pretože terapia je selektívna voči nádoru, bez skrížených mechanizmov s chemoterapiou a rádioterapiou, takže ju možno aplikovať s chemoterapiou a na rádiorezistentné ochorenia s lepšou toleranciou a nižšou toxicitou v porovnaní s konvenčnou liečbou rakoviny. Prevládajúce používanie PDT pre hlboko uložené nádory sa však ešte nepodarilo získať. Napriek tomu sa uskutočnili určité pokusy vykonať klinicky PDT hlboko uložených nádorov. Okrem hlbokaj lokalizácie nádoru je ďalším limitom aj slabá selektivita a akumulácia či postterapeutická

fotosenzitivita, ktorá sa hlavne prejavovala u 1. generácie PS. Tieto obmedzenia sa podarilo optimalizovať vývojov PS 2. a 3. generácie (Sun *et al.*, 2022, Mfouo-Tynga & Abrahamse, 2015, Lo *et al.*, 2023).

5.5 Svetlo

V rámci PDT terapie sa využívajú PS, ktoré sú excitované svetlom z viditeľného (VIS) až blízkeho infračerveného (NIR) spektra, čo vedie k prieniku žiarenia tkanivom od niekoľkých milimetrov (mm) až po centimetrov (cm). Parametre ako zdroj svetla, intenzita, vlnová dĺžka, šírka impulzu a hĺbky prieniku sa líšia v závislosti na type cieľového tkaniva a použitého PS. Lasery ako najbežnejší zdroj svetla poskytuje oveľa lepšiu presnosť v porovnaní s bežnými konvenčnými zdrojmi. Využíva sa široká škála laserových systémov ako napríklad argónový (488 – 750 nm), hélium-neonový (632 nm), lasery na kovové pary a farbivá, lasery s vlnovou dĺžkou na rozhraní VIS a IR (300 – 1100 nm). Z nelaserových svetelných zdrojov sa využívajú xenónové oblúkové lampy (300 – 1200 nm), halogénové lampy (250 – 730 nm), sodíkové lampy (590 – 670 nm) či LED diódy (350 – 1100 nm) (Agostinis *et al.*, 2011, Warriier *et al.*, 2020).

Lampy s nekoherentným svetlom boli prvým svetelným zdrojom používaným v PDT, vrátane žiariviek, žiaroviek, halogénových výbojok, xenónových výbojok a sodíkových výbojok. Lampy sú jednoduché a lacné, ale ich nevýhody spočívajú najmä vo veľkej divergencii lúčov, širokej spektrálnej šírke a vyžadujú si optickú filtráciu. LED diódy sú polovodičové zariadenia, ktoré tiež generujú nekoherentné svetlo s výhodami nízkej ceny a prenosnosti. Majú potenciál byť vysoko účinné pre PS 2. generácie, ktorých absorpčné vlnové dĺžky sú bližšie k maximálnej emisii LED. Nevýhody LED sú podobné ako u svietidiel, navyše majú nežiaduce tepelné efekty. Preto sú lampy aj LED diódy vhodné iba na povrchové lézie. Svetlo generované lasermi je jedinečne koherentne monochromatické. Kvôli vysokej požadovanej presnosti sa často používajú lasery, ktoré vyžarujú svetlo s určitou vlnovou dĺžkou, ktorá sa dá prispôbiť absorpčným spektrom PS. Medzitým sa dajú ľahko spojiť s optickým vláknom, ako je endoskopia, na ošetrovanie hlbších cieľov. V PDT sa typicky používajú klinické diódové lasery s výstupnými vlnovými dĺžkami v rozsahu 415 – 690 nm (Yang *et al.*, 2021).

5.6 Kyslík

$^3\text{O}_2$ ako súčasť PDT spolu s PS a svetlom sú tri hlavné súčasti v rámci tohto druhu terapie. $^3\text{O}_2$ je východným prvkom v produkcii ROS, ktoré majú priamy účinok na nádorové bunky, vedú k poškodeniu mikrocirkulácie tkanív a odpovedi imunitného systému (Ong *et al.*, 2020).

ROS sú chemicky reaktívne radikálové látky odvodené od kyslíka. Príkladmi radikálových a neradikálových molekúl môže byť peroxid vodíka (H_2O_2), superoxid anión radikál ($\cdot\text{O}_2^-$), hydroxylový radikál ($\text{HO}\cdot$) či $^1\text{O}_2$. ROS sú produkované počas rôznych biochemických reakcií mimo bunky aj vo vnútri bunky – v cytosóle a všetkých organelách (najmä v mitochondriách, peroxisónoch a endoplazmatickom retikule). Endogénne zdroje a mechanizmy môžu byť stimulované vonkajšími činiteľmi ako sú znečisťujúce látky, ťažké kovy, tabak, dym, drogy, xenobiotiká alebo žiarenie (Gadzhimagomedova *et al.*, 2020).

Hypoxia (znížený obsah kyslíka v tkanive) v centre nádoru predstavuje terapeutické obmedzenie terapie PDT. $^3\text{O}_2$ a ROS sa významnou mierou zúčastňuje zničenia vaskularity nádoru, ale taktiež spôsobuje zhoršenie jeho vlastnej účinnosti na rast nádoru. Je to spôsobené rýchlym metabolizmom buniek a jeho nedostatočným prísunom do tkaniva. Ďalšie štúdie sa preto zamerali na zlepšenie dostupnosti $^3\text{O}_2$ v okolí nádoru využitím nanočastíc PLGA (kopolyméry kyseliny maslovej a glykolovej) a katalásového enzýmu (CAT). PLGA a CAT dokázali efektívnejšie využiť prítomný H_2O_2 , a tým zvýšiť produkciu $^3\text{O}_2$ v tkanive (Yang *et al.*, 2019).

5.7 Fotosenzitizéry

Jedným z troch hlavných a rozhodujúcich faktorov v rámci PDT terapie, okrem viditeľného svetla a $^3\text{O}_2$ (generátor cytotoxických ROS), je prítomnosť fotosenzitívnej látky, v tomto prípade PS, ktorý je sám o sebe netoxický. Základom štruktúry u väčšiny PS je tetrapyrrolový kruh podobný protoporfirinovej štruktúre molekuly hemu. Ide o farbiva, ktorých vlastnosťou je absorpcia svetla o špecifickej vlnovej dĺžke, s následným spustením fotochemickej a fotofyzikálnej reakcie. Vyznačujú sa vysokým stupňom chemickej čistoty, stabilitou pri izbovej teplote, minimálnou cytotoxicitou v tme, ľahkým prienikom v tkanive,

vysokou selektívnou lokalizáciou v tkanive a schopnosťou vyvolávať fotosenzitívny účinok iba pri špecifickej vlnovej dĺžke svetla. Maximálnu fotochemickú reaktivitu prejavujú v rozmedzí 600 – 800 nm, kedy poskytujú dostatok energie na stimuláciu $^3\text{O}_2$ a produkciu ROS, vedúcich k porušeniu mikrovaskulárneho zásobenia nádoru a aktiváciou imunitného systému (expresia proteínov teplotného šoku, akútny zápal či infiltrácia leukocyty) (Kwiatkowski *et al.*, 2018, Agostinis *et al.*, 2011 Castano *et al.*, 2006).

Tabuľka 1 Príklady klinicky schválených alebo klinicky testovaných fotosenzitizérov. Prevzaté z (Donohoe *et al.*, 2019).

Chemická skupina	Fotosenzitizér	λ (nm)	Schválená aplikácia	Prebiehajúce klinické testovania
Porfyrín	porfimer sodný (Photofrin)	630	Pažerák a rakovina pľúc	Močový mechúr, žľožovod, mozog a vaječníky
Chlorín	temoporfin (Foscan)	652	Rakovina pľúc a kože	Hlava a krk, žľožovod
Chlorín	talaporfin (Laserphyrin)	660	Rakovina pľúc	Pečeň, pankreas, črevá a mozog
Chlorín	verteporfin (Visudyne)	690	Makulárna degenerácia	Koža a pankreas
Porfyrínový prekurzor	5-Aminolevulová kyselina, 5-ALA (Levulan [®])	635	Aktinická (solárna) keratóza	Koža a močový mechúr
Bakteriochlorín	padeliporfin (WST11, TOOKAD [®])	762	Prostata	
Chlorín	HPPH (Photochlor)	665		Hlava a krk, pažerák a pľúca
Ftalocyanín	kremitý ftalocaynín (Pc4)	675		Kožný T-bunkový lymfóm
Chlorín	deriváty chlorínu e6 (Photolon [™] , Radachlorin [®])	660		Nasofaring, sarkóm a hlava
Bakteriochlorín	redaporfin (LUZ11, F ₂ BMet)	749		Hlava a krk

Väčšina klinicky schválených a predklinických testovaných PS pre protinádorovú PDT sú porfyríny, chlóríny, bakteriochloríny alebo ftalocyaníny. Porfimer sodný (derivát hematoporfyrinu, Photofrin[®]), temoporfin (Foscan[®]), verteporfin (derivát benzoporfyrinu, Visudyne[®]), ALA (Levulan[®]) a talaporfin sodný (Laserphyrin[®]) sa používajú v klinickej praxi, ale vykazujú obmedzenú absorpciu vo fototerapeutickom okne, a tým aj zníženú účinnosť pri liečbe hlbokých lézií (Tabuľka 1). Pri niektorých z týchto PS sú často pozorované týždne až mesiace fotosenzitivity kože, čo je to spôsobené ich nízkou mierou klirensu. Niektoré z obmedzení (fotosenzitivita, prestupnosť tkanivom) súčasných klinicky schválených PS boli čiastočne prekonané v poslednom desaťročí dvoma PS založenými na štruktúre makrocyklu bakteriochlorínu: padeliporfin a redaporfin (Donohoe *et al.*, 2019).

PS obecné patria medzi látky prírodného či chemického pôvodu. Podstatou účinku je prenos svetelnej energie v rámci susedných molekúl prítomného molekule kyslíka z tkaniva a selektívny stupeň väzby PS na cieľovú štruktúru v organizme. Štúdium týchto látok je preto zamerané predovšetkým na ich selektivitu, toxicitu, elimináciu z tkanív či špecifickejšie zameranie (Shi *et al.*, 2019).

5.7.1 1.generácia

PS zaviedol do liečby po prvýkrát v 70. rokoch Dr. Dougherty a jeho kolegovia. Testovali vo vode rozpustnú porfyrinovú zmes nazývanú hematoporfyrinový derivát (HpD). HpD bol získaný čistením a chemickou modifikáciou prvého porfyrinu použitého ako PS - hematoporfyrin (Hp). HpD v porovnaní s Hp vykazoval lepšiu tkanivovú selektivitu pre nádory a menší fotosenzibilizačný potenciál na koži. Následne bola dostupná zmes porfyrinových dimérov a oligomérov izolovaných z HpD pod obchodným názvom Photofrin[®] (porfimer sodný). V súčasnosti zostáva porfimer sodný najčastejšie používaným PS. Napriek širokým aplikáciám v PDT má prípravok určité obmedzenia svojich klinických aplikácií, ktoré vyplývajú z nasledujúcich vlastností: nízka chemická čistota či slabá penetrácia tkaniva v dôsledku maximálnej absorpcie pri relatívne krátkej vlnovej dĺžke (630 nm). Okrem toho po PDT dochádza k niekoľkotýždňovej precitlivenosti kože na svetlo z dôvodu dlhého poločasu PS a jeho vysokej akumulácie v koži. Nevýhody 1. generácie PS si vynútili potrebu skúmania nových zlúčenín a iniciovali vývoj PS 2. generácie (Kwiatkowski *et al.*, 2019, Dobson *et al.*, 2019).

5.7.2 2. Generácia

2. generácia PS sa zamerala na nedostatky podmienené v prvej generácii PS. Ako prvým optimalizovaným derivátom tejto generácie bol verteporfin (derivát benzoporfirinu) komerčne známy pod obchodným označením Visudyne[®] a temoporfin známy pod obchodným označením Foscan[®]. Ďalšou látkou je ALA, ktorá sa ako proliečivo biotransformáciou v organizme mení na protoporfyrin IX (PpIX). Z ďalších látok tu patria texafyríny, deriváty tiopurínu, chlorínu (anológy ako bakteriochloríny) a ftalocyaníny. PS 2. generácie sa vyznačujú vyššou chemickou čistotou, vyšším výťažkom tvorby ¹O₂ a lepšou penetráciou do hlboko umiestnených tkanív vďaka ich maximálnej absorpcii v rozsahu vlnových dĺžok 650 – 800 nm. Okrem toho vykazujú menej vedľajších účinkov, ktoré vyplývajú z vyššej selektivity pre nádorové tkanivá a rýchlejšej eliminácie PS z tela. Hlavnou nevýhodou PS 2. generácie je ich slabá rozpustnosť vo vode, ktorá je výrazne limitujúcim faktorom pri ich intravenóznom podaní a núti hľadať nové spôsoby podávania liečiv (Zhu & Finlay, 2008, Kwiatkowski *et al.*, 2019).

5.7.3 3. generácia

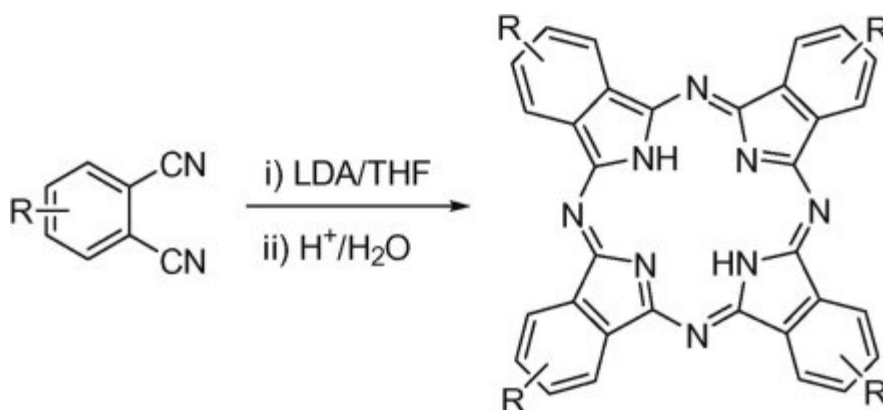
Nevýhody spojené s prvou a druhou generáciou sa snažila eliminovať 3. generácia PS. Cieľom sa stalo zlepšenie a zvýšenie afinity PS k nádorovému tkanivu a to prostredníctvom naviazania sa PS s biomolekulami ako napríklad s LDL časticami, protilátkami, sacharidovými podjednotkami alebo aminokyselinami, čím došlo k zlepšeniu fotostability, rozpustnosti vo vodných roztokoch a príjem látok bunkami nádoru. Ďalej sa skúma konjugácia PS so bovinným sérovým albumínom, špecifickými monoklonálnymi protilátkami a prepojenie PS s nosičovým systémom (liposómy, polyméry, nanočastice) (Gomes *et al.*, 20018, Kwiatkowski *et al.*, 2019).

5.7.4 Ftalocyaníny

Ftalocyaníny (Pc) patria do 2. generácie PS. Ide o symetrický aromatický tetrapyrolový makrocyklus zložený zo štyroch izoindolových jednotiek viazaných atómom dusíku

a štruktúralne sú príbuzné porfyrinom. Vďaka aromatickému cyklu vykazujú zaujímavé fotofyzikálne, fotochemické, polovodičové a fotovodičové vlastnosti. Na základe týchto vlastností sa uplatňujú v rôznych oblastiach, ako napríklad PDT terapii nádorových ochorení, v elektrokatalýze, ako polovodiče či chemosenzory a farbivá v solárnych článkoch. Z látok bežne sa vyskytujúcich v prírode sú podobné hemu, vitamínu B₁₂ a chlorofylu. Ftalonitrily a substituované ftalonitrily sú najbežnejším a najpoužívanejším východiskovým materiálom pre syntézu bezkovových a kovových Pc. Zaraďujú sa medzi organické a organokovové zlúčeniny s možnosťou modifikácie centrálného kovu (napr. Zn²⁺, Al³⁺, Cu²⁺) a axiálnych, periférnych či neperiférnych substituentov, čo ovplyvňuje následne ich biodistribúciu, farmakokinetiku a rozpustnosť. Ich vlastnosťou je silná absorpcia v červenom spektre (> 650nm), čo je oblasť spektra, ktoré preniká do optimálnej hĺbky tkanív (de Siqueira *et al.*, 2022, Araújo *et al.*, 2020, Hanack, 2015, Sekkat *et al.*, 2011).

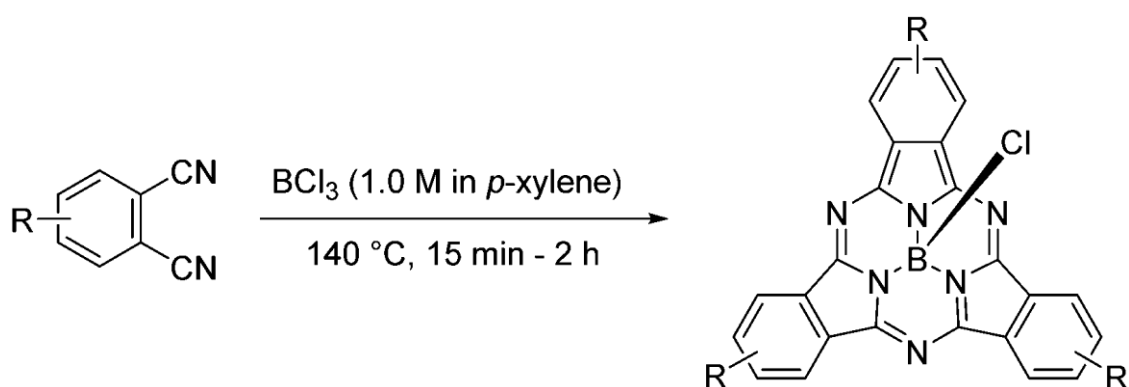
Nesubstituované Pc vykazujú vynikajúce optické vlastnosti, tepelnú a chemickú stabilitu. Nevýhodou predstavuje ich slabá rozpustnosť vo vodnom a organickom prostredí, čo bráni ich biologickej aplikácii a ovplyvňuje ich pôsobenie v rámci cytotoxických mechanizmov pôsobiacich na nádorové bunky. Slabá rozpustnosť sa prejavuje nízkou biologickou dostupnosťou, agregáciou pri intravenóznom podaní a toxickými účinkami spôsobenými ich lokálnou akumuláciou. Biokompatibilitu je možné zvýšiť pripojením iontových alebo hydrofilných funkčných skupín, ako sú karboxylové alebo tiolové skupiny či peptidy, polyétery a sacharidy. Sľubnou stratégiou je aj ich začlenenie do liposomálnych častíc, micel, nanokapsúl alebo polymérnych nanočastíc, čo vedie k ich lepšej terapeutickému účinnosti (Farajzadeh *et al.*, 2022, Lo *et al.*, 2020, Santos *et al.*, 2020).



Obrázok 3 Syntéza ftalocyanínu. *LDA* (lítium diisopropylamid), *THF* (tetrahydrofuran). Prevzaté z (Zheng *et al.*, 2015).

5.7.5 Subftalocyaníny

Subftalocyaníny (SubPc) sú homológne deriváty Pc, zložené z troch izoindolových kruhov. Oproti Pc, ktoré vytvárajú plošné zlúčeniny, SubPc v priestore zaujímajú trojrozmerný kuželovitý tvar. Centrálnym prvkom v štruktúre je bór, na ktorý je možné v axiálnej polohe naviazať ligandy, spolu s možnou substitúciou aj periférnych aromatických skupín. Čo sa týka ich fotochemických vlastností vyznačujú sa absorpciou a fluorescenciou vo viditeľnom spektre s maximálnym vrcholom okolo 550 – 600 nm. SubPc je možné využiť ako organické funkčné farbivá pri fluorescenčnom značení, optickom zobrazení živých buniek, pri zobrazení a liečbe rakoviny *in vivo* či v oblasti supramolekulárnej chémie a organickej fotovoltaike. Ich syntéza sa prvýkrát podarila v roku 1972 pánom Mellerovi a Ossokovi (Mori & Shibata, 2017, Grant *et al.*, 2019, Skvortsov *et al.*, 2020, Ogura *et al.*, 2022).



Obrázok 4 Syntéza axiálne chlorovaných subftalocyanínov. Prevzaté z (Lavarda *et al.*, 2022).

Veľký potenciál SubPc pramení z jedinečnej 3D priestorovej orientácie, ktorá umožňuje molekule látky vysokú absorpciu svetla vo viditeľnej oblasti, intenzívnu fluorescenčnú emisiu žiarenia, jednoduchú optimalizáciu ich elektronických?? a chemických vlastností, a taktiež schopnosť transportu polárneho náboja. Všetky tieto vlastnosti umožňujú SubPc výbornú tepelnú stabilitu a fotostabilitu, spolu s primeraným agregáčnym správaním molekuly. Potenciálny účinok látok je možné zvýšiť vhodnou periférnou substitúciou naviazaním elektrón akceptujúcich skupín ako napríklad kyslíkovej skupiny či halogénovými atómami fluóru a chlóru (Zango *et al.*, 2018, Labella *et al.*, 2022).

5.8 Bunková smrť

U mnohobunkových organizmov sa prejavuje neustalá snaha o udržanie homeostatickej rovnováhy medzi počtom nových buniek tvorených mitózou a počtom poškodených buniek alebo nepotrebných buniek, ktoré je potrebné z tela odstrániť. Tento neustály dohľad nad obratom buniek je nevyhnutný pre správny vývoj štruktúr organizmu, ako sú orgány a rôzne časti tela. Mechanizmy, ktorými organizmus reguluje mitózu, deteguje bunkové abnormality a iniciuje programovanú bunkovú smrť, zahŕňa veľké množstvo génov ovplyvňujúce stimuláciu/inhibíciu mitózy, iniciáciu apoptózy, pyroptózu alebo autofágiu. Bunková smrť je teda základným fyziologickým procesom, ktorý koordinuje nielen samotný vývoj od embryogenézie ale aj autoimunitné a imunitné procesy. Nekontrolovaná proliferácia buniek môže viesť k rozvoju rôznych chorôb, ako napríklad rakovina, Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba či reumatoidná artritída (D'Arcy, 2019, Bertheloot *et al.*, 2021).

Mechanizmy bunkovej smrti sa tradične delia na dva typy, a to mechanizmy programovanej bunkovej smrti, napríklad apoptóza (závislá na špecializovanom molekulárnom aparáte) a mechanizmy nekrotickej bunkovej smrti spôsobenými fyzikálnymi, chemickými či biologickými vplyvmi. Nedávno sa však preukázalo, že medzi týmito dvoma klasickými mechanizmami existuje určitý prekryv a kooperačné regulačné procesy, a že samotný organizmus ovplyvňuje alternatívnymi formami bunkovej smrti (napr. pyroptóza, autofágia, ferroptóza) (Tower, 2015, Li *et al.*, 2022).

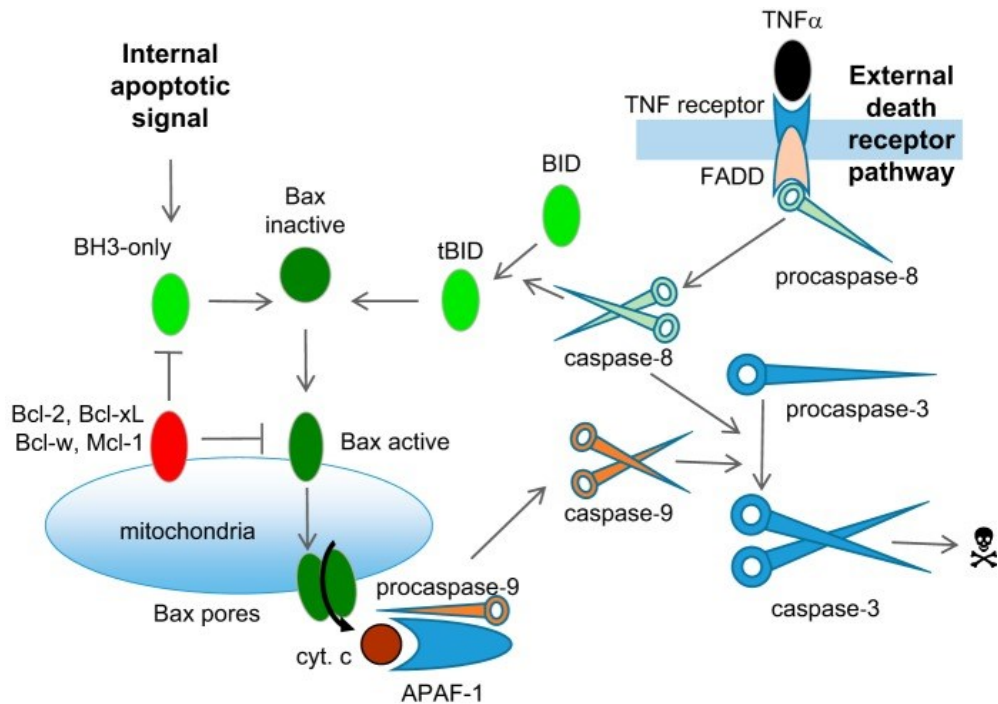
5.8.1 Apoptóza

Apoptóza je sprostredkovaný dvoma signálnymi kaskádami: vnútornou a vonkajšou cestou. Vnútorná dráha sa bežne vyskytuje ako dôsledok narušenia bunkovej homeostázy. Vonkajšia cesta sa prejavuje ako následok extracelulárnej signalizácie sprostredkovanej receptormi smrti (Sauler *et al.*, 2019).

- a) Vnútorná dráha je primárne riadená pro- a antiapoptotickými členmi rodiny proteínov Bcl-2, vrátane Bax, Bak, Bid a kaspázou-9 (aktivuje kaspázu-3 a kaspázu-7), s následnou permeabilizáciou mitochondriálnej vonkajšej membrány (MOMP), vedúcej k úniku cytochrómu c (Cyt c) do cytosolu. V cytosole sa viaže na monomery

APAF-1, čo vedie k viacstupňovej oligomerizácii APAF-1, závislému na nukleotidoch (proces výmeny ADP za ATP), a vytvoreniu apoptózy. Do cytosolu sa okrem Cyt c dostávajú aj proapoptické proteíny SMAC a DIABLO, ktoré inhibujú antiapoptické členy rodiny IAP (inhibítory apoptózy) (Christgen *et al.*, 2022).

- b) Vonkajšia cesta je na rozdiel od vnútornej cesty regulovaná signalizáciou receptorov smrti lokalizovaných na povrchu bunky, tvorbou DISC a aktiváciou kaspázy-8 a kaspázy-9. Aktivácia receptorov smrti ako napríklad rodinou ligandov indukujúcich apoptózu (TRAIL) súvisiacich s nádorovým nekrotickým faktorom (TNF) a väzbou ligandov, vedie následne k náboru adaptívnych proteínov (kaspázy-8 a -10), vrátane domén smrti spojených s Fas (FADD). Kaspázy následne štiepia a uvoľňujú svoje substráty (kaspázy-3, -7 a -6) a spúšťajú proces apoptózy v bunke (Christgen *et al.*, 2022).



Obrázok 5 Prehľad vnútornej a vonkajšie cesty apoptózy. *Internal apoptotic signal* (vnútorný signál apoptózy), *External death receptor pathway* (vonkajšia cesta s receptorom smrti). Prevzaté z (Fricker *et al.*, 2018).

5.8.2 Nekróza

Nekróza je alternatívnou nekontrolovanou formou bunkovej smrti, ktorá je vyvolaná vonkajším poškodením – hypoxiou alebo zápalovým procesom. Tento proces je asociovaný s reguláciou pomocou rôznych prozápalových proteínov a zlúčenín, ako napríklad NF- κ B, vedúci k poškodeniu a prasknutiu bunkovej membrány, rozliatia bunkového obsahu do okolia s vyvolaným poškodením tkaniva. V porovnaní s apoptózou je nekróza energeticky nezávislá, kedy sú bunky pri náhlom šoku (napr. ožiarení, teplom, chemikáliami) poškodené tak vážne, že nie sú schopné ďalšieho fungovania. Reakciou je opuch (onkóza) v dôsledku neschopnosti udržať homeostázu svojho prostredia (D'Arcy, 2019).

5.8.3 Autofágia

Autofágia je katabolický proces, ktorý bunky využívajú na recykláciu intracelulárnych makromolekúl (napr. proteíny) alebo dokonca celých organizmov, pri nedostatočnom množstve živín v organizme alebo bunkovom strese, podporujúci homeostázu a bioenergetické procesy. Tento proces zahŕňa označovanie cieľových štruktúr alebo organel, ktoré budú začlenené do vezikul a následne fúzané s lyzosómami vedúcimi k ich degradácii. Autofágia je adaptačným procesom, ale za určitých podmienok môže podporovať programovanú bunkovú smrť, nekroptózu či ferroptózu (Strasser & Vaux, 2020, Sauler *et al.*, 2019).

