

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Fotodynamická terapie *in vitro* na nádorových buněčných liniích

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: **Markéta Kolaříková**
Studijní program: N1406 Biochemie
Studijní obor: Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **Prof. RNDr. Hana Kolářová, CSc.**
Rok: 2020

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

Ráda bych poděkovala své vedoucí diplomové práce, Prof. RNDr. Haně Kolářové, CSc., za odborné vedení, veškerou poskytnutou pomoc a ochotu, kterou mi věnovala. Taktéž bych chtěla poděkovat celému Ústavu lékařské biofyziky za jejich čas, podporu a cenné rady.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Markéta Kolaříková
Název práce	Fotodynamická terapie <i>in vitro</i> na nádorových buněčných liniích
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav lékařské biofyziky
Vedoucí práce	Prof. RNDr. Hana Kolářová, CSc.
Rok obhajoby práce	2020

Abstrakt

Fotodynamická terapie, jakožto alternativní léčba zejména nádorových onemocnění, využívá světlo, kyslík a fotodynamicky aktivní látku neboli fotosensitizer. Jakmile je fotosensitizer v buňkách aktivován zářením o vlnové délce shodné s absorpčním maximem fotosensitizeru, dochází k produkci reaktivních forem kyslíku, které vedou k buněčnému poškození, případně k buněčné smrti. Fotodynamické reakce byly studovány především na nádorových buněčných liniích HeLa (karcinom děložního čípku) a G361 (lidský melanom). Konfokální mikroskopií byla pozorována lokalizace fotosensitizeru TMPyP v mitochondriích i v lysozomech. Pomocí světelné mikroskopie s fázovým kontrastem byly ověřovány morfologické změny buněk zejména po administraci fotosensitizeru a po jeho následné aktivaci ozářením. Životnost buněk byla ověřována MTT testem a produkce ROS byla studována fluorescenčními metodami buněčného poškození s využitím fluorescenčních značek. Následkem fotodynamické reakce byl u nádorových linií pozorován trend nárůstu reaktivních forem kyslíku v závislosti na koncentraci fotosensitizeru. V souvislosti s ozářením byla rovněž naměřena zvýšená hladina singletního kyslíku u všech buněčných linií a prostřednictvím MTT testu buněčné životnosti bylo prokázáno snížení životnosti v závislosti na zvyšující se koncentraci fotosensitizeru. Z výsledků této práce vyplývá, že fotosensitizer TMPyP je velmi účinný pro navození fotodynamické reakce v nádorových buněčných liniích v *in vitro* podmínkách.

Klíčová slova	Fotodynamická terapie, fotosensitizer, reaktivní formy kyslíku, singletní kyslík, apoptóza, nekróza
Počet stran	104
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Markéta Kolaříková
Title	Photodynamic Therapy <i>in vitro</i> on Cancerous Cell Lines
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Medical Biophysics
Supervisor	Prof. RNDr. Hana Kolářová, CSc.
The year of presentation	2020

Abstract

Photodynamic therapy is an alternative treatment used mainly for cancerous diseases. This therapy uses the properties of light, oxygen and photodynamically active substance called a photosensitizer. After the activation of a photosensitizer with light of an appropriate wavelength, the reactive oxygen species are formed leading to cell damage or even cell death. In this diploma thesis, photodynamic reactions have been studied with a focus on cancerous cell lines HeLa (cervical cancer cell line) and G361 (human melanoma cell line). Using confocal microscopy the localization of a photosensitizer TMPyP was observed in mitochondria and lysosomes. Using light microscopy with phase contrast, morphological cell changes were assessed after the administration of a photosensitizer and its consequential activation by light. The cell viability was assessed with MTT assay and the production of reactive oxygen species was then studied using fluorescent probes. As a consequence of a photodynamic reaction in cancer cell lines, the growth of reactive oxygen species was observed. This growth was dependent on the concentration of a photosensitizer. Also, the level of singlet oxygen was enhanced after the irradiation in all tested cell lines. Using the MTT assay the reduction in cell viability with a dependency on the rising concentration of the photosensitizer was observed. From these results we conclude that photosensitizer TMPyP is very effective for the induction of photodynamic reactions in cancerous cell lines *in vitro*.

Keywords	Photodynamic therapy, photosensitizer, reactive oxygen species, singlet oxygen, apoptosis, necrosis
Number of pages	104
Number of appendices	0
Language	Czech

Cíle práce

Cílem teoretické části této diplomové práce je provedení literárního přehledu problematiky mechanismu a principu fotodynamické terapie (PDT), ale také možnosti využití fotodynamicky aktivních látek pro fotodynamickou terapii nádoru. Experimentální část je věnována zejména ověření produkce reaktivních forem kyslíku v závislosti na životnosti buněk po ozáření nádorových i nenádorových buněčných linií při určité koncentraci fotosenzitizéru a při stanovené hustotě energie záření. Dále je zde popisována tematika morfologických změn buněk v souvislosti s fotodynamickou terapií a lokalizace fotosenzitizéru v buňkách před i po ozáření. Nedílnou součástí je i diskuze vlastních výsledků v porovnání s literaturou.

Obsah

ÚVOD	1
1 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
1.1 Fotodynamická terapie obecně	2
1.1.1 Mechanismus PDT	3
1.1.2 Reaktivní formy kyslíku	5
1.1.3 Singletní kyslík	8
1.2 Selektivita PDT	10
1.2.1 Příjem a lokalizace fotosensitizerů v nádorových buňkách	12
1.3 Poškození buněk po ozáření	13
1.3.1 Poškození plazmatické membrány	13
1.3.2 Poškození lyzozomů	14
1.3.3 Poškození mitochondrií	15
1.3.4 Poškození Golgiho aparátu a endoplazmatického retikula	17
1.4 Charakterizace fotosensitizeru TMPyP	20
1.4.1 Lokalizace a relokalizace TMPyP	21
1.5 PDT indukovaná buněčná smrt	23
1.5.1 Role Bcl-2 rodiny a MAPK v odpovědi na PDT	23
1.5.2 Mechanismus spouštění apoptózy	27
1.5.3 Mechanismus spouštění nekrózy	30
1.5.4 PDT a autofagie	32
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	36
2.1 Materiál	36
2.1.1 Buněčné linie	36
2.1.2 Fotosensitizer	36
2.1.3 Roztoky a média	36
2.1.4 Komerční kity	37
2.1.5 Laboratorní pomůcky	37
2.2 Metody	38
2.2.1 Produkce ROS a MTT test	38
2.2.2 Určení hodnoty IC ₅₀	39
2.2.3 Produkce singletního kyslíku	39
2.2.4 Mikroskopie s fázovým kontrastem	40
2.2.5 Konfokální mikroskopie	41
2.2.6 Kolokalizace	43
3 VÝSLEDKY	46
3.1 Měření produkce ROS a MTT test	46
3.1.1 Bez ozáření	47
3.1.2 Po ozáření	50
3.2 Hodnota IC ₅₀	53
3.3 Měření produkce singletního kyslíku	54
3.3.1 Bez ozáření	55
3.3.2 Po ozáření	56
3.4 Vliv jednotlivých složek PDT na morfologii buněk	57
3.5 Lokalizace a kolokalizace TMPyP	61
3.5.1 Bez ozáření	63
3.5.2 Po ozáření	69
4 Diskuze	81
4.1 Měření produkce ROS a MTT test	81

4.1.1	Bez ozáření.....	81
4.1.2	Po ozáření.....	81
4.2	Měření produkce singletního kyslíku.....	82
4.3	Vliv jednotlivých složek PDT na morfologii buněk	84
4.4	Lokalizace a kolokalizace TMPyP.....	85
5	ZÁVĚR.....	90
6	LITERATURA	92
7	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	102

ÚVOD

Fotodynamická terapie je alternativní léčbou pro různá nádorová i nenádorová onemocnění. V současnosti se jedná o moderní přístup léčby zejména rakovinného onemocnění. Základy této terapie byly položeny již v roce 1900, kdy objevil německý student medicíny tzv. fotodynamický efekt kombinací barviva akridinu a světla na trepkách (Raymond, 1999). O pouhé tři roky později provedla stejná vědecká skupina první zákrok na pacientech. Následovalo mnoho preklinických studií a hledání či vylepšování dalších fotosensitizerů (fotodynamicky aktivních látek), které by mohly v kombinaci se světlem a kyslíkem způsobit požadovaný fotodynamický efekt, tedy zničit nežádoucí nádorové buňky (Kübler, 2005).

Základním principem této terapie je tedy fotochemická reakce, která požaduje simultánní přítomnost fotosensitizeru, kyslíku a viditelného světla. Využívá se zde také selektivní akumulace fotosensitizeru v nádorových buňkách. V důsledku aktivace fotosensitizeru světlem o vlnové délce, která je shodná s absorpčním maximem této fotodynamicky aktivní látky, dochází k jeho interakci s okolními molekulami. Tvoří se tak různé druhy reaktivních forem kyslíku (ROS), které v buňkách způsobují narušení rovnováhy a poškození organel vedoucí k buněčné smrti. Ve značném množství vzniká i důležitý člen skupiny ROS, singletní kyslík, který taktéž způsobuje buněčnou smrt.

V závislosti na lokalizaci nádorové tkáně je fotosensitizer aplikován buď systémově nebo intravenózně. V určitých případech může být tato látka aplikována i povrchově (Kennedy *et al.*, 1996). S rozmanitou škálou velikostí, umístění a typů nádorů se vyvinulo i mnoho způsobů, jak a čím aplikovat PDT. Velký vývoj byl zaznamenán jak v samotných fotosensitizérech, které mohou být různým způsobem modifikovány pro lepší zacílení na nádorovou tkáň, tak i ve světelných zdrojích. Světlo může být na podpovrchovou maligní tkáň zacíleno například pomocí laserových vláken se světelným difuzérem. U povrchových aplikací je světlo vedeno vláknem, které má na svém konci mikročočky. U objemných nádorů je několik vláken umístěno hned vedle sebe, aby došlo k ozáření celé požadované plochy (Kübler, 2005).

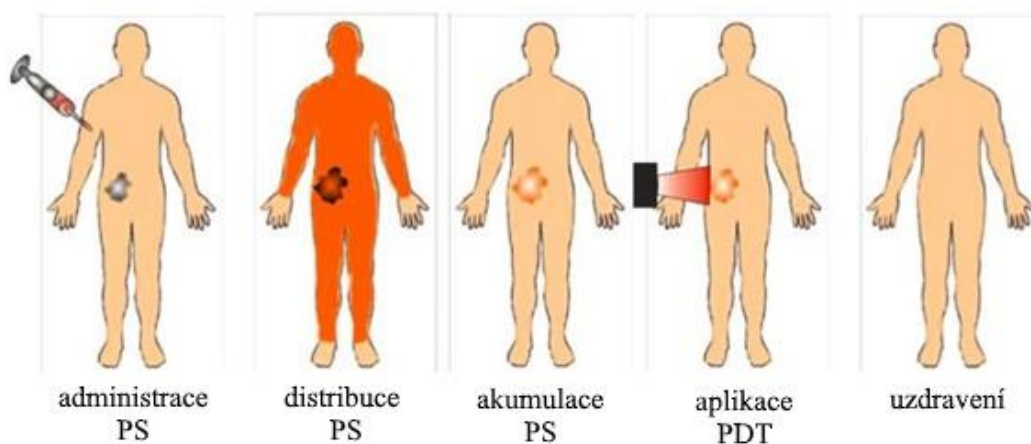
Nyní je PDT minimálně invazivní technikou, která může být aplikována opakovaně, a to i na stejné místo. Velikou výhodou je i to, že jiné léčebné přístupy, jako je chemoterapie, ionizující záření nebo chirurgický zákrok, nezamezují aplikaci PDT, a dokonce mohou být pacientům provedeny před nebo i po provedení terapie (Kübler,

2005).

1 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

1.1 Fotodynamická terapie obecně

PDT je moderní a neinvazivní formou terapie, která je používána pro neonkologická, ale i onkologická onemocnění různých typů. Tuto terapii lze využít i k léčbě chronických zánětů nebo i bakteriálních infekcí, které jsou způsobeny bakteriálními kmeny s rezistencí na antibiotika a nelze je tedy léčit klasickým přístupem (Sperandio *et al.*, 2013). PDT je založena na lokální nebo systémové aplikaci fotosenzitivní sloučeniny neboli fotosensitizeru, který je akumulován v patologické tkáni (Obr. 1). Principem je, že molekuly fotosensitizeru absorbují světlo příslušné vlnové délky, která souhlasí s absorpčním maximem fotosensitizeru, což vede k iniciaci procesů, které jsou zodpovědné za selektivní destrukci nežádoucích buněk. Klíčová je distribuce fotosensitizeru pouze v patologické tkáni, což významně ulehčuje selektivní destrukci a je to také důvod, proč je PDT dobře snášena pacienty (Kwiatkowski *et al.*, 2018). V kombinaci s jinými terapeutickými postupy nachází tato terapie široké uplatnění v mnoha odvětvích medicínského průmyslu (Luo *et al.*, 2017). Navzdory úspěchu, kterým se PDT může pyšnit, se stále zkoumají nové sloučeniny a inovativní metody, které by mohly zlepšit efektivitu této terapie v klinické onkologii. Zajímavým vylepšením je například využití elektroporace a nanočástic pro zvýšení koncentrace fotosensitizeru v daných buňkách, což má za následek lepší efektivitu aplikace PDT (Schmitt a Juillerat - Jeanneret, 2012).

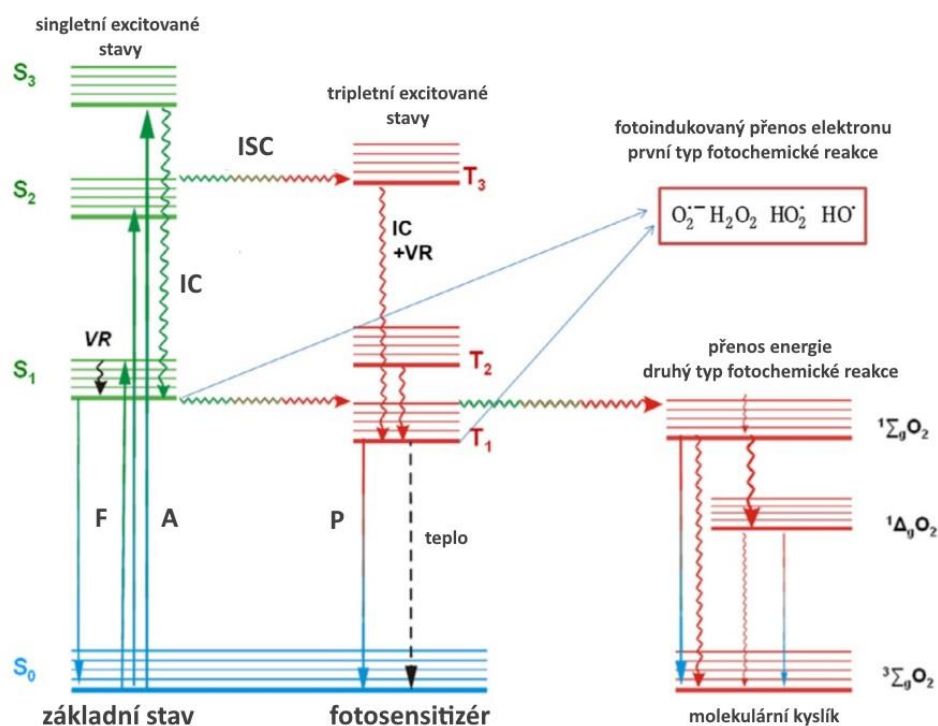


Obr. 1 Schematická ilustrace mechanismu PDT (Mroz *et al.*, 2011)

1.1.1 Mechanismus PDT

Mechanismus této terapie je založen na třech netoxických složkách, jejichž spoluprací lze dosáhnout požadovaného efektu v patologické tkáni. Jedná se o interakci mezi fotosensitizerem, zářením o příslušné vlnové délce shodné s absorpčním maximem fotosensitizeru, a kyslíkem rozpuštěným v buňkách (Allison a Moghissi, 2013).