5.8.4 Pyroptóza

Pyroptóza je forma programovanej bunkovej smrti vyvolaná vnútrobunkovými baktériami ako napríklad *Salmonella* sp. Proces je sprostredkovaný kaspázou-1, ktorá je aktivovaná v rámci takzvaného zápalového tkaniva vyvolaného radom adaptérov alebo kaspázou-11, ktorej aktivácia je vyvolaná intracelulárnym lipopolysacharidom (LPS). Následne dochádza k aktivácii proteínu gasdermin D, ktorý tvorí póry v plazmatickej membráne bunky a kaspázy-3 a -7, degradácii chromatínu a expozícii prozápalových komponent, ktoré vedú

k bunkovej smrti. Inflamasómy predstavujú silnú obranu proti patogénom alebo bunkovému stresu, vedúcemu k lytickej bunkovej smrti, obrane šírenia mikroorganizmov a upozorňovaniu imunitného systému na potenciálne nebezpečenstvo (Strasser & Vaux, 2020, Tong *et al.*, 2022, Bertheloot *et al.*, 2021).

5.8.5 Metódy stanovenia

V ľudskom tkanive sa apoptóza bežne hodnotí ultraštruktúrnymi analýzami bunkovej morfológie sprostredkovanou elektrónovou mikroskopiou, histologickým meraním fragmentácie DNA pomocou TUNEL, prietokovou cytometriou izolovaných buniek s hodnotením expozície fosfatidylserínu (PhSer) a imunohistochémiou proteínov asociovaných s apoptózou (Sauler *et al.*, 2019).

6 CIELE PRÁCE

- Stanovenie fotodynamickej účinnosti SubPc derivátov na nádorových bunkových líniah HeLa a SK-MEL-28.
- Stanovenie „dark“ toxicity týchto derivátov.
- Stanovenie časového profilu prestupu látok do buniek.
- Stanovenie subcelulárnej lokalizácie študovaných SubPc.
- Stanovenie typu bunkovej smrti.

7 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

7.1 Základné vybavenie pre prácu s bunkovými líniami

- sterilné inkubačné nádoby T75 (TPP, Švajčiarsko)
- sterilné plastové serologické pipety rôzneho objemu (TPP, Švajčiarsko)
- sterilné mikroskúmavky rôzneho objemu (Eppendorf, Nemecko)
- Bürkerova komôrka (Brand, Nemecko)
- 96-jamkové mikrotitračné doštičky s plochým dnom (TPP, Švajčiarsko)
- sterilné Pasteurove pipety (Brand, Nemecko)
- sterilné škrabky na bunky (TPP, Švajčiarsko)
- sterilné plastové špičky rôzneho rozsahu (Eppendorf, Nemecko)
- sterilné centrifugačné skúmavky rôzneho objemu (TPP, Švajčiarsko)
- sterilné laboratórne sklo (Simax, Česká republika)
- 96-jamková biela mikrotitračná doštička s čírym dnom na stanovenie luminiscencie a fluorescencie (Corning Incorporated, USA)
- sterilné plastové vaničky (Eppendorf, Nemecko)
- Petriho misky so skleneným dnom vhodné pre konfokálnu mikroskopiu (WillCo Wells B.V., Holandsko)
- sterilné plastové Petriho misky (TPP, Švajčiarsko)
-

7.2 Prístrojové vybavenie

- bunkové inkubátory s termostatom a reguláciou koncentrácie CO₂ (Sanyo, Japonsko a Esco, USA)
- boxy s laminárnym prúdením BioAir TopSafe 1.2 (EuroClone, Taliansko)
- pipetovací nadstavec Biohit Midi Plus (BioHit, Fínsko)
- vodný kúpeľ (Mettler, Nemecko)
- automatické pipety rôzneho rozsahu (Eppendorf, Nemecko)
- 8-kanálová elektronická pipeta e-PET Biohit 50-1200 µl (BioHit, Fínsko)
- 450W xenónová lampa Newport (Newport Corporation, USA)

- centrifúga Hermle Z 300 (Hermle Labor Technik, Nemecko)
- doštičková trepačka Heidolph Titramax 100 (Heidolph Instruments, Nemecko)
- čítačka mikrotitračných doštičiek Tecan Infinite M200 (Tecan Group Ltd., Švajčiarsko)
- čítačka mikrotitračných doštičiek Tecan SPARK (Tecan Group Ltd., Švajčiarsko)
- fluorescenčný spektrofotometer (Edinburgh Instruments, Livingston, Spojené Kráľovstvo)
- invertovaný fluorescenčný mikroskop Nikon TiE (Nikon, Japonsko)
- invertovaný fluorescenčný mikroskop Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Japonsko)

7.3 Chemikálie a reagensy

- Fosfátom pufrovaný fyziologický roztok, tablety (PBS; Sigma-Aldrich, Nemecko)
- trypsin/EDTA (T/E; 10× koncentrovaný, Lonza, Belgicko)
- kultivačné médium DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Lonza, Belgicko)
- kultivačné médium CO₂ Independent Medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA)
- fetálne bovinné sérum (FBS; Sigma-Aldrich, Nemecko)
- penicilín/streptomycín (P/S; 100× koncentrovaný, Lonza, Belgicko)
- ultraglutamín I (Lonza, Belgicko)
- HEPES pufor (Lonza, Belgicko)
- roztok peroxidu vodíka, 3% (Fluka, Sigma, Nemecko)
- trypanová modrá, 0,4% (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma-Aldrich, Nemecko)
- roztok neutrálnej červene, 3,3 mg/ml (NR; Sigma, Nemecko)
- fixačný roztok pre NR (1% CaCl₂ v 0,5% formaldehyde)
- lyzačný roztok pre NR (1% roztok ľadovej kyseliny octovej v 50% etanole)
- digitonín (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- bortetomib (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- FasL (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay (Promega, USA)
- bovinný sérový albumín (BSA; Sigma-Aldrich, USA)
- detekčný kit BCA (Sigma-Aldrich, Nemecko)

- purifikovaná ultračistá voda (MQ-voda, Millipore, USA)
- fluorescenčná sonda LysoTracker™ Blue DND-22 (ThermoFisher Scientific, USA)
- fluorescenčná sonda HCS LipidTOX™ Deep Red Neutral Lipid Stain (ThermoFisher Scientific, USA)
- fluorescenčná sonda MitoTracker™ Green FM (ThermoFisher Scientific, USA)

Skúmané látky:

Vyvíjané a syntetizované v rámci vedeckej skupiny prof. Zimčíka, Katedra farmaceutickej chémie a farmaceutickej analýzy, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova.

- fotosenzitizér 3I-SubPc-CE
- fotosenzitizér 3EtS-SubPc-CE
- fotosenzitizér 3EtS-SubPc-Tyr-FB
- fotosenzitizér 3EtS-SubPc-Tyr-Boc
- fotosenzitizér 12F-SubPc-CE
- fotosenzitizér 12F-SubPc-Tyr-Boc

7.4 Bunkové kultúry

Bunkové kultúry patria k jedným z najcennejších nástrojov, ktoré sa využívajú či už v základnom alebo aplikovanom/klinickom výskume. Bunky sa získavajú izoláciou z ich prirodzeného prostredia (*in vivo*), označované ako primárne bunky, alebo z tzv. bunkových bánk (cell banks), príkladom môže byť americká ATCC (z ang. *American Type Culture Collection*). Takto získané bunky prípadne bunkové línie sa následne množia a študujú *in vitro*. V závislosti na type výskumného projektu a s ním spojené požiadavky je potrebné vybrať bunky a bunky línie, ktoré tieto požiadavky spĺňajú. S experimentálnym procesom sa spája aj správna starostlivosť o bunkové línie a v neposlednom rade aj osobná bezpečnosť a sterilita pri/po práci s bunkami vzhľadom na možnosť vystaveniu sa biologického nebezpečenstva, prípadne kontaminácii bunkových kultúr (Preksha *et al.*, 2021).

Tkanivové kultúry zohrávajú kľúčovú úlohu vo vedeckej oblasti a umožnili rozvoj viacerých oblastí ako napr. biotechnológie, biofarmácie či toxikológie. Ich využitie sa prejavuje najviac vo farmaceutickom výskume zameranom na štúdium absorpcie liečiv a hodnotení ich potenciálnej toxicity. V súčasnej dobe je možné kultivovanie a testovanie látok na dvoch typoch kultúr a to: 2D a 3D. Za klasické bunkové kultúry sa považujú 2D kultúry, ktoré majú svoje obmedzenia a špecifiká bunkového rastu a diferenciácie. Dôležitú úlohu v procese kultivácie 2D kultúr hrá použité inkubačné médium, ktoré poskytuje živiny, rastové faktory či antibiotiká zabraňujúce kontaminácii. Optimalizáciou podmienok ako teploty, koncentrácie plynu či primeranej vlhkosti je možné doceliť požadované prostredie na experimentálne testovanie. Využitie 3D bunkových kultúr pre zmenu umožnilo rekonštruovať mikroprostredie nádoru, a tým napodobniť podmienky *in vivo* a sledovať interakcie medzi bunkami navzájom (Bober *et al.*, 2022).

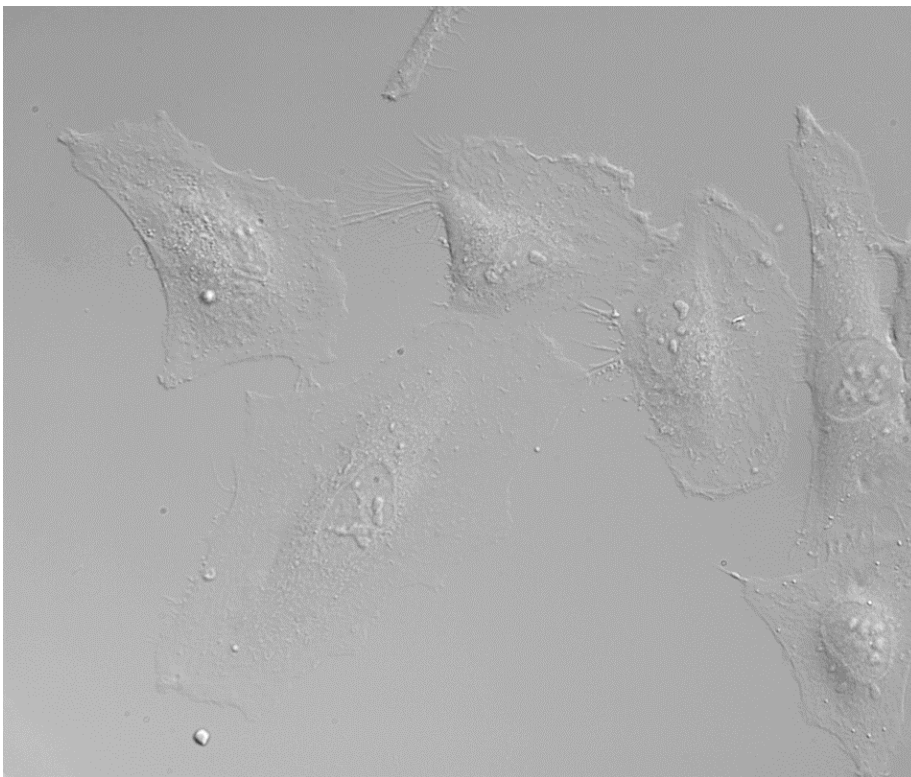
V rámci našich experimentálnych stanovení sa použili 2D bunkové kultúry HeLa a SK-MEL-28, ktoré boli zaobstarané od ATCC.

7.4.1 Bunková línia HeLa

Rakovinové bunky, nazývané ako HeLa bunky, podľa Henrietty Lacksovej, boli prvou ľudskou bunkovou líniou. Henrietta Lacksová v roku 1951 zomrela na vážny a agresívny

adenokarcinóm krčka maternice, kedy sa po prevedení biopsie tkaniva zistilo nepretržité bunkové delenie prítomných nádorových buniek. Tento objav predstavoval prelom v biomedicínskom výskume a diagnostike mnohých ochorení (Lucey *et al.*, 2009).

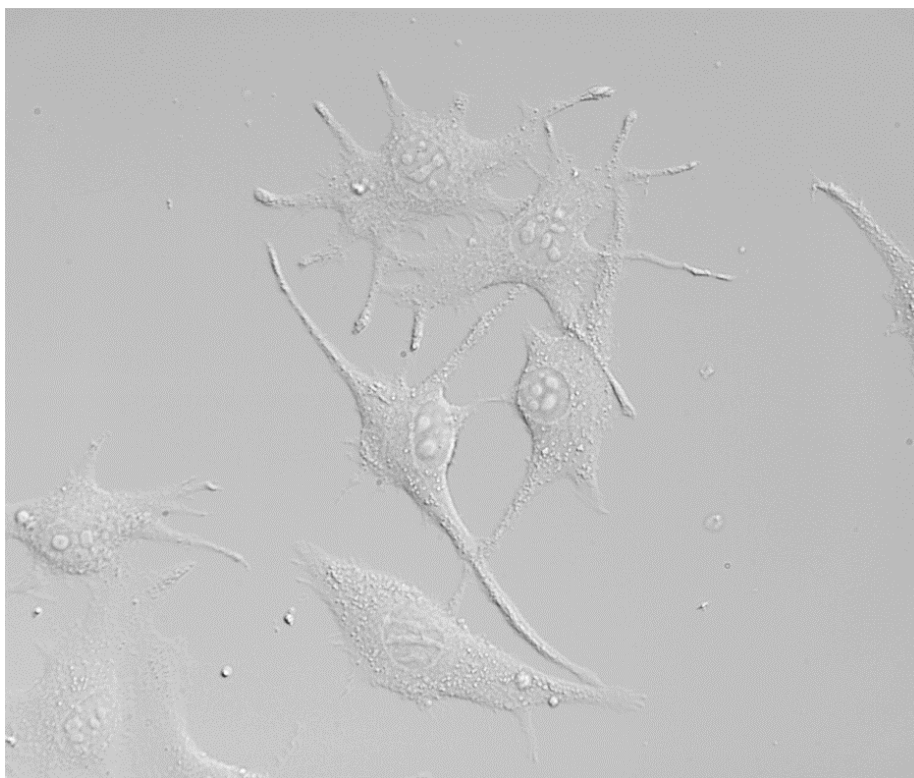
Výskumné práce a štúdiá uskutočnené na HeLa bunkách prebiehajú celosvetovo. Experimentálne práce sa spočiatku zameriavali hlavne na protinádorovú terapiu, metabolizmus liečiv, génovú expresiu či syntézu bielkovín. Diagnostika sa postupne, vďaka modernému technickému vybaveniu, zameriava na sekvenovanie DNA a RNA, pričom odhaľuje a poskytuje podrobný popis genómových variant genómu nádorových buniek (Zhao *et al.*, 2014, Landry *et al.*, 2013).



Obrázok 6 HeLa bunky v diferenciálnom interferenčnom kontraste. Zväčšenie objektívu 60×.

7.4.2 Bunková línia SK-MEL-28

Bunková línia SK-MEL-28 predstavuje ľudské melanómové nádorové bunky. Ich štúdium sa v posledných rokoch zvýšilo vzhľadom na exponenciálny nárast rakoviny kože vo vyspelých krajinách (Zeng *et al.*, 2014).



Obrázok 7 SK-MEL-28 bunky v diferenciálnom interferenčnom kontraste. Zväčšenie objektívu 60×.

7.4.3 Kultivačné médium

Kultivačné médium je jednou zo základných a najdôležitejších zložiek potrebných k udržaniu viability bunkových kultúr. Jeho príprava si vyžaduje dodržanie sterilných podmienok, čo bolo zabezpečené prácou v prostredí laminárnych boxov. Pred prípravou média sa jednotlivé zložky, okrem HEPES pufru a ultraglutamínu, vytemperovali vo vodnom kúpeli na teplotu 37 °C.

Kultivačné médium pre HeLa bunky a bunky SK-MEL-28 má identické zloženie všetkých použitých komponent. Kultivačné médium pre tieto dve bunkové línie sa pripravilo z DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) bez prídavku fenolovej červene a glutamínu. Do média sa postupne pridali jednotlivé zložky: HEPES pufor (1 %), ďalej FBS (10 %), P/S (1 %) a ultraglutamin I (2 %). Médium, ktoré obsahuje prídavok FBS séra, sa taktiež označuje ako SCM, čiže sérum obsahujúce médium (*serum-containing medium*), využívané k samotnej kultivácii a experimentálnej práci s bunkami. U niektorých experimentov (subcelulárna

lokalizácia) sa na rozdiel od SCM kultivačného média použilo SFM médium (bezserové médium, *serum free medium*) s totožným zložením, ale bez prídavku FBS.

Pre metodiku stanovenia bunkovej smrti kitom RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay sa použilo *CO₂ independent medium* (špeciálne médium nezávislé od prítomnosti vyššej koncentrácie *CO₂* v atmosfére inkubátora) doplnené 10 % FBS, 1 % P/S a 2 % ultraglutamin I. Médium sa pripravovalo, rovnako ako predošlé média, za sterilných podmienok laminárneho boxu, uchovávané v chladničke a pred experimentálnou prácou temperované a premiešané.

Takto pripravené a hotové médiá, obsahujúce všetky potrebné zložky, boli na záver dôkladne premiešané a skladované v chladničke pre samotnú prácu s bunkovými kultúrami. Pred každým použitím sa pripravené médiá nechali vytemperovať vo vodnom kúpeli na požadovaných 37 °C a dôkladne zamiešali.

7.4.4 Inkubácia buniek

Kultivácia bunkových kultúr HeLa a SK-MEL-28 prebiehala v bunkových inkubátoroch pri teplote 37 °C, 5% *CO₂* atmosfére a konštantnej humidite. Bunky boli kultivované a uchovávané v SCM médiu v sterilných plastových inkubačných fľašiach T75. Všetka potrebná práca prebiehala v sterilnom laminárnom boxe, podľa štandardného pracovného protokolu práce s bunkami.

Inkubačné podmienky buniek HeLa k stanoveniu bunkovej smrti sa líšili v porovnaní s bunkami určenými k cytotoxicitným experimentom. Bunky sa kultivovali štandardne v T75 kultivačných fľašiach v inkubátore pri 37 °C, ale bez kontroly vlhkosti a *CO₂* atmosféry. Vzhľadom na tieto obmedzenia bolo potrebné aby sa kultivačné médium (*CO₂ independent medium*) menilo každý druhý deň.

Podmienky inkubácie buniek pre subcelulárnu lokalizáciu sú zhodná s podmienkami pri postupe stanovenia cytotoxicity a časovému prestupu látok do bunky.

7.4.5 Bunková pasáž

Pasážovanie, označované aj ako proces subkultivácie, je dôležitou metódou udržania životaschopnosti bunkových kultúr v podmienkach *in vitro*. Ide o prenos časti vykultivovaných buniek do novej inkubačnej fľaše s čerstvým kultivačným médiom, v čo najpravidelnejších intervaloch, kvôli spotrebe živných látok z média a prítomnosti metabolickým produktov buniek.

Dôležitou podmienkou v procese pasážovania je stav konfluencie buniek v kultivačnej nádobe. Je to stav, kedy bunky pokrývajú čo najväčší povrch dna kultivačnej nádoby a dostávajú sa do vzájomného kontaktu medzi sebou. Odporúčaný stav konfluencie sa pohybuje medzi 80-90%, kedy sa mikroskopicky sledujú morfológické zmeny a tvar buniek, prípadne prítomnosť kontaminácie, v priebehu 3 – 4 dní pred pasážovaním. Tento časový interval medzi jednotlivými pasážami je zvolené kvôli zamedzeniu nežiadúcich morfológických zmien na bunkách, zmenám ich vlastností či životaschopnosti, alebo zamedzeniu nežiadúcej kontaminácie.

Celý proces pasážovania buniek sa uskutočnil za prísne sterilných podmienok v prostredí laminárneho boxu a všetky potrebné roztoky boli vopred temperované vo vodnom kúpeli na požadovaných 37 °C.

Prvý krok v procese bunkovej pasáže je odobratie starého kultivačného média z pôvodnej inkubačnej fľaše a oplach bunkovej kultúry predhriatym roztokom sterilného PBS pufra. Oplach buniek sa vykonal dvakrát, aby došlo k dostatočnému odstráneniu séra, ktoré môže negatívne ovplyvniť ďalší proces, vzhľadom na prítomnosť inaktivujúcich zložiek trypsínu v ďalšom postupe práce. V druhom kroku nasledovalo pridanie 1 ml roztoku trypsínu (T/E) rovnomerne po celom dne nádoby, a to z dôvodu, aby došlo k oddeleniu buniek od jej dna. Takto pripravené nádoba je vložená do inkubátora na maximálnu dobu 5 minút pri teplote 37 °C. V tomto časovom intervale nastáva proces označovaný ako trypsinizácia, kedy sa bunky oddeľujú od dna nádoby pôsobením proteáz, a stávajú sa bunkovou suspenziou. Priebežne sa uskutoční kontrola v mikroskope či došlo k oddeleniu všetkých buniek a vytvoreniu dostatočnej suspenzie. Následne bolo potrebné proces trypsinizácie v nádobe ukončiť, aby nedošlo k poškodeniu buniek. Do nádoby sa pridalo 9 ml predhriateho SCM média, ktoré pôsobí inaktivujúco voči roztoku trypsínu.

Ďalším krokom bolo resuspendovanie buniek. Dôkladným resuspendovaním buniek a opláchnutím dna nádoby procesom, kedy bola opätovne nasatá a vypustená bunková suspenzia do pipety proti dnu nádoby, sa docielil vznik homogénnej suspenzie bez prítomnosti zhlukov buniek. Množstvo suspenzie, ktoré sa odoberie do novej nádoby sa volí podľa aktuálneho stavu konfluencie a stavu z predchádzajúcich pasáží. Časť takto pripravenej suspenzie sa odobrala do novej sterilnej inkubačnej fľaše s obsahom 15 ml vopred nahriateho nového média SCM. Opätovne sa nová suspenzia premiešala dôkladne s čerstvým médiom a rovnomerne sa rozprestrela po dne nádoby. Takto pripravené bunky boli ďalej kultivované podľa štandardných podmienok popísaných vyššie (kapitola 7.4.4 Inkubácia buniek) do ďalšej pasáže. Zvyšok bunkovej suspenzie v starej nádobe sa použil na experimenty.

Podmienky kultivácie a pasážovania HeLa buniek určených k stanoveniu bunkovej smrti si vyžadovali zmenu štandardne zavedených postupov. Bunky k tomuto stanoveniu bolo potrebné prispôbiť na atmosféru bez CO₂. Spasážovanie buniek prebehlo v prvý deň do pôvodného SCM média a *CO₂ independent medium* v pomere 1:1. Na druhý deň sa toto kultivačné médium vymenilo iba za čisté *CO₂ independent medium*, v ktorom sa bunky uchovávali počas celej doby experimentu. Inkubácia prebiehala pri 37 °C, bez prítomnosti CO₂ atmosféry a zvýšenej vlhkosti.

Bunky pre stanovenia cytotoxicity, subcelulárnej lokalizácie a časového prestupu látok bunkou majú zhodný proces pasážovania a následnej kultivácie.

7.4.6 Stanovenie počtu životaschopných buniek

Stanovenie počtu životaschopných buniek, označované aj ako test vylúčenia farbiva bunkou, je jednoduchou a rýchlou technikou merania viability buniek. K stanoveniu sa využíva trypanová modrá, eozín alebo jodid propidia, kedy sa sleduje stav integrity bunkovej membrány živých buniek (Strober, 2015).

Princípom stanovenia počtu životaschopných buniek je schopnosť buniek absorbovať farbivo, v tomto prípade roztok trypanovej modrej, ktoré difunduje cez plazmatickú membránu a dostáva sa ľahko do vnútra bunky. Hlavný rozdiel spočíva v schopnosti živých buniek toto farbivo transportovať cez membránu bunky. Živé bunky sú schopné toto farbivo aktívne transportovať cez membránu opäť von, v porovnaní s mŕtvymi bunkami, kedy je táto funkcia

porušená a farbivo je zadržované vo vnútri bunky, kde sa hromadí. Mikroskopicky je možné pozorovať živé bunky, ktoré sú zobrazené na svetlo modrom pozadí ako svetlé sférické útvary a bunky mŕtve sfarbené sýto modro, kvôli nahromadenému farbivo vo vnútri bunky.

K stanoveniu sa využívala Bürkerova komôrka. Ako prvé sme si pripravili mikroskúmvku, kde sme si napipetovali 100 μ l 0,4% roztoku trypanovej modrej a 100 μ l dobre premiešanej bunkovej suspenzie, ktorá nám zostala v rámci procesu pasážovania (kap. 7.4.5 Bunková pasáž). Obsah mikroskúmvky sa poriadne premiešal na vortexe a nechal inkubovať 5 minút pri laboratórnej teplote. Po tomto časovom intervale sa zmes opäť poriadne premiešala a aplikovala na každú z polovic Bürkerovej komôrky v objeme 10 μ l. Na každej z polovic komôrky, konkrétne v piatich štvorcoch, sa pod mikroskopom hodnotil počet živých, pre nás vizuálne neofarbených buniek, ktorý sa vo finále prepočítal na objem 1 ml bunkovej suspenzie.

7.4.7 Nasadzovanie buniek na experiment

K zabezpečeniu čo najväčšej zhody (konštantnosti) v rámci výsledkov a ich reprodukovateľnosti v sérii meraní, sa s bunkovými kultúrami pracovalo v sterilnom prostredí laminárneho boxu. Vzhľadom na typ experimentu sa volili požadované sterilné plastové nádoby, v ktorých prebiehali stanovenie. Pre cytotoxicitné merania sa zvolila koncentrácia 75 000 buniek/ml. Bunky sa získali odberom požadovaného množstva bunkovej suspenzie zo starej kultivačnej nádoby po procese pasážovania (kapitola 7.4.5).

Na začiatku sa ako prvé vypočítal objem SCM média a množstvo bunkovej kultúry potrebnej k zachovaniu zvolenej koncentrácie. Hodnoty sa získali výpočtom výsledného počtu živých buniek zo suspenzie v trypanovej modrej. Následne sa pripravila sterilná plastová vanička, do ktorej sa napipetovalo potrebné množstvo čerstvého vopred vytemperovaného média z vodného kúpeľa a objem bunkovej suspenzie. Vo vaničke sa táto zmes poriadne premiešala a s pomocou elektrickej multikanálovej automatickej pipety sa suspenzia buniek a média aplikovala do jamiek 96-jamkovej mikrotitračnej doštičky v množstve 100 μ l/jamku. Pre každú jamku tým pripadá obsah približne 7 500 buniek. Mikrotitračná doštička sa na záver vložila do bunkového inkubátora na 24 hodín, kde bola inkubovaná za štandardných podmienok. Časový interval 24 hodín spolu s vhodnými podmienkami v priestoroch

inkubátora, zabezpečili dostatočné množstvo narastených buniek potrebných k uskutočneniu požadovaných experimentov.