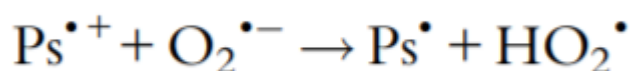
Fotochemická reakce, která je zodpovědná za destrukci nádorových buněk, je zprostředkována dvěma hlavními mechanismy, které jsou závislé na molekulách kyslíku v buňkách. První stádium obou mechanismů je téměř stejné. Po vstupu do buňky je fotosensitizer ozářen a dojde tedy k absorpci (A) fotonů fotosensitizerem, což vede k přestupu z jeho základního singletního energetického stavu S_0 do excitovaného singletního stavu (S_1 , S_2 , S_3), který je velmi nestabilní. Ihned po absorpci fotonu dochází k deaktivaci prostřednictvím relaxace na nejnižší vibrační energetickou hladinu prvního excitovaného stavu. Tento velmi rychlý proces (10^{-15} s) je definován jako vnitřní konverze (IC) nebo vibrační relaxace (VR). Excitovaná molekula existuje v nejnižším excitovaném singletním stavu v řádu nanosekund, a poté se relaxací dostane do základního stavu. Je-li relaxace z S_1 stavu doprovázena emisí fotonu, tento proces je znám jako fluorescence (F). Další relaxační dráhou, která soutěží s již zmíněnými fotoprocesy, je neradiativní přechod do nejnižšího excitovaného tripletního stavu (T_1) známý pod pojmem intersystémový přechod (ISC). Dále může následovat emise z tripletového excitovaného stavu T_1 procesem fosforescence (P), ale spíše dochází k fotochemickým reakcím. T_1 je totiž stav, ve kterém má fotosensitizer terapeutický účinek. Interakce fotosensitizeru v excitovaném tripletním stavu s okolními biomolekulami má za následek dva typy fotochemických reakcí. T_1 stav fotosensitizeru je nejdůležitějším parametrem v tvorbě ROS po ozáření. Dlouhá doba života tripletních stavů zvyšuje pravděpodobnost reakce fotosensitizeru s molekulárním kyslíkem vedoucí k tvorbě ROS (Obr. 2) (Luksiene, 2003; Robertson *et al.*, 2009; Dabrowski *et al.*, 2017).



Obr. 2 Fotofyzikální a fotochemické procesy znázorněné upraveným diagramem Jablonského (Dabrowski *et al.*, 2017)

V prvním mechanismu fotochemické reakce fotosenzitizer přenáší energii ve formě elektronu nebo atomu vodíku z excitovaného tripletového stavu T¹ na biomolekuly (substrát), které se nachází v jeho blízkosti. Tím dochází k tvorbě volných radikálů a radikálových aniontů fotosenzitizeru a / nebo substrátu. Tyto meziprodukty pak mohou reagovat s kyslíkem a tvořit tak například superoxid aniontového radikálu (O₂^{•-}), který je tvořen přenosem elektronu na kyslík v přítomnosti redukčního činidla nebo přímo excitovaného fotosenzitizeru. O₂^{•-} pak v buňkách tvoří další generaci ROS prostřednictvím volných radikálových řetězových reakcí (Obr. 3) Tato kaskáda reakcí vede k oxidativnímu stresu, který způsobuje destrukci nádorových buněk (Luksiene, 2003; Nowak-Stepniowska *et al.*, 2013; Dabrowski *et al.*, 2017).

V druhém typu mechanismu fotochemické reakce dochází k přenosu energie z T¹ excitovaného tripletního stavu fotosenzitizeru přímo na molekuly kyslíku, které jsou v základním tripletním stavu, přičemž se fotosenzitizer navrácí do svého základního singletního stavu. Tento přímý přenos energie mezi molekulami fotosenzitizeru a kyslíku



Obr. 3 Tvorba hydroxylového radikálu (Dabrowski *et al.*, 2017)

je možný díky stejné orientaci spinů těchto molekul. Touto cestou dochází k tvorbě excitovaných částic kyslíku a tvoří se tzv. singletní kyslík, který má velmi silné oxidační vlastnosti (Nowak-Stepniowska *et al.*, 2013).

Molekuly kyslíku jsou v základním tripletním stavu a excitací se dostanou do singletního stavu. Vzhledem k tomu, že většina organických sloučenin je v základním singletním stavu, excitovaný fotosensitizer nepoškozuje organické struktury v buňkách a reaguje pouze s molekulami kyslíku, které jsou rozpuštěné v cytoplazmě (Fonseca *et al.*, 2006). Jsou to tedy reaktivní formy kyslíku, které jsou zodpovědné za fotopoškození proteinů, tuků a ostatních molekul v daném místě aplikace fotosensitizeru (Kessel a Oleinick, 2010).

Předpokládá se, že typ II mechanismu fotochemické reakce je nejdůležitějším procesem, který zajišťuje efektivitu PDT. Nicméně, zastoupení obou mechanismů je závislé na mnoha faktorech, jako je například koncentrace kyslíku, pH a struktura fotosensitizeru. Se snižující se koncentrací kyslíku převládá první typ mechanismu fotochemické reakce (Castano *et al.*, 2005a). Výsledkem fotochemických reakcí je tedy usmrcení nádorových buněk v procesu apoptózy a / nebo nekrózy (Kessel a Oleinick, 2010). Zastoupení obou typů buněčné smrti závisí na intracelulární lokalizaci fotosensitizeru. Například, poškození mitochondrií může vést k apoptóze, zatímco destrukce buněčných membrán a ztráta integrity indukuje nekrózu. Poškození lysozomů nebo endoplazmatického retikula způsobuje buněčnou smrt prostřednictvím autofagie (Plaetzer *et al.*, 2003).

1.1.2 Reaktivní formy kyslíku

Reaktivní formy kyslíku jsou produkty částečné redukce molekulárního kyslíku (O_2). Dva nepárové elektrony s paralelními spiny lokalizované ve dvou separátních orbitalech jsou příčinou náchylnosti O_2 na tvorbu radikálních forem (Evans *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2016). Produktem jednoelektronové redukce O_2 je superoxidový iont ($O_2^{\cdot-}$), zatímco dvouelektronová redukce O_2 vede k tvorbě peroxidu vodíku (H_2O_2). H_2O_2 sice patří mezi spíše neutrální ROS, ale jeho následný produkt, hydroxylový radikál (HO^{\cdot}), je jeden z nejsilnějších oxidantů vůbec. K ROS patří i produkt vzniklý reakcí přenosu energie, singletní kyslík (1O_2) (Ogilby, 2010; Oszajca *et al.*, 2016; Dabrowski, 2017).

Stereotypní pohled na ROS je, že jejich produkce není regulovatelná a jejich intracelulární cíle jsou spíše náhodné. Oxidace intracelulárních lipidů, proteinů a DNA vede k poškození biomolekul, což způsobuje patologické procesy jako jsou nádorová a

neurodegenerativní onemocnění nebo ateroskleróza (Lin a Beal, 2006; Dabrowski, 2017).

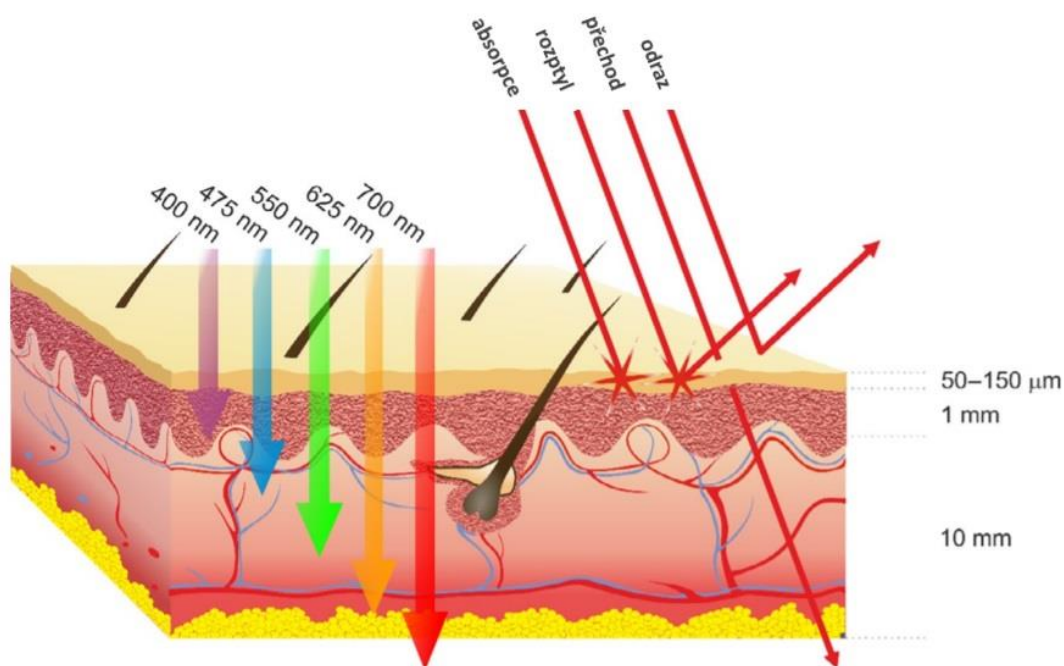
Různé chemické látky, jako jsou léčiva, pesticidy, některé kovy nebo oxidy kovů přítomné ve smogu, UV a gama záření, teplota, poranění nebo stárnutí, vedou ke zvýšení produkce ROS. K jejich tvorbě taktéž přispívají neutrofilny, eozinofily a makrofágy během inflamatorní reakce nebo vedlejší produkty elektronových transportních reakcí, které probíhají v mitochondriích. ROS, které jsou vytvořeny v takových procesech, způsobují oxidativní poškození proteinů, lipidů a nukleových kyselin, ale taktéž narušují funkce orgánů a buněk, což vede k buněčné smrti (Fuchs, 2001).

Ikdyž ROS nepochybně způsobují mnoho škodlivých aspektů, jsou taktéž zodpovědné za řadu prospěšných efektů. Jejich tvorba například zajišťuje funkční metabolismus, ale mají také funkci v několika intracelulárních signálních dráhách. Jako signální poslové byli identifikováni zejména $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 (Sundaresan, 1995). Z těchto dvou má významnější roli H_2O_2 vzhledem k jeho vyšší stabilitě. Buněčné přežití je silně závislé na redoxní homeostáze. V některých případech dochází vlivem zvýšené produkce ROS k narušení funkcí buňky prostřednictvím oxidativního stresu, který zároveň aktivuje buněčné obranné mechanismy. Za účelem snížení nebo odstranění těchto problémů si organismy vytvořily systém antioxidačních enzymů, které jsou zodpovědné za rovnováhu ROS v buňkách. Mezi tyto enzymy patří superoxid dismutáza (SOD1, SOD2 a SOD3), glutation peroxidáza a kataláza. Některé malé molekuly, jako je vitamín E, karotenoidy či vitamín C, napomáhají těmto enzymům v udržení správné hladiny ROS. Superoxidový iont může být převeden na jiné reaktivní formy, jako například H_2O_2 , za pomoci SOD. H_2O_2 pak může být znovu využit na tvorbu superoxidových radikálů, anebo může být převeden katalázou či glutationem (GSH) na vodu (Trachootham *et al.*, 2009; Dabrowski, 2017). V přítomnosti přechodných kovů, jako je například Fe^{2+} , je H_2O_2 konvertován na hydroxylové radikály (HO^{\cdot}), které jsou velmi reaktivní a mohou způsobit poškození lipidů, proteinů a DNA (Dabrowski, 2017).

V mitochondriích dochází k redukci molekulárního kyslíku na vodu v procesu oxidativní fosforylace. Cytochrom *c* oxidáza katalyzuje přenos čtyř elektronů na kyslík, přičemž dochází k progresivní tvorbě ROS. Únik elektronů z mitochondriálního elektronového transportního řetězce je zdrojem $O_2^{\cdot-}$, který je posléze přeměněn na H_2O_2 , HO^{\cdot} a peroxynitrit ($ONOO^-$) (Vatansever *et al.*, 2013). Mírné zvýšení hladin ROS způsobuje buněčnou proliferaci a přežití, avšak jakmile dosáhne hladina ROS určité úrovně, dochází k překonání antioxidační kapacity buňky, což vede k buněčné smrti. Normální buňky mají schopnost tolerovat určité množství exogenních ROS, nicméně

nádorové buňky tuto schopnost v důsledku jejich abnormální metabolické aktivity nemají. U nádorových buněk dochází ke změně redoxní dynamiky tak, že netolerují hladiny ROS nad toxickým prahem (Soares *et al.*, 2016). Zvýšení ROS v nádorových buňkách použitím exogenních ROS modulujících léčiv vede ke zvýšení ROS nad hladinu toxického prahu, což má za následek buněčnou smrt. Nádorové buňky jsou v porovnání s normálními buňkami náchylnější na exogenní ROS a jejich přežití je tedy více závislé na antioxidační aktivitě (Trachootham *et al.*, 2009). Terapeutické strategie využívající ROS pro léčbu nádorových onemocnění jsou velmi slibné, protože ROS způsobují větší poškození nádorových buněk, než těch nenádorových (Pelicano *et al.*, 2004).

Jak již bylo zmíněno, vlnová délka světla pro efektivní aktivaci fotosensitizeru vedoucí k tvorbě ROS musí korespondovat s elektronovým absorpčním pásem dané sloučeniny. Penetrační hloubka a efektivní dodání světla jsou dvě hlavní bariéry v aplikaci PDT do hlubších tkání. Následná interakce světla s tkání neprobíhá jen procesem absorpce, ale také rozptylu, přechodu a odrazu (Obr. 4) (Szacilowski, 2005). Ideální fotosensitizer pro aplikaci do hlubších tkání by měl mít absorpční pík v oblasti 630 až 700 nm (Hu *et al.*, 2015). Avšak, vzhledem k tomu, že voda absorbuje v NIR oblasti, a že energie se snižuje se zvyšující se vlnovou délkou, nejvhodnější oblast pro penetraci hlubokými tkáněmi je 700 až 1000 nm (Smith *et al.*, 2009). Nicméně, světlo s nízkou energií (nad 850 nm) je méně efektivní pro tvorbu ROS kvůli termálním efektům



Obr. 4 Světelné interakce s lidskou tkání

způsobených neradiativním přechodem (Dabrowski *et al.*, 2016).