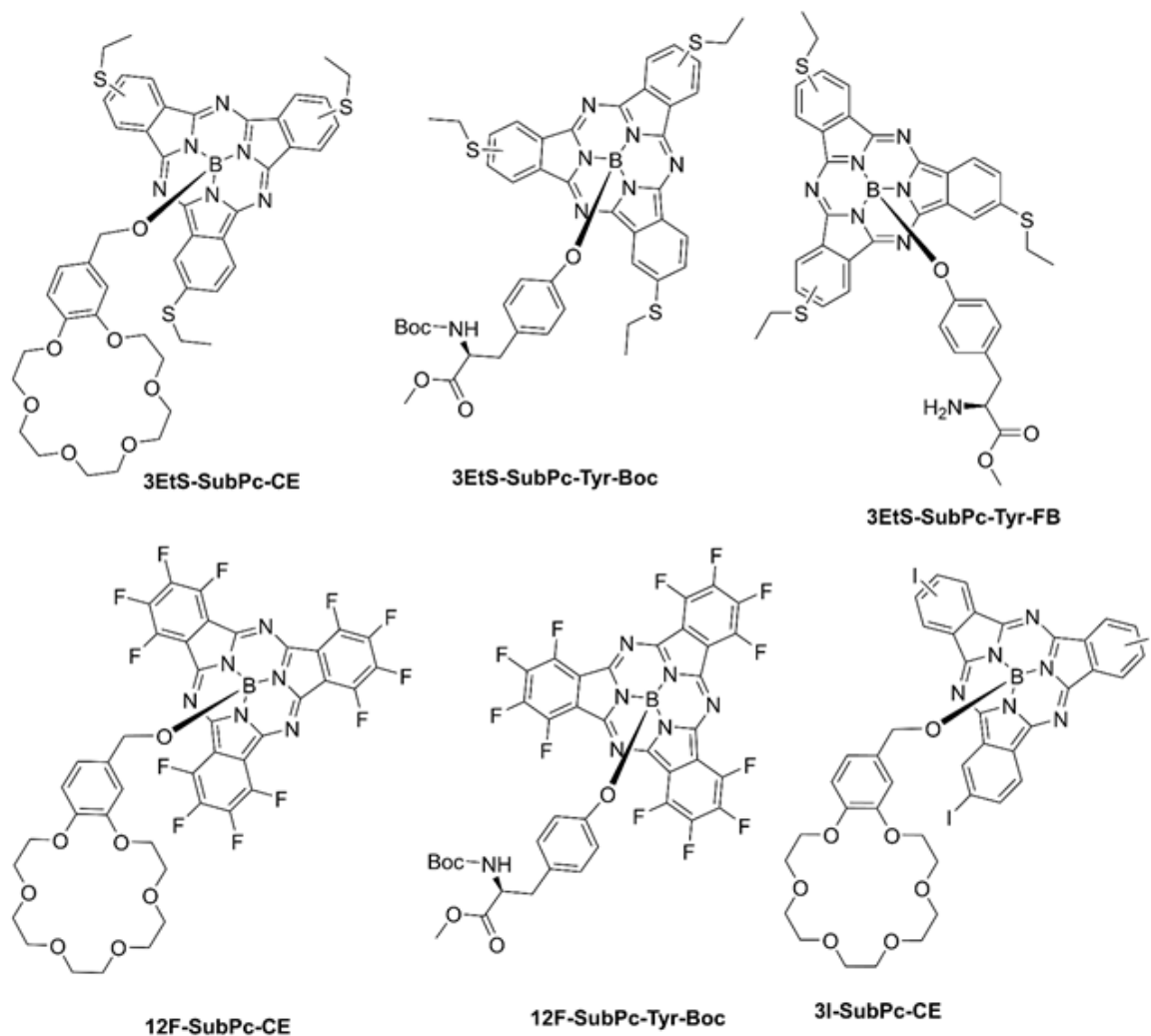
K zadokumentovaniu subcelulárnej lokalizácie sa použili sterilné plastové Petriho misky so skleneným dnom (s priemerom 3 cm) špeciálne určené pre konfokálnu mikroskopiu. Rovnako ako pri cytotoxicitných experimentoch sa pripravila zmes buniek v SCM médiu, pričom sa postup prípravy zmesi zhodoval. Pipetovaný objem sa v tomto prípade ale líšil v porovnaní s fototoxickými stanoveniami. Na dno Petriho misky sa napipetovalo 500 μ l zmesi. Takto pripravené misky boli inkubované podľa štandardných podmienok 24 hodín.

Bunky nasadzované k experimentálnemu stanoveniu časového prestupu látok do bunky mali obdobný proces nasadzovania ako pri subcelulárnej lokalizácii (sterilné Petriho misky s priemerom 6 cm, hustote 5×10^5 buniek/jamku v objeme 5 ml, inkubácia za štandardných podmienok (37 °C, 5% CO₂) na dobu 24h).

Postup práce pri stanovení životaschopnosti buniek v zmesi trypanovej modrej a pri nasadzovaní buniek pre stanovenie bunkovej smrti sa zachoval rovnaký. Nariedená bunková suspenzia spolu so špeciálne určeným médiom (v tomto prípade *CO₂ independent medium*) pre toto stanovenie, bola aplikovaná do jamiek 96-jamkovej bielej doštičky s priehľadným dnom. Typ doštičky sa líšil oproti tým, ktoré sa používajú k stanoveniu fotodynamickéj aktivity látok, preto aby sa pri procese ožiarenia a následného zaznamenávania luminiscenčného a fluorescenčného signálu eliminovala interferencia v rámci jednotlivých jamiek doštičky. Inkubácia buniek prebiehala podľa rovnakých podmienok ako je opísané v kap. 7.4.5.

7.5 Študované fotosenzitizéry

Všetky študované a experimentálne testované PS zahrnuté v praktickej časti tejto diplomovej práce boli syntetizované na Farmaceutickej fakulte v Hradci Králové (Univerzita Karlova). Samotným vývojom a syntézou sa zaoberala vedecká skupina z katedry Farmaceutickej chémie a farmaceutickej analýzy pod vedením prof. PharmDr. Petra Zimčíka, Ph.D.



Obrázok 8 Štruktúry experimentálne testovaných PS. Subftalocyaníny s axiálne naviazaným benzocrownom (3I-SubPc-CE, 3EtS-SubPc-CE a 12F-SubPc-CE) a metylesterom tyrozinu (3EtS-SubPc-Tyr-FB, 12F-SubPc-Tyr-Boc a 3EtS-SubPc-Tyr-Boc).

Študované látky patria do skupiny SubPc. V porovnaní s Pc sa líšia prítomnosťou iba troch izoindolových skupín a v centrálnej časti štruktúry je lokalizovaný atóm bóru. Ďalším rozdielom je priestorová orientácia SubPc štruktúry. Oproti Pc, ktoré sú planárne rozložené v priestore, SubPc majú konický až kužeľovitý tvar. Táto vlastnosť im prináša výhodu, kedy SubPc pri aplikácii neagregujú, a tým nie je znížená samotná účinnosť látky. Rozdielom je taktiež aj absorpčné maximum, ktoré sa v porovnaní s PS (napríklad (aza)ftalocyaníny či naftalocyaníny) pohybuje vo viditeľnej časti spektra v rozmedzí 630 – 700 nm (červená oblasť), SubPc majú toto maximum nižšie s hodnotami 530 - 600 nm (zelená oblasť spektra).

Experimentálne skúmané látky majú v axiálnej polohe naviazané substituenty benzocrownu a metylesteru tyrozinu a periférnej časti molekuly etylsulfanylové substituenty, atómy fluóru alebo atómy jódu (Obr.8). Zásobné roztoky boli pripravené rozpustením PS v sterilnom DMSO o koncentrácii 10 mM.

7.5.1 Nasadzovanie látok

Pri nasadzovaní skúmaných látok na kultivačnú doštičku alebo Petriho misky bolo potrebné dodržať viacero kritérií. Jedno z prvých a hlavných kritérií manipulácie s testovanými látkami v zásobných či pracovných roztokoch, a taktiež aj práce s bunkovými kultúrami, bolo dodržanie sterilného pracovného prostredia, ktoré bolo zabezpečené prácou v laminárnych boxoch laboratória. S roztokmi látok bolo potrebné zaobchádzať nielen v čo najsterilnejšom prostredí, ale aj v prostredí bez prístupu svetla (za tmy), prípadne s čo najmenšou intenzitou svetelného žiarenia, aby bolo zabránené predčasnej fotoaktivácii použitých a študovaných PS.

Po inkubácii buniek z procesu ich nasadzovania (kapitola 7.4.7), sa k narasteným bunkám po 24 hodinovom časovom intervale aplikovali rôzne koncentrácie nami študovaných látok. Testované PS sa pripravili do sterilných mikroskúmaviek nariadením sterilných zásob týchto látok SCM médiom, prípadne SFM médiom vzhľadom na typ experimentu. Kultivačné médiá, pre prípravu roztokov či výmenu starého média v inkubačnej nádobe, a samotné pracovné roztoky látok sa pred nasadením temperovali vo vodnom kúpeli na teplotu 37 °C.

U cytotoxicitných experimentov sa po 24 hodinách k narasteným bunkám na 96-jamkovej mikrotitračnej doštičke pridali požadované koncentrácie skúmaného PS pripraveného v SCM médiu. Jednotlivé vybrané koncentrácie látky boli nasadené do zvolených jamiek opatrne výmenou média za roztok danej koncentrácie v objeme 100 µl. Na doštičke sa okrem buniek ovplyvnených PS, zvolili aj bunky neovplyvnené, označené ako negatívna kontrola, bez prídavku študovaného PS u ktorých sa iba vymenilo staré médium za čerstvé. Ďalšia časť buniek, označená ako pozitívna kontrola, bola ovplyvnená letálnym množstvom H₂O₂, ktorá slúžila ako kontrola úmrtnosti buniek. Pred prídavkom H₂O₂ došlo taktiež k výmene starého média za nová. Mikrotitračná doštička, so skúmaným typom PS, bola následne vložená do bunkového inkubátora a inkubovaná podľa štandardných podmienok do doba 12 hodín.

Obdobný postup nasadzovania látok bol aj pri stanovení bunkovej smrti, kedy sa pracovalo s bunkami v 96-jamkovej bielej mikrotitračnej doštičke s čírym dnom. Aplikovanie študovaných látok bolo podobné ako pri experimentálnom stanovení cytotoxicity, s tým rozdielom, že roztoky látok PS boli pripravené v *CO₂ independent medium*. Okrem buniek s testovaným PS boli na doštičke aj bunky neovplyvnené (ako negatívna kontrola). Inkubácia prebiehala 12 hodín pri teplote 37 °C. Zvolené koncentrácie stanovovaných PS odpovedali ich hodnotám EC₈₅.

Pri stanovení subcelulárnej lokalizácie a časovom prestupe látok sa ako prvé odobralo staré kultivačné médium z Petriho misky, ku ktorému sa následne pridali testované PS s danou koncentráciou.

7.6 Cytotoxické metódy

Experimenty sa uskutočnili v klasických čírych 96-jamkových mikrotitračných doštičkách s nasadenými HeLa a SK-MEL-28 bunkami v sterilnom prostredí laminárneho boxu. V závislosti na tom či bola hodnotená toxicita študovaných látok po aktivácii svetlom (fototoxicita) alebo vlastná toxicita látok tzv. „dark“ toxicita (absencia zdroja svetelného žiarenia), sa pracovný postup stanovenia líšil.

7.6.1 Fotoaktivácia látok

Fototoxicita je termín označujúci toxicitu látok vyvolanú po ich aktivácii požadovaným typom žiarenia. K hodnoteniu sa použili bunky pripravené podľa vyššie popísaného postupu (kap. 7.4.7) a inkubované s testovanými PS podľa kapitoly 7.5.1.

Po 12 hodinovom časovom intervale inkubácii buniek so študovanou látkou bolo vymenené staré médium za nové médium v celej doštičke. Výmena média prebehla sterilne za tmy v laminárnom boxe pomocou multikanálovej pipety. Oplach buniek vopred vytemperovaným čerstvým médiom v objeme 100 µl sa vykonal v poradí dvakrát za sebou z dôvodu dostatočného odstránenia zvyškového množstva PS, ktoré sa do buniek nedostalo.

Ihneď po výmene sa takto pripravená mikrotitračná doštička preniesla pod 450 W xenónovú lampu osadenú vodným a *long-pass* a vodným filtrom, kde bola ožiarená zhora svetlom z červenej časti viditeľného spektra po dobu 15 minút celá doštička ($\lambda > 570$ nm; 12,4 mW/cm²; 11,2 J/cm²). Po ukončení ožarovania sa doštička umiestnila späť do inkubátora, kde bola inkubovaná za štandardných podmienok ďalších 24 hodín. Na záver sa pomocou metódy NRU (*Neutral Red Uptake Assay*) stanovila životaschopnosť buniek vychytaním NR.

Ožarovanie doštičky na stanovenie bunkovej smrti prebehlo podobným spôsobom – za rovnakej vlnovej dĺžky a času žiarenia. Samotná doštička sa ožarovala zo spodnej časti a vrchná časť sa počas procesu zakrývala hliníkovou fóliou. Pred samotným ožarovaním sa v celej doštičke obdobne vymenilo staré médium za temperované nové *CO₂ independent medium*.

7.6.2 „Dark“ toxicita

„Dark“ toxicita, respektíve vlastná toxicita látok, je termín označujúci toxicitu študovaných látok bez ich predchádzajúceho ožiarovania. Postup prípravy suspenzie buniek, ich nasadzovanie na doštičku a aplikácia testovaných látok sa zhodujú s vyššie popísaným postupom.

Roztoky testovaných PS látok boli pripravené v mnohonásobne vyšších koncentráciách ako v porovnaní pri stanovení fototoxicity. Inkubačná doba PS s bunkami prebiehala namiesto štandardných 12 hodín až v 24 hodinovom časovom intervale. Vzhľadom na fakt, že zásobné roztoky našich skúmaných PS boli pripravené rozpustením v roztoku DMSO, ktorý je toxický pre bunky vo vyšších koncentráciách, bola na doštičku pridaná kontrola toxicity samotného DMSO, aby sa vylúčilo jeho prípadné ovplyvnenie výsledkov.

Dôležitým faktom pri spracovaní tejto metódy bolo zamedzenie prístupu svetla počas celého procesu stanovenia, kedy sa pracovalo prísne za tmy, aby nedošlo k aktivácii látok, čo by spôsobilo vznik falošne zníženej životaschopnosti buniek. Aby sa predišlo aktivácii látok svetlom, boli doštičky s nasadenými látkami, zabalené do hliníkovej fólie a takto inkubované požadovanú dobu. Po uplynutí inkubácie sa pomocou NRU stanovila životaschopnosť buniek rovnakým spôsobom ako pri stanovení fototoxicity.

7.7 Stanovenie viability buniek pomocou neutrálnej červene

Stanovenie počtu životaschopných buniek, na základe absorpcie NR, predstavuje kvantitatívny odhad viability v cytotoxicitných testoch. Ide o najpoužívanejší typ testu využívaný v biomedicínskych, enviromentálnych oblastiach či farmaceutickom, agrochemickom alebo kozmetickom priemysle, ktorý umožňuje *in vitro* kvantifikáciu xenobiotikami indukovanej cytotoxicity. Bol založený v roku 1985, ako náhrada tradičných, subjektívne hodnotených metód hodnotenia cytotoxického potenciálu. NRU je v porovnaní s inými testami (napr. využitie tetrazóliovej soli, stanovenie úniku enzýmov či obsah bielkovín) lacnejší a citlivejší typ. Podstatou je schopnosť životaschopných buniek supravitálne farbivo, v tomto prípade NR (slabé kationické farbivo), viazať a začleniť do lyzosómov a endosómov neiónovou pasívnou difúziou. Vyjadrením cytotoxicity je zníženie príjmu NR po expozícii skúmaného xenobiotika v závislosti od jeho koncentrácie (Repetto *et al.*, 2008, Ates *et al.*, 2017, Cudazzo *et al.*, 2019).

NR (hydrochlorid 3-amino-7-dimetyl-amino-2-metylfenazín) je slabé kationové farbivo, ktoré preniká bunkovou membránou difúziou. V intaktných bunkách sa farbivo viaže a akumuluje s aniónovými miestami v lyzosóme, kde sa nabije a ďalej už voľne do cytoplazmy neprechádza. Poškodenie bunky spôsobí uvoľnenie NR. Pôsobenie xenobiotík na povrch buniek a lyzosomálnu membránu vedie k ich zvýšenej citlivosti a krehkosti, a následnej zníženej schopnosti vychytávať farbivo. Poškodené respektíve mŕtve bunky strácajú schopnosť toto farbivo zadržiavať (Lestari *et al.*, 2010).

NRU bol použitý u oboch typov cytotoxicitných experimentov. Pred samotným spracovaním bolo potrebné pomocou multikanálovej pipety v celej doštičke vymeniť staré médium za nové v objeme 100 µl dvakrát za sebou. Oplachom buniek čerstvým predhriatym PBS, pred pridaním pracovného roztoku NR, slúžil ku odstráneniu zvyšných PS, ktoré by pri nasledovnom spracovaní a vyhodnotení mohli viesť k falošne zvýšenej absorbancii alebo k interferencii s vychytávaním NR. Príprava pracovného roztoku NR prebehla nariadením zásobného roztoku NR (3,3 g/l) s príslušným objemom média. Takto pripravený roztok sa pomocou multikanálovej automatickej pipety aplikoval do jednotlivých jamiek v celej doštičke v objeme 100 µl. Následne bola doštička s bunkami a napipetovaným roztokom NR vložená do inkubátora, kde prebehla 2 hodinová inkubácia za štandardných podmienok (37 °C, 5% CO₂).

Po skončení inkubácie buniek s NR sa z doštičky odstránilo všetko médium. Bunky v každej jamke mikrotitračnej doštičky boli fixované roztokom 1% CaCl₂ v 0,5% formaldehyde. Fixačný roztok sa s použitím automatickej multikanálovej pipety aplikoval na celú doštičku v množstve 100 µl/jamku a po časový interval 15 minút nechal inkubovať pri laboratórnej teplote.

Následne sa fixačný roztok z doštičky odstránil a fixované bunky na dne jamiek mikrotitračnej doštičky boli opláchnuté dvakrát 100 µl PBS. Ako posledné sa do celej doštičky multikanálovou automatickou pipetou pridalo 100 µl lyzačného roztoku (1% roztok ľadovej kyseliny octovej v 50% etanole). Doštička s lyzačným roztokom bola umiestnená na doštičkovú trepačku na 30 minút, kedy pri laboratórnej teplote došlo k lýze buniek.

Po skončení finálnej inkubácie sa lyzované bunky v doštičke hodnotili pomocou spektrofotometra Tecan Infinite M200 pri vlnovej dĺžke 540 nm. Pomocou programu Microsoft Office Excel sa zaznamenané výsledné hodnoty absorbancií spracovali. Životaschopnosť buniek bola vyjadrená ako percento negatívnej kontroly (neovplyvnené bunky, 100 %) po odčítaní pozitívnej kontroly (pozadie).

7.8 Stanovenie bunkovej smrti

Plazmatická membrána zdravých buniek je zložené z množstva lipidov, ktoré sú asymetricky rozložené na vnútornom a vonkajšom povrchu membrány. Jedným z týchto lipidov je PhSer, ktorý sa bežne nachádza na vnútornej strane, vystavený bunkovej cytoplazme. Počas poškodenia bunky apoptózou sa asymetria stráca a PhSer zmení lokalizáciu na vonkajší povrch. Annexin V (36-kDa proteín viažuci vápnik) sa viaže s PhSer. Fluorescenčne značený Annexin V sa používa na detekciu exponovaného PhSer na vonkajšej membráne apoptotických buniek, ale aj nekrotických buniek, ktoré majú porušenú membránu, čo umožňuje vstup Annexinu V do cytoplazmatického priestoru buniek (Crowley *et al.*, 2016).

Test určenia typu bunkovej smrti je založený na meraní životaschopnosti buniek, kineticky v reálnom čase na základe expozície PhSer na vonkajšom povrchu plazmatickej membrány v rámci procesu apoptózy. K stanoveniu sa použil luminiscenčný kit (Promega Corporation, USA). Zaznamenávanie luminiscenčného a fluorescenčného signálu prebiehalo na čítačke mikrotitračných doštičiek. V detekčnom kite RealTime-Glo™ Annexin V sa

nachádza ekvimolárne množstvo dvoch podjednotiek Annexin V fúzných proteínov – Annexin V-LgBiT a Annexin V-SmBiT. Súčasťou testu je aj profluorescenčné farbivo, ktoré má afinitu k DNA (test nepriepustnosti bunkovej membrány).

Predchádzajúce kroky ako pasážovanie, stanovenie počtu životaschopných buniek trypanovou modrou, ich nasadzovanie na doštičku, aplikovanie skúmaných PS a ich fotoaktivácia boli opísané vyššie v predchádzajúcich kapitolách.

Dôležitým rozdielom v porovnaní s cytotoxicitnými stanoveniami bolo použitie iného typu kultivačného média, mikrotitračnej doštičky a meracieho zariadenia. Bunky pred zahájením experimentálneho stanovenia bolo potrebné prispôbiť na iné podmienky – bežná atmosféra (nižšia koncentrácia CO_2). To sa docielilo kultiváciou buniek v špeciálnom kultivačnom médiu (*CO₂ independent medium*, Gibco, USA). Na stanovenie bunkovej smrti bola použitá špeciálna biela sterilná 96-jamková mikrotitračná doštička s transparentným dnom, čo zamedzilo medziprechodu fluorescenčného a luminiscenčného signálu v rámci jamôčok doštičky. Hodnoty luminiscenčného a fluorescenčného žiarenia sa zaznamenávali na čítačke mikrotitračných doštičiek vybavenou zariadením na zaznamenávanie týchto dvoch výsledných hodnôt (Tecan SPARK, Tecan Group Ltd., Švajčiarsko).

Detekčné reagenty testu bunkovej smrti sa pred stanovením uchovávali v mrazničke. Pred aplikáciou sa jednotlivé substráty nechali rozmraziť a vytemperovať na laboratórnu teplotu. Komponenty súpravy kitu je možné použiť a spotrebovať ihneď, prípadne je možné ich rozdeliť a s jednotlivými alikvotmi pracovať individuálne. Substrát Annexin V NanoBiT[®] je rozpustný vo väčšine používaných kultivačných médií, pričom jeho potenciál je možné zvýšiť prídavkom sérových doplnkov, napr. 10% FBS alebo 10% konské sérum. Väzobnú interakciu je možné zlepšiť aj medzi Annexinom V a PhSer a to prídavkom $CaCl_2$, ktorý je pre túto väzbu kľúčový. V rámci stanovenia sa odporúča okrem samotných buniek s testovanou látkou zaradiť aj kontroly so substrátmi a bez substrátov, aby bolo možné posúdenie a potvrdenie znášanlivosti reagentov zo súpravy.

V rámci nášho experimentálneho stanovenia boli zaradené 3 typy kontrol:

- A. Kontrola bez zlúčenín, iba s bunkami (100 μ l média a 100 μ l detekčného činidla). Tento typ kontroly slúžil ako kontrola životaschopnosti buniek.
- B. Kontrola so zlúčeninami označená ako pozitívna kontrola (100 μ l média, 100 μ l činidla indukujúceho typ bunkovej smrti spolu s detekčným činidlom). Táto kontrola

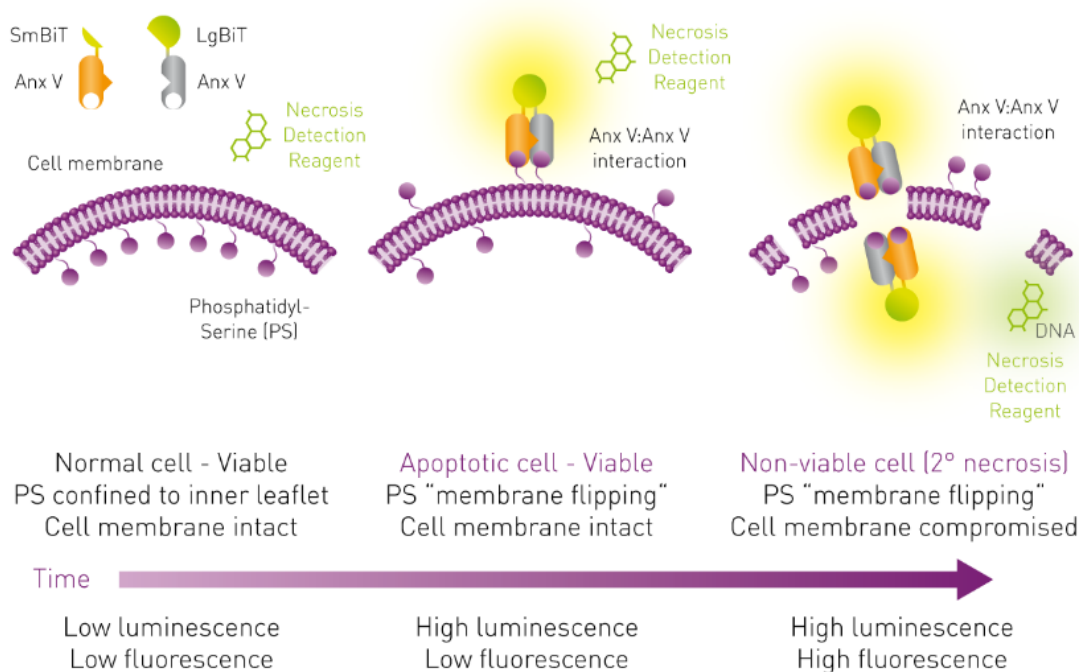
viedla k stanoveniu relatívnej veľkosti odozvy skúmaných látok a preukázanie pozitivity kontroly činidla.

- C. Kontrola bez buniek (100 μ l média a 100 μ l detekčného činidla). Kontrola slúžila k detekcii nešpecificky vygenerovaného luminiscenčného a fluorescenčného signálu pozadia pri stanovení. Priemerné hodnoty pozadí týchto dvoch parametrov sa odčítavali od všetkých skúmaných vzoriek, kvôli normalizácii údajov stanovenia.

V prvom kroku, pred samotnou prípravou detekčného činidla, bolo potrebné substráty Annexin V NanoBiT[®], CaCl₂ a detekčný reagent nekrózy rozmraziť a vytemperovať na laboratórnu teplotu, ďalšie substráty ako Annexin V-SmBiT a Annexin V-LgBiT sa vložili do ľadu. Po vypočítaní potrebného objemu jednotlivých komponent pre prípravu detekčného činidla sa do sterilnej plastovej 15 ml skúmavky pridalo ako prvé predhriate sterilné kultivačné médium. Následne sa postupne v jednotlivých krokoch pridali požadované alikvotné objemy Annexinu V NanoBiT, CaCl₂ a činidlo detekujúce nekrózu. Medzi každým aplikovaným substrátom sa celý objem skúmavky zvortexoval. Na záver sa pridala Annexin V-SmBiT a Annexin V-LgBiT substrát a obsah skúmavky sa opatrne premiešal, aby sa predišlo vzniku bublín.

Po fotoaktivácii skúmaných PS (450 W xenónová lampa; $\lambda > 570$ nm; 12,4 mW/cm²; 15 min, 11,2 J/cm²) sa na celú mikrotitračnú doštičku aplikovalo detekčné činidlo. Obsah skúmavky sa preliat do sterilnej vaničky a pomocou automatickej multikanálovej pipety aplikovalo 100 μ l detekčného reagentu na každú jamku doštičky. Po napipetovaní sa takto pripravená doštička vložila na doštičkovú trepačku na dobu 30s pri 500 – 700 rpm, aby sa docielilo rovnomernému a kompletnému rozloženiu substrátu so skúmanými látkami v jamkách doštičky. Doštička s krytom (zamedzenie kontaminácie a teplotným rozdielom) sa na záver vložila na čítačku mikrotitračných doštičiek Tecan SPARK (Tecan Group Ltd., Švajčiarsko), kde sa v 15 minútových intervaloch v priebehu 24-48 hodín zaznamenávali hodnoty luminiscencie a fluorescencie. Celý postup práce prípravy detekčného reagentu a aj jeho samotné aplikovanie na doštičku prebiehalo v laminárnom boxe a za tmy.

RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis Assay



Obrázok 9 Stanovenie bunkovej smrti pomocou kinetickej metódy RealTime-Glo™ väzbou Annexin V na PhSer. Prevzaté z (Real-time assessment of apoptosis and necrosis, BioTechniques, 2018). *Anx V SmBiT & Anx V LgBiT* (Annexin V s podjednotkami SmBit a LgBiT), *necrosis detection reagent* (detekčné činidlo pre nekrózu), *phosphatidyl-serine* (PhSer), *cell membrane* (bunková membrána), *Anx V:Anx V interaction* (väzba podjednotiek Annexinu V).

7.9 Časový profil prestupu skúmaných látok do buniek

Časový profil prestupu skúmaných látok do buniek, bol uskutočnený na bunkových líniiach HeLa a SK-MEL-28. Bunky boli nasadené na sterilné Petriho misky s priemerom 6 cm o hustote 5×10^5 buniek/jamku v objeme 5 ml a inkubované za štandardných podmienok (37°C , 5% CO_2) na dobu 24 hodín.

Na druhý deň sa k narasteným bunkám, po odpipetovaní starého média, pridal nami študovaný SubPc v objeme 5 mL $1\mu\text{M}$ roztoku rozpusteného v médiu. Po inkubačnej dobe v časových intervaloch 0, $\frac{1}{2}$, 1, 2, 4, 8, a 12 hodín sa jednotlivé bunky dvakrát opláchli predhriatym PBS pufrom (Sigma-Aldrich, Nemecko). Po pridaní 5 ml PBS boli bunky dôkladne zoškrabané z dna Petriho misky pomocou bunkovej škrabke a bola zozbieraná suspenzia buniek Pasterovou pipetou do 15 mL plastových skúmaviek, tento krok sa následne

zopakoval ešte raz. Následne sa jednotlivé skúmavky s bunkovými suspenziami centrifugovali 5 minút pri 1500 rpm. Supernatant bol odstránený a k sedimentu vyschnutých buniek bolo pridaných 0,5 ml DMSO (Sigma-Aldrich, Nemecko). Resuspendované a lyzované vzorky buniek s PS boli pomocou pipety prenesené do 1,5 ml mikroskúmaviek a uchované v mrazničke pri teplote -20 °C do druhého dňa.