Jednou z těchto terapeutických strategií využívajících ROS je i PDT. Vhodný fotosensitizer pro PDT musí mít požadovanou čistotu, stabilitu, nízkou toxicitu, silnou absorpci nejlépe v oblasti 630–850 nm, ale hlavně musí mít schopnost tvořit ROS s vysokým výtěžkem (Allison *et al.*, 2004; Dabrowski *et al.*, 2016). Taktéž je důležité, aby se fotosensitizer preferenčně lokalizoval v mitochondriích nebo v endoplazmatickém retikulu, kde jsou vzniklé ROS schopné indukovat imunogenní buněčnou smrt (Krysko *et al.*, 2012). Nejčastěji studovanými fotosensitizéry jsou porfyriny, pro které je typická silná absorpce ve viditelné oblasti a velká schopnost tvorby ROS, zejména singletního kyslíku (De Rosa a Crutchley, 2002; Dabrowski *et al.*, 2017).

1.1.3 Singletní kyslík

Molekulární kyslík má dva nízko položené singletní excitační stavy, $^1\Delta_g$ (95 kJ.mol⁻¹) a $^1\Sigma_g^+$ (158 kJ.mol⁻¹) nad tripletním stavem ($^3\Sigma_g^-$) (Obr. 2). Elektronová konfigurace těchto stavů se liší pouze strukturou π antivazebných orbitalů. Přechod z $^1\Delta_g$ stavu do $^3\Sigma_g^-$ stavu je spinově zakázaný, a proto má O₂ v $^1\Delta_g$ stavu relativně dlouhou dobu života. Na druhé straně, druhý excitovaný stav kyslíku má krátkou životnost z důvodu jeho spinově povolenému přechodu do $^1\Delta_g$. Jakmile se $^1\text{O}_2$ dostane do singletního excitovaného stavu, dochází k jeho deaktivaci do základního stavu. Tento proces se nazývá zhášení a může k němu docházet dvěma způsoby. Prvním způsobem, fyzikálním zhášením, dochází k deaktivaci singletního kyslíku bez spotřeby O₂ nebo tvorby produktu. Druhou cestou je chemické zhášení, kdy zhášeďlo reaguje se singletním kyslíkem, přičemž vzniká nový produkt (De Rosa a Crutchley, 2002).

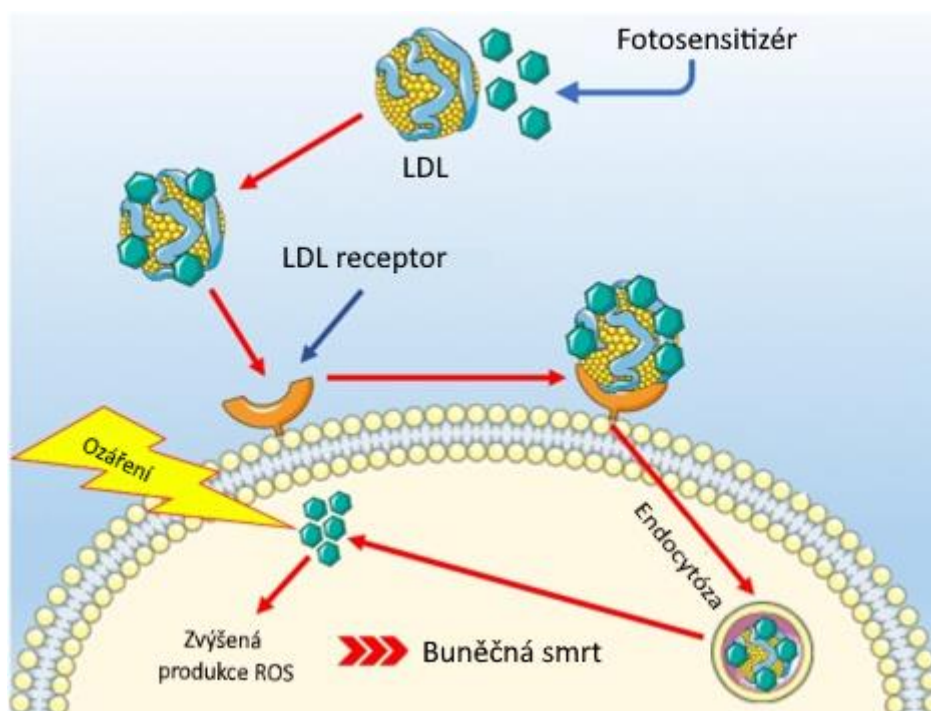
Je známo, že singletní kyslík má schopnost oxidovat substráty, které nebyly nijak ovlivněny kyslíkem, který se nacházel ve své normální energetické hladině. V singletním excitovaném stavu je tedy kyslík značně elektrofilní. Zatímco molekuly v excitovaném tripletním stavu mohou podněcovat singletní kyslík, v mnoha případech bylo prokázáno, že jsou také jeho efektivními zhášeči. což může vést k fotodegradaci a fotovybělování. Fotodegradací dochází k tomu, že singletní kyslík reaguje s materiálem, který je degradován. Fotovybělováním rozumíme degradaci barviva singletním kyslíkem (De Rosa a Crutchley, 2002).

Singletní kyslík je hlavním prostředníkem v PDT. PDT vyvolaná spotřeba kyslíku způsobuje téměř okamžitou anoxii ve velkých oblastech nádoru a za těchto podmínek fotosensitizer již negeneruje $^1\text{O}_2$. Dostupnost kyslíku je tedy hlavním limitujícím

faktorem pro PDT. Při běžných dávkách energie ($100 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$), které jsou schváleny pro PDT léčiva, dochází k anoxii již po 1 s u všech tkání s výjimkou cév a cévních stěn. Aby nedošlo k anoxii, je nutné snížit dávku energie pod $6 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$. Při běžných dávkách energie je tedy PDT limitovaná pouze na cévy a první vrstvu buněk okolo nich. Navíc, poškození endoteliální buněčné integrity prostřednictvím $^1\text{O}_2$ podporuje cévní průsak (Hackbarth, 2019). Nicméně, tento problém se nedávno podařilo překonat pomocí vaskulární PDT, kde fotosensitizer cirkuluje v cévách a vysoce selektivním ozářením jsou poté zničeny cévy zásobující nádor (Azzouzi *et al.*, 2015). Jsou-li anoxické podmínky rapidně vyvolány a udržovány dlouhou dobu destrukcí zásobních cév nádoru, kyslíková deplece má potenciál usmrtit většinu nádorových buněk (Papandreou *et al.*, 2005; Azzouzi *et al.*, 2015). Nicméně, pokud zůstane inertní, byť jen minimální frakce buněk (nádorové kmenové buňky), dojde k indukci HIF (hypoxií indukovaný faktor) komplexu, který pomáhá buňkám přežít za nízkých O_2 podmínek (Li a Zhang, 2016). Spolu s indukcí HIF dojde i ke stimulaci VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor), který podporuje tvorbu cév, a transkripčního faktoru $\text{NF}\kappa\text{B}$ a AP-1 (aktivátorový protein 1)), který má mimo jiné i roli v onkogenezi (Senger *et al.*, 1983; Fujioka *et al.*, 2004; Hackbarth *et al.*, 2019).

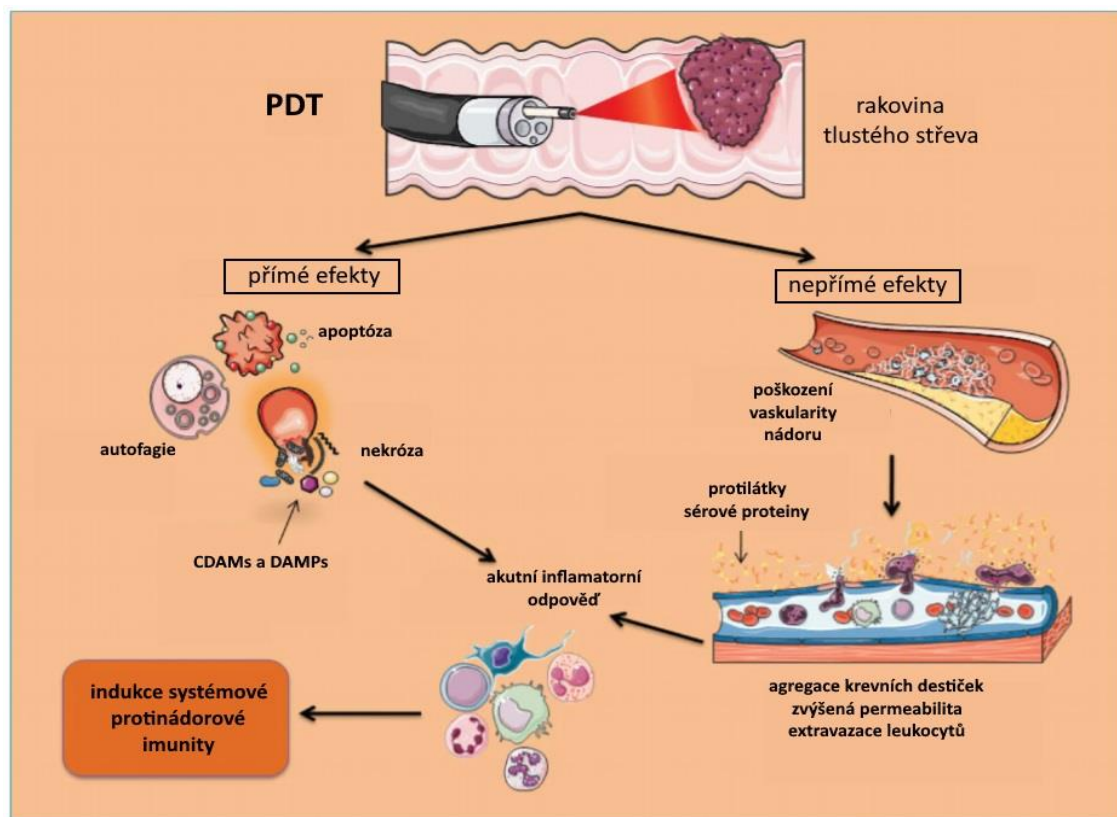
1.2 Selektivita PDT

Fotochemické reakce probíhají pouze v patologických tkáních, a to v oblasti distribuce fotosensitizeru, což umožňuje selektivní destrukci (Vrouenraets *et al.*, 2003). Důvodem, proč se fotosensitizer akumuluje v nádorových buňkách ve značně vyšší koncentraci než ve zdravých buňkách, je tendence fotosensitizerů vázat se na lipoproteiny s nízkou hustotou (LDL) (Obr. 5). Úkolem těchto proteinů je dodávat tkáním nezbytný cholesterol, který je pak využíván na tvorbu buněčných membrán během buněčného dělení. Pro nádorové buňky je typické, že mají vyšší mitotickou aktivitu než buňky nenádorové, a vykazují tedy zvýšený příjem LDL lipoproteinů (Cruz *et al.*, 2013). LDL lipoproteiny tedy fungují jako transportéry fotosensitizeru do nádorových tkání. Zajímavostí je, že u patologických tkání byla také zjištěna zvýšená exprese LDL lipoproteinových receptorů umístěných na povrchu buněk (Hamblin a Newman, 1994; Castano *et al.*, 2005b). Tento přirozený systém lze také využít pro zvýšení efektivity PDT nekovalentním navázáním fotosensitizeru na LDL před jeho aplikací do těla pacienta (Choromańska *et al.*, 2013).



Obr. 5 Mechanismus transportu fotosensitizeru do buňky pomocí LDL (Kwiatkowsky *et al.*, 2018)

PDT vede k systémové protinádorové odpovědi i prostřednictvím napadení vaskulárního systému patologické tkáně a imunitního systému. PDT způsobuje narušení struktury nádoru a stimuluje tedy přímou interakci mezi imunitními a nádorovými buňkami. Přímá destrukce nádorové tkáně vede k silné inflamační reakci a infiltraci nádoru leukocyty. Fotopoškození membrán vede k aktivaci fosfolipáz a poté i cyklooxygenáz. Na zničení nežádoucí tkáně se tedy podílí i lokální akumulace inflamatorních mediátorů jako jsou metabolity arachidonové kyseliny nebo produkty lipidové hydrolýzy, společně s uvolněním CDAMs (molekulární vzory spojené s buněčnou smrtí) a DAMPs (molekulární vzory spojené s poškozením) z patologické tkáně (Castano *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2008, Firczuk *et al.*, 2010; Reginato *et al.*, 2014). Nádorové buňky, kterým se podařilo uniknout přímému účinku PDT, mohou být zničeny nepřímým vlivem PDT na cévní systém nádoru. Reaktivní formy kyslíku poškozují vaskulární endoteliální buňky a aktivují tím koagulační procesy, kdy dochází k blokaci cév prostřednictvím trombu. Výsledkem této cévní okluze je perzistentní hypoxie patologické tkáně, což vede k buněčné smrti nádorových buněk (Obr.6) (Krammer, 2001).



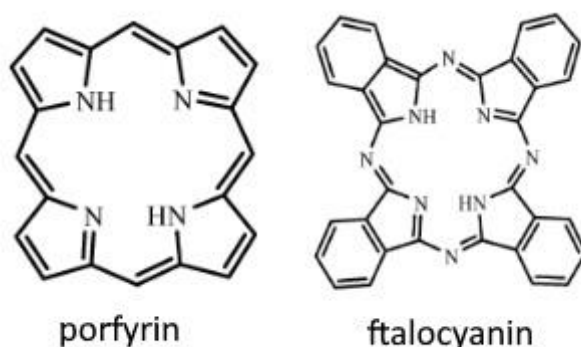
Obr. 6 PDT vyvolané protinádorové efekty (Firczuk *et al.*, 2010)

1.2.1 Příjem a lokalizace fotosensitizerů v nádorových buňkách

Určení intracelulární lokalizace fotosensitizeru je velmi důležité z důvodu vývoje těchto látek a následného zlepšení terapeutického účinku (Luksiene, 2003).

Klinicky akceptovaný Photofrin, který patří do první generace fotosensitizerů, má několik absorpčních píků. Bohužel, dostatečná penetrace tkáně je dosažena při použití záření o vlnové délce 630 až 635 nm, což je oblast, ve které má Photofrin nejslabší absorpci. Navíc, fotosensitizery porfyrinového typu, jako právě Photofrin, mají tendenci se akumulovat v kůži pacienta a jen velmi pomalu se z ní uvolňují, což způsobuje dlouhotrvající kožní fotosensitivitu, a tedy i nepříjemnosti pro pacienta, který se musí vyhýbat přímému paprsku světla po dobu až šesti týdnů (Sibata *et al.*, 2001). Navíc, díky porfyrinovým složkám (Obr. 7) má Photofrin odlišnou lipofilní aktivitu, a tedy i odlišnou intracelulární lokalizaci (Luksiene, 2003).