Na druhý deň boli jednotlivé vzorky zahratie na laboratórnu teplotu a stanovená koncentrácia PS meraním fluorescenčného signálu. Fluorescenčné žiarenie vzoriek látok bolo merané s využitím FS5 spektrofotometra (Edinburgh Instruments, Livingston, Spojené Kráľovstvo) pri vlnových dĺžkach odpovedajúce maximám ich emisných spektier. K zostrojeniu kalibračnej krivky sa použili zriedené roztoky farbív v bunkovom lyzáte (narastené bunky bez študovaných PS a spracované podľa postupu vyššie).

7.10 Stanovenie množstva bielkovín

Stanovenie množstva bielkovín vo vzorkách sa uskutočnilo pomocou metódy BCA (*bicinchoninic acid*). Do jamiek 96-mikrotitračnej doštičky sa napipetovalo 10 µl jednotlivých študovaných vzoriek (rozpustených v DMSO). Koncentračná rada roztokov BSA, potrebná ku zostrojeniu kalibračnej krivky, bola pripravená rozpustením BSA v MQ-vode a to v koncentráciách 0; 50; 100; 200; 400; 600; 800; 1000 a 2000 µg/ml. Z pripravených koncentračných roztokov sa do daných jamiek mikrotitračnej doštičky napipetuje 10 µl. Vzhľadom na to, že vzorky a koncentračná rada boli rozpustené v rozdielnych rozpúšťadlách bola táto nesúrodosť vykompenzované pridaním 10 µl MQ-vody ku všetkým vzorkám a pridaním rovnakého objemu DMSO ku koncentračnej rade BSA.

Samotný roztok BCA bol pripravený v pomere 1:50, kedy sa zmiešal 4% roztok $\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a zásobný roztok BCA. Takto pripravený roztok bol pridaný do všetkých jamiek v objeme 200 µl/jamku pomocou automatickej multikanálovej pipety. Mikrotitračná doštička sa následne nechala inkubovať po dobu 30 minút v bunkovom inkubátore pri teplote 37 °C. Po uplynutí tejto časovej doby sa merala výsledná absorbanca na čítačke mikrotitračných doštičiek Tecan Infinite M200 (Tecan Group Ltd., Švajčiarsko) pri vlnovej dĺžke 562 nm.

7.11 Hodnotenie výsledkov

Hodnoty cytotoxicitných testov boli spracované pomocou programu Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA) a s využitím softwaru GraphPad Prism (GraphPad Software, USA) sa zo získaných dát experimentálne skúmaných látok vytvorili grafy, pomocou ktorých sa zistili hodnoty EC_{50} a TC_{50} .

Výsledky fototoxických experimentov predstavovali hodnoty strednej efektívnej (terapeutickej) koncentrácie, označované ako EC_{50} . Ide o koncentrácie experimentálne skúmaných látok, ktorých hodnoty po ožiarení svetlom spôsobili pokles viability danej bunkovej línie na 50 % v porovnaní s bunkami, ktoré ovplyvnené neboli. Jednotlivé získané hodnoty EC_{50} sa vzťahovali pre každú z testovaných PS.

Rovnakým spôsobom boli vyhodnotené dáta u „dark“ toxicity, pre každú zo skúmaných látok, kedy výsledky predstavovali hodnoty strednej toxickej koncentrácie (TC_{50}) – koncentrácia testovanej látky, ktorá spôsobila zníženie životaschopnosti buniek na 50 % oproti kontrole, kedy v tomto prípade látka nebola aktivovaná svetlom.

7.12 Subcelulárna lokalizácia skúmaných látok

K vytvoreniu mikroskopických snímok bol využitý invertný fluorescenčný mikroskop Nikon Eclipse TiE (Nikon, Japonsko) s chladenou sCMOS kamerou Andor Zyla 5.5 (Andor Technology, Spojené Kráľovstvo), spolu s LED fluorescenčným zdrojom (CoolLED pE-300^{white}, CoolLED Ltd., Spojené Kráľovstvo).

K určení subcelulárnej lokalizácie študovaných PS sa použili bunkové línie HeLa a SK-MEL-28, ktoré boli sledované pomocou fluorescenčného mikroskopu. Bunky sa nasadzovali na sterilné plastové Petriho misky so skleneným dnom, ktoré sú špeciálne určené pre konfokálnu mikroskopiu. Bunky boli nasadené na jednotlivé Petriho misky v SCM po 0,5 ml s následnou 24 hodinovou inkubáciou. Po 24 hodinách sa k bunkám pridal skúmaný PS s požadovanou koncentráciou v SCM. Potom sa bunky spolu s PS nechali inkubovať po dobu ďalších 12 hodín sa štandardných podmienok (37 °C v CO₂ inkubátore). Po ukončení inkubácie sa odstránilo staré médium, bunky sa opláchli dvakrát SFM médium a následne boli značené s fluorescenčnými sondami pripravenými v čerstvom SFM médiu:

- A) 0,4 μM MitoTrackerTM Green FM ako mitochondriálna sonda
- B) 0,4 μM LysoTrackerTM Blue DND-22 označujúca kyslé organely (lyzosómy)
- C) HCS LipidTOXTM Deep Red Neutral Lipid Stain označujúca lipidové častice

Inkubačná doba sa vzhľadom na typ fluorescenčnej sondy líšila.

- a) Inkubácia buniek s MitoTrackerTM Green a LysoTrackerTM Blue sondou prebiehala po dobu 20 minút. Po inkubácii nasledoval dvakrát oplach predohriatym SFM. Čerstvé SFM médium sa na záver pridalo ku vzorkám a tie boli následne inkubované a mikroskopicky snímané.
- b) Časť vzoriek sa fixovala 4% paraformaldehydom po dobu 15 minút pri izbovej teplote. Nasledoval trikrát oplach predhriatym PBS. HCS LipidTOXTM Deep Red Neutral Lipid Stain fluorescenčná sonda (nariedené 1:1000) sa na záver inkubovala s bunkami po dobu 30 minút pri izbovej teplote.

K detekcii fluorescenčného žiarenia sa využili filtre pre kanály DAPI, FITC, Cy3 a Cy5, a pomocou fluorescenčného mikroskopu Nikon Eclipse TiE (Nikon, Japonsko) s 100× olejovým objektívom sa zhotovila séria mikrofotografií s využitím sCMOS kamery Andor Zyla 5.5 (Andor Technology, Spojené Kráľovstvo).

8 VÝSLEDKY

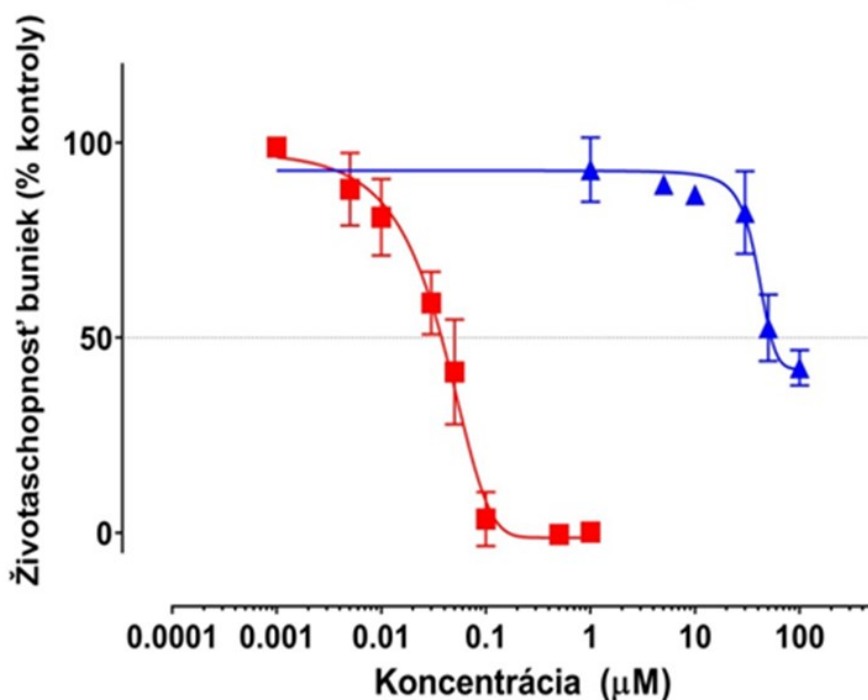
8.1 Stanovenie cytotoxicity

8.1.1 Bunky SK-MEL-28

8.1.1.1 3I-SubPc-CE

Fototoxicita skúmanej látky 3I-SubPc-CE pred ožiarením s inkubačnou dobou 12 h bola testovaná na bunkovej línii SK-MEL-28 v koncentračnom rozmedzí 0,001–1 μM v SCM. Zo získaných výsledkov sa stanovila hodnota strednej efektívnej koncentrácie (EC_{50}). EC_{50} podľa získaných hodnôt zobrazených v grafe na Obrázku 10 zodpovedá $0,0378 \pm 0,0076 \mu\text{M}$.

Vlastná toxicita („dark“ toxicita) látky 3I-SubPc-CE (bunková línia SK-MEL-28) bola skúmaná v rozmedzí koncentrácií 1 – 100 μM v SCM. Výsledné dáta pre EC_{50} z grafu na Obrázku 10 odpovedajú koncentrácii $71,843 \pm 2,245 \mu\text{M}$.

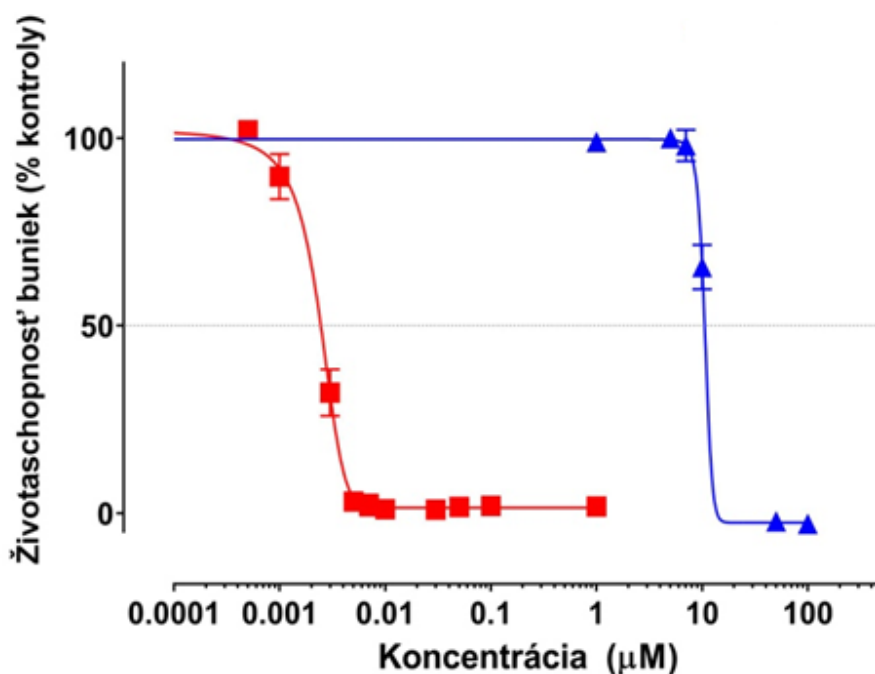


Obrázok 10 Graf závislosti životaschopnosti buniek SK-MEL-28 na koncentrácii 3I-SubPc-CE. Fototoxicita (•) a vlastná toxicita látky (•).

8.1.1.2 3EtS-SubPC-CE

Fototoxicita skúmanej látky 3EtS-SubPc-CE pred ožiarením s inkubačnou dobou 12h bola testovaná na bunkovej línii SK-MEL-28 v koncentračnom rozmedzí 0,001 – 1 μM v SCM. Zo získaných výsledkov sa stanovila hodnota strednej efektívnej koncentrácie (EC_{50}). EC_{50} podľa získaných hodnôt zobrazených v grafe na Obrázku 11 zodpovedá $0,0023 \pm 0,0007 \mu\text{M}$.

Vlastná toxicita („dark“ toxicita) látky 3EtS-SubPc-CE (bunková lúnia SK-MEL-28) bola skúmaná v rozmedzí koncentrácií 1 – 100 μM v SCM. Výsledné dáta pre EC_{50} z grafu na Obrázku 11 odpovedajú koncentrácii $14,492 \pm 1,131 \mu\text{M}$.

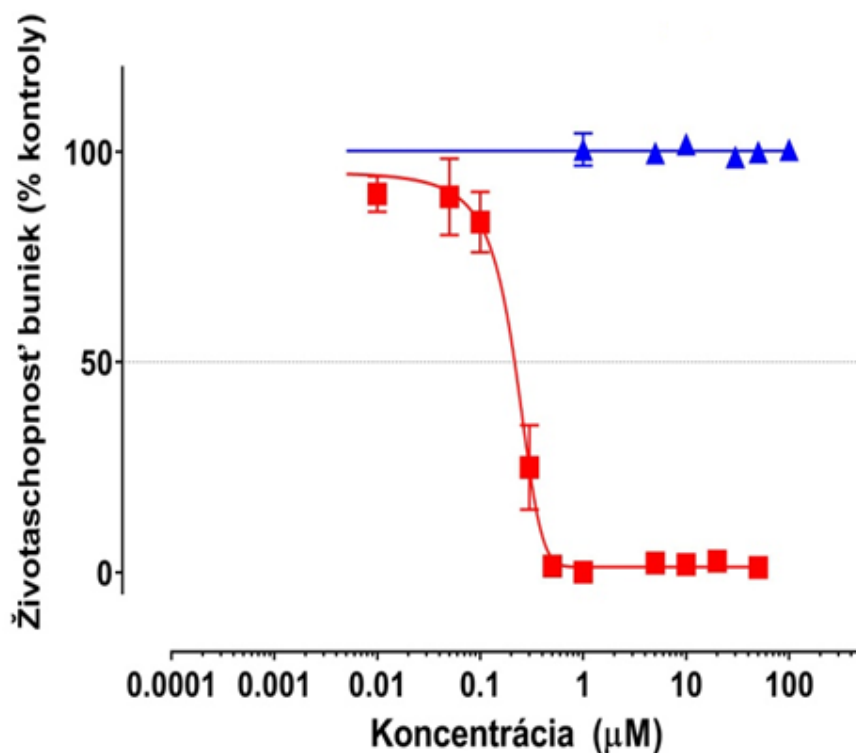


Obrázok 11 Graf závislosti životaschopnosti buniek SK-MEL-28 na koncentrácii 3EtS-SubPc-CE. Fototoxicita (•) a vlastná toxicita látky (•).

8.1.1.3 3EtS-SubPc-Tyr-FB

Fototoxicita skúmanej látky 3EtS-SubPc-Tyr-FB pred ožiarením s inkubačnou dobou 12 h bola testovaná na bunkovej línii SK-MEL-28 v koncentračnom rozmedzí 0,01 – 100 μM v SCM. Zo získaných výsledkov sa stanovila hodnota strednej efektívnej koncentrácie (EC_{50}). EC_{50} podľa získaných hodnôt zobrazených v grafe na Obrázku 12 zodpovedá $0,2234 \pm 0,0171$ μM .

Vlastná toxicita („dark“ toxicita) látky 3EtS-SubPc-Tyr-FB (bunková lúnia SK-MEL-28) bola skúmaná v rozmedzí koncentrácií 1 – 100 μM v SCM. Výsledné dáta pre EC_{50} z grafu na Obrázku 12 odpovedajú koncentrácii >100 μM .

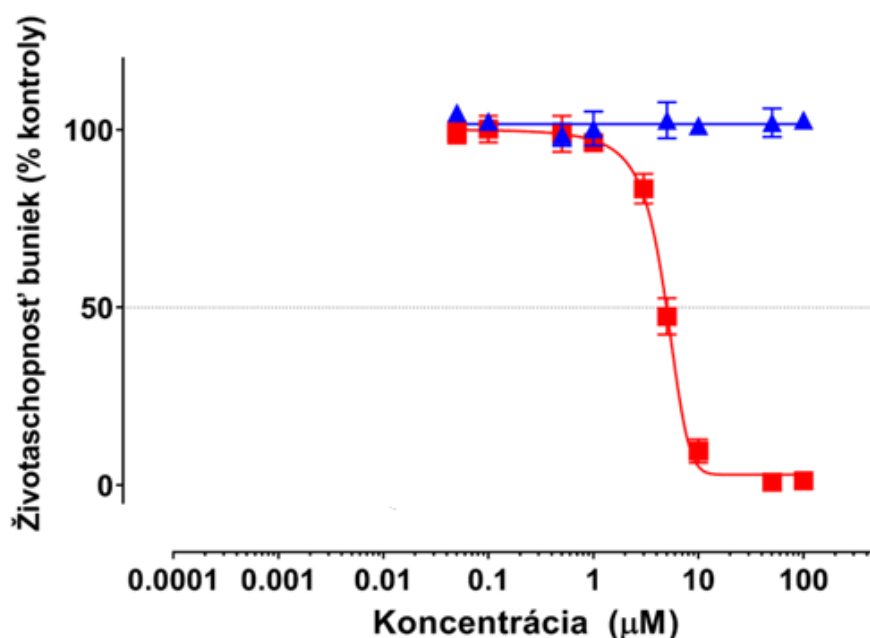


Obrázok 12 Graf závislosti životaschopnosti buniek SK-MEL-28 na koncentrácii 3EtS-SubPc-Tyr-FB. Fototoxicita (•) a vlastná toxicita látky (•).

8.1.1.4 3EtS-SubPc-Tyr-Boc

Fototoxicita skúmanej látky 3EtS-SubPc-Tyr-Boc pred ožiarením s inkubačnou dobou 12h bola testovaná na bunkovej línii SK-MEL-28 v koncentračnom rozmedzí 0,001 – 100 μM v SCM. Zo získaných výsledkov sa stanovila hodnota strednej efektívnej koncentrácie (EC_{50}). EC_{50} podľa získaných hodnôt zobrazených v grafe na Obrázok 13 zodpovedá $4,77 \pm 0,31 \mu\text{M}$.

Vlastná toxicita („dark“ toxicita) látky 3EtS-SubPc-Tyr-Boc (bunková lúnia SK-MEL-28) bola skúmaná v rozmedzí koncentrácií 0,05 – 100 μM v SCM. Výsledné dáta pre EC_{50} z grafu na Obrázku 13 odpovedajú koncentrácii $>100 \mu\text{M}$.

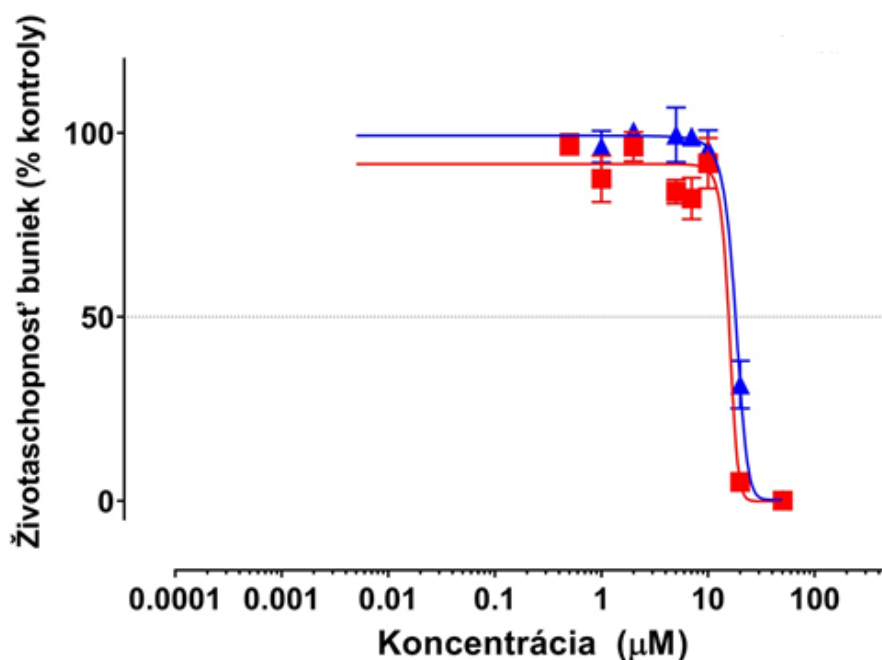


Obrázok 13 Graf závislosti životaschopnosti buniek SK-MEL-28 na koncentrácii 3EtS-SubPc-Tyr-FB. Fototoxicita (•) a vlastná toxicita látky (•).

8.1.1.5 12F-SubPc-CE

Fototoxicita skúmanej látky 12F-SubPc-CE pred ožiarením s inkubačnou dobou 12 h bola testovaná na bunkovej línii SK-MEL-28 v koncentračnom rozmedzí 0,05 – 80 μM v SCM. Zo získaných výsledkov sa stanovila hodnota strednej efektívnej koncentrácie (EC_{50}). EC_{50} podľa získaných hodnôt zobrazených v grafe na Obrázku 14 zodpovedá $16,291 \pm 2,888 \mu\text{M}$.

Vlastná toxicita („dark“ toxicita) látky 12F-SubPc-CE (bunková lúnia SK-MEL-28) bola skúmaná v rozmedzí koncentrácií 1 – 20 μM v SCM. Výsledné dáta pre EC_{50} z grafu na Obrázku 14 odpovedajú koncentrácii $18,953 \pm 0,053 \mu\text{M}$.

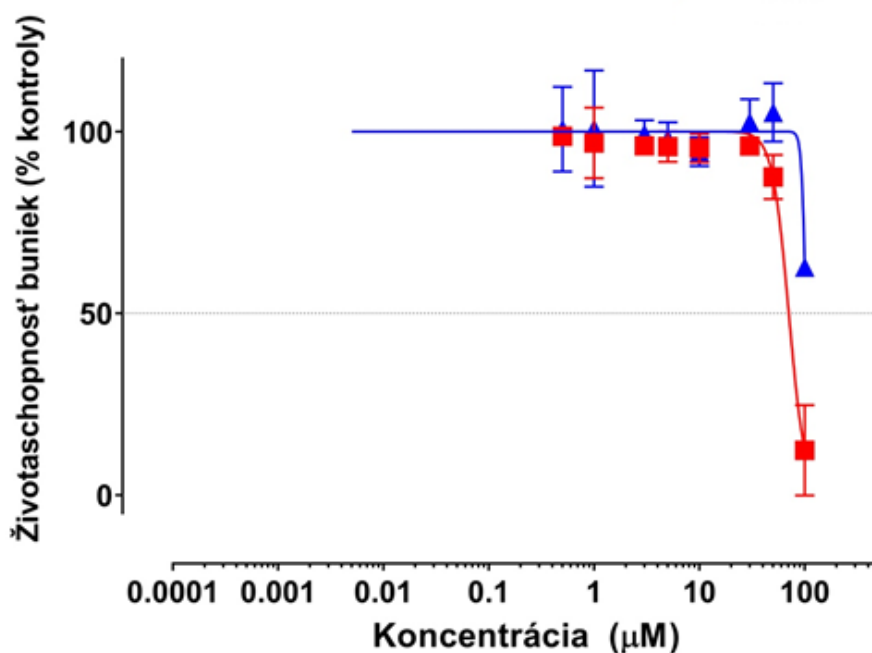


Obrázok 14 Graf závislosti životaschopnosti buniek SK-MEL-28 na koncentrácii 12F-SubPc-CE. Fototoxicita (•) a vlastná toxicita látky (•).

8.1.1.6 12F-SubPc-Tyr-Boc

Fototoxicita skúmanej látky 12F-SubPc-Tyr-Boc pred ožiarením s inkubačnou dobou 12 h bola testovaná na bunkovej línii SK-MEL-28 v koncentračnom rozmedzí 0,05 – 100 μM v SCM. Zo získaných výsledkov sa stanovila hodnota strednej efektívnej koncentrácie (EC_{50}). EC_{50} podľa získaných hodnôt zobrazených v grafe na Obrázku 15 zodpovedá $66,153 \pm 5,086$ μM .

Vlastná toxicita („dark“ toxicita) látky 12F-SubPc-Tyr-Boc (bunková lúnia SK-MEL-28) bola skúmaná v rozmedzí koncentrácií 0,05 – 100 μM v SCM. Výsledné dáta pre EC_{50} z grafu na Obrázku 15 odpovedajú koncentrácii >100 μM .



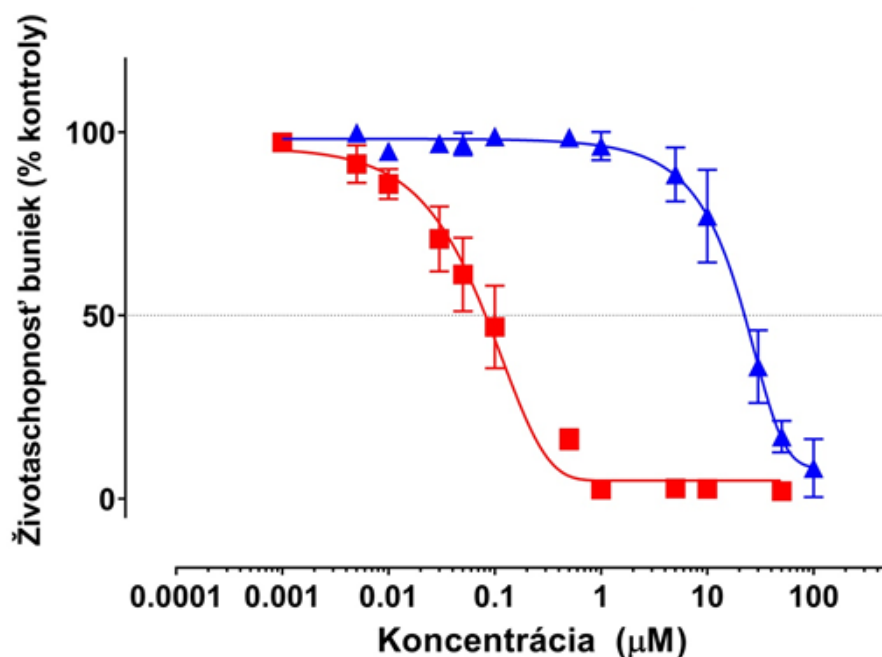
Obrázok 15 Graf závislosti životaschopnosti buniek SK-MEL-28 na koncentrácii 12F-SubPc-Tyr-Boc. Fototoxicita (•) a vlastná toxicita látky (•).

8.1.2 HeLa bunky

8.1.2.1 3I-SubPc-CE

Fototoxicita skúmanej látky 3I-SubPc-CE pred ožiarením s inkubačnou dobou 12 h bola testovaná na bunkovej línii HeLa v koncentračnom rozmedzí 0,001 – 80 μM v SCM. Zo získaných výsledkov sa stanovila hodnota strednej efektívnej koncentrácie (EC_{50}). EC_{50} podľa získaných hodnôt zobrazených v grafe na Obrázku 16 zodpovedá $0,0656 \pm 0,01692 \mu\text{M}$.

Vlastná toxicita („dark“ toxicita) látky 3I-SubPc-CE (bunková línii HeLa) bola skúmaná v rozmedzí koncentrácií 0,005 – 100 μM v SCM. Výsledné dáta pre EC_{50} z grafu na Obrázku 16 odpovedajú koncentrácii $23,499 \pm 3,438 \mu\text{M}$.

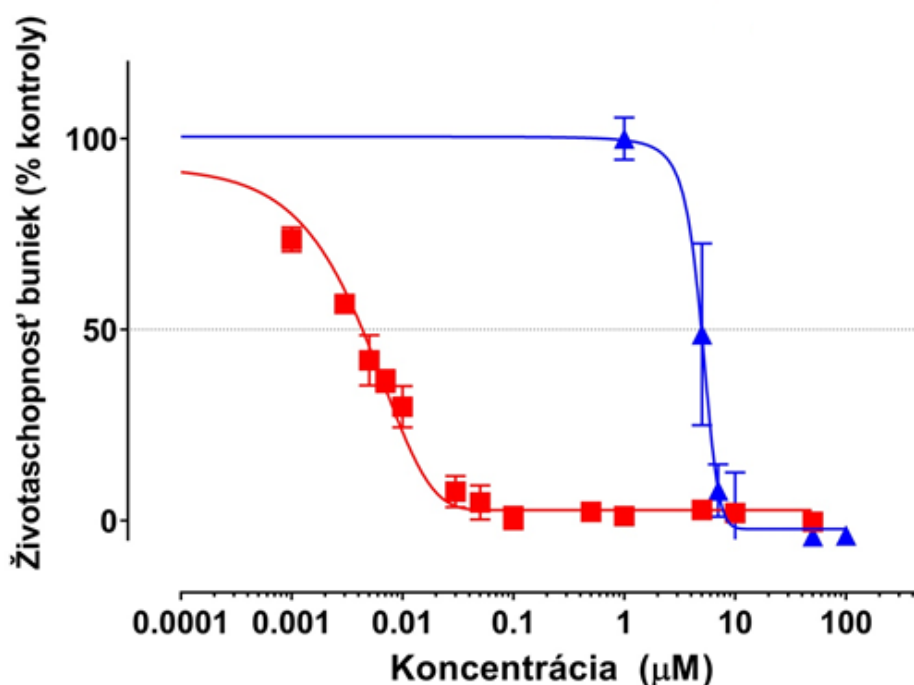


Obrázok 16 Graf závislosti živoschopnosti buniek HeLa na koncentrácii 3I-SubPc-CE. Fototoxicita (•) a vlastná toxicita látky (•).