Fotosensitizery druhé generace, kam patří například ftalocyaniny (Obr. 7), se vyznačují hydrofilní povahou. Jsou to čistější sloučeniny, lze je aktivovat světlem, které proniká hlouběji do tkání a jejich intracelulární lokalizaci lze jednodušeji identifikovat. Jedná se především o mitochondrie, lysozomy, plazmatickou membránu a endoplazmatické retikulum (Luksiene, 2003). Taktéž jejich vyloučení z nepostižené tkáně je daleko rychlejší, než u porfyrinů (Freitas a Hamblin, 2016). Nicméně, je to lipofilní aktivita a agregační stupeň fotosensitizeru, co determinuje akumulaci schopnost a lokalizační specifitu v nádorových buňkách (Kalka *et al.*, 2000). Po intravenózním podání hydrofobních fotosensitizerů dochází k navázání těchto látek na lipoproteiny (LDL, případně HDL-lipoproteiny s vysokou hustotou), které jsou následně transportovány krví k patologické tkáni. Do jisté míry je selektivita fotosensitizerů k patologické tkáni zvyšována s lipofilním charakterem fotosensitizeru (Berg *et al.*, 1989).



Obr. 7 Struktura porfyrinu a ftalocyaninu (Ormond a Freeman, 2013)

Na nádorové buňky, které se vyznačují vysokým počtem LDL membránových receptorů, se naváže LDL (případně HDL) spolu s fotosenzitizérem a následuje receptorem zprostředkovaná endocytóza (Jori *et al.*, 1984) (Obr. 5). S příchodem molekul fotosenzitizéru do buněk dochází k jejich akumulaci v lipofilních kompartmentech jako je plazmatická membrána, dále membrány mitochondrií, jádra, endoplazmatického retikula či lysozomů. Avšak, existují i jiné faktory, které zvyšují příjem fotosenzitizéru patologickou tkání. Mezi tyto faktory patří například nižší pH nádorů, které je spojeno s jejich nedostatečným zásobováním kyslíkem a vysokou glykolytickou aktivitou (Luksiene, 2003). Po intravenózním podání hydrofilních fotosenzitizérů jsou tyto látky nesené albuminy a jinými sérovými proteiny (Kessel *et al.*, 1987). Tyto fotosenzitizéry se preferenčně akumulují v mezibuněčném prostoru a vaskulární stromě nádorové tkáně. Vzhledem k jejich hydrofilní povaze je šance, že dojde k difúzi přes plazmatickou membránu do cytoplazmy malá (Luksiene, 2003).

Obecně, hydrofobní fotosenzitizéry způsobují usmrcení nádorových buněk přímou interakcí, kdežto hydrofilní fotosenzitizéry způsobují buněčnou smrt těchto buněk prostřednictvím poškození cévního zásobení, a tedy i přerušением dodávky kyslíku a jiných důležitých nutričních látek (Luksiene, 2003).

1.3 Poškození buněk po ozáření

Jelikož je distribuce singletního kyslíku z místa jeho tvorby limitovaná, místa buněčného poškození po ozáření jsou blízce spjata s lokalizací fotosenzitizéru. Obecně nemají fotosenzitizéry tendenci akumulovat se v buněčném jádře, a proto tedy nemají potenciál poškozovat DNA či způsobovat mutace a následnou karcinogenezi (Luksiene, 2003).

1.3.1 Poškození plazmatické membrány

U buněčných membrán, jako je plazmatická membrána, mitochondriální, lysozomální a jaderná, dochází k vážnému poškození prostřednictvím oxidace cholesterolu a reziduí nenasycených mastných kyselin (Geze *et al.*, 1993; Geiger *et al.*, 1995). Poškození plazmatické membrány může být po ozáření daného fotosenzitizéru pozorováno již prvních pár minut po vystavení záření o specifické vlnové délce. Tento typ poškození je vyznačován zejména bobtnatěním membrány a posléze i uvolňováním vezikul obsahujících signální enzymy plazmatické membrány a lysozomální enzymy. Dále se jedná o snížení aktivního transportu, zvýšení hladin Ca^{2+} , depolarizaci plazmatické membrány a inhibici aktivit enzymů plazmatické membrány jako je například ATPáza (Kalka *et al.*, 2000).

Oxidativní poškození proteinů membránového transportu vyvolává rapidní narušení iontové homeostázy Na^{2+} , Ca^{2+} , K^{+} a dalších, zatímco membránová integrita je v daném okamžiku stále zachována. Uvolnění těchto fyziologicky aktivních iontů je spojeno s okamžitou indukcí akutní inflamatorní reakce. Narušení buněčných membrán způsobuje uvolnění fosfolipidů, zvýší se hladiny Ca^{2+} a dochází k aktivaci fosfolipázy A_2 , která degraduje fosfolipidy na volné mastné kyseliny, ale také vyvolává uvolnění arachidonové kyseliny, která je 5-lipooxygenásou konvertována na leukotrieny a hydroxy kyseliny a cyklooxygenásou na tromboxany a prostaglandiny, které iniciují akutní inflamatorní reakci. Dále dochází k tvorbě superoxidových radikálů prostřednictvím proteinkinázy C a ke kondenzaci chromatinu v okolí jádra. Taktéž dochází k aktivaci endonukleáz, jejichž úkolem je DNA fragmentace. Ca^{2+} ionty fungují jako signály, které jsou zodpovědné za iniciaci PDT zprostředkované apoptózy (Oleinick, 1998; Godar, 1999). Prostřednictvím Ca^{2+} a tromboxanů dochází k tvorbě intravaskulárního trombu, a to rozložením protrombinu na fragmenty trombinu, ale také nastává uvolnění von Willebrandového faktoru, což je adhezivní glykoprotein, který je syntetizován endoteliálními buňkami v reakci na poraněné cévní stěny. Zastavení proudu krve v dané oblasti má za následek lokální hypoxii a iniciaci nekrotických procesů kvůli nutričním nedostatkům (Foster *et al.*, 1991; Luksiene, 2003).

1.3.2 Poškození lysozomů

Lysozomy jsou membránové organely vznikající z hladkého endoplazmatického retikula či Golgiho aparátu. Tyto organely obsahují kyselé hydrolázy sloužící k rozkladu extra i intracelulárního materiálu. Endocytické dopravení hydrofobních fotosensitizerů (první generace fotosensitizerů, například Photofrin) způsobuje interakci s lysozomální membránou během lysozomální degradace lipoproteinového nosiče (LDL) (Geze *et al.*, 1993). Významnou roli zde hrají i SLC transportéry, které představují transportní systém do lysozomů pro rozpustné látky (Bissa *et al.*, 2016). Avšak vlivem intracelulárního lipidového transportu či metabolismu může docházet k přenesení fotosensitizeru z membrány lysozomů na jiné buněčné membrány či organely, jako je například endoplazmatické retikulum, mitochondrie či plazmatická membrána. Je to způsob, jakým se buněčný metabolismus snaží chránit lysozomy před fotochemickým poškozením (Geze *et al.*, 1993). Destabilizace lysozomální membrány totiž vede k uvolnění lysozomálních hydroláz jak do intracelulárního prostoru, kde způsobuje buněčnou smrt, tak i do extracelulárního prostoru, kde navíc dochází k inflamatorní

odpovědi (Miller *et al.*, 1983). Zároveň jakýkoliv jiný buněčný cíl fotosensitizeru, který způsobuje buněčnou smrt, nakonec vede k uvolnění lysozomálních enzymů po buněčné lýzi (Geze *et al.*, 1993).

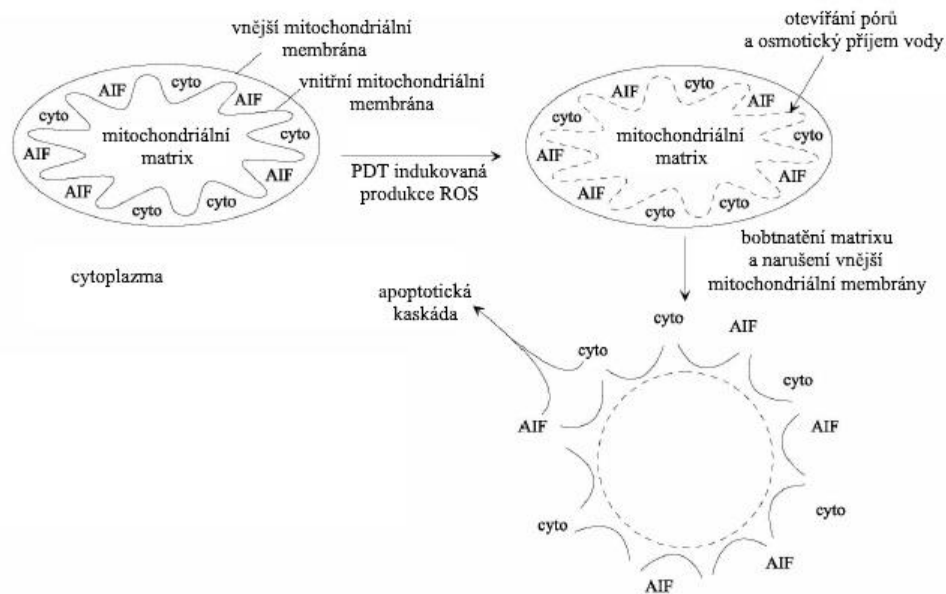
V rámci PDT může docházet k buněčné smrti prostřednictvím autofagie, která je zprostředkována právě lysozomy. Respektive dochází k aktivaci SLC38A9 transmembránového proteinu na lysozomální membráně, což vede k tvorbě komplexu s mTORC1 na lysozomálním povrchu, a tedy i k iniciaci autofagie (Bissa *et al.*, 2016).

Bylo zjištěno, že při použití ftalocyaninu 4 v kombinaci s PDT, který se primárně akumuluje v mitochondriích, dochází k účasti lysozomů na buněčné smrti. Zejména zde má roli chelatovatelné Fe, jehož zdroj se nachází právě v lysozomech (Saggu *et al.*, 2012). Chelatovatelné Fe, ale například i Cu, tvoří vysoce reaktivní hydroxylový radikál (OH^{\bullet}) z H_2O_2 , ale také superoxidový radikál ($\text{O}_2^{\bullet-}$) (Kehrer, 2000). Jakmile se chelatovatelné Fe dostane do cytosolu, je rapidně pohlceno vápenatým transportérem mitochondrií (Uchiyama *et al.*, 2008). Uvnitř mitochondrií pak dochází k toxickým ROS kaskádám (Saggu *et al.*, 2012).

1.3.3 Poškození mitochondrií

Mitochondrie jsou doumembránové organely a hrají důležitou roli v tvorbě buněčné energie, Ca^{2+} homeostázy, redoxní signální dráhy a regulaci apoptózy. Mají svůj vlastní genetický materiál, mitochondriální DNA, což jim umožňuje nezávislou replikaci. Taktéž jsou považovány za organely, ve kterých se akumuluje fotosensitizer během PDT (Wen *et al.*, 2013).

V důsledku onkologických signálů dochází v mitochondriích buněk k metabolickému reprogramování. V nádorových buňkách se mitochondrie stávají disfunkčními, což je pozorováno změnou způsobu tvorby energie (ATP) z oxidativní fosforylace na tvorbu energie prostřednictvím glykolýzy, ale také zvýšením tvorby ROS. Zvýšení aerobní glykolýzy v nádorových buňkách je známo pod pojmem Warburgův efekt. K tvorbě ROS dochází při elektronovém transportu skrze mitochondriální dýchací řetězec, který je esenciální právě pro oxidativní fosforylaci. Elektrony, které unikají z dýchacího komplexu mohou reagovat s molekulárním kyslíkem, což vede k produkci superoxidu. ATP a redoxní rovnováha jsou důležité pro buněčnou životnost a proliferaci, mitochondriální disfunkce tedy způsobuje obrovské změny v metabolismu buněčné energie a tvorbě ROS. Navíc jsou tyto metabolické změny spojeny se zvýšenou regulací NAD(P)H oxidázy (Wen *et al.*, 2013). Jelikož nádorové buňky vykazují různý stupeň



Obr. 8 Jeden z možných mechanismů PDT indukované apoptózy. PDT způsobuje produkci ROS, což vede k otevírání porů mitochondriálních membrán. Následně dochází k osmotickému příjmu vody mitochondriální matrix, která začne bobtnat. Následkem toho se poškodí vnější mitochondriální membrána a dojde k uvolnění pro-apoptických proteinů jako je cytochrom *c*, AIF nebo prokaspázy (Plaetzer *et al.*, 2002).

mitochondriální disfunkce prostřednictvím zvýšené tvorby ROS, zvýšeného membránového potenciálu a pozměněného energetického metabolismu, lze tyto změny využít ke zlepšení terapeutické selektivity PDT zacílením fotosenzitizeru na mitochondrie (Trachootham *et al.*, 2009).

Zvýšením hladin ROS dochází k narušení mitochondriálního póru přechodné propustnosti (MPTP), což vede k okamžitému kolapsu mitochondriálního membránového potenciálu. Společně s mitochondriálním membránovým potenciálem dochází k uvolnění apoptotických faktorů (například cytochrom *c*), které spouštějí apoptotickou kaskádu vedoucí k buněčné smrti, a to prostřednictvím aktivace kaspáz v cytosolu, nebo aktivací AIF v jádře (Obr. 8) (Lemasters *et al.*, 1998). Zvýšené množství ROS u nádorových buněk, které mají disfunkční mitochondrie způsobuje, že jsou tyto buňky daleko citlivější na oxidativní stres, než nenádorové buňky s přirozeně nižší hladinou ROS (Trachootham *et al.*, 2009).

Mitofagie je specializovaná forma autofagie, ve které jsou poškozené či disfunkční mitochondrie rozpoznány autofagickým komplexem a následně degradovány lysozomem. Poškozené mitochondrie jsou obecně ty, které nejsou schopny

tvorit ATP prostřednictvím oxidativní fosforylace v důsledku zvýšeného membránového potenciálu. Dochází ke zvýšené akumulaci ROS, což vede k buněčné smrti (Sorrentino *et al.*, 2018). Mitochondrie tvoří vysoce dynamickou síť, a proto musí být tyto disfunkční organely separovány od těch funkčních v procesu mitofagie. Regulace proteinů, které jsou zahrnuty v mitofagickém procesu, je u nádorových buněk narušena (Vara-Perez *et al.*, 2019). Stejně tak je narušen i metabolismus nádorových buněk, který musí splňovat tři hlavní potřeby rychle se dělících buněk, a to rychlou tvorbu ATP, dostatek metabolických prekurzorů pro rychlou biosyntézu makromolekul a udržování požadovaného redoxního stavu (Cairns *et al.*, 2011). Autofagie je způsob, jakým si nádorová buňka napomáhá udržovat své metabolické potřeby, a to prostřednictvím degradace uhlohydrátů, proteinů, lipidů či nukleotidů. Touto cestou získává nádorová buňka esenciální komponenty pro uhlíkový metabolismus (Kimmelman a White, 2017). Mitofagií taktéž dochází k redukci mitochondriální hmoty, a tedy i ke snížení buněčné potřeby kyslíku, což vede k přežití v podmínkách hypoxie (Semenza, 2018). Mitofagie je tedy způsob, jakým se nádorová buňka brání protinádorové léčbě (například chemo/radio terapie či PDT), což potvrzuje i fakt, že nádorové buňky, které jsou rezistentní na protinádorovou terapii, vykazují vyšší hladiny mitofagie (Villa *et al.*, 2017).

Modulace procesu mitofagie během chemoterapeutické léčby přispívá k překonání rezistence nádorových buněk, ale také zmírňuje vedlejší účinky způsobeny léčbou či samotnou rakovinou (Vara-Perez *et al.*, 2019).

1.3.4 Poškození Golgiho aparátu a endoplazmatického retikula

Fotosensitizéry třetí a poslední generace, jako jsou například Padeliporfin a Redaporfin, patří do skupiny bakteriochlorinů a mají lepší schopnost absorpce světla (740–780 nm), penetrace tkání a tvorby reaktivních forem kyslíku (Arnaut *et al.*, 2014). Z těchto dvou látek je Redaporfin stabilnější, a byl shledán velmi efektivním u léčby imunokompetentní myši s podkožními nádory s úspěšností až 85 %. Protinádorový účinek Redaporfinu je částečně připisován imunitnímu systému, jelikož byla efektivita této léčby drasticky snížena u imunodeficientní myši (Rocha *et al.*, 2015; Pucelin *et al.*, 2016). Buněčná smrt prostřednictvím imunitního systému vyvolaná PDT je zprostředkována dráhou zahrnující endoplazmatické retikulum, respektive zde dochází k fosforylaci eIF2 α (eukaryotický translační faktor 2- α) kinázou endoplazmatického retikula EIF2AK3 (kináza 3 eukaryotického translačního faktoru 2- α) a k odhalení kalreticulínu na povrchu

buňky (Galluzzi *et al.*, 2012; Garg *et al.*, 2012, Garg *et al.*, 2016; Rufo *et al.*, 2017).

Právě Redaporfin se specificky akumuluje nejvíce v endoplazmatickém retikulu a v Golgiho aparátu. Po ozáření Redaporfinu dochází k jeho aktivaci a selektivnímu poškození daných buněčných organel a následně k buněčné smrti dráhou, která je nezávislá na mitochondriální cestě vedoucí k apoptóze. Po fotoaktivaci způsobuje Redaporfin selektivní úbytek specifických proteinů endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu, ale nemá vliv na aktinový cytoskelet či mitochondriální proteiny. Spolu s úbytkem proteinů u těchto buněčných organel dochází také k narušení jejich funkce, což vede k ireverzibilní inhibici sekrece proteinů prostřednictvím Golgiho aparátu (Gomes da Silva *et al.*, 2018).

Endoplazmatické retikulum je buněčným místem skladování Ca^{2+} a syntézy, sbalování a maturace většiny sekretovaných a transmembránových proteinů. Fyziologické či patologické procesy, které narušují sbalení proteinů způsobují stres a aktivují signalizační dráhu UPR (signální dráha nesbalených proteinů) (Ron a Walter, 2007). Tato komplexní buněčná odpověď je zprostředkována třemi molekulami, a to EIF2AK3, ATF6 (aktivovaný transkripční faktor 6) a IRE1 (Inositol vyžadující enzym 1) (Schroder a Kaufman, 2005). Domény EIF2AK3, ATF6 a IRE1 interagují s chaperonem GRP78 (glukosou regulovaný protein 78), který po akumulaci nesbalených proteinů disociuje od těchto tří molekul, což způsobuje jejich aktivaci (Malhotra a Kaufman, 2007).

Po aplikaci PDT s Redaporfinem došlo u endoplazmatického retikula k fosforylaci eIF2 α , která byla překvapivě zprostředkována EIF2AK1 (kináza 1 eukaryotického translačního faktoru 2- α) a ne EIF2AK3, jako je tomu u jiných fotosensitizerů, které se akumuluji v endoplazmatickém retikulu (například Hypericin, fotosensitizer druhé generace) (Gomes da Silva *et al.*, 2018). Fosforylaci eIF2 α dochází k redukcí translace a hromadění proteinů v endoplazmatickém retikulu (Harding *et al.*, 2000; Jiang a Wek, 2005). Dále dochází k jaderné translokaci ATF6 a aktivaci IRE1–XBP1 (X–box vázající protein 1). Jakmile je ATF6 uvolněno od GRP78, dochází k jejímu štěpení v Golgiho aparátu, kde se uvolňuje transkripčně aktivní fragment, který je translokován do jádra (Haze *et al.*, 1999). Tento fragment spolupracuje s XBP1 proteinem a indukuje expresi genů kódující proteinové chaperony a komponenty degradační dráhy endoplazmatického retikula (ERAD) (Yamamoto *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007). Akumulací nesbalených proteinů v endoplazmatickém retikulu dojde k aktivaci transmembránové protein kinázy

endoplazmatického retikula IRE1, dojde k její oligomerizaci a poté transautofosforylaci kinázové domény IRE1. Transautofosforylaci kinázové domény získává IRE1 endoribonukleázovou aktivitu, která štěpí mRNA transkripčního faktoru XBP1. Následně dochází k ligaci mRNA XBP1 necharakterizovanou RNA ligázou a posléze je produkován sestřížený XBP1 protein (Calfon *et al.*, 2002). Tento XBP1 protein funguje jako vysoce aktivní transkripční faktor, který reguluje sbalovací kapacitu endoplazmatického retikula (Lee *et al.*, 2003). V konečném důsledku dochází k aktivaci signalizační dráhy UPR s cílem udržení funkce endoplazmatického retikula, a tedy i buněčné funkce (Ron a Walter, 2007).

Obdobná pozorování byla spojena i s různými léčivy, které vyvolávají buněčnou smrt pomocí imunitního systému, což posiluje trvání, že fosforylace eIF2 α je důležitým znakem buněčné smrti zprostředkované imunitním systémem v kombinaci s PDT (Bezu *et al.*, 2018). K dalším takovým znakům, které byly detekovány v odpovědi na PDT s Redaporfinem, patří i vystavení kalretikulinu na povrchu buňky či sekrece ATP (Gomes da Silva *et al.*, 2018).

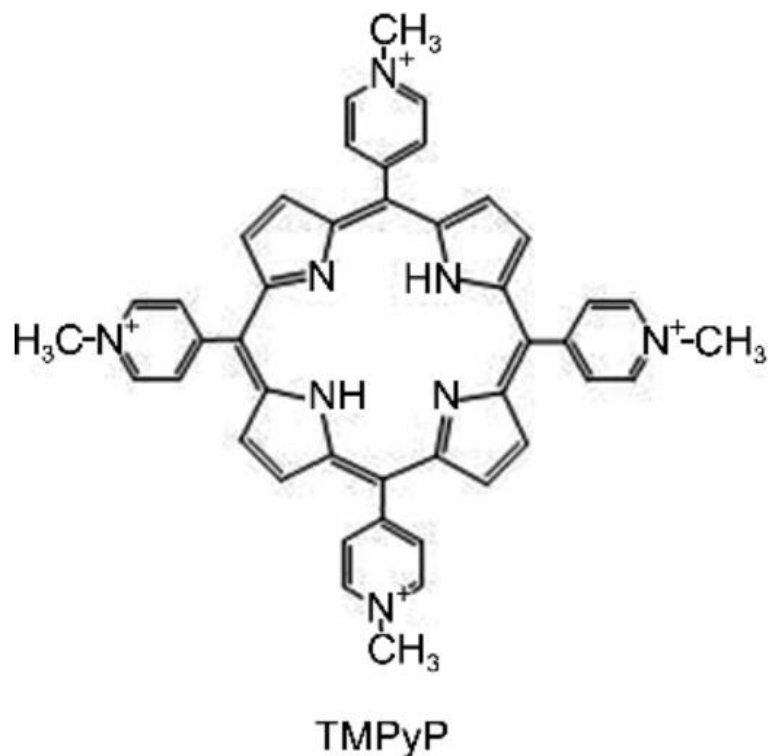
Fototoxický efekt Redaporfinu vykazuje určitou hierarchii narušení organel, ve které endoplazmatické retikulum s Golgiho aparátem fungují nezávisle na mitochondriích. Narušení endoplazmatického retikula a/nebo Golgiho aparátu je ireverzibilní a dostatečné pro usmrcení buněk, a to nejspíše narušením buněčného transportního systému a dynamiky Golgiho aparátu (Jollivet *et al.*, 2007; Guizzunti a Seemann, 2016). Poškození Golgiho aparátu prostřednictvím PDT s Redaporfinem se vyznačuje zejména sražením, ale při použití jiných fotosenzitizérů může docházet i k vakuolizaci a disperzi. Dále dochází k zablokování anterográdního transportního systému sekrečních proteinů z endoplazmatického retikula do Golgiho aparátu (Gomes da Silva *et al.*, 2018). Golgiho aparát obsahuje anti-apoptické proteiny jako je například GAAP (Golgiho anti-apoptický protein), který se chová jako iontový kanál a ovlivňuje homeostázu Ca²⁺ iontů (Carrara *et al.*, 2015). Teoreticky by zmizení tohoto proteinu mělo způsobit apoptózu, avšak PDT způsobuje spíše obecné narušení proteinů endoplazmatického retikula či Golgiho aparátu. Nicméně, ireverzibilní inaktivace těchto organel způsobuje buněčnou smrt různými dráhami (Gomes da Silva *et al.*, 2018).

1.4 Charakterizace fotosenzitizéru TMPyP

(5,10,15,20–Tetrakis (1–methyl–4–pyridinio) porfyrin tetra (p–toluensulfonát)) (TMPyP) patří do skupiny hydrofilních kationtových porfyrinů se silnou afinitou k DNA. TMPyP (Obr. 9) vykazuje absorpční koeficient v oblasti modrého světla a má potenciál k tvorbě vysokého množství ROS, ale především singletního kyslíku. Díky těmto vlastnostem je velmi slibným fotosenzitizérem v aplikaci PDT (Garcia-Sampedro *et al.*, 2019).

Porfyriny jsou aromatické makrocykly odvozené z porfinů. Tyto tetrapyrolové organické pigmenty mají roli v mnoha různých biologických procesech, například hem nebo chlorofyl má porfyrinovou strukturu (Senge a Davis, 2010). Pro fotochemickou reakci a elektronový transport jsou důležité právě čtyři pyrolové kruhy spojené čtyřmi methioninovými můstky (Garcia-Sampedro *et al.*, 2019). Většina klinicky schválených fotosenzitizérů pro biomedicínské aplikace jsou právě porfyriny a jejich deriváty (Senge a Davis, 2010). Porfyriny mají schopnost emitovat červenou fluorescenci, čehož se využívá v chirurgii k vyznačení hranic nádoru (Nagaya *et al.*, 2017).

Ve vodném roztoku má TMPyP hned několik absorpčních píků, avšak ten nejsilnější z nich se nachází v modré oblasti viditelného spektra a nazývá se Soretův pás,



Obr. 9 Struktura fotosenzitizéru TMPyP (Gong *et al.*, 2012)

nebo také B pás ($\lambda_{\max} = 424 \text{ nm}$). Navíc, při delších vlnových délkách obsahuje absorpční spektrum tohoto fotosensitizeru další čtyři pásy (Q pásy), které reprezentují malé absorpční píky v zelené a červené oblasti viditelného spektra (konkrétně se jedná o oblast 518, 554, 585 a 630 nm) (Garcia-Sampedro *et al.*, 2019). Fotosensitizer TMPyP lze aktivovat modrým světlem, pokud se jedná o povrchové léze nebo antimikrobiální aplikace, ale i červeným světlem, pokud se jedná o léze, které jsou hluboko v tkáních. Každopádně, zvolený světelný zdroj by měl poskytnout excitační vlnovou délku korespondující s maximálním absorpčním píkem fotosensitizeru k zajištění optimální tvorby ROS. TMPyP je také charakterizován vysokým kvantovým výtěžkem v roztoku fosfátového pufru. Fluorescenční emise tohoto fotosensitizeru je ve vodném roztoku charakterizována mezi 649–655 nm a 715–720 nm (Garcia-Sampedro *et al.*, 2019).

1.4.1 Lokalizace a relokalizace TMPyP

Intracelulární lokalizace fotosensitizeru je důležitá, protože na ní závisí, jakou signalizační dráhou proběhne buněčná smrt (Agostinis *et al.* 2004; Cenklova, 2017). PDT může totiž indukovat buněčnou smrt prostřednictvím apoptózy, autofagie, mitotické katastrofy a nekrózy. Jaký typ buněčné smrti proběhne záleží na mnoha parametrech, mezi nimiž je například chemická povaha fotosensitizeru, intracelulární lokalizace, buněčný genotyp a dávka PDT (koncentrace fotosensitizeru, světelná dávka, nebo jejich kombinace) (Garcia-Sampedro *et al.*, 2019).

Bylo prokázáno, že fotosensitizer TMPyP se do buňky dostává endocytózou a před ozáření se vyskytuje zejména v lysozomech, pouze minimální frakce byla detekována v jádře, avšak po světelné aktivaci dochází k lysozomální lýzi vlivem zvýšeného množství ROS a TMPyP se relokalizuje do jádra, kde se díky své kationtové povaze váže na aniontovou DNA (Patito *et al.*, 2001). Při velmi vysokých koncentracích se TMPyP váže na DNA v jádře, což může být problém (Tada-Oikawa *et al.* 2009). Tato lokalizace totiž nemusí vždy vést k buněčné smrti, namísto toho dochází v jádře k tvorbě mutací, které následně vedou ke karcinogenezi u přeživších buněk (Moan *et al.*, 1989). I přesto má TMPyP v porovnání s jiným léčebným přístupem (například rentgenové záření) daleko nižší potenciál poškodit DNA a způsobit tak mutace vedoucí ke karcinogenezi. K relokalizaci do jádra i do jadérka dochází u tohoto fotosensitizeru až po jeho aktivaci ozáření, kdy dochází k fotopoškození lysozomů vlivem ROS. Obsah lysozomů je následně společně s fotosensitizerem uvolněn do cytoplazmy (Patito *et al.*, 2001; Zapletalova *et al.*, 2016).