8.1.2.2 3EtS-SubPc-CE

Fototoxicita skúmanej látky 3EtS-SubPc-CE pred ožiarením s inkubačnou dobou 12 h bola testovaná na bunkovej línii HeLa v koncentračnom rozmedzí 0,001 – 50 μM v SCM. Zo získaných výsledkov sa stanovila hodnota strednej efektívnej koncentrácie (EC_{50}). EC_{50} podľa získaných hodnôt zobrazených v grafe na Obrázku 17 zodpovedá $0,0044 \pm 0,0021 \mu\text{M}$.

Vlastná toxicita („dark“ toxicita) látky 3EtS-SubPc-CE (bunková lúnia HeLa) bola skúmaná v rozmedzí koncentrácií 1 – 100 μM v SCM. Výsledné dáta pre EC_{50} z grafu na Obrázku 17 odpovedajú koncentrácii $5,245 \pm 1,486 \mu\text{M}$.

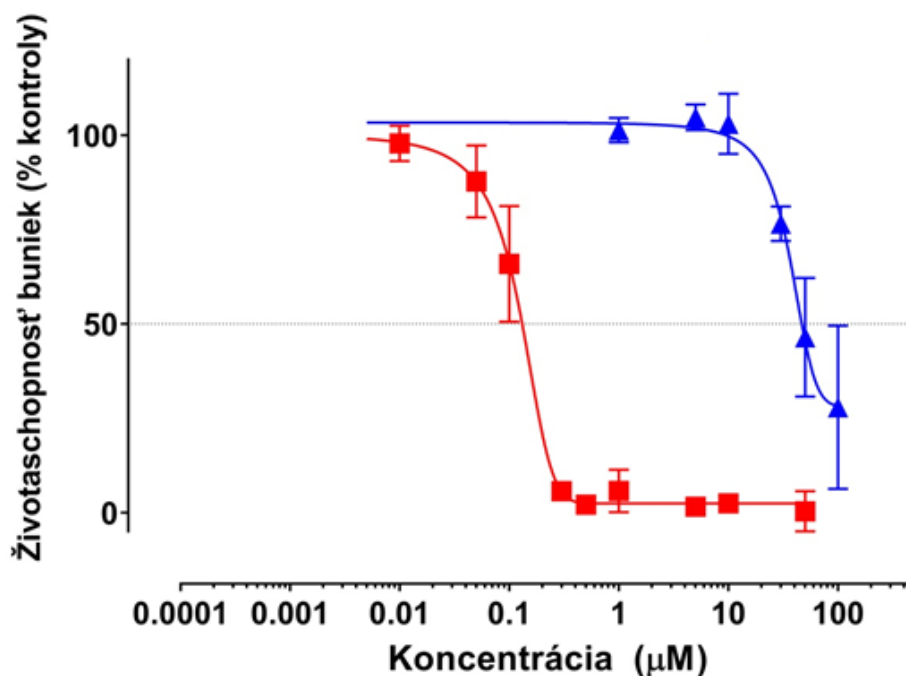


Obrázok 17 Graf závislosti životaschopnosti buniek HeLa na koncentrácii 3EtS-SubPc-CE. Fototoxicita (•) a vlastná toxicita látky (•).

8.1.2.3 3EtS-SubPc-Tyr-FB

Fototoxicita skúmanej látky 3EtS-SubPc-Tyr-FB pred ožiarením s inkubačnou dobou 12 h bola testovaná na bunkovej línii HeLa v koncentračnom rozmedzí 0,01 – 80 μM v SCM. Zo získaných výsledkov sa stanovila hodnota strednej efektívnej koncentrácie (EC_{50}). EC_{50} podľa získaných hodnôt zobrazených v grafe na Obrázku 18 zodpovedá $0,1200 \pm 0,0183 \mu\text{M}$.

Vlastná toxicita („dark“ toxicita) látky 3EtS-SubPc-Tyr-FB (bunková lúnia HeLa) bola skúmaná v rozmedzí koncentrácií 1 – 100 μM v SCM. Výsledné dáta pre EC_{50} z grafu na Obrázku 18 odpovedajú koncentrácii $68,809 \pm 26,743 \mu\text{M}$.

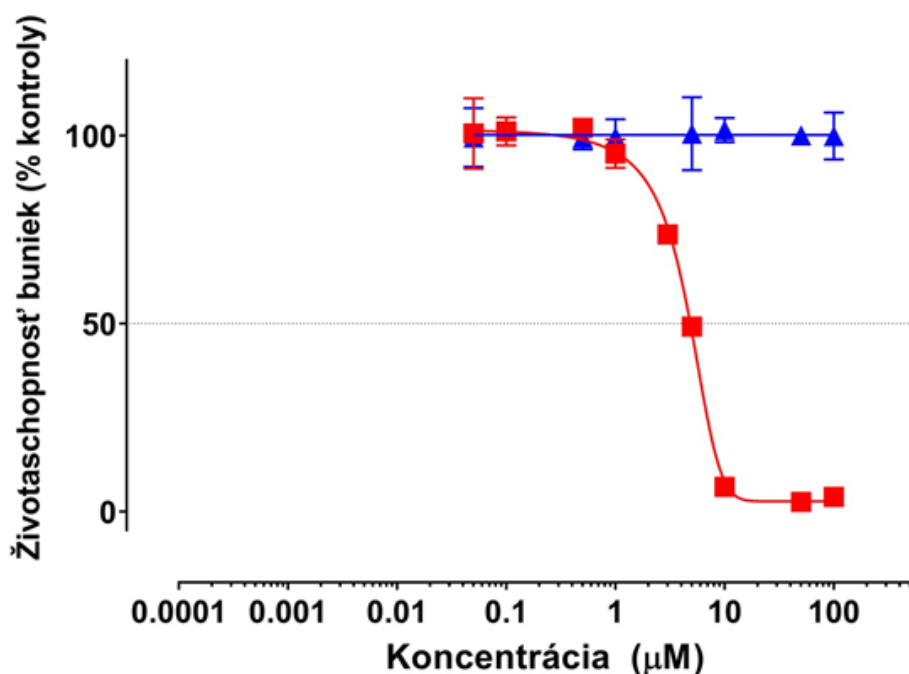


Obrázok 18 Graf závislosti životaschopnosti buniek HeLa na koncentrácii 3EtS-SubPc-Tyr-FB. Fototoxicita (•) a vlastná toxicita látky (•).

8.1.2.4 3EtS-SubPc-Tyr-Boc

Fototoxicita skúmanej látky 3EtS-SubPc-Tyr-Boc pred ožiarením s inkubačnou dobou 12 h bola testovaná na bunkovej línii HeLa v koncentračnom rozmedzí 0,05 – 100 μM v SCM. Zo získaných výsledkov sa stanovila hodnota strednej efektívnej koncentrácie (EC_{50}). EC_{50} podľa získaných hodnôt zobrazených v grafe na Obrázku 19 zodpovedá $4,45 \pm 0,01 \mu\text{M}$.

Vlastná toxicita („dark“ toxicita) látky 3EtS-SubPc-Tyr-Boc (bunková línia HeLa) bola skúmaná v rozmedzí koncentrácií 0,05 – 100 μM v SCM. Výsledné dáta pre EC_{50} z grafu na Obrázku 19 odpovedajú koncentrácii $>100 \mu\text{M}$.

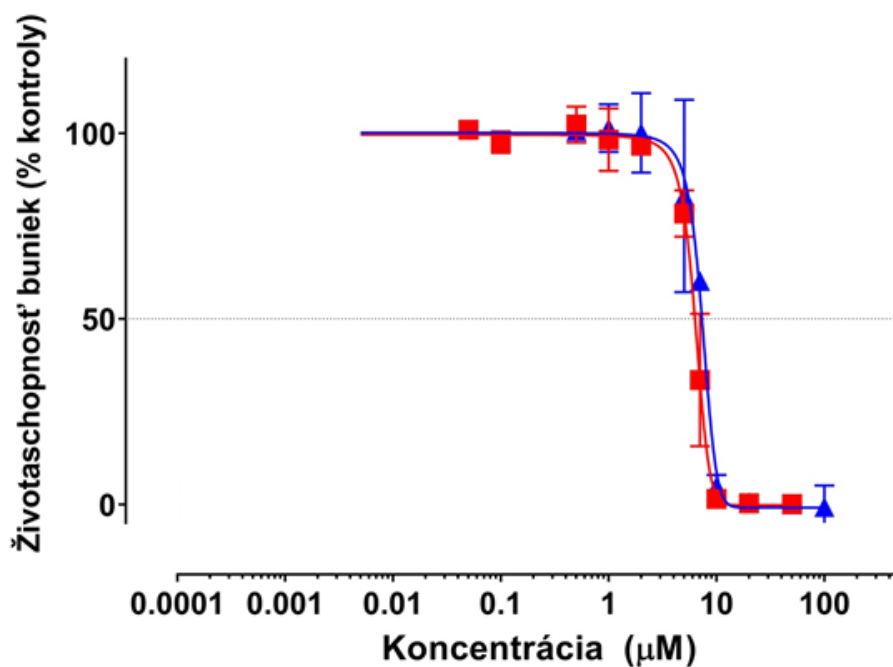


Obrázok 19 Graf závislosti životaschopnosti buniek HeLa na koncentrácii 3EtS-SubPc-TyrBoc. Fototoxicita (•) a vlastná toxicita látky (•).

8.1.2.5 12F-SubPc-CE

Fototoxicita skúmanej látky 12F-SubPc-CE pred ožiarením s inkubačnou dobou 12 h bola testovaná na bunkovej línii HeLa v koncentračnom rozmedzí 0,05 – 80 μM v SCM. Zo získaných výsledkov sa stanovila hodnota strednej efektívnej koncentrácie (EC_{50}). EC_{50} podľa získaných hodnôt zobrazených v grafe na Obrázku 20 zodpovedá $6,400 \pm 0,391 \mu\text{M}$.

Vlastná toxicita („dark“ toxicita) látky 12F-SubPc-CE (bunková línia HeLa) bola skúmaná v rozmedzí koncentrácií 0,8 – 100 μM v SCM. Výsledné dáta pre EC_{50} z grafu na Obrázku 20 odpovedajú koncentrácii $6,781 \pm 1,191 \mu\text{M}$.

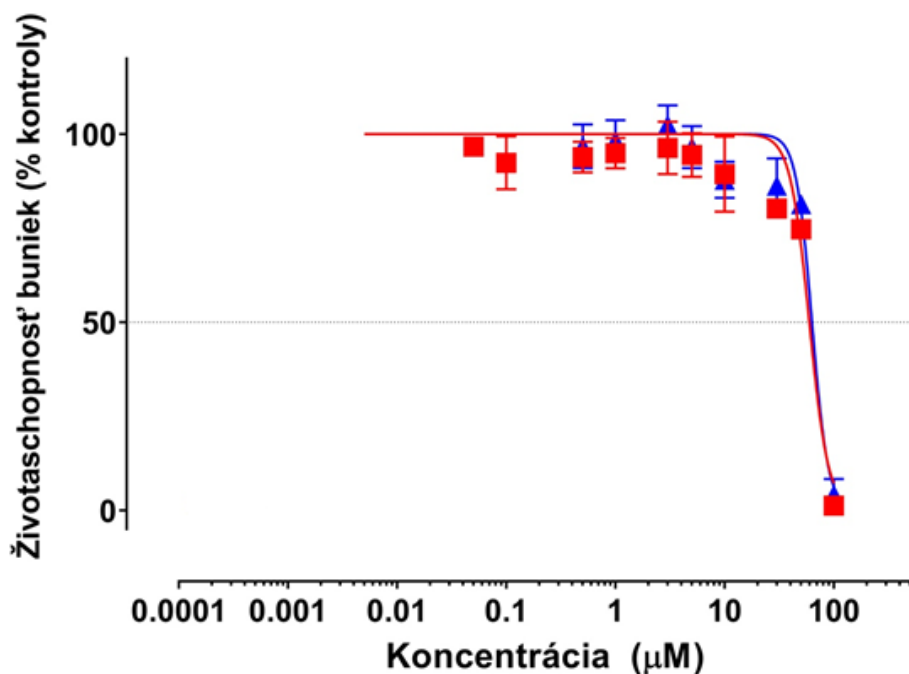


Obrázok 20 Graf závislosti životaschopnosti buniek HeLa na koncentrácii 12F-SubPc-CE. Fototoxicita (•) a vlastná toxicita látky (•).

8.1.2.6 12F-SubPc-Tyr-Boc

Fototoxicita skúmanej látky 12F-SubPc-Tyr-Boc pred ožiarením s inkubačnou dobou 12 h bola testovaná na bunkovej línii HeLa v koncentračnom rozmedzí 0,05 – 100 μM v SCM. Zo získaných výsledkov sa stanovila hodnota strednej efektívnej koncentrácie (EC_{50}). EC_{50} podľa získaných hodnôt zobrazených v grafe na Obrázku 21 zodpovedá $64,011 \pm 5,831 \mu\text{M}$.

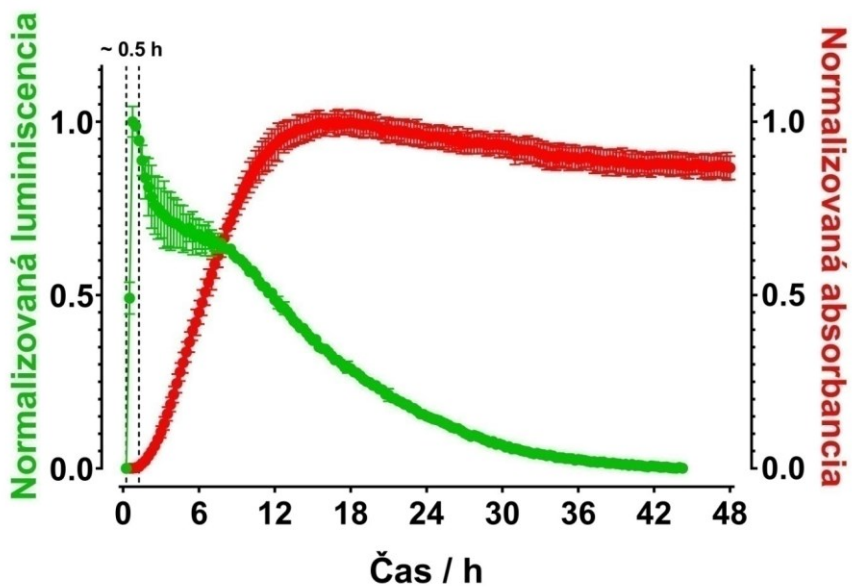
Vlastná toxicita („dark“ toxicita) látky 12F-SubPc-Tyr-Boc (bunková línia HeLa) bola skúmaná v rozmedzí koncentrácií 0,5 – 100 μM v SCM. Výsledné dáta pre EC_{50} z grafu na Obrázku 21 odpovedajú koncentrácii $65,665 \pm 2,836 \mu\text{M}$.



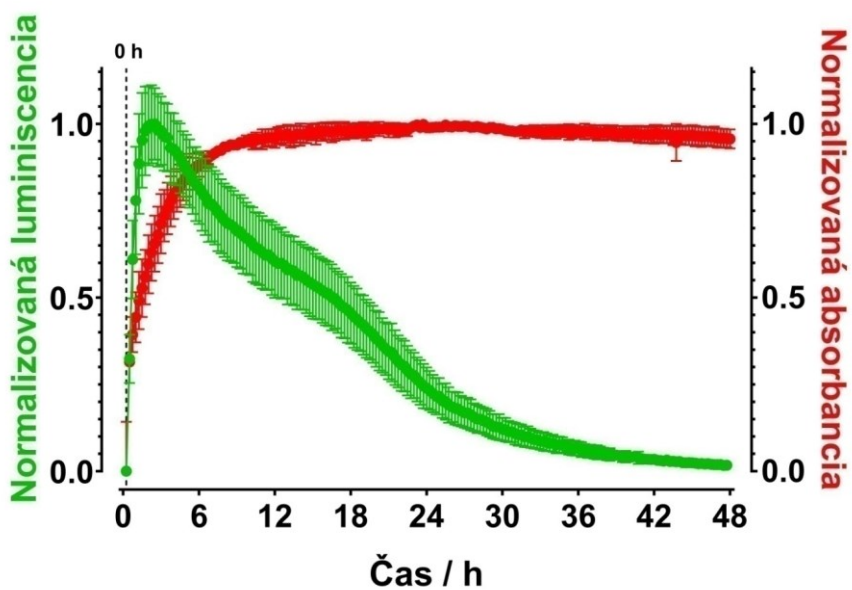
Obrázok 21 Graf závislosti životaschopnosti buniek HeLa na koncentrácii 12F-SubPc-Tyr-Boc. Fototoxicita (•) a vlastná toxicita látky (•).

8.2 Bunková smrť

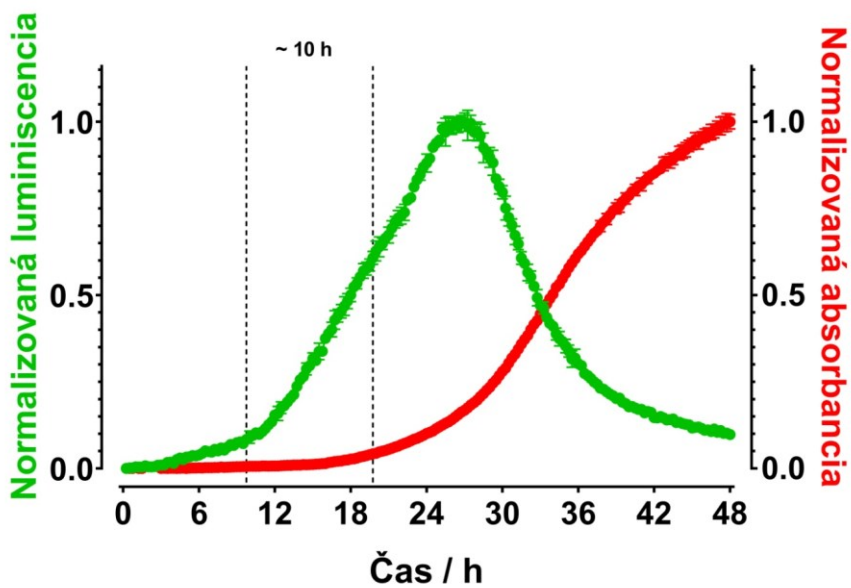
V rámci stanovenie typu bunkovej smrti na bunkovej línii SK-MEL-28 sa zaznamenávali kineticky v priebehu 48 hodín hodnoty luminiscenčného a fluorescenčného signálu. Luminiscenčný signál je odpoveďou na naviazanie sa študovaného PS s Annexinom V. Hodnoty fluorescenčného signálu sú ukazovateľom stavu a integrity bunkovej membrány a väzby detekčnej sondy na jadrovú DNA. Nekrotický typ úmrtia bunky (primárna nekróza) je charakterizovaný súčasným a kontinuálnym nárastom oboch sledovaných signálov. Počas apoptózy dochádza najskôr k nárastu luminiscenčného signálu a po časovom odstupe aj fluorescenčného signálu ako prejav sekundárnej nekrózy s porušením jadrovej membrány s DNA. Súčasne počas detekcie typu bunkovej smrti vyvolávanú študovanými látkami sa použili pozitívne kontroly pre nekrozu – peroxid vodíka a digitonin. Ako pozitívna kontrola apoptózy slúžil bortezomib (induktor vnútornej cesty apoptózy) a FasL (induktor pre vonkajšiu cestu apoptózy).



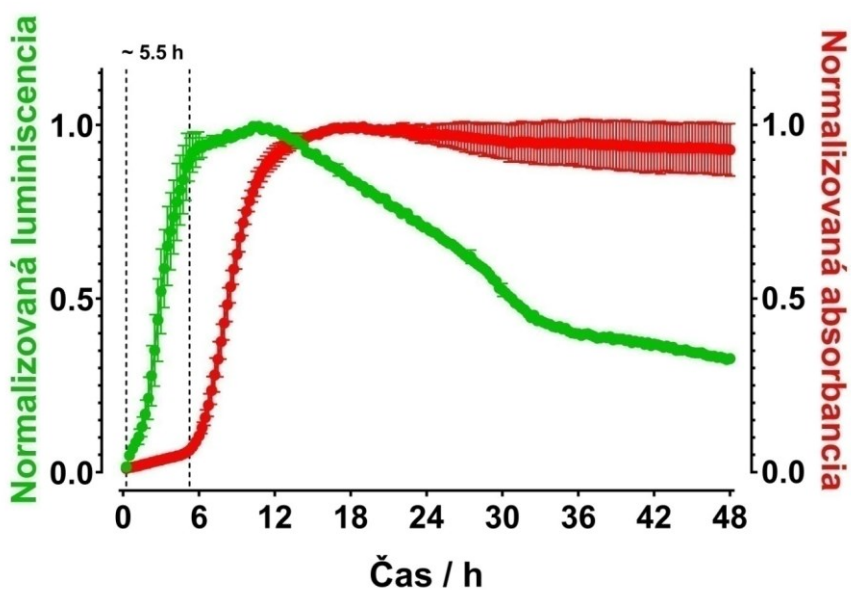
Obrázok 22 Stanovenie typu bunkovej smrti v čase pomocou Annexinu V (luminiscenčný signál) a sondy viažucej sa na DNA (fluorescenčný signál). Indukcia bunkovej smrti pomocou **pozitívnej kontroly pre nekrózu – peroxid vodíka** o koncentrácii 20 μM . Nárast oboch signálov je s minimálnym oneskorením.



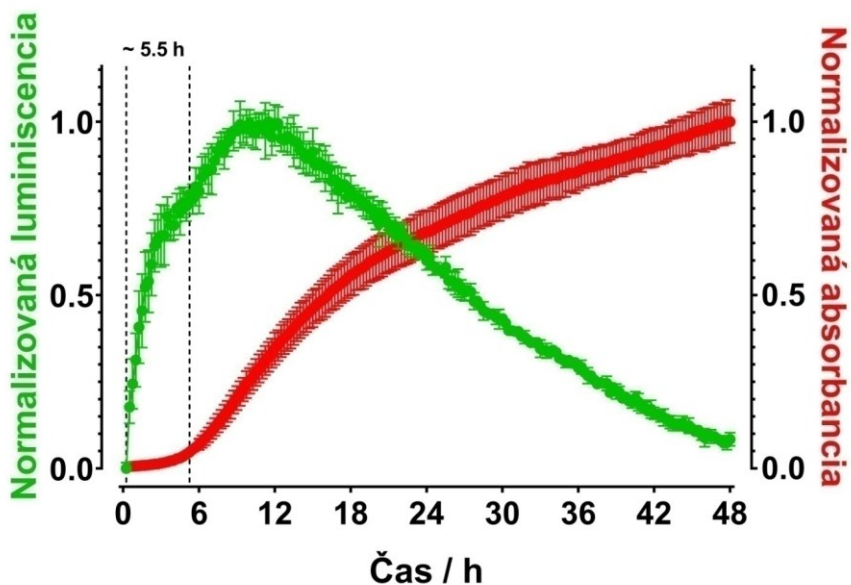
Obrázok 23 Stanovenie typu bunkovej smrti v čase pomocou Annexinu V (luminiscenčný signál) a sondy viažucej sa na DNA (fluorescenčný signál). Indukcia bunkovej smrti pomocou **pozitívnej kontroly pre nekrózu – digitonín** o koncentrácii 25 $\mu\text{g/ml}$. Nárast oboch signálov je bez oneskorenia.



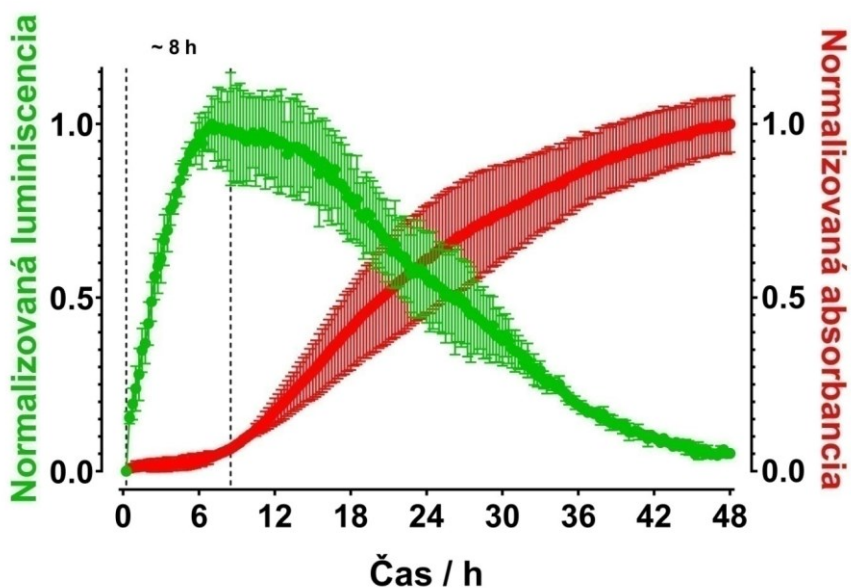
Obrázok 24 Stanovenie typu bunkovej smrti v čase pomocou Annexinu V (luminiscenčný signál) a sondy viažucej sa na DNA (fluorescenčný signál). Indukcia bunkovej smrti pomocou **pozitívnej kontroly pre apoptózu – bortezomib** o koncentrácii 10 μM . Nárast oboch signálov je s časovým odstupom cca 10 h.



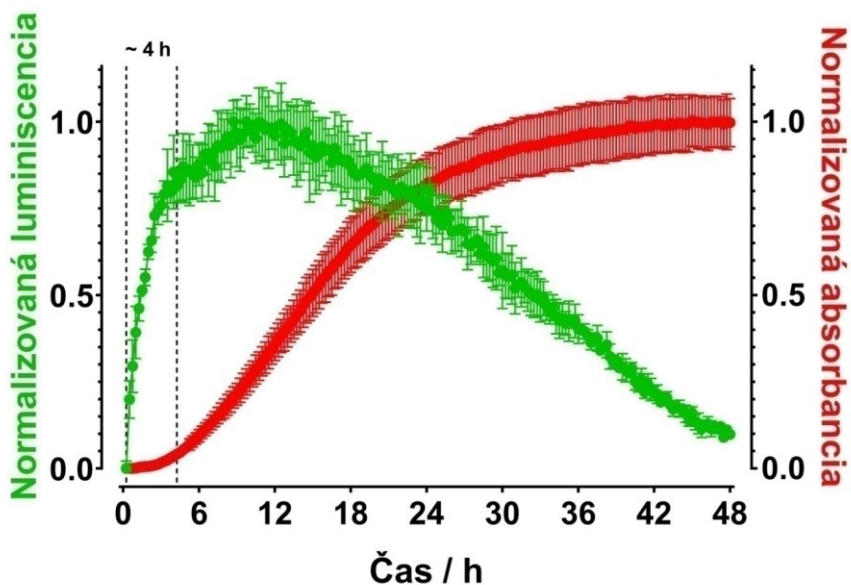
Obrázok 25 Stanovenie typu bunkovej smrti v čase pomocou Annexinu V (luminiscenčný signál) a sondy viažucej sa na DNA (fluorescenčný signál). Indukcia bunkovej smrti pomocou **pozitívnej kontroly pre apoptózu – FasL** o koncentrácii 400 ng/ml. Nárast oboch signálov je s časovým odstupom cca 5,5 h.