Intracelulární lokalizace fotosensitizerů je obecně spojena s mechanismem, kterým jsou tyto látky pohlceny buňkou, a taktéž determinuje subcelulární domény fotopoškození (Moan *et al.*, 1989). Většina fotosensitizerů má molekulární hmotnost 600 až 1000 Da a jejich subcelulární distribuce je vysoce závislá na jejich chemické struktuře (Garcia-Sampedro *et al.*, 2019).

Protinádorové účinky TMPyP částečně závisí na schopnosti tvořit ROS po světelné aktivaci. Tím dochází k intracelulárním změnám klíčových komponent, jako je cytoskelet nebo v některých případech DNA oxidace a další (Garcia-Sampedro *et al.*, 2019). Za fotopoškození DNA, respektive modifikaci guaninů, je zodpovědný generovaný singletní kyslík. Tento efekt je ale závislý na dávce fotosensitizeru TMPyP a objevuje se spíše u jednovláknové DNA než u dvouvláknové (Tada-Oikawa *et al.* 2009). TMPyP svou vazbou k tubulinu také pozměňuje dynamiku cytoskeletu, což způsobuje disorganizaci mikrotubulů a depolymerizaci (Juarranz *et al.*, 2001).

Aktivací TMPyP dochází taktéž k produkci singletního kyslíku, který je zodpovědný jak za buněčné poškození, tak za oxidativní stres (Weishaupt *et al.*, 1976). Je známo několik proteinů, které jsou translokovány do jádra během oxidativního stresu, kde se podílejí na tvorbě volných radikálů (Curry a Levy, 1993). Tato třída proteinů je s velkou pravděpodobností zodpovědná za translokaci fotosensitizeru do jádra během PDT (Patito *et al.*, 2001). Zvýšená exprese byla během PDT detekována zejména u proteinů teplotního šoku (například Hsp-70) a u proteinů regulovaných glukózou (GRP). U těchto proteinů byl během PDT zaznamenán masivní transport z cytoplazmy do jádra způsobený oxidativním stresem (Curry *et al.*, 1993; Gomer *et al.*, 1996).

Nenádorové buňky vykazují sníženou schopnost akumulovat porfyrinové sloučeniny ve srovnání s nádorovými buňkami (Pizova *et al.*, 2015). Může to být důsledek pomalejšího metabolismu nenádorových buněk, který vede k redukovanému příjmu fotosensitizeru, a tedy i k nižší produkci ROS po fotoaktivaci (Tita a Perussi, 2001).

V jedné z prvních publikovaných *in vivo* PDT studií byl TMPyP aplikován intravenózně v koncentraci 2.1 mg.kg⁻¹ do Balb/c (Bagg a Albino myš) myši s MS-2 fibrosarkomem. Analýzou tkáňové biodistribuce bylo zjištěno, že TMPyP se preferenčně akumuluje v nádorové tkáni ve srovnání s nenádorovou, až na jaterní a slezinní buňky. Koncentrace tohoto fotosensitizeru byla 24-48 h po aplikaci minimální. Kůže a svalová tkáň vykazovaly jen velmi nízké koncentrace TMPyP první hodinu po intravenózní aplikaci. Žádné stopy tohoto fotosensitizeru nebyly detekovány v mozkové tkáni,

což podporuje myšlenku, že TMPyP nepřechází přes hematoencefalickou bariéru (Villanueva a Jori, 1993).

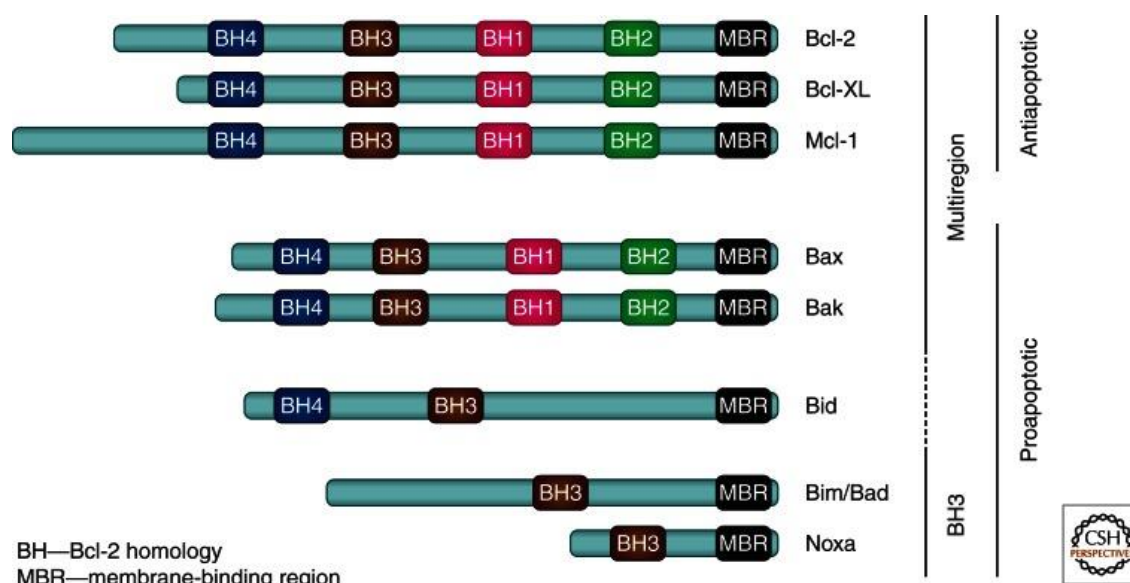
1.5 PDT indukovaná buněčná smrt

U fotodynamické terapie bylo prokázáno, že efektivně indukuje apoptózu v různých modelových systémech, a to ve spolupráci s ROS, které přímo poškozují klíčovou organelu pro regulaci buněčné smrti, mitochondrie. Typ buněčné smrti, který nastane po ozáření fotosensitizeru, ovlivňuje odpověď imunitního systému, a tedy i efektivitu léčby. Apoptóza i nekróza mají vliv na aktivitu a specifickou odpověď různých typů buněk zahrnutých v potenciální protinádorové odpovědi imunitního systému. Výsledný typ buněčné smrti může být pozměněn vhodnou kombinací složek této terapie, což vede k požadovanému poměru apoptózy a nekrózy, který je nejvýhodnější pro kompletní zničení nádoru (Plaetzer *et al.*, 2002).

1.5.1 Role Bcl-2 rodiny a MAPK v odpovědi na PDT

V savčích buňkách má Bcl-2 rodina proteinů (Obr. 10) nejméně dvacet členů a všichni sdílejí nejméně jednu konzervovanou doménu. Tato rodina proteinů je rozdělena do dvou podskupin obsahujících proteiny, které buď inhibují nebo zprostředkovávají apoptózu. Tato rodina zahrnuje čtyři anti-apoptotické proteiny (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, A1 a Mcl-1) a dvě skupiny pro-apoptotických proteinů, rodiny Bax a BH3 (Oltvai *et al.*, 1993; Cory a Adams, 2002). Pro-apoptotické proteiny jsou dále děleny na ty, které oligomerizují a permeabilizují vnější mitochondriální membránu (Bax a Bak) a poté na ty, které zprostředkovávají apoptózu skrze aktivaci Bax a Bak nebo inhibici anti-apoptotických proteinů (zde patří Bid, Bim, Bad a Noxa). Anti-apoptotické proteiny mají potenciál inhibovat apoptózu v odpovědi na mnoho, ale ne všechny cytotoxické podněty (Mroz *et al.*, 2011; Shamas-Din *et al.*, 2013). Sám Bcl-2 a několik dalších anti-apoptotických molekul asociují s vnější mitochondriální membránou a s membránou endoplazmatického retikula či jádra a udržují jejich integritu. Mohou tak předcházet uvolnění cytochromu *c* a následné aktivaci kaspázy 9. Nejspíše také regulují aktivaci několika dalších kaspáz, a to nezávisle na mitochondriálním poškození (Cory a Adams, 2002).

Proteiny patřící do této rodiny vykazují sekvenční homologii k prvnímu členu Bcl-2 rodiny (Bcl-2) nejméně v jednom ze čtyř BH (Bcl-2 homologních) regionů. Všechny anti-apoptotické proteiny, stejně jako i pro-apoptotické Bax, Bak a Bid, mají několik BH regionů a jsou evolučně příbuzné, kdežto proteiny patřící do BH3 skupiny



Obr. 10 Schematický přehled nejdůležitějších proteinů rodiny Bcl-2 (Shamas-Din *et al.*, 2013)

obsahují pouze BH3 region a jsou evolučně vzdálené od multiregionových proteinů. Většina proteinů z Bcl-2 rodiny obsahuje region vázající se na membránu (MBR) na jejich C konci ve formě kotvy, sekvence cílicí na mitochondrie nebo jako hydrofobní aminokyselinovou sekvenci, která umožňuje vazbu a lokalizaci těchto proteinů na vnější mitochondriální membráně nebo na membráně endoplazmatického retikula (Shamas-Din *et al.*, 2013).

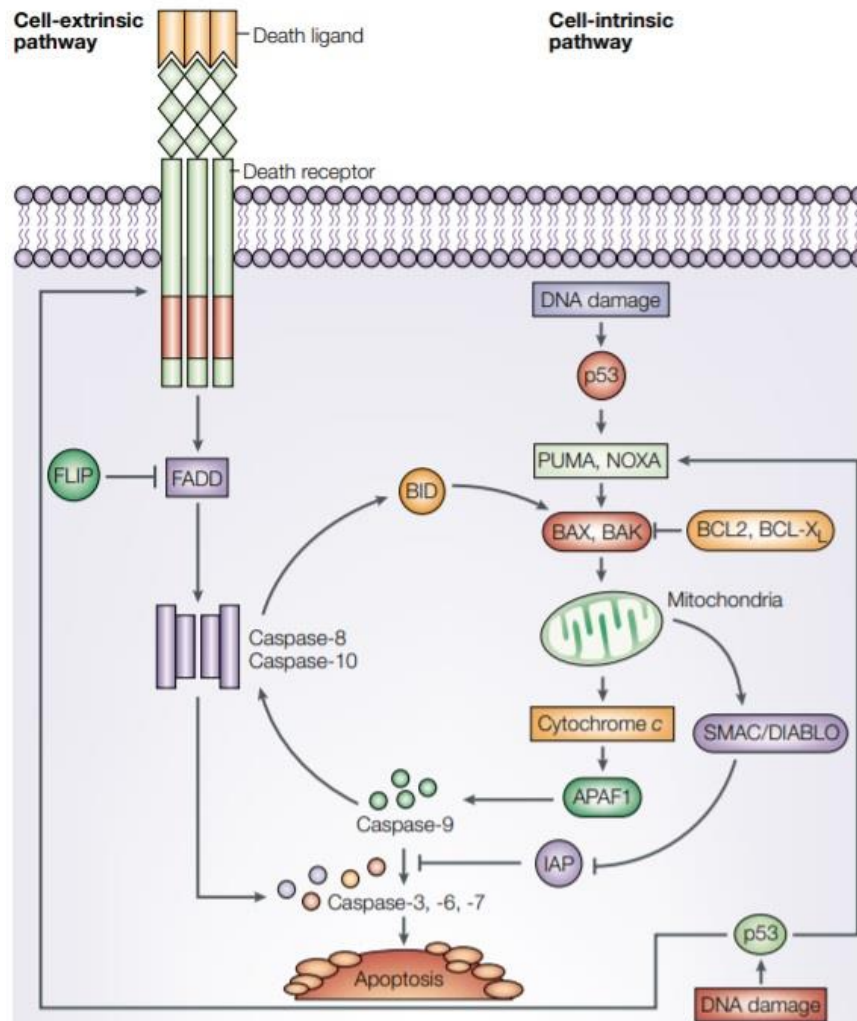
Je známo, že PDT způsobuje fotopoškození Bcl-2 a dalších anti-apoptotických proteinů, zatímco aktivuje pro-apoptotické členy rodiny. Zvyšuje se tak poměr pro-apoptotického proteinu Bax k anti-apoptotickému Bcl-2 (Kim *et al.*, 1999). Proteiny z BH3 pro-apoptotické rodiny fungují jako tzv. senzory poškození a seskupují antagonisty anti-apoptotických proteinů. Jsou to spouštěče, které detekují různé intracelulární vývojové vady nebo poškození. Ve zdravých buňkách dochází k jejich sekvestraci cytoskeletem, aby nedošlo k jejich náhodné aktivaci. Proteiny z Bax rodiny mají roli v následné signalizační dráze, pravděpodobně v narušení mitochondrií (Mroz *et al.*, 2011). Během apoptózy dochází k oligomerizaci Bax a Bak ve vnější mitochondriální membráně, což způsobuje narušení její integrity a uvolnění pro-apoptotických proteinů jako je cytochrom *c* do cytosolu (Cory a Adams, 2002). V cytosolu tvoří cytochrom *c* komplex s Apaf-1, prokaspázou 9 a ATP nebo dATP a dochází tak k aktivaci kaspáz (Martinou *et al.*, 2000).

Svou roli zde hrají i receptory smrti z TNFR rodiny. Většina z nich jsou transmembránové signální přenašeče, které zprostředkovávají odpověď na vazbu ligandu.

Avšak, některé z těchto receptorů nemají signální funkci. Jedná se o receptory, které fungují jako návnady a soutěží se signálními receptory o interakci s ligandy a zeslabují tak funkci těchto receptorů. Členové TNFR rodiny se signální funkcí se dělí do dvou hlavních skupin. První skupina se nazývá receptory smrti a mají přítomnou cytoplazmatickou doménu smrti. Mezi členy této rodiny patří například APO2L/TRAIL (Apo2 ligand/TNF apoptózu indukující ligand) a FasL (FAS ligand), kteří indukují apoptózu mechanismem nezávislým na p53. U druhé skupiny není tato cytoplazmatická doména přítomna. Domény smrti umožňují interakci receptorů smrti s adaptorovými proteiny, u kterých je přítomna doména smrti. Tyto adaptory obsahují sekvenční moduly, které umožňují vazbu k intracelulárním efektorovým enzymům. Jeden z nejznámějších adaptorů je FADD (FAS asociovaná doména smrti), který aktivuje specifické kaspázy iniciující apoptózu (Chinnaiyan *et al.*, 1995; Ashkenazi, 2002). Další takový adaptor je TRADD (TNFR asociovaná doména smrti), který stimuluje serin/threonin protein kinázy kontrolující fosforylační kaskády pro transkripci genů, které modulují imunitní systém (Hsu *et al.*, 1995).