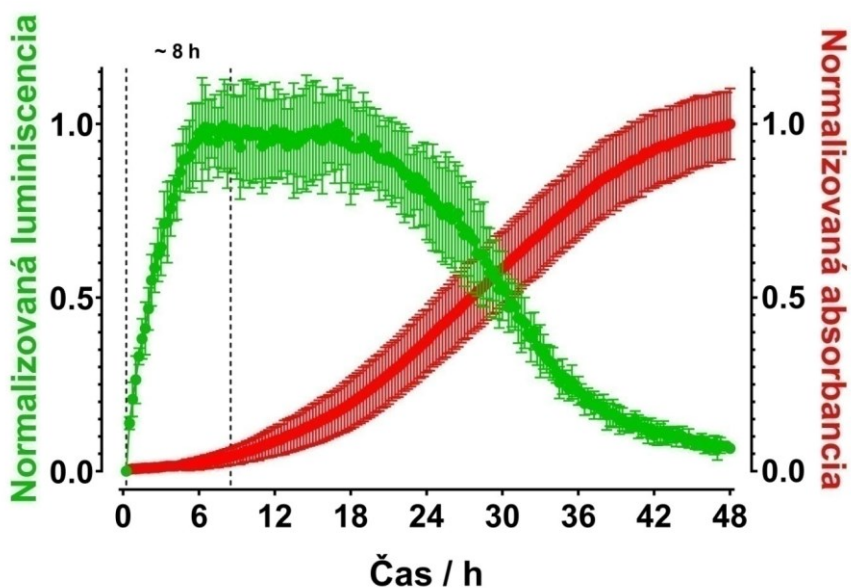
Obrázok 26 Sledovanie bunkovej smrti v čase pomocou Annexinu V (luminiscenčný signál) a sondy viažucej sa na DNA (fluorescenčný signál). Stanovenie typu bunkovej smrti pre látku **3I-SubPc-CE** s koncentráciou. Nárast oboch signálov je s časovým odstupom cca 5,5 h, čo preukazuje typ úmrtia bunky apoptózou.



Obrázok 27 Sledovanie bunkovej smrti v čase pomocou Annexinu V (luminiscenčný signál) a sondy viažucej sa na DNA (fluorescenčný signál). Stanovenie typu bunkovej smrti pre látku **3EtS-SubPc-CE** s koncentráciou. Nárast oboch signálov je s časovým odstupom cca 8 h, čo preukazuje typ úmrtia bunky apoptózou.



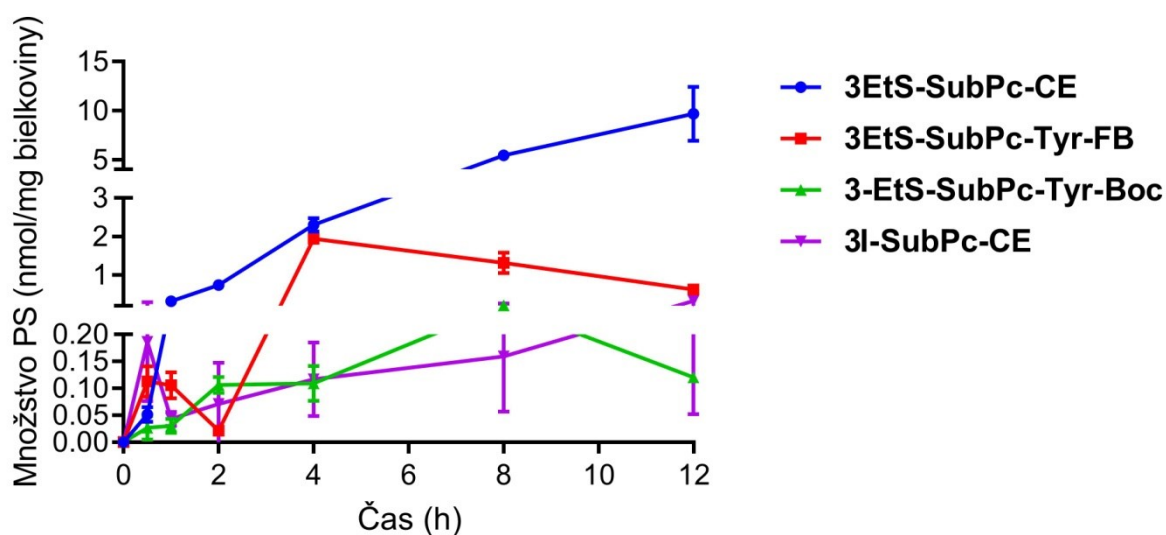
Obrázok 28 Sledovanie bunkovej smrti v čase pomocou Annexinu V (luminiscenčný signál) a sondy viažucej sa na DNA (fluorescenčný signál). Stanovenie typu bunkovej smrti pre látku **3EtS-SubPc-Tyr-FB** s koncentráciou. Nárast oboch signálov je s časovým odstupom cca 4 h, čo preukazuje typ úmrtia bunky apoptózou.



Obrázok 29 Sledovanie bunkovej smrti v čase pomocou Annexinu V (luminiscenčný signál) a sondy viažucej sa na DNA (fluorescenčný signál). Stanovenie typu bunkovej smrti pre látku **3EtS-SubPc-Tyr-Boc** s koncentráciou. Nárast oboch signálov je s časovým odstupom cca 8 h, čo preukazuje typ úmrtia bunky apoptózou.

8.3 „Uptake“ látok

Stanovenie časového prestupu látok do buniek na bunkovej línii HeLa prebiehalo inkubáciou buniek v Petriho miskách, kedy sa v časových intervaloch 0, ½, 1, 2, 4, 8, 12 h k bunkám pridávali testované PS. Bunky po danom intervale boli zoškrabané a lyzované v DMSO. Takto pripravené vzorky sa uchovali v mrazničke pri -20°C. Pomocou spektrofluorometra sa v jednotlivých vzorkách meral fluorescenčný signál. Stanovenie množstva bielkovín vo vzorkách študovaných látok prebiehalo pomocou metódy BCA na čítačke mikrotitračných doštičiek.

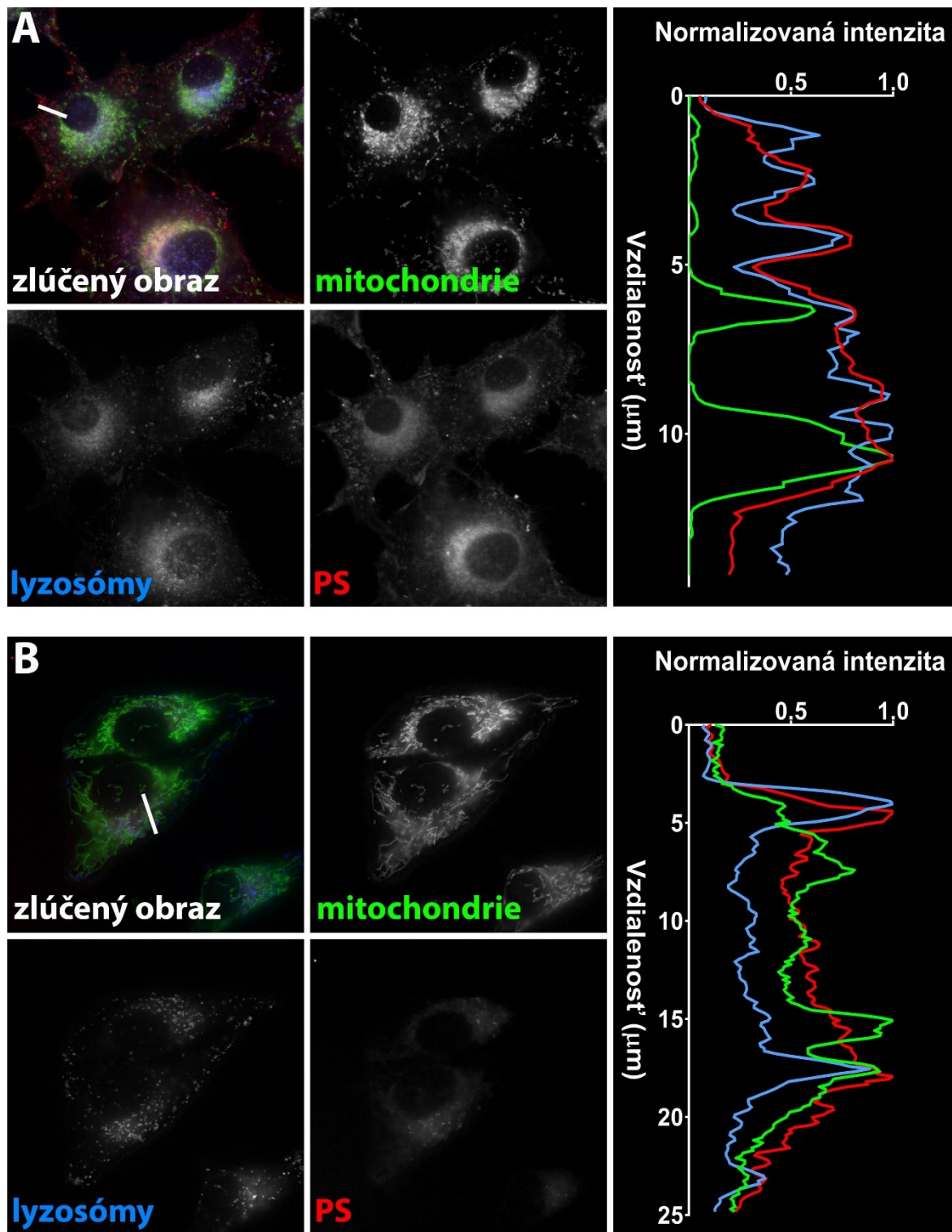


Obrázok 30 Časový profil prestupu študovaných látok do HeLa buniek zaznamenaný pomocou fluorescenčného signálu.

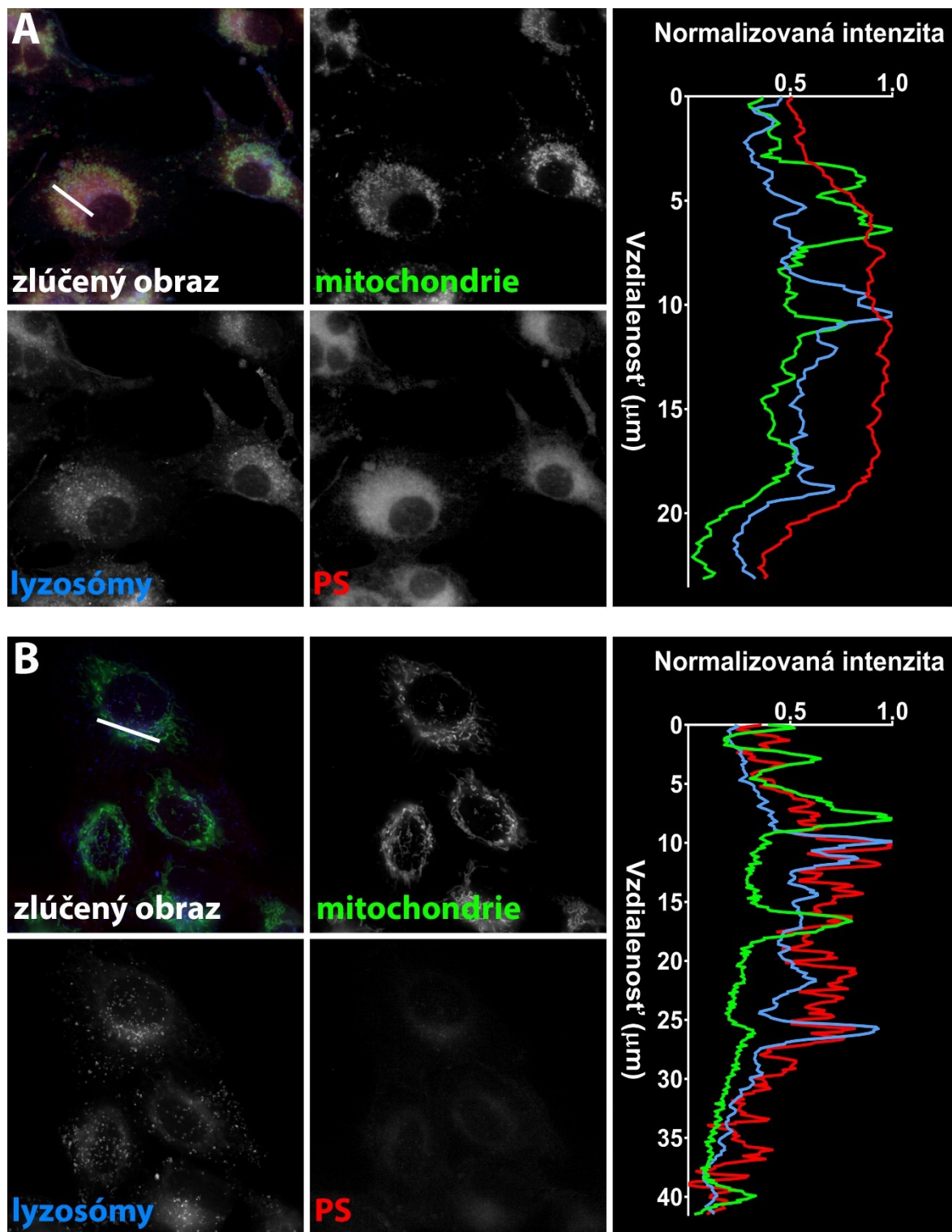
8.4 Subcelulárna lokalizácia

Fotografická dokumentácia zobrazujúca subcelulárnu lokalizáciu študovaných PSs na bunkových líniiach SK-MEL-28 (A) a HeLa (B) bola získaná s využitím invertovaného fluorescenčného mikroskopu Nikon Eclipse Ti-E (Nikon, Japonsko) s chladenou sCMOS kamerou Andor Zyla 5.5 (Andor Technology, Spojené Kráľovstvo) a s LED fluorescenčným zdrojom žiarenia (CoolLed pE-300 white, CoolLed Ltd., Spojené Kráľovstvo).

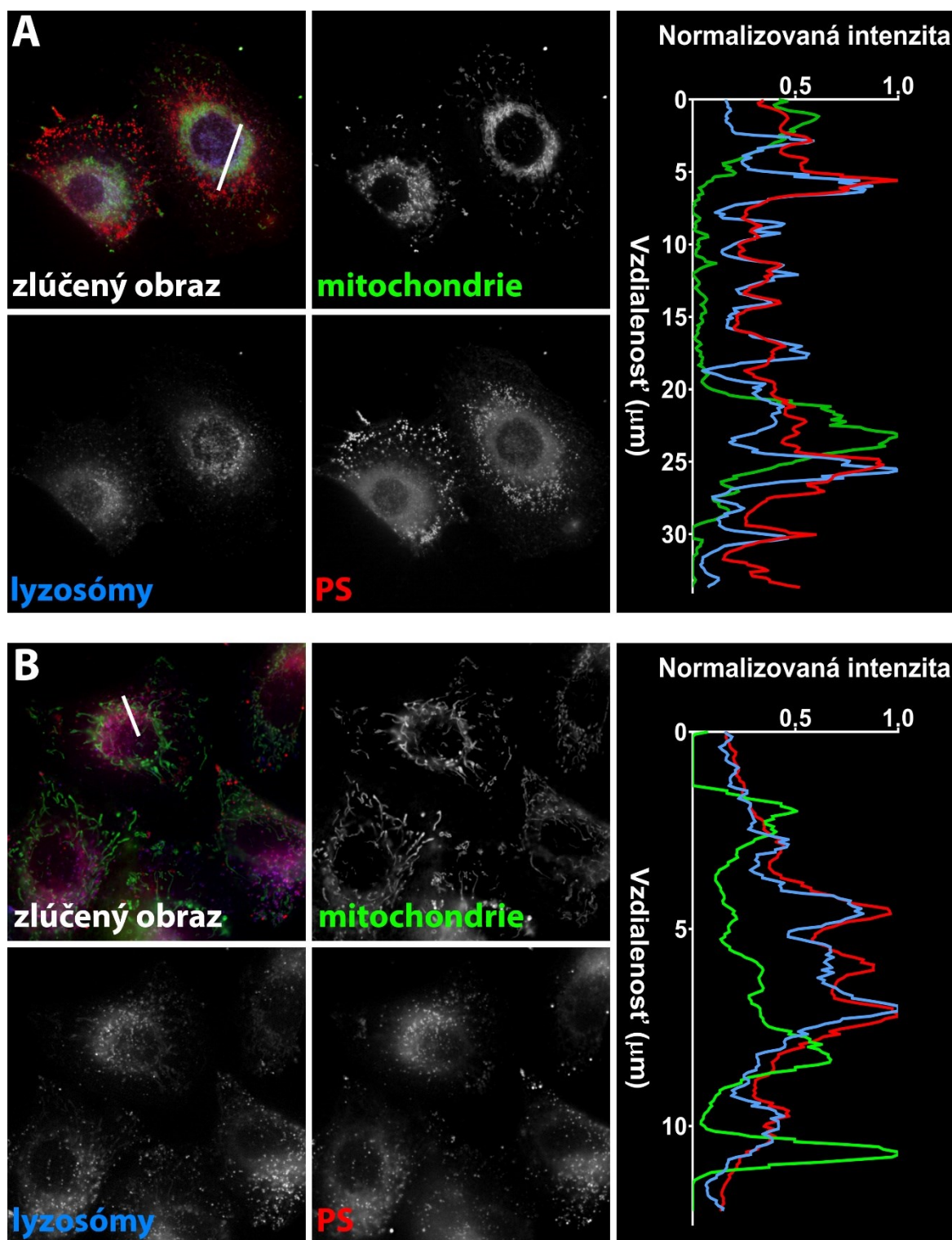
8.4.1 Lyzosómy



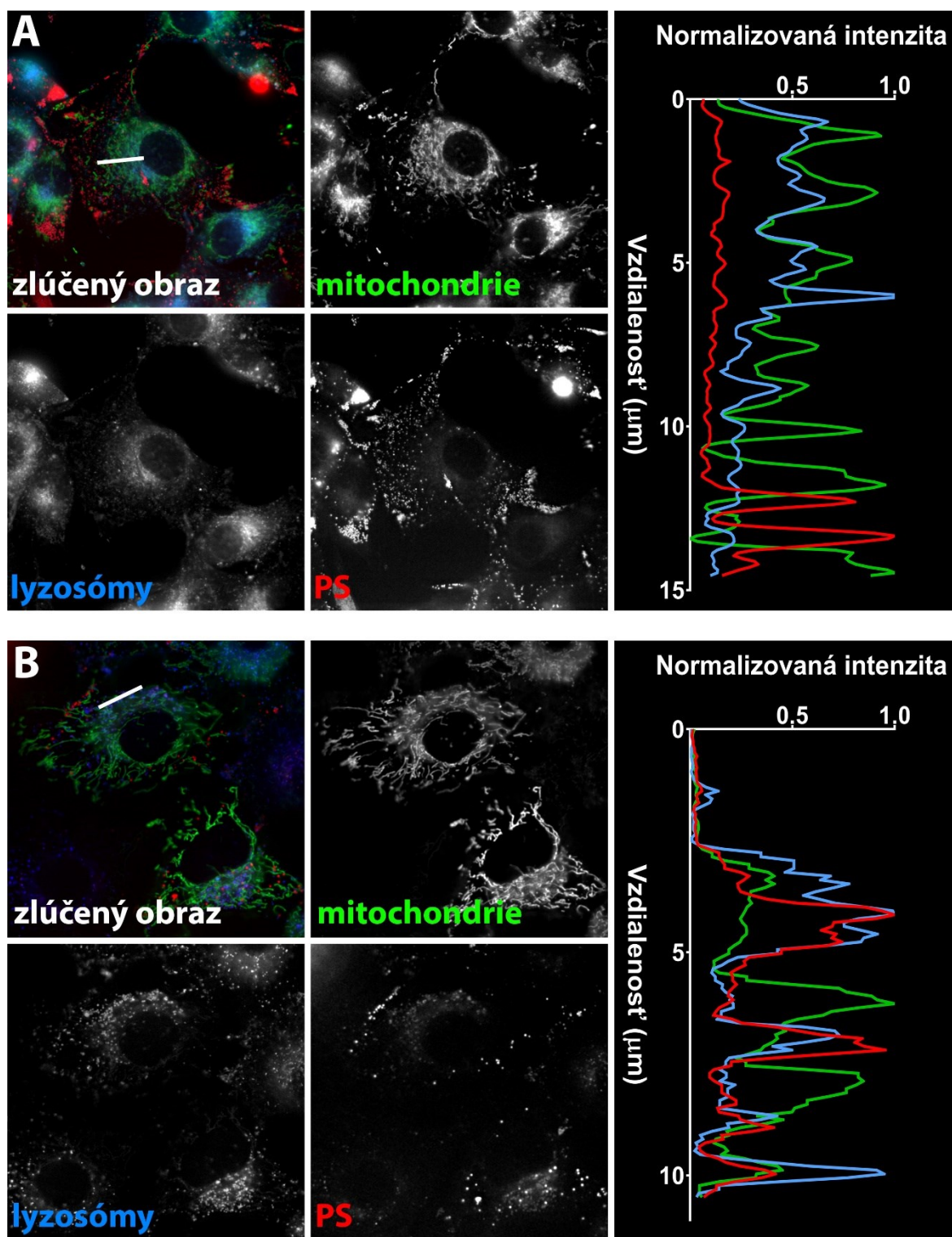
Obrázok 31 Subcelulárna lokalizácia látky 3I-SubPc-CE. Výsledky lokalizácie na bunkovej línii SK-MEL-28 (A) a na bunkovej línii HeLa (B). Študovaný PS (červený), lyzosómy farbené pomocou fluorescenčného farbiva LysoTracker Blue DND-22 (modré), mitochondrie farbené pomocou MitoTracker Green FM (zelené), prekryv fluorescenčných kanálov (v ľavo hore). Vlastná fluorescenčná aktivita 3I-SubPc-CE zaznamenaná pomocou Cy3 kanálu, mitochondrie s použitím FITC kanálu, a lyzosómy kanálom DAPI.



Obrázok 32 Subcelulárna lokalizácia látky 3EtS-SubPc-CE. Výsledky lokalizácie na bunkovej línii SK-MEL-28 (A) a na bunkovej línii HeLa (B). Študovaný PS (červený), lyzosómy farbené pomocou fluorescenčného farbiva LysoTracker Blue DND-22 (modré), mitochondrie farbené pomocou MitoTracker Green FM (zelené), prekryv fluorescenčných kanálov (v ľavo hore). Vlastná fluorescenčná aktivita 3EtS-SubPc-CE zaznamenaná pomocou Cy3 kanálu, mitochondrie s použitím FITC kanálu, a lyzosómy kanálom DAPI.

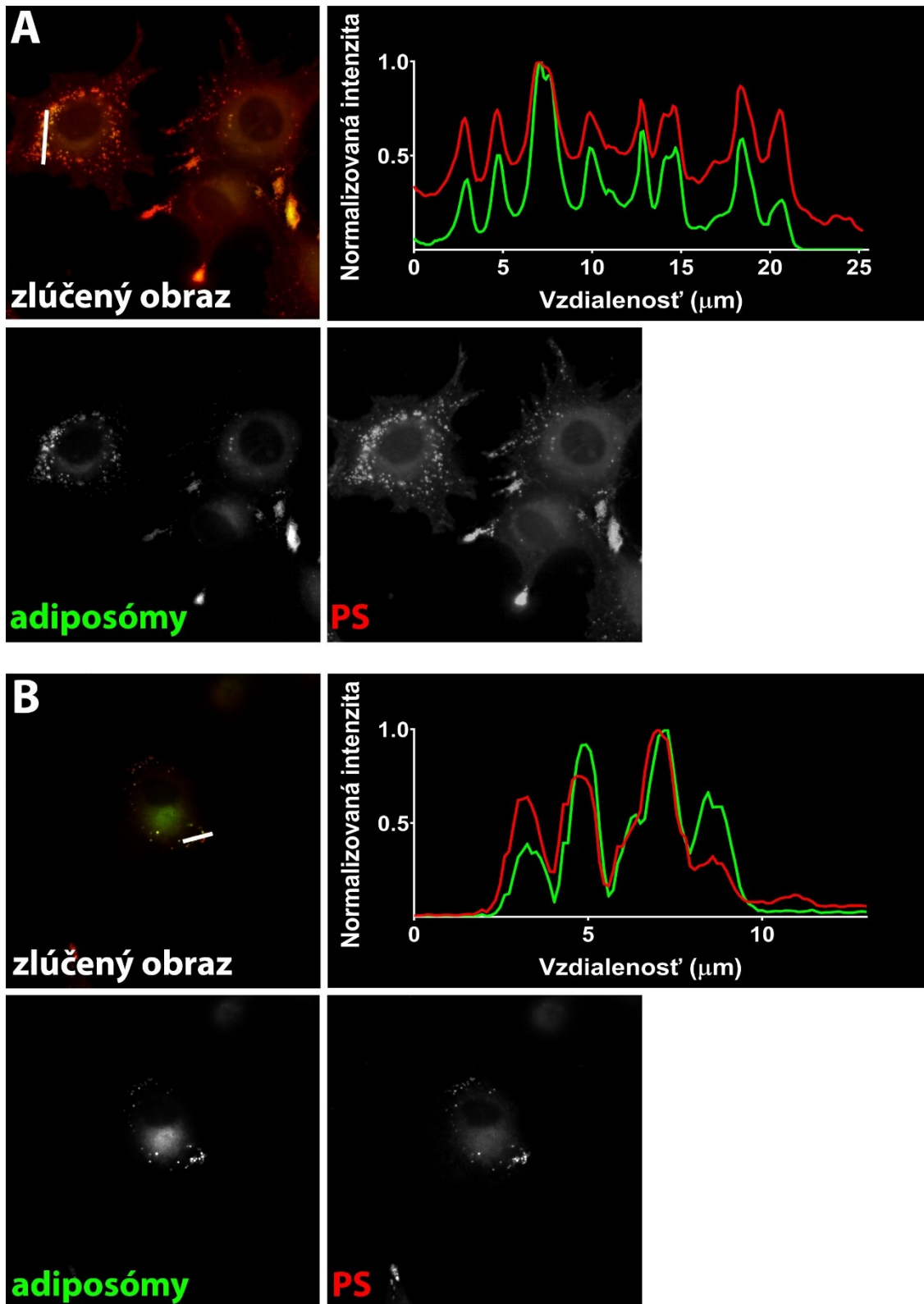


Obrázok 33 Subcelulárna lokalizácia látky 3EtS-SubPc-Tyr-FB. Výsledky lokalizácie na bunkovej línii SK-MEL-28 (A) a na bunkovej línii HeLa (B). Študovaný PS (červený), lyzosómy farbené pomocou fluorescenčného farbiva LysoTracker Blue DND-22 (modré), mitochondrie farbené pomocou MitoTracker Green FM (zelené), prekryv fluorescenčných kanálov (v ľavo hore). Vlastná fluorescenčná aktivita 3EtS-SubPc-Tyr-FB zaznamenaná pomocou Cy3 kanálu, mitochondrie s použitím FITC kanálu, a lyzosómy kanálom DAPI.