Existují dvě hlavní signální dráhy, které iniciují apoptózu v savčích buňkách (Obr. 11). První z nich, vnitřní buněčná dráha apoptózy, je spouštěna v odpovědi na poškození DNA, chybný buněčný cyklus, hypoxii a jiné typy buněčných stresů. Většina ozáření a chemoterapeutických léčiv způsobuje apoptózu nádorových buněk přes vnitřní buněčnou dráhu jako nepřímý důsledek buněčného poškození. Tato dráha vyžaduje funkci p53. Inaktivace p53, ať už přímo mutací nebo nepřímo přes p53 modulátory, je přítomna u mnoha lidských nádorů (Ashkenazi, 2002). Tato vnitřní dráha zahrnuje naštěpení pro-apoptotického Bid kaspázou 8. Po naštěpení se Bid translokuje z cytosolu do mitochondrií a přenáší tak apoptotický signál. Zároveň dochází k aktivaci pro-apoptotické větve Bcl-2 rodiny (Bax a Bak), která způsobí uvolnění apoptotických faktorů (cytochrom *c*, SMAC/DIABLO) z mitochondrií do cytosolu (Adams a Cory, 1998; Hunt a Evan, 2001). V cytosolu se cytochrom *c* váže na adaptor Apaf1 (apoptotický proteázový aktivační faktor 1) a dochází tak k tvorbě apoptozómu, který aktivuje kaspázu 9, která aktivuje kaspázy 3, 6 a 7. SMAC/DIABLO se váže na inhibitory apoptózy (IAP), které nemohou zeslabovat kaspázovou aktivitu a dochází tak k apoptóze (Du *et al.*, 2000; Verhagen, 2000).

Vnější cesta indukce apoptózy zahrnuje interakci receptorů smrti s jejich ligandy. Tato dráha stimuluje apoptózu nezávisle na p53. Ligand se naváže na receptor smrti, který je ukotven na buněčném povrchu, a dojde k jeho aktivaci. Poté se vytvoří tzv. DISC



Obr. 11 Dvě hlavní signální dráhy iniciující apoptózu v savčích buňkách (Ashkenazi, 2002)

komplex, a dojde k aktivaci kaspázy 8 a 10, které fungují jako proteázy iniciující apoptózu. Tyto kaspázy poté aktivují další kaspázy 3, 6 a 7, které jsou jinak aktivovány pomocí kaspázy 9 ve vnitřní dráze spouštění apoptózy. Kaspázová aktivita (zejména kaspáza 3 a 9) je důležitá pro následující kroky. Dochází ke ztrátě mitochondriálního membránového potenciálu, zmenšení buněčného obsahu a kondenzaci jádra (Li *et al.*, 1998, Ashkenazi, 2002).

Mitogen aktivované protein kinázy (MAPK) patří do třídy serin/threonin kináz, které jsou aktivovány duální fosforylací jak na tyrosinových, tak i threoninových reziduích (Davis, 1994). Tyto enzymy jsou kritickou součástí komplexního buněčného signálního systému, který reguluje genovou expresi v odpovědi na různé extracelulární podněty. Existují tři velmi dobře známé MAPK rodiny, které se účastní v procesu apoptózy: ERK (kináza regulovaná extracelulárním signálem), JNK

(c – Jun N – terminální kináza) / SAPK (stresem aktivovaná kináza) a p38 MAPK (Mroz *et al.*, 2011; Davis, 1994). Každý z těchto enzymů je cílem fosforylačních kaskád. JNK a p38 MAPK mají důležité funkce v signalizaci, která řídí buněčnou odpověď na velké množství stresů, ale také kontroluje proliferaci, diferenciaci, přežití nebo migraci specifických typů buněk. JNK a p38 MAPK regulují aktivitu a expresi klíčových inflamatorních mediátorů, jako jsou cytokiny a proteázy, které nejspíše fungují jako spouštěče nádorových onemocnění (Wagner a Nebreda, 2009).

Zajímavou roli má v buněčné signalizační dráze vedoucí k apoptóze i sekundární posel ceramid, který permeabilizuje vnější mitochondriální membránu a umožňuje tak vypuštění cytochromu *c* (Siskind a Kolesnick, 2002). Během apoptózy dochází mimo jiné i k hydrolyze fosfolipidu sfingomyelinu v buněčné membráně. Hydrolyzou sfingomyelinu je produkován ceramid. Při tomto procesu také dochází ke stimulaci SAPK/JNK dráhy, se kterou ceramid také spolupracuje za účelem indukce apoptózy (Verheij *et al.*, 1996).

1.5.2 Mechanismus spouštění apoptózy

Apoptóza je ATP vyžadující proces charakterizovaný kondenzací chromatinu, štěpením chromozomální DNA na internukleozomální fragmenty, zmenšením buněčného objemu i obsahu, bobtnatěním membrán a tvorbou apoptotických tělísek, aniž by došlo k dramatickému poškození plazmatické membrány. V *in vitro* podmínkách zůstává plazmatická membrána intaktní až do pozdní apoptotické fáze, kdežto v *in vivo* podmínkách jsou apoptotické buňky odstraněny imunitním systémem ještě předtím, než dojde k velkému poškození plazmatické membrány. Nedochozí tedy k expozici fosfatidylserinu z vnější vrstvy plazmatické membrány, ani k následné fagocytóze obklopujícími buňkami (Kroemer *et al.*, 2005; Zapletalova *et al.*, 2016).

Apoptotický proces je kódován v každé savčí buňce a vždy zahrnuje reverzibilní i ireverzibilní signální dráhy, které jsou indukované kaspázami. Rodina kaspáz jsou proteázy s cysteinem v jejich aktivním místě. Po aktivaci začínají kaspázy štěpit, čímž aktivují další prokaspázy (zejména prokaspázu 3, 6 a 7), což vede k aplikaci proteolytické kaskády (Zapletalova *et al.*, 2016). Některé aktivované kaspázy štěpí i proteiny nukleární laminy, čímž dochází k jejímu ireverzibilnímu poškození (Kramer *et al.*, 2010). Jiné aktivované kaspázy zase štěpí protein, který normálně udržuje DNA degradující enzym (DNAsu) v inaktivní formě. Takto dochází k uvolnění DNAsy, která štěpí DNA v jádře, a tedy i redukuje hmotu samotného jádra

(Castano *et al.*, 2005; Roos a Kaina, 2006).

Degradace DNA na malé jaderné fragmenty je jednou z nejlépe charakterizovaných biochemických znaků apoptózy (Nagata, 2000). Důvodem apoptózy je blokáce DNA replikace, která vede ke kolapsu replikačních vidliček a tvorbě dvouřetězcových zlomů, které jsou esenciální pro spouštění apoptózy. ATM (ataxia telangiectasia mutated) a ATR (ataxia telangiectasia and Rad3 related) proteiny detekují dvouřetězcové zlomy a předávají signál kontrolním kinázám CHK1 a CHK2, ale také proteinu p53, který se stabilizuje a blokuje proliferaci buňky nadregulací proteinu p21, který blokuje přechod z G1 fáze buněčného cyklu do S fáze. Při nižších hladinách dvouřetězcových zlomů dochází k zastavení buněčného cyklu, avšak při vyšších hladinách se akumuluje velké množství p53, což vede k indukci transkripční aktivace pro-apoptotických genů pro pro-apoptotické proteiny Fas, Puma a Bax. Mnoho nádorů si prostřednictvím mutace v p53 proteinu našlo způsob, jak uniknout buněčné smrti. Avšak, existuje záložní systém, který zahrnuje aktivaci E2F1 (transkripční faktor) prostřednictvím kontrolních kináz CHK1 a/nebo CHK2, a taktéž nadregulaci p73, čímž dochází k transkripci pro-apoptotických členů Bcl-2 rodiny Bax, Puma a Noxa. Puma a Noxa pak interferují s dalšími pro-apoptotickými členy Bcl-2 rodiny, Bax a Bak, a dochází tak k indukci permeabilizace vnější mitochondriální membrány a uvolnění cytochromu *c* (Lane, 1992; Letai *et al.*, 2002; Roos a Kaina, 2006). K mutaci p73 téměř nikdy nedochází, avšak v nádorových buňkách je p73 nadexprimován, což může být důvodem, proč jsou nádory obecně náchylné ke genotoxickým protinádorovým léčivům i v nepřítomnosti funkční p53 (Melino *et al.*, 2002). Svoji roli v p53-nezávislé apoptóze má i NF- κ B. Jedná se o jaderný transkripční faktor, jehož funkcí dochází k transkripci anti-apoptotických genů. Avšak, za určitých podmínek vykazuje tento faktor i apoptotickou aktivitu. Reaktivní formy kyslíku totiž indukují transkripci FasL (Fas ligandu) skrze NF- κ B, což stimuluje proces apoptózy (Bauer *et al.*, 1998). Jiná dráha p53 nezávislé apoptózy zahrnuje degradaci Bcl-2 nebo defosforylaci Bad (Bcl-2 antagonistu buněčné smrti), která vede k sekvestraci Bcl-2 a Bcl-X_L (transmembránový anti-apoptotický protein) z mitochondriální membrány, což je opět následováno apoptózou (Breitschopf *et al.*, 2000; Klumpp a Krieglstein, 2002). Taktéž kaspáza 2, která je jedinou pro-kaspázou konstitutivně přítomnou v jádře, a navíc i v Golgiho aparátu, je zahrnuta v p53 nezávislé apoptóze (Zhivotovsky *et al.*, 1999). Kaspáza 2 vyžaduje aktivaci kaspázou 9, která se nachází v mitochondriích. Kaspáza 2 tedy funguje v mitochondriální apoptotické dráze, kde buď aktivuje pro-apoptotické

proteiny Bcl-2 rodiny s následným evolvěním cytochromu *c* z mitochondrií, nebo způsobuje uvolnění cytochromu *c* nezávisle na proteinech Bcl-2 rodiny. Kaspáza 2 také narušuje interakci cytochromu *c* s aniontovými fosfolipidy a posiluje tak jeho uvolnění (Guo *et al.*, 2002; Robertson *et al.*, 2004; Enoksson *et al.*, 2004; Roos a Kaina, 2006). Další způsob indukce apoptózy prostřednictvím DNA poškození spočívá v inhibici RNA syntézy, což vede ke snížení hladiny produktů jistých důležitých genů, jako je například MKP1 (mitogen aktivovaná protein kináza fosfatáza). Takto dochází k aktivaci JNK a poté AP1 (aktivátorový protein 1), který stimuluje aktivaci receptoru smrti (Roos a Kaina, 2006).

Existují dvě fáze štěpení DNA. Ta první zahrnuje štěpení genomu na 200–300 kbp a 30–50 kbp úseky prostřednictvím jednořetězcových zlomů. Tato fáze je spouštěna apoptózou indukujícím faktorem (AIF), který je uvolněn z mitochondrií (Vittar *et al.*, 2010). Druhá fáze zahrnuje další štěpení DNA na oligonukleozomální fragmenty procesem CAD-dependentní DNA fragmentace (Earnshaw, 1995).

Cheng a Cao (2017) zjistili, že TMPyP4 ((5,10,15,20 – tetrakis (1 – methylpyridinium – 4 – yl) porfyrin), který také patří do skupiny kationtových hydrofilních fotosensitizerů, způsobuje apoptózu lidských buněk nádoru děložního hrdla. TMPyP4 inhibuje telomerázovou aktivitu prostřednictvím vazby a stabilizace telomerického G–kvadruplexu DNA nádorových buněk (Rha *et al.*, 2000; Grand *et al.*, 2002; Shamma *et al.*, 2003). Takto dochází k inhibici proliferace nádorových buněk pomocí fotosensitizeru TMPyP4 (Cheng a Cao, 2017). Předchozí studie prokázaly, že TMPyP4 by mohl způsobit progresivní zkracování telomer, jehož důsledkem je apoptóza (Fujimori *et al.*, 2011). S tímto tvrzením i spojen i fakt, že během PDT s TMPyP4 dochází ke zvýšené expresi genu pro fosforylovaný p53 protein a k aktivaci mitogen aktivovaných protein kináz (Mikami–Terao *et al.*, 2009). MAPK signalizační dráhy působí v regulaci mnoha procesů, jako je například buněčná proliferace. Avšak, mají funkci i v indukci rezistence nádorových buněk k radioterapii či chemoterapii. Navíc, p38 MAPK signalizační kaskáda je hlavní dráhou, která potlačuje apoptózu nádorových buněk (Liu *et al.*, 2016). p38 MAPK dráha je tedy vhodný terapeutický cíl pro TMPyP4, čemuž naznačuje i to, že nadexprese p38 MAPK signalizační dráhy prostřednictvím TMPyP4 způsobuje inhibici proliferace nádorových buněk, zatímco dochází k jejich apoptóze (Cheng a Cao, 2017).

1.5.3 Mechanismus spouštění nekrózy

Nekróza neboli pasivní buněčná smrt, je výsledkem buď extrémních vnějších fyzických podmínek (například extrémní teplota, tlak, osmolarita, pH) nebo vážného buněčného poškození indukovaného chemickými procesy (metabolické inhibitory, letální dávky ionizujícího záření, různé toxické látky). Tento proces není programovaný a je spojen se ztrátou membránové integrity a metabolické homeostázy vzhledem k nekontrolované a náhlé buněčné dezintegraci. Nekróza není reverzibilní a je spojována s charakteristickými morfologickými znaky, jako je prasknutí membrány, cytoplazmatické bobtnání či karyolýza (Zhou, 1989; Buja *et al.*, 1993; Plaetzer *et al.*, 2002). Tohle vše vede k buněčné fragmentaci a uvolnění buněčného materiálu do extracelulárního prostoru. Dekompozice buněk během nekrózy je zprostředkována především proteolytickou aktivitou (Proskuryakov a Gabai, 2010).

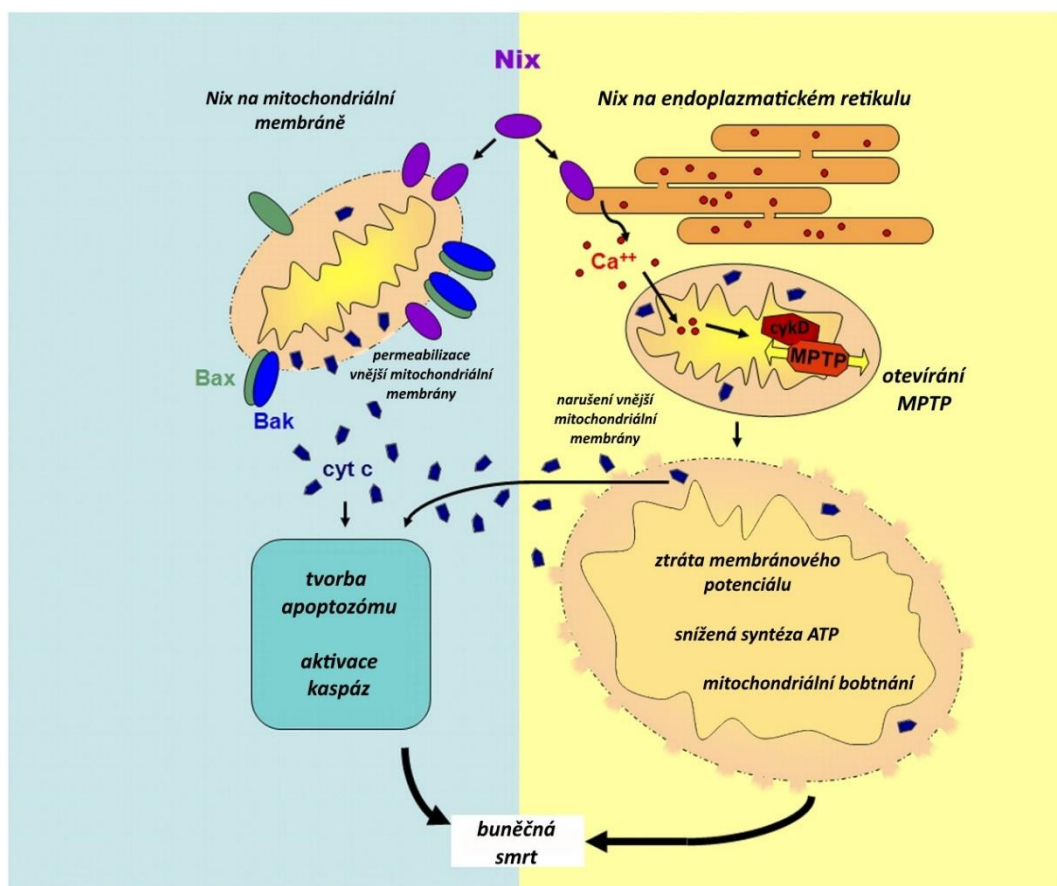
Mezi důležité faktory, které determinují, zda proběhne buněčná smrt procesem apoptózy nebo nekrózy, patří typ buňky, subcelulární lokalizace fotosenzitizeru, aplikovaná dávka ozáření nebo parciální tlak kyslíku (Buytaert *et al.*, 2007). Obecně mají vysoké dávky PDT (ať už vysoká koncentrace fotosenzitizeru nebo dávky ozáření) tendenci způsobovat nekrózy, kdežto aplikace nižších dávek vede k apoptotickému usmrcení buněk (Mroz *et al.*, 2011).