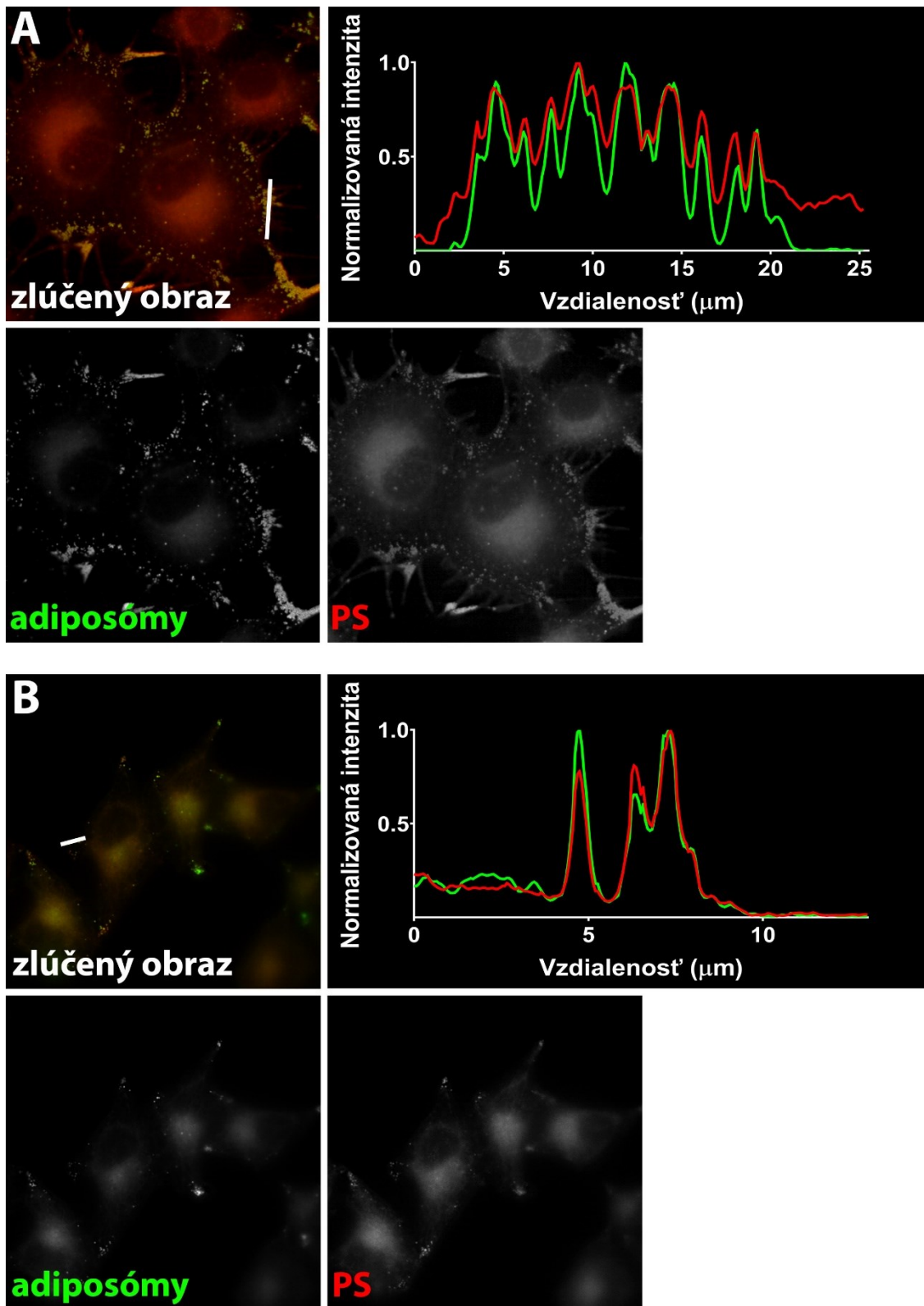


Obrázok 34 Subcelulárna lokalizácia látky 3EtS-SubPc-Tyr-Boc. Výsledky lokalizácie na bunkovej línii SK-MEL-28 (A) a na bunkovej línii HeLa (B). Študovaný PS (červený), lyzosómy farbené pomocou fluorescenčného farbiva LysoTracker Blue DND-22 (modré), mitochondrie farbené pomocou MitoTracker Green FM (zelené), prekryv fluorescenčných kanálov (v ľavo hore). Vlastná fluorescenčná aktivita 3EtS-SubPc-Tyr-BOC zaznamenaná pomocou Cy3 kanálu, mitochondrie s použitím FITC kanálu, a lyzosómy kanálom DAPI.

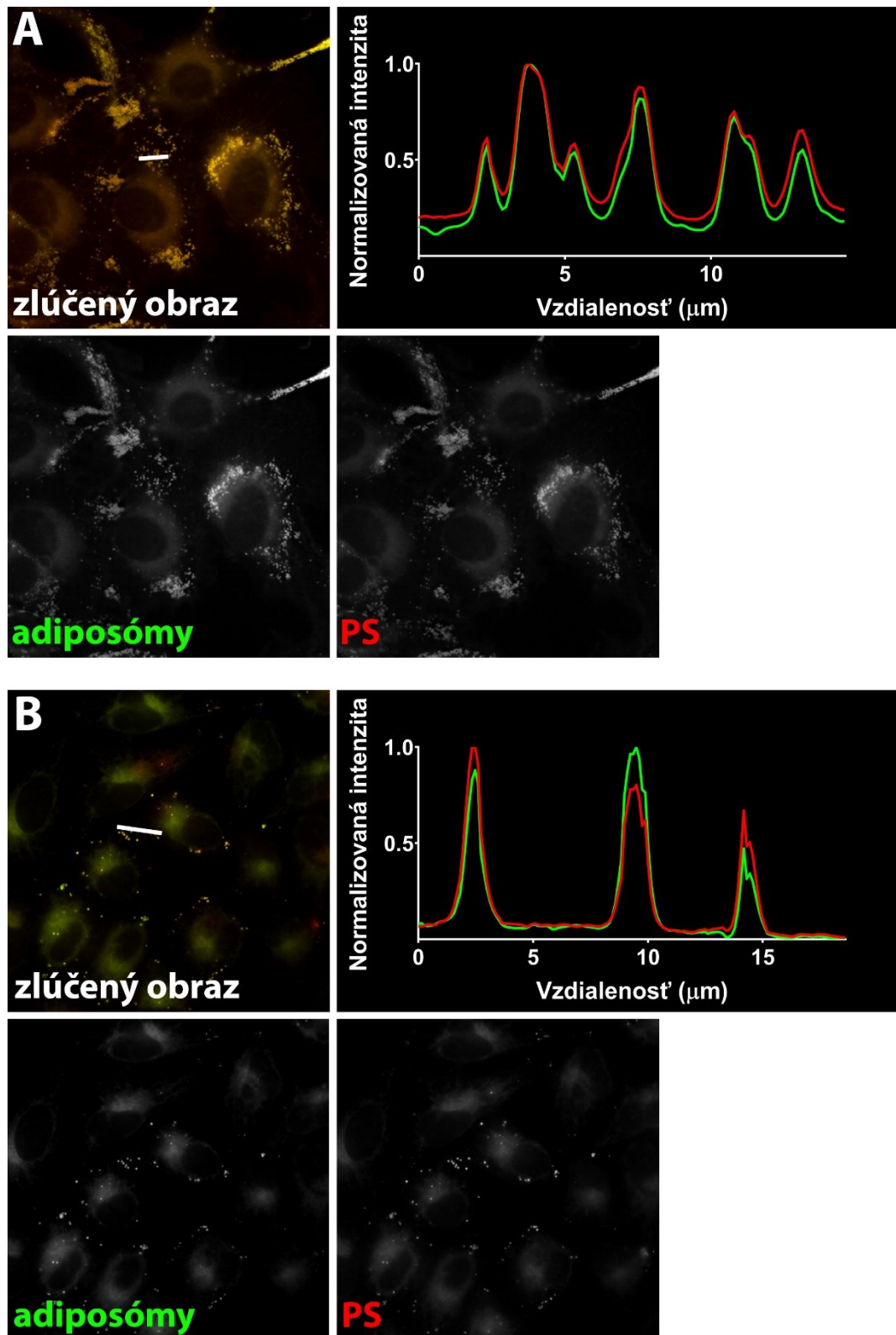
8.4.2 Adiposómy



Obrázok 35 Subcelulárna lokalizácia látky 3I-SubPc-CE. Výsledky lokalizácie na bunkovej línii SK-MEL-28 (A) a na bunkovej línii HeLa (B). Študovaný PS (červený), adiposómy (zelené), prekryv fluorescenčných kanálov (v ľavo hore). Vlastná fluorescenčná aktivita PS zaznamenaná pomocou Cy3 kanálu, adiposómy kanálom Cy5.



Obrázok 36 Subcelulárna lokalizácia látky 3EtS-SubPc-Tyr-FB. Výsledky lokalizácie na bunkovej línii SK-MEL-28 (A) a na bunkovej línii HeLa (B). Študovaný PS (červený), adiposómy (zelené), prekryv fluorescenčných kanálov (v ľavo hore). Vlastná fluorescenčná aktivita PS zaznamenaná pomocou Cy3 kanálu, adiposómy kanálom Cy5.



Obrázok 37 Subcelulárna lokalizácia látky 3EtS-SubPc-Tyr-Boc. Výsledky lokalizácie na bunkovej línii SK-MEL-28 (A) a na bunkovej línii HeLa (B). Študovaný PS (červený), adiposómy (zelené), prekryv fluorescenčných kanálov (v ľavo hore). Vlastná fluorescenčná aktivita PS zaznamenaná pomocou Cy3 kanálu, adiposómy kanálom Cy5.

9 DISKUSIA

Fotodynamická terapia (PDT) je forma fototerapie zahŕňajúca fotochémiu, fotofyziku a fotobiológiu. Hoci ľudia v dávnych dobách používali svetlo na liečbu niektorých chorôb (napríklad na vitiligo alebo psoriázu), moderný koncept PDT sa etabloval až v 20. storočí. Oscar Raab náhodne objavil, že mikroorganizmy, ktoré sa inkubovali s určitými farbivami, boli zabitú vystavením svetlu. Vďaka objaveniu porfimeru sodného v 70-tych rokoch minulého storočia a rýchlemu rozvoju laserovej techniky, technológie optického prenosu a molekulárnej biológie za posledných 30 rokov priťahuje PDT čoraz viac pozornosti a stáva sa dobre študovanou terapiou rakoviny a rôznych iných malígnych ochorení. PDT ako neinvazívna metóda liečby nádorov, ktorá sa líši od chirurgie, rádioterapie a chemoterapie, je menej toxická, krátkodobá, nerezistentná voči liečivu, selektívna pre nádorové tkanivo a môže sa ľahko realizovať kombináciou liečby rakoviny s inou liečbou. PDT už bola aplikovaná pri rakovine tumore kože, spinocelulárnom karcinóme či karcinóme prostaty, prsníka, krčka maternice, pľúc a mnohých ďalších (Yi *et al.*, 2020).

Úspešné použitie PDT ako terapie vyžaduje optimálnu kombináciu svetla špecifickej vlnovej dĺžky, svetlom aktivovanej chemickej látky známej ako fotosenzitizér (PS) a molekulárneho kyslíka $^3\text{O}_2$ prítomného v tkanive na vyvolanie bunkovej smrti prostredníctvom oxidačného poškodení. Základ liečby závisí od vychytávania PS do malígneho tkaniva po systémovom alebo topickom podaní. Absorpcia svetla PS spôsobí prechod zo základného stavu do excitovaného stavu. PS prenesie energiu zo svojho excitovaného stavu na molekulu $^3\text{O}_2$ a vytvorí singletový kyslík ($^1\text{O}_2$). Okrem generovania $^1\text{O}_2$ (mechanizmus typu 2) môže fungovať aj mechanizmus typu 1 – založený na prenose elektrónov medzi tripletovým stavom a biomolekulami. To vedie k tvorbe superoxidového anión radikálu a iných reaktívnych foriem kyslíka (ROS). ROS ako $^1\text{O}_2$, hydroxylové radikály a superoxidové anión radikály vedú k oxidačnému poškodeniu buniek a môžu podporovať apoptózu (programovanú bunkovú smrť) alebo nekrózu v závislosti od intenzity dodaného svetla. Je známe, že dochádza k fotooxidačnému poškodeniu kľúčových molekúl spojených s funkciou bunkovej membrány, vrátane zvyškov aminokyselín a cholesterolu, ako aj intracelulárnych štruktúr, ako sú nukleové kyseliny, ktoré kontrolujú normálnu bunkovú aktivitu a relatívny stav bunky v rámci bunkového cyklu (Banerjee *et al.*, 2017).

PS vo fotodynamickej terapii umožňujú prenos a transláciu svetelnej energie do chemickej reakcie typu II. V klinickej praxi pochádzajú PS z troch skupín – porfyríny, chlorofyly a Pc. Všetky klinicky úspešne aplikované PS majú schopnosť vo väčšej alebo menšej miere poškodiť tkanivá a vaskulárny systém nádoru po špecifickom ožiarení danej oblasti, s dosiahnutím ablácie nádoru. Každý PS je aktivovaný pri dostatočnej a špecifickej dávke svetla vhodnej na zvolený typ terapie ochorenia. Bonusom je ich schopnosť fluorescencie a vizualizácie lézie (Allison *et al.*, 2004).

Do dnešného dňa bolo indentifikovaných približne 200-300 chemických zlúčenín s potenciou fotosenzitívnou vlastnosťou. Niektoré z týchto látok prešli klinickým testovaním a boli schválené EMA a FDA, u niektorých testovania ešte prebiehajú zatiaľ čo iné sú ešte len vo výskumnej fáze. Prvým klinicky používaným PS bol porfimer sodný (neskôr známy pod komerčným názvom Photofrin[®]), zaradujúci sa k prvej generácii PS. Kvôli obmedzeniam ako je nízka absorpčná vlnová dĺžka a postterapeutická fotosenzitivita sa pristúpilo k vylepšeniu a optimalizácii dovtedy známych PS. V rámci druhej generácie sa klinicky využívajú napríklad ALA (Levulan[®]), temoporfin (Foscan[®]), verteporfin (Visudyne[®]) a hydroxyhlinitý sulfonovaný ftalocyanín (Photosens[®]) na široké spektrum ochorení (pečeň, koža, prostata, pľúca a iné). Tretia generácia sa v štúdiu PS snaží o ich začlenenie/pripojenie do liposómov, nanočastíc či naviazaním na protilátky a lipoproteíny, čo by viedlo k zvýšeniu účinku v procese lokalizácie a následnej eliminácie nádorových buniek.

Náplňou tejto diplomovej práce bolo experimentálne štúdium nových derivátov ftalocaynínových fotosenzitizérov zo zmenšeným makrocyclom, označovaných ako subftalocyaníny (SubPc). Základnú štruktúru tvorí tetrapyrolové jadro s centrálnou viazaným atómom (polo)kovu (v tomto prípade ide o bór) a väzbou troch isoindolových skupín na ktoré je v axiálnej polohe substituovaná štruktúra benzocrownu alebo metylesteru tyrozínu. Molekuly skúmaných PS sú v periférnych častiach látky doplnené o atómy fluóru alebo jódu. Syntéza a samotná príprava prebehla na Katedre farmaceutickej chémie a farmaceutickej analýzy (Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova) vedeckou skupinou prof. PharmDr. Petra Zimčíka, Ph.D., konkrétne Dr. Demuthom a doc. Novákovou.

Pc a SubPc nie sú využívané len v rámci nádorovej terapie, ich uplatnenie je možné aj v iných aplikačných sférach na základe ich optimálnych fyzikálnych vlastností s možnosťou tieto vlastnosti ďalej vylepšiť. Vo vedeckej práci sa Grant *et al.*, 2019 venoval štúdiu subftalocyanínov s centrálnym atómom bóru (SubPc) a kremíkových ftalocyanínov (SiPc) ako

aktívneho materiálu v rámci organickej fotovoltiky (OPV). Samotné SubPc a SiPc mali veľmi dobré absorpčné vlastnosti v oranžovo-červenej oblasti viditeľného spektra v porovnaní s klasickými Pc. Zahnutím axiálnych skupín bolo možné vyladenie rozpustnosti a stability molekuly. Od klasických Pc taktiež ovplyvali lepším transferom elektrónov, čo viedlo k optimalizovaniu metódy OPV. Fotoindukčným elektrónovým transferom (PET) sa zaoberal Skvortsov *et al.*, 2020, kedy do axiálnej pozície bol substituovaný ligand 4-dimetylamínofenoxy a 4-hydroxyfenoxy. Zavedenie hydroxy a fenoxy skupiny potvrdilo optimalizovanie metódy PET, kedy ligandy slúžili ako donor elektrónov. Ich fluorescencia sa prejavila najviac rozpusteným v kyseline trifluóroctovej. Počet štúdií zaoberajúcich sa aplikáciou SubPc v rôznych odvetviach, vzhľadom na relatívne novú skupinu derivátov Pc, je malý, a práve preto sme sa vo výskumnej práci zamerali ďalej práve na tieto nové deriváty. Z našich výsledkov SubPc sa preukázala účinnosť týchto látok ako extrémne vysoká a to ich aktivitou v nanomolových koncentráciách.

Experimentálna práca sa uskutočnila na dvoch ľudských nádorových bunkových líniiach, a to na HeLa bunkách (ľudské nádorové bunky krčka maternice) a SK-MEL-28 bunkách (nádorová bunky kožného melanómu). Obe bunkové línie boli inkubované v SCM médiu za štandardných podmienok. Prvé testovanie látok sa uskutočnilo metódou stanovenia cytotoxicity študovaných PSs po ožiarení svetlom o vhodnej vlnovej dĺžke a toxicity samotných látok bez predchádzajúceho ožiarenia (tzv. „dark“ toxicita).

Výsledky cytotoxických stanovení nami skúmaných látok sú zobrazené v Tabuľke 2. Z výsledkov EC_{50} vyplýva, že najlepšiu účinnosť v rámci PDT terapie (DLI = 12h) prejavila látka 3EtS-SubPc-CE, ktorej efektívna koncentrácia na bunkovej línii SK-MEL-28 má hodnoty $EC_{50} = 2,3 \pm 0,7$ nM. Obdobne boli získané hodnoty aj pri stanovení na bunkovej línii HeLa ($EC_{50} = 4,4 \pm 2,1$ nM). Sľubné výsledky boli získané aj u látku 3I-SubPc-CE, na bunkovej línii SK-MEL-28 ($EC_{50} = 37,8 \pm 7,6$ nM) a HeLa ($EC_{50} = 65,6 \pm 19,6$ nM). Látky 3EtS-SubPc-Tyr-FB (SK-MEL-28 $EC_{50} = 223,4 \pm 17,1$ nM; HeLa $EC_{50} = 120,0 \pm 18,3$ nM) a 3EtS-SubPc-Tyr-Boc (SK-MEL-28 $EC_{50} = 4,77 \pm 0,31$ μ M; HeLa $EC_{50} = 4,45 \pm 0,01$ μ M) prejavili obdobne dobré výsledky účinnosti v porovnaní s prvými dvoma spomínanými látkami. Aktivita látok 12F-SubPc-CE (SK-MEL-28 $EC_{50} = 16,291 \pm 2,888$ μ M; HeLa $EC_{50} = 6,400 \pm 0,391$ μ M) a 12F-SubPc-Tyr-Boc (SK-MEL-28 $EC_{50} = 66,153 \pm 5,086$ μ M; HeLa $EC_{50} = 64,011 \pm 5,831$ μ M) dosiahla o niekoľko rádov vyššie hodnoty, čím sa ich aktivita v rámci PDT terapie prejavila ako nedostatočná.

Vlastná toxicita látok („dark“ toxicita) bola obdobne experimentálne testovaná taktiež na bunkách SK-MEL-28 a HeLa. Získané hodnoty TC_{50} pre skúmané SubPc sú zobrazené v Tabuľke 2. Výsledky nameraných hodnôt v rámci metódy „dark“ toxicity odpovedajú hodnotám získaným po ožiarení študovaných PS. Látka 12F-SubPc-CE a 12F-SubPc-Tyr-Boc prejavili nulový PDT efekt (toxicita po ožiarení odpovedá ich vlastnej toxicite bez ožiarenia).

Tabuľka 2 Výsledky EC_{50} (fototoxicita) a TC_{50} („dark“ toxicita) pre študované látky na bunkovej línii SK-MEL-28 a HeLa vyhodnotenú metódou neutrálnej červene.

Študované látky (PS)	Nádorová bunková línia			
	SK-MEL-28		HeLa	
	EC_{50} (μ M)	TC_{50} (μ M)	EC_{50} (μ M)	TC_{50} (μ M)
	PDT	„Dark“	PDT	„Dark“
3I-SubPc-CE	0,0378 \pm 0,0076	71,843 \pm 2,245	0,0656 \pm 0,0169	23,499 \pm 3,438
3EtS-SubPc-CE	0,0023 \pm 0,0007	14,492 \pm 1,131	0,0044 \pm 0,0021	5,245 \pm 1,486
3EtS-SubPc-Tyr-FB	0,2234 \pm 0,0171	>100	0,1200 \pm 0,0183	68,809 \pm 26,743
3EtS-SubPc-Tyr-Boc	4,77 \pm 0,31	>100	4,45 \pm 0,01	>100
12F-SubPc-CE	16,291 \pm 2,888	18,953 \pm 0,053	6,400 \pm 0,391	6,781 \pm 1,191
12F-SubPc-Tyr-Boc	66,153 \pm 5,086	>100	64,011 \pm 5,831	65,665 \pm 2,836

Porovnaním fotodynamickej aktivity našich študovaných SubPc s výsledkami zo štúdie amfifilných kationických ftalocynínov (Halaskova *et al.*, 2022), uskutočnenej za porovnateľných podmienok, preukázali na bunkovej línii HeLa nami experimentálne skúmané látky oveľa optimálnejšie výsledky. Najlepšiu PDT aktivitu prejavila naša látka 3EtS-SubPc-CE ($EC_{50} = 4,4 \pm 2,1$ nM) oproti amfifilným Pc, u ktorých sa hodnoty EC_{50} pohybovali medzi 27 až 105 nM.

Zo štúdie Machacek *et al.*, 2016 sa aktivita našich SubPc (3EtS-SubPc-CE a 3I-SubPc-CE) v porovnaní s testovanými (aza)ftalocyanínmi skúmanými na bunkách HeLa taktiež potvrdila ako porovnateľná s najefektívnejšou látkou **6** z ich štúdie ($EC_{50} = 3,8 \pm 0,2$ nM; ta má však výrazne nižšiu „dark“ toxicitu – $TC_{50} = 435 \pm 26$ μ M). Na druhú stranu, obe naše vyššie spomenuté látky dosiahli oveľa lepšie a efektívnejšie výsledky v porovnaní s klinicky používanými PS študovanými za rovnakých podmienok, a to: temoporfin ($EC_{50} = 0,045 \pm 0,007$ μ M; $TC_{50} = 20,6 \pm 2,5$ μ M), verteporfin ($EC_{50} = 0,036 \pm 0,010$ μ M; $TC_{50} = 18,6 \pm 4,2$ μ M) či PpIX ($EC_{50} = 0,80 \pm 0,13$ μ M; $TC_{50} = >10$ μ M).

Xu *et al.*, 2007 porovnáva aktivitu študovaných SubPc na bunkových líniiach HepG2 a HT29 pre štyri študované látky. Najlepšiu aktivitu zo študovaných látok dosiahli látky **4**

(HepG2 i HT29 $IC_{50} = 0,02\mu M$) a **5** (HepG2 $IC_{50} = 0,02\mu M$; HT29 $IC_{50} = 0,04\mu M$). V porovnaní s našimi študovanými látkami je PDT aktivita látok 3EtS-SubPc-CE a 3I-SubPc-CE niekoľkonásobne optimálnejšie. Samotné porovnanie výsledkov *in vitro* s údajmi z literatúry je takmer nemožné, vzhľadom na jediný možný vedecký článok zaoberajúci sa EC_{50} u SubPc.

Stanovenie typu bunkovej smrti sa uskutočnilo na bunkovej línii SK-MEL-28 pre štyri SubPc (3I-SubPc-CE, 3EtS-SubPc-CE, 3EtS-SubPc-Tyr-FB a 3EtS-SubPc-Tyr-Boc). Ako metóda bola zvolená väzba Annexinu V na fosfatidylserín (PhSer), kedy bola kineticky v priebehu 48 hodín zaznamenávaná hodnota signáli luminiscencie a fluorescencie. Po porovnaní získaných výsledkov s digitoninom a H_2O_2 ako pozitívnou kontrolou pre nekrozu, a s látkami bortezomib (pozitívna kontrola vnútornej cesty pre apoptózu) a FasL (pozitívna kontrola vonkajšej cesty apoptózy) sa u našich skúmaných látok potvrdil ako hlavný typ bunkovej smrti apoptóza na základe časového oneskorenia signáli fluorescencie. Hlavný typ bunkovej smrti apoptózou sa preukázal aj na štúdiu Pc vo vedeckej práci Halaskova *et al.*, 2021 u kationových amfifilných látok **1Me a 2Me**. V práci Machacek *et al.*, 2015 sa u kationických Pc preukázal hlavný typ bunkovej smrti nekrozou, na základe ruptúry membrány a vyliatia lyzosomálneho obsahu do cytoplazmy. Vo vedeckom článku Van de Winkel *et al.*, 2018 zameranom na štúdium SubPc potvrdzuje u skúmaných látok **1a až 1c** typ smrti apoptózou. Banfi *et al.*, 2012, s využitím prietokovej cytometrie testoval na bunkách HTC116 BODIPY Pc ako potenciálnych PS v PDT. V jeho práci sa taktiež potvrdil typ bunkovej smrti apoptickou cestou.

Aktivita vybraných štyroch SubPc sa hodnotila aj v rámci lokalizácie týchto látok na bunkových líniiach SK-MEL-28 a HeLa bunkách. Hodnota signálu fluorescenčných sond MitoTrackerTM Green FM (zelená sonda pre mitochondrie), LysoTrackerTM Blue DND-22 (modrá sonda pre lyzosómy), HCS LipidTOXTM Deep Red Neutral Lipid Stain (červená fluorescenčná sonda pre lipidy) sa zaznamenávala pomocou fluorescenčného mikroskopu Nikon Ti-E a olejového imerzného objektívu (zväčšenie 100x) s DAPI, FITC, Cy3 a Cy5 fluorescenčných filtrov. Všetky experimentálne študované látky sa špecificky lokalizovali u oboch bunkových línii v endolyzosomálnom kompartmente buniek. Vlastná fluorescencia PS však bola zaznamenaná aj v periférnej časti bunky, čo bolo potvrdené že ide o adiposómy. V experimentálnej štúdi Machacek *et al.*, 2015 sa taktiež prejavila lokalizácia študovaných Pc (**1Zn-Et a 2Zn-Et**) v lyzosómoch. Endolyzosomálna lokalizácia látok sa potvrdila aj v práci Kollar *et al.*, 2020 pre všetky so skúmané PS. Xu *et al.*, 2007, potvrdzuje aktivitu skúmaných SubPc **2, 3, 4 a 5** (axiálne substituované SubPc s alkoxy a fenoxi skupinami) na línii TH29,

ako silné fluorescenčné žiarenie zachytené v cytoplazme buniek. Distribúcia periférne a centrálnie substituovaných SubPc (deriváty s alkyl, aryl, halogén či 4-karboetoxyfenylo skupinami) sa preukázala v endoplazmatickom retikule (Burstev *et al.*, 2022). Subcelulárna lokalizácia látok **5** až **7** z práce Zhou *et al.*, 2023 sa rovnako ako u nás preukázala na základe fluorescenčného signálu v lyzosomálnych štruktúrach HeLa buniek.

Na základe hodnotenia časového prestupu študovaných SubPc do buniek HeLa v intervaloch 0, ½, 1, 2, 4, 8, a 12 hodín mala látka 3EtS-SubPc-CE najvyššiu koncentráciu v bunkách (4 h = 1,5 nmol/mg bielkovín, 8 h = 4 nmol/mg bielkovín a 12 h = 8 nmol/mg bielkovín. U našich zvyšných troch látkach sa ich množstvo po 12 h pohybovalo od 0,1 – 0,5 nmol/mg bielkovín. V porovnaní s výsledkami dosiahnutými v štúdiu (Aza)Pc (Machacek *et al.*, 2016,) látka **1** (0,2 nmol/mg bielkovín), s látkou **6** (0,085 nmol/mg bielkovín) zo štúdie Machacek *et al.*, 2016, či so študovanými látkami **8**, **10** a **6** (Ghazal *et al.*, 2017), ktorých hodnoty sa pohybovali v rozmedzí od 0,2 – 0,4 nmol/mg bielkovín, naše látky dosiahli vyšších hodnôt. Makhseed *et al.*, 2020 v štúdiu glykolyzovaných Pc preukázal ich nízky bunkový “uptake”, ktorý sa hlavne preukázal u látky **PcG1** (0,6 pmol/mg bielkovín). Štúdiom kationických a anionických Pc (Kollar *et al.*, 2020), preukázal u anionických látok **1** a **3d** s hodnotami 0,07 nmol/mg bielkovín pre látku **1** a 0,027 nmol/mg bielkovín u látky **3d**. V porovnaní s inými derivátmi (Aza)Pc se nami študované látky dostávajú do buniek vo výrazne vyšších koncentráciách.

10 ZÁVER

- Stanovenie fototoxicity látok 3I-SubPc-CE, 3EtS-SubPc-CE, 3EtS-SubPc-Tyr-FB, 3EtS-SubPc-Tyr-Boc, 12F-SubPc-CE, 12F-SubPc-Tyr-Boc na bunkových líniách SK-MEL-28 a HeLa. Tri zo skúmaných šiestich látok dosiahli najoptimálnejšie výsledky pri stanovení PDT aktivity. Výsledné EC_{50} týchto látok sú porovnateľné s klinicky testovanými a používanými PS.
- Vlastná toxicita študovaných látok sa pohybovala v rozmedzí od 5 μM do $>100 \mu\text{M}$, kedy väčšina látok dosiahla dostatečného rozdielu hodnôt TC_{50} v porovnaní s ich EC_{50} .
- V rámci stanovenia typu bunkovej smrti metódou väzby Annexinu V na fostatidylerín sa u skúmaných látok prejavil apoptický typ úmrtia buniek.
- Zo všetkých študovaných látok, v rámci metódy časového prestupu PS do bunky, sa na základe fluorescenčného žiarenia preukázala látka 3EtS-SubPc-CE.
- Subcelulárna lokalizácia sa u skúmaných PS s využitím fluorescenčných farbív potvrdila v lyzosómoch a adiposómoch buniek HeLa a SK-MEL-28.
- Najefektívnejšiu fotodynamickú účinnosť prejavila látka 3EtS-SubPc-CE, ktorá dosiahla hodnotu $EC_{50} = 0,0023 \pm 0,0007 \mu\text{M}$ na SK-MEL-28 bunkách a $EC_{50} = 0,0044 \pm 0,0021 \mu\text{M}$ u HeLa buniek. Zvyšné látky taktiež prejavili sľubnú výsledky v rámci fototoxicitných meraní na oboch líniách buniek s výnimkou látky 12F-SubPc-CE a 12F-SubPc-Tyr-Boc, ktoré neprejavili žiadny očakávaný PDT efekt po zhodnotení ich EC_{50} a TC_{50} .

11 POUŽITÉ SKRATKY

APAF- 1	z ang. <i>apoptotic peptidase activating factor 1</i>
ATCC	americká banka bunkových línii (<i>American Type Culture Collection</i>)
BCA	bicinchonová kyselina (<i>bicinchoninic acid</i>)
BpD	derivát benzoporfirínu (<i>benzoporphyrin derivate</i>)
BSA	bovinný sérový albumín
CAT	kataláza (<i>catalase</i>)
Cyt c	cytochróm c
DMEM	kultivačné médium (<i>Dulbecco 's modified Eagle 's medium</i>)
DMSO	dimetylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
EC₅₀	stredná efektívna koncentrácia (<i>half maximal effective concentration</i>)
EDTA	etyléndiamínotetraoctová kyselina (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EMA	Európska lieková agentúra (<i>European Medicines Agency</i>)
FADD	z ang. <i>Fas -associated protein with death domain</i>
FBS	fetálne boviné sérum
FDA	Úrad pre kontrolu potravín a liečiv (<i>Food and Drug Administration</i>)
LDL	lipoproteín s nízkou hustotou (<i>low density lipoprotein</i>)
LED	svetlo emitujúca dioda (<i>light emmiting diode</i>)
LPS	lipopolysacharid
HeLa	bunky rakoviny krčka maternice
HEPES	pufor; <i>N</i> -2-hydroxyetylpipezazín- <i>N'</i> -2-etánsulfónová kyselina

HpD	derivát hematoporfirínu (<i>hematoporphyrin derivate</i>)
Hp	hematoporfirin
IAP	inhibítor apopotózy (<i>inhibitor of apoptosis</i>)
NIR	blízke infračervené svetlo (<i>near infrared light</i>)
MOMP	permeabilizácia mitochondriálnej vonkajšej membrány (<i>mitochondrial outer membrane permeabilization</i>)
NR	neutrálna červen (<i>neutral red</i>)
NRU	metóda vychytávania neutrálnej červene (<i>neutral red uptake</i>)
OPV	organická fotovoltika (<i>organic photovoltaics</i>)
PBS	fosfátový pufor (<i>phosphate buffer saline</i>)
Pc	ftalocaynín (<i>phthalocyanine</i>)
PDT	fotodynamická terapia (<i>photodynamic therapy</i>)
PET	fotoindukčný elektrónový transfer (<i>photoinduced electron transfer</i>)
PhSer	fosfatidylserin (<i>phosphatidylserine</i>)
PI	jodid propídia (<i>propidium iodide</i>)
PLGA	kopolyméry kyseliny maslovej a glykolovej (<i>poly(lactic-co-glycolic) acid</i>)
PpIX	protoporfirin IX
PS	fotosenzitizér (<i>photosensitiser</i>)
P/S	zmes penicilín/streptomycín
ROS	reaktívne formy kyslíka (<i>reactive oxygen species</i>)
RNA	ribonukleová kyselina (<i>ribonucleic acid</i>)
SCM	kultivačné médium obsahujúce sérum (<i>serum containing medium</i>)
SFM	bezsérové médium (<i>serum free medium</i>)

SK-MEL-28	ľudské melanómová nádorové bunky
SMAC	z ang. <i>second mitochondria-derived activator of caspase</i>
SubPc	subftalocyanín (<i>subphtalocyanine</i>)
TUNEL	z ang. <i>terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
TC₅₀	stredná toxická koncentracia (<i>half maximal toxic concentration</i>)
TNF	tumor nekrotizujúci faktor
TRAIL	z ang. <i>TNF- related apoptosis-induced ligand</i>
T/E	zmes trypsín s EDTA
VIS	oblasť viditeľného spektra (<i>visible spectrum</i>)
¹O₂	singletový kyslík
³O₂	molekulový kyslík
•O₂⁻	superoxidanión kyslík
H₂O₂	peroxid vodíku
HO•	hydroxylový radikál
2D/3D	dvojdimenzionálny/trojdimenzionálny
ALA	kyselina 5-aminolevulová (<i>5-aminolevulinic acid</i>)

12 POUŽITÁ LITERATÚRA

Abrahamse, H., Hamblin, MR.: *New photosensitizers for photodynamic therapy*. *Biochem J*. 2016 Feb 15;473(4):347-64. doi: 10.1042/BJ20150942. PMID: 26862179; PMCID: PMC4811612.

Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, Hahn SM, Hamblin MR, Juzeniene A, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Mroz P, Nowis D, Piette J, Wilson BC, Golab J. *Photodynamic therapy of cancer: an update*. *CA Cancer J Clin*. 2011 Jul-Aug;61(4):250-81. doi: 10.3322/caac.20114. Epub 2011 May 26. PMID: 21617154; PMCID: PMC3209659.

Akimoto, J.: *Photodynamic Therapy for Malignant Brain Tumors*. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2016;56(4):151-7. doi: 10.2176/nmc.ra.2015-0296. Epub 2016 Feb 16. PMID: 26888042; PMCID: PMC4831940

Allison, R. R., Downie, G. H., Cuenca, R., Hu, X. H., Childs, C. J., & Sibata, C. H. (2004). Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 1(1), 27-42.

Araújo ARL, Tomé AC, Santos CIM, Faustino MAF, Neves MGPMS, Simões MMQ, Moura NMM, Abu-Orabi ST, Cavaleiro JAS. *Azides and Porphyrinoids: Synthetic Approaches and Applications. Part 2-Azides, Phthalocyanines, Subphthalocyanines and Porphyrazines*. *Molecules*. 2020 Apr 10;25(7):1745. doi: 10.3390/molecules25071745. PMID: 32290240; PMCID: PMC7180445.

Ates G, Vanhaecke T, Rogiers V, Rodrigues RM. *Assaying Cellular Viability Using the Neutral Red Uptake Assay*. *Methods Mol Biol*. 2017;1601:19-26. doi: 10.1007/978-1-4939-6960-9_2. PMID: 28470514.

Banerjee SM, MacRobert AJ, Mosse CA, Periera B, Bown SG, Keshtgar MRS. *Photodynamic therapy: Inception to application in breast cancer*. *Breast*. 2017 Feb;31:105-113. doi: 10.1016/j.breast.2016.09.016. Epub 2016 Nov 8. PMID: 27833041.

Banfi, S., Caruso, E., Zaza, S., Mancini, M., Gariboldi, M. B., & Monti, E. (2012). *Synthesis and photodynamic activity of a panel of BODIPY dyes*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 114, 52–60. doi:10.1016/j.jphotobiol.2012.05

Bertheloot D, Latz E, Franklin BS. *Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death*. Cell Mol Immunol. 2021 May;18(5):1106-1121. doi: 10.1038/s41423-020-00630-3. Epub 2021 Mar 30. PMID: 33785842; PMCID: PMC8008022.

Bober Z, Aebischer D, Olek M, Kawczyk-Krupka A, Bartusik-Aebischer D. *Multiple Cell Cultures for MRI Analysis*. Int J Mol Sci. 2022 Sep 3;23(17):10109. doi: 10.3390/ijms231710109. PMID: 36077507; PMCID: PMC9456466.

Burtsev, I. D., Dubinina, T. V., Egorov, A. E., Kostyukov, A. A., Shibaeva, A. V., Agranat, A. S., ... & Kuzmin, V. A. (2022). *Substituted boron subphthalocyanines—Prospective compounds for theranostics: Synthesis, photochemical properties and in vitro cytotoxicity*. Dyes and Pigments, 207, 110690.

Castano, AP., Mroz, P., Hamblin, MR.:*Photodynamic therapy and anti-tumour immunity*. Nat Rev Cancer. 2006 Jul;6(7):535-45. doi: 10.1038/nrc1894. PMID: 16794636; PMCID: PMC2933780.

Cengel KA, Simone CB 2nd, Glatstein E. *PDT: What's Past Is Prologue*. Cancer Res. 2016 May 1;76(9):2497-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0927. PMID: 27197260; PMCID: PMC5568068.

Christgen S, Tweedell RE, Kanneganti TD. *Programming inflammatory cell death for therapy*. Pharmacol Ther. 2022 Apr;232:108010. doi: 10.1016/j.pharmthera.2021.108010. Epub 2021 Oct 4. PMID: 34619283; PMCID: PMC8930427.

Cudazzo G, Smart DJ, McHugh D, Vanscheeuwijck P. *Lysosomotropic-related limitations of the BALB/c 3T3 cell-based neutral red uptake assay and an alternative testing approach for assessing e-liquid cytotoxicity*. Toxicol In Vitro. 2019 Dec;61:104647. doi: 10.1016/j.tiv.2019.104647. Epub 2019 Sep 10. PMID: 31518669.

Crowley LC, Marfell BJ, Scott AP, Waterhouse NJ. *Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry*. Cold Spring Harb Protoc. 2016 Nov 1;2016(11). doi: 10.1101/pdb.prot087288. PMID: 27803250.

D'Arcy MS. *Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy*. Cell Biol Int. 2019 Jun;43(6):582-592. doi: 10.1002/cbin.11137. Epub 2019 Apr 25. PMID: 30958602.

de Siqueira LBO, Dos Santos Matos AP, da Silva MRM, Pinto SR, Santos-Oliveira R, Ricci-Júnior E. *Pharmaceutical nanotechnology applied to phthalocyanines for the promotion of antimicrobial photodynamic therapy: A literature review*. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2022 Sep;39:102896. doi: 10.1016/j.pdpdt.2022.102896. Epub 2022 May 4. PMID: 35525432.

Dobson, J., de Queiroz, GF., Golding, JP.:*Photodynamic therapy and diagnosis: Principles and comparative aspects*. *Vet J*. 2018 Mar;233:8-18. doi: 10.1016/j.tvjl.2017.11.012. Epub 2017 Nov 24. PMID: 29486883.

Donohoe C, Senge MO, Arnaut LG, Gomes-da-Silva LC. *Cell death in photodynamic therapy: From oxidative stress to anti-tumor immunity*. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2019 Dec;1872(2):188308. doi: 10.1016/j.bbcan.2019.07.003. Epub 2019 Aug 8. PMID: 31401103.

Dougherty, TJ., Gomer, CJ., Henderson, BW., Jori, G., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J., Peng, Q.:*Photodynamic therapy*. *J Natl Cancer Inst*. 1998 Jun 17;90(12):889-905. doi: 10.1093/jnci/90.12.889. PMID: 9637138; PMCID: PMC4592754.

Farajzadeh N, Özdemir S, Tollu G, Altuntaş Bayır Z, Burkut Koçak M. *Biological properties of hexadeca-substituted metal phthalocyanines bearing different functional groups*. *J Inorg Biochem*. 2022 Sep;234:111888. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2022.111888. Epub 2022 Jun 3. PMID: 35691264.

Fricker M, Tolkovsky AM, Borutaite V, Coleman M, Brown GC. *Neuronal Cell Death*. *Physiol Rev*. 2018 Apr 1;98(2):813-880. doi: 10.1152/physrev.00011.2017. PMID: 29488822; PMCID: PMC5966715.

Gadzhimagomedova Z, Zolotukhin P, Kit O, Kirsanova D, Soldatov A. *Nanocomposites for X-Ray Photodynamic Therapy*. *Int J Mol Sci*. 2020 Jun 3;21(11):4004. doi: 10.3390/ijms21114004. PMID: 32503329; PMCID: PMC7312431.

Ghazal, B., Machacek, M., Shalaby, M. A., Novakova, V., Zimcik, P., & Makhseed, S. (2017). *Phthalocyanines and Tetrapyrazinoporphyrazines 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. doi:10.1021/acs.jmedchem.7b00272.

Gomes, ATPC., Neves, MGPMS., Cavaleiro, JAS.: *Cancer, Photodynamic Therapy and Porphyrin-Type Derivatives*. *An Acad Bras Cienc.* 2018;90(1 Suppl 2):993-1026. doi: 10.1590/0001-3765201820170811. PMID: 29873666.

Grant TM, Josey DS, Sampson KL, Mudigonda T, Bender TP, Lessard BH. *Boron Subphthalocyanines and Silicon Phthalocyanines for Use as Active Materials in Organic Photovoltaics*. *Chem Rec.* 2019 Jun;19(6):1093-1112. doi: 10.1002/tcr.201800178. Epub 2019 Jan 23. PMID: 30672126.

Halaskova M, Kostelansky F, Demuth J, Hlbocanova I, Miletin M, Zimcik P, Machacek M, Novakova V. *Amphiphilic Cationic Phthalocyanines for Photodynamic Therapy of Cancer*. *Chempluschem.* 2022 Jul 26;87(9):e202200133. doi: 10.1002/cplu.202200133. Epub ahead of print. PMID: 35880676.

Halaskova M, Rahali A, Almeida-Marrero V, Machacek M, Kucera R, Jamoussi B, Torres T, Novakova V, de la Escosura A, Zimcik P. *Peripherally Crowded Cationic Phthalocyanines as Efficient Photosensitizers for Photodynamic Therapy*. *ACS Med Chem Lett.* 2021 Mar 1;12(3):502-507. doi: 10.1021/acsmchemlett.1c00045. PMID: 33738078; PMCID: PMC7958147.

Hanack M. *Glycosylated Metal Phthalocyanines*. *Molecules.* 2015 Nov 10;20(11):20173-85. doi: 10.3390/molecules201119683. PMID: 26569201; PMCID: PMC6332309.

Kollar, J., Machacek, M., Halaskova, M., Lenco, J., Kucera, R., Demuth, J., ... Zimcik, P. (2020). *Cationic versus Anionic Phthalocyanines for Photodynamic Therapy: What a Difference the Charge Makes*. *Journal of Medicinal Chemistry*. doi:10.1021/acs.jmedchem.0c00481.

Kwiatkowski S, Knap B, Przystupski D, Saczko J, Kędzierska E, Knap-Czop K, Kotlińska J, Michel O, Kotowski K, Kulbacka J. *Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations*. *Biomed Pharmacother.* 2018 Oct;106:1098-1107. doi: 10.1016/j.biopha.2018.07.049. Epub 2018 Jul 17. PMID: 30119176.

Labella J, Momblona C, Čulík P, López-Serrano E, Kanda H, Nazeeruddin MK, Torres T. *Modulating the Electron Transporting Properties of Subphthalocyanines for Inverted*

Perovskite Solar Cells. Front Chem. 2022 Jun 14;10:886522. doi: 10.3389/fchem.2022.886522. PMID: 35910737; PMCID: PMC9329656.

Landry, J. J., Pyl, P. T., Rausch, T., Zichner, T., Tekkedil, M. M., Stütz, A. M., ... & Steinmetz, L. M. (2013). *The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line*. G3: Genes, Genomes, Genetics, 3(8), 1213-1224.

Lavarda G, Labella J, Martínez-Díaz MV, Rodríguez-Morgade MS, Osuka A, Torres T. *Recent advances in subphthalocyanines and related subporphyrinoids*. Chem Soc Rev. 2022 Nov 28;51(23):9482-9619. doi: 10.1039/d2cs00280a. PMID: 36354343.

Lestari F, Hayes AJ, Green AR. 9 - *In Vitro biological toxicity assessments for fire combustion products*. Fire Toxicity, Woodhead Publishing, 2010, Pages 346-365, ISBN 9781845695026, doi:10.1533/9781845698072.3.346.

Li M, Wang ZW, Fang LJ, Cheng SQ, Wang X, Liu NF. *Programmed cell death in atherosclerosis and vascular calcification*. Cell Death Dis. 2022 May 18;13(5):467. doi: 10.1038/s41419-022-04923-5. PMID: 35585052; PMCID: PMC9117271.

Li X, Lovell JF, Yoon J, Chen X. *Clinical development and potential of photothermal and photodynamic therapies for cancer*. Nat Rev Clin Oncol. 2020 Nov;17(11):657-674. doi: 10.1038/s41571-020-0410-2. Epub 2020 Jul 22. PMID: 32699309.

Li, Xingshu, Songyi Lee and Juyoung Yoon. "Supramolecular photosensitizers rejuvenate photodynamic therapy." Chemical Society reviews 47 4 (2018): 1174-1188 .

Li Y, Wang B, Zheng S, He Y. *Photodynamic therapy in the treatment of oral leukoplakia: A systematic review*. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2019 Mar;25:17-22. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.10.023. Epub 2018 Nov 1. PMID: 30391342.

Lo PC , Rodríguez-Morgade MS , Pandey RK , Ng DKP , Torres T , Dumoulin F . *The unique features and promises of phthalocyanines as advanced photosensitisers for photodynamic therapy of cancer*. Chem Soc Rev. 2020 Feb 21;49(4):1041-1056. doi: 10.1039/c9cs00129h. Epub 2019 Dec 17. PMID: 31845688.

Lo PC, Ng DKP, Pandey RK, Zimcik P. *Photodynamic Therapy: An Innovative and Versatile Treatment Modality Triggered by Light*. Chempluschem. 2023 Apr 12:e202300159. doi: 10.1002/cplu.202300159. Epub ahead of print. PMID: 37042437.

Lucey BP, Nelson-Rees WA, Hutchins GM. *Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination*. Arch Pathol Lab Med. 2009 Sep;133(9):1463-7. doi: 10.5858/133.9.1463. PMID: 19722756.

Machacek, M., Cidlina, A., Novakova, V., Svec, J., Rudolf, E., Miletin, M., ... Zimcik, P. (2015). *Far-Red-Absorbing Cationic Phthalocyanine Photosensitizers: Synthesis and Evaluation of the Photodynamic Anticancer Activity and the Mode of Cell Death Induction*. Journal of Medicinal Chemistry, 58(4), 1736–1749. doi:10.1021/jm5014852.

Machacek M, Demuth J, Cermak P, Vavreckova M, Hrubá L, Jedlickova A, Kubat P, Simunek T, Novakova V, Zimcik P. *Tetra(3,4-pyrido)porphyrazines Caught in the Cationic Cage: Toward Nanomolar Active Photosensitizers*. J Med Chem. 2016 Oct 27;59(20):9443-9456. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b01140. Epub 2016 Oct 5. PMID: 27682881.

Machacek, M., Kollár, J., Miletin, M., Kučera, R., Kubát, P., Simunek, T., ... Zimcik, P. (2016). *Anionic hexadeca-carboxylate tetrapyrazinoporphyrazine: synthesis and in vitro photodynamic studies of a water-soluble, non-aggregating photosensitizer*. RSC Advances, 6(12), 10064–10077. doi:10.1039/c5ra25881b.

Makhseed, saad, Husain, A. A., Kubát, P., Machacek, M., Zimcik, P., Ganesan, A., ... Cerveny, L. (2020). *Dually Directional Glycosylated Phthalocyanines as Extracellular Red-Emitting Fluorescent Probes*. Dalton Transactions. doi:10.1039/d0dt01180k

Mori S, Shibata N. *Synthesis and application of trifluoroethoxy-substituted phthalocyanines and subphthalocyanines*. Beilstein J Org Chem. 2017 Oct 27;13:2273-2296. doi: 10.3762/bjoc.13.224. PMID: 29114331; PMCID: PMC5669247.

Mfouo-Tynga, I., Abrahamse, H.: *Cell death pathways and phthalocyanine as an efficient agent for photodynamic cancer therapy*. Int J Mol Sci. 2015 May 6;16(5):10228-41. doi: 10.3390/ijms160510228. PMID: 25955645; PMCID: PMC4463643.

Pražmo EJ, Kwaśny M, Łapiński M, Mielczarek A. *Photodynamic Therapy As a Promising Method Used in the Treatment of Oral Diseases*. Adv Clin Exp Med. 2016 Jul-Aug;25(4):799-807. doi: 10.17219/acem/32488. PMID: 27629857.

Ogura Y, Nakano M, Maeda H, Segi M, Furuyama T. *Cationic Axial Ligand Effects on Sulfur-Substituted Subphthalocyanines*. Molecules. 2022 Apr 26;27(9):2766. doi: 10.3390/molecules27092766. PMID: 35566117; PMCID: PMC9105831.

Ong, YH., Dimofte, A., Kim, MM., Finlay, JC., Sheng, T., Singhal, S., Cengel, KA., Yodh, AG., Busch, TM., Zhu, TC.: *Reactive Oxygen Species Explicit Dosimetry for Photofrin-mediated Pleural Photodynamic Therapy*. *PhotochemPhotobiol.* 2020 Mar;96(2):340-348. doi: 10.1111/php.13176. Epub 2019 Dec 6. PMID: 31729774; PMCID: PMC7299188.

Preksha G, Yesheswini R, Srikanth CV. *Cell culture techniques in gastrointestinal research: Methods, possibilities and challenges*. *Indian J Pathol Microbiol.* 2021 Jun;64(Supplement):S52-S57. doi: 10.4103/IJPM.IJPM_933_20. PMID: 34135138.

Rkein AM, Ozog DM. *Photodynamic therapy*. *Dermatol Clin.* 2014 Jul;32(3):415-25, x. doi: 10.1016/j.det.2014.03.009. PMID: 24891062.

Real-time assessment of apoptosis and necrosis. *BioTechniques* [online]. 2018, 64(4), 187-188 [cit. 2023-05-05]. Dostupné z: doi:10.2144/btn-2017-0129

Repetto G, del Peso A, Zurita JL. *Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity*. *Nat Protoc.* 2008;3(7):1125-31. doi: 10.1038/nprot.2008.75. PMID: 18600217.

Santos KLM, Barros RM, da Silva Lima DP, Nunes AMA, Sato MR, Faccio R, de Lima Damasceno BPG, Oshiro-Junior JA. *Prospective application of phthalocyanines in the photodynamic therapy against microorganisms and tumor cells: A mini-review*.

Sauler M, Bazan IS, Lee PJ. *Cell Death in the Lung: The Apoptosis-Necroptosis Axis*. *Annu Rev Physiol.* 2019 Feb 10;81:375-402. doi: 10.1146/annurev-physiol-020518-114320. Epub 2018 Nov 28. PMID: 30485762; PMCID: PMC6598441.

Shi, X., Zhang, CY., Gao, J., Wang, Z.: *Recent advances in photodynamic therapy for cancer and infectious diseases*. *WileyInterdiscip Rev NanomedNanobiotechnol.* 2019 Sep;11(5):e1560. doi: 10.1002/wnan.1560. Epub 2019 May 6. PMID: 31058443; PMCID: PMC6697192.

Skvortsov IA, Zimcik P, Stuzhin PA, Novakova V. *pH-Sensitive subphthalocyanines and subazaphthalocyanines*. *Dalton Trans.* 2020 Aug 28;49(32):11090-11098. doi: 10.1039/d0dt01703e. Epub 2020 Jun 25. PMID: 32582891.

Sun B, Bte Rahmat JN, Zhang Y. *Advanced techniques for performing photodynamic therapy in deep-seated tissues*. *Biomaterials*. 2022 Dec;291:121875. doi: 10.1016/j.biomaterials.2022.121875. Epub 2022 Oct 27. PMID: 36335717.

Photodiagnosis Photodyn Ther. 2020 Dec;32:102032. doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.102032. Epub 2020 Oct 2. PMID: 33017659.

Sekkat N, van den Bergh H, Nyokong T, Lange N. *Like a bolt from the blue: phthalocyanines in biomedical optics*. *Molecules*. 2011 Dec 23;17(1):98-144. doi: 10.3390/molecules17010098. PMID: 22198535; PMCID: PMC6269082.

Strasser A, Vaux DL. *Cell Death in the Origin and Treatment of Cancer*. *Mol Cell*. 2020 Jun 18;78(6):1045-1054. doi: 10.1016/j.molcel.2020.05.014. Epub 2020 Jun 8. PMID: 32516599.

Strober W. *Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability*. *Curr Protoc Immunol*. 2015 Nov 2;111:A3.B.1-A3.B.3. doi: 10.1002/0471142735.ima03bs111. PMID: 26529666; PMCID: PMC6716531.

Tong X, Tang R, Xiao M, Xu J, Wang W, Zhang B, Liu J, Yu X, Shi S. *Targeting cell death pathways for cancer therapy: recent developments in necroptosis, pyroptosis, ferroptosis, and cuproptosis research*. *J Hematol Oncol*. 2022 Dec 8;15(1):174. doi: 10.1186/s13045-022-01392-3. PMID: 36482419; PMCID: PMC9733270.

Tower J. *Programmed cell death in aging*. *Ageing Res Rev*. 2015 Sep;23(Pt A):90-100. doi: 10.1016/j.arr.2015.04.002. Epub 2015 Apr 8. PMID: 25862945; PMCID: PMC4480161.

Van de Winckel, E., Mascaraque, M., Zamarrón, A., Juarranz de la Fuente, Á., Torres, T., & de la Escosura, A. (2018). *Dual Role of Subphthalocyanine Dyes for Optical Imaging and Therapy of Cancer*. *Advanced Functional Materials*, 28(24), 1705938. doi:10.1002/adfm.201705938.

Warrier A, Mazumder N, Prabhu S, Satyamoorthy K, Murali TS. *Photodynamic therapy to control microbial biofilms*. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2021 Mar;33:102090. doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.102090. Epub 2020 Nov 4. PMID: 33157331.

Xu, H., Jiang, X.-J., Chan, E. Y. M., Fong, W.-P., & Ng, D. K. P. (2007). *Synthesis, photophysical properties and in vitro photodynamic activity of axially substituted subphthalocyanines*. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 5(24), 3987. doi:10.1039/b712788j.

Yang D, Lei S, Pan K, Chen T, Lin J, Ni G, Liu J, Zeng X, Chen Q, Dan H. *Application of photodynamic therapy in immune-related diseases*. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2021 Jun;34:102318. doi: 10.1016/j.pdpdt.2021.102318. Epub 2021 Apr 30. PMID: 33940209.

Yang, Z., Wang, J., Ai, S., Sun, J., Mai, X., Guan, W.: *Self-generating oxygen enhanced mitochondrion-targeted photodynamic therapy for tumor treatment with hypoxia scavenging*. *Theranostics*. 2019 Sep 20;9(23):6809-6823. doi: 10.7150/thno.36988. PMID: 31660070; PMCID: PMC6815961.

Yi C, Yu Z, Ren Q, Liu X, Wang Y, Sun X, Yin S, Pan J, Huang X. *Nanoscale ZnO-based photosensitizers for photodynamic therapy*. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020 Jun;30:101694. doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.101694. Epub 2020 Feb 25. PMID: 32109615.

Zango G, Sakurai T, Urones B, Saeki H, Matsuda W, Martínez-Díaz MV, Seki S, Torres T. *Peripherally Cyanated Subphthalocyanines as Potential n-Type Organic Semiconductors*. *Chemistry*. 2018 Jun 12;24(33):8331-8342. doi: 10.1002/chem.201801190. Epub 2018 May 29. PMID: 29644758.

Zeng, G., Liu, J., Chen, H., Liu, B., Zhang, Q., Li, M., & Zhu, R. (2014). *Dihydromyricetin induces cell cycle arrest and apoptosis in melanoma SK-MEL-28 cells*. *Oncology reports*, 31(6), 2713-2719.

Zhao, Y., Yao, R., Ouyang, L., Ding, H., Zhang, T., Zhang, K., ... & Sun, W. (2014). *Three-dimensional printing of Hela cells for cervical tumor model in vitro*. *Biofabrication*, 6(3), 035001.

Zheng, W., Wan, C. Z., Zhang, J. X., Li, C. H., & You, X. Z. (2015). *Facile synthesis of phthalocyanine at low temperature with diisopropylamide anion as nucleophile*. *Tetrahedron letters*, 56(30), 4459-4462.

Zhou S, Lv X, Li M, Gao Z, Tu S, Qiao S, Mo M, Tang X, Wang Y, Sun S. *Synthesis, Optical Properties, and Fluorescence Cell Imaging of Novel Mixed Fluorinated*

Subphthalocyanines. *Molecules*. 2023 Jan 11;28(2):725. doi: 10.3390/molecules28020725. PMID: 36677782; PMCID: PMC9866271.

Zhu, TC., Finlay, JC.:*The role of photodynamic therapy (PDT) physics*. *Med Phys*. 2008 Jul;35(7):3127-36. doi: 10.1118/1.2937440. PMID: 18697538; PMCID: PMC2673560.