U fotosenzitizerů, které se lokalizují v plazmatické membráně, dochází po jejich aktivaci k vyvolání nekrózy v důsledku ztráty membránové integrity a rychlého poklesu intracelulárního ATP (Kessel a Poretz, 2000). Taktéž se předpokládá, že vysoké dávky PDT fotochemicky inaktivují esenciální enzymy apoptotické dráhy, kaspázy, ale i jiné komponenty apoptotické kaskády (Mroz *et al.*, 2011). Například Lavie *et al.* (1999) ve své práci uvedli, že po aplikaci PDT s hypericinem, fotosenzitizerem druhé generace, na leukemické buňky došlo k inhibici apoptózy prostřednictvím fosforylace laminů nebo i jejich zesíťování za účelem předejit jadernému kolapsu.

Stejně jako apoptóza, i nekróza je zprostředkována dráhami, které zahrnují povrchové receptory smrti a mitochondrie či endoplazmatické retikulum. Mitochondriální změny vedoucí k nekróze jsou odlišné od těch, které vedou k apoptóze a zahrnují otvírání póru přechodné propustnosti (MPTP) ve vnitřní mitochondriální membráně. MPTP je regulován cyklofilinem D, malým proteinem, který se nachází v mitochondriální matrix. Výsledkem otvírání MPTP je ztráta mitochondriálního membránového potenciálu, který je důležitý pro produkci ATP z ADP. Navíc, otevírání

MPTP má za následek typické morfologické znaky nekrózy a také narušuje vnější mitochondriální membránu, která následkem toho uvolní apoptogeny vedoucí k apoptotické buněčné smrti (Kitsis a Molquentin, 2010).

Nix/BNip3L (Bcl-2 / adenovirus E1B 19 kDa interagující protein 3) je protein, který je přítomen na vnější mitochondriální membráně, ale také na membráně endoplazmatického retikula a jeho funkce je stimulace apoptózy nebo nekrózy (Chinnadurai *et al.*, 2008). Chen *et al.* (2010) zjistili, že Nix/BNip3L indukuje buněčnou smrt dvěma dráhami. Mitochondriálně cílený Nix/BNip3L stimuluje klasickou Bax/Bak dependentní permeabilizaci vnější mitochondriální membrány, uvolnění cytochromu *c* a aktivaci kaspáz vedoucí k apoptóze, v endoplazmatickém retikulu indukuje tento protein otevírání MPTP prostřednictvím cyklofilinu D, což vede k uvolnění cytochromu *c*, které je ale nezávislé na Bax/Bak a způsobuje narušení vnější mitochondriální membrány. Tedy, Nix/BNip3L je schopen indukce apoptózy i nekrózy v závislosti na jeho lokalizaci. Ionty Ca^{2+} zde fungují jako spojení mezi událostmi mitochondrií a endoplazmatického retikula (Obr. 12).



Obr. 12 Duální funkce Nix/BNip3L na membráně mitochondrií a endoplazmatického retikula (Kitsis a Molquentin, 2010).

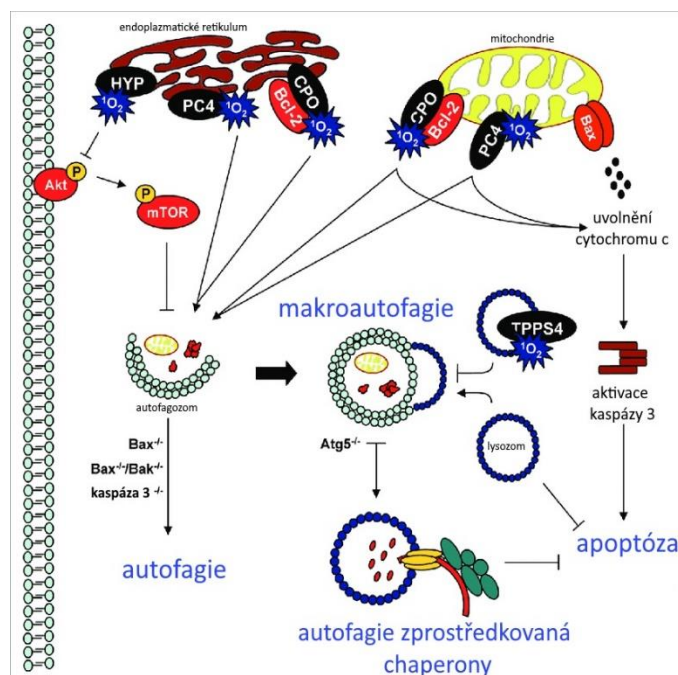
Také modifikace proteinů, respektive oxidace specifických proteinů (například tubulinu α a β vedoucí k narušení organizace mikrotubulů), určuje mechanismus, jakým dojde k PDT indukované buněčné smrti. (Sakharov *et al.*, 2003). Avšak, molekulární cíl oxidace se také liší v závislosti na lokalizaci fotosensitizeru (Sobolev *et al.*, 2000; Moor, 2000). Buněčné proteiny jsou klíčové pro zprostředkování toxicity singletním kyslíkem (Schafer a Buettner, 1999). Oxidace způsobuje modifikace na bočních řetězcích aminokyselin proteinu. Konkrétně boční řetězce cysteinu, histidinu, methioninu, tryptofanu a tyrosinu jsou zvláště náchylné na modifikace vyvolané ROS. Zvláště modifikace tyrosinu je klíčová, jelikož hraje důležitou roli v intracelulární signální transdukci (Berlett a Stadtman, 1997).

PDT indukovaná nekróza nádorové tkáně je považována za výsledek akutní inflamatorní reakce. Ranné poranění endoteliálních buněk a s nimi i cirkulujících krevních destiček a erytrocytů způsobuje fyzikálně–chemické změny v cévní stěně, což snižuje průtok krve a iniciuje procesy hemostáze a trombózy. Zvýšená permeabilita endoteliálních buněk vede k uvolnění sérových proteinů z krve a dochází tak k tvorbě otoku okolo poraněných cév. Otok spolu s rychlou redukcí dodávky krve a krvácením v nádoru vede k hypoxii či dokonce k anoxii poraněných neoplastických buněk, což vede k nekróze. Tento proces je dále posílen i uvolněním některých vazoaktivních látek nebo i substancí, které způsobují lýzi tkáně. Mezi takové látky patří třeba histamin, proteázy či fosfatázy z fotopoškozených žírných buněk a neutrofilů (Zhou, 1989).

1.5.4 PDT a autofagie

Autofagie je katabolický buněčný mechanismus, který buňce umožňuje udržovat rovnováhu mezi syntézou, degradací a recyklací buněčných produktů (Mathew *et al.*, 2007). Mimo odstranění nežádoucích proteinů, organel či mikroorganismů, autofagie také umožňuje relokalizovat nutrienty z nepodstatných procesů tam, kde jsou esenciální v podmínkách stresu nebo nedostatku živin (Mroz *et al.*, 2011). V eukaryotických buňkách existují tři hlavní typy autofagie. Jedná se o makroautofagii (nejznámější typ autofagie), mikroautofagii a autofagii zprostředkovanou chaperony (CMA) (Klionsky, 2005). Makro i mikroautofagie zahrnují dynamické uspořádání membrány k pohlcení částí cytoplazmy, ale taktéž mají kapacitu pro sekvestraci velkých struktur, jako jsou celé organely. Mikroautofagie zahrnuje přímé pohlcení cytoplazmy invaginací lyzozomálního povrchu a dalším zpracováním, kdežto makroautofagie sekvestruje části cytoplazmy *de novo* vytvořeným

dvoumembránovým autofagozomem, který pak fúzuje s lysozomem a pohlcený obsah je rozložen lysozomálními hydrolázami. V obou případech je membrána vytvořeného autofagického tělíska rozložena, aby mohl být jeho obsah odbourán a zbylé makromolekuly jsou pomocí membránových permáz transportovány zpět do cytosolu k opětovnému použití. CMA ale nefunguje na principu uspořádání membrány, místo toho přímo translokuje nesbalené, rozpustné proteiny přes limitující membránu lysozomu (Yang a Klionsky, 2009). Jednou z prvních nemocí, se kterou byla asociována autofagie, je rakovina (Kondo *et al.*, 2005). Autofagie hraje nejen roli v buněčném vývoji a diferenciaci, ale také funguje v potlačení růstu nádoru a nejspíše je spojena i s prodloužením života. V kvasinkách byly indentifikovány tzv. geny spojené s autofagií (Atg geny) a jejich ortology byly nalezeny i v jiných organismech, což naznačuje konzervaci autofagického procesu ve všech eukaryotech (Yang a Klionsky, 2009). Atg5 je velmi důležitý gen v procesu autofagie. Zajímavé je, že po aplikaci PDT s fotosensitizerem, který se akumuluje v endoplazmatickém retikulu (Hypericin), byla u nádorových buněk zpozorována defektní autofagie (Atg5 deficientní buňky), jejíž důsledkem byla kompenzační nadregulace CMA dráhy za účelem omezení apoptotické buněčné smrti (Obr.13) (Dewaele *et al.*, 2010). Existují i buněčné linie, které jsou deficientní na pro-apoptotické faktory. Jedná se například o myší embryonální fibroblasty nebo buňky nádoru prsu (MCF-7 linie). U těchto buněk nejsou přítomny pro-apoptotické faktory Bax ani Bak, nebo jsou deficientní na kaspázu 3. V těchto případech nastává ozáření fotosensitizeru buněčná smrt nezávisle na kaspázách stimulací procesu autofagie (Obr. 13) (Buytaert *et al.*, 2006; Reiners *et al.*, 2010).



Obr. 13 Indukce autofagie pomocí PDT. V určitých případech vede stimulace autofagie k buněčné ochraně před apoptotickou nebo i autofagickou buněčnou smrtí. Fotosensitizéry: HYP (hypericin), PC4 (silikon ftalocyanin), CPO (methoxyethyl porfycen), TPPS4 (meso-tetrakis(4-sulfonatofenyl) porfyrin) (Dewaele *et al.*, 2010)

Protein Tor (proteinový cíl rapamycinu) má velmi důležitou roli v indukci autofagie (Carrera, 2004). Tor tvoří dva funkčně odlišné proteinové komplexy TORC1 (komplex 1 cíle rapamycinu u savčích buněk) a TORC2 (komplex 2 cíle rapamycinu u savčích buněk) (Loewith *et al.*, 2002). Z těchto dvou komplexů má TORC1 primární roli v regulaci autofagie. Za podmínek bohatých na nutrienty má TORC1 aktivní formu a inhibuje autofagii, kdežto za nedostatku podmínek je tento komplex inhibován, což umožňuje autofagickou aktivitu (Noda a Ohsumi, 1998). Roli zde hraje i Akt–mTOR (Protein kináza B / savčí cíl rapamycinu) dráha, která je zahrnuta v iniciačních fázích makroautofagie a představuje tak regulační a redoxní krok v signalizaci vyvolané ROS po PDT (Azad *et al.*, 2009; Dewaele *et al.*, 2011). Akt je protein kináza, která je stejně jako mTOR (savčí cíl rapamycinu), přímým cílem inhibičních účinků ROS za podmínek oxidativního stresu. (Weyergand *et al.*, 2009). Například po aplikaci PDT s Hypericinem, který se lokalizuje v endoplazmatickém retikulu, došlo k rychlému vypnutí dráhy Akt–mTOR, což ve výsledku vedlo k indukci autofagie (Obr. 10) (Dewaele *et al.*, 2010).

Autofagie má důležitou roli v nádorovém bujení. Množství proteolýzy a autofagické degradace je v nádorových buňkách nižší než v nenádorových (Gunn *et al.*, 1977; Kisen *et al.*, 1993). Ve spojení s autofagií a nádorovým onemocněním

je důležitý BECN1 (Bcl-2 interagující genový produkt) protein, což je savčí homolog Atg6/Vps30 (S autofagií spojený gen 6 / vakuolární třídící protein 30), který se nachází v kvasinkách a je nezbytný pro indukci autofagie za nedostatku dusíku (Liang *et al.*, 1999). U různých typů nádorů, zejména u nádoru prsu, vaječníků či prostaty, se objevuje alelická delece na chromozomu 17q21, kde je lokalizován právě BECN1 (Kondo *et al.*, 2005). Hladiny BECN1 byly značně sníženy ve vzorcích z nádoru prsu ve srovnání se zdravou epiteliální tkání z prsu (Liang *et al.*, 1999), což naznačuje, že snížená exprese BECN1 nejspíše přispívá k vývoji nebo progresi nádoru prsu (Kondo *et al.*, 2005).

Avšak, mnohé studie potvrdily, že autofagická buněčná smrt je aktivována v odpovědi na různé protinádorové terapie (Kondo *et al.*, 2005). Naneštěstí není vždy autofagická odpověď nádorových buněk na terapeutika známkou buněčné smrti. Může se jednat jen o reakci na léčbu, kdy dochází k recyklaci proteinů a buněčných komponent (Ogier-Denis a Codogno, 2003). Proces autofagie totiž může odstraňovat proteiny či organely nádorových buněk, které se poškodily protinádorovou léčbou, nebo může degradací buněčných komponent poskytovat dostatek živin pro rychle se dělící nádorové buňky. Inhibicí autofagie v rámci protinádorové léčby tedy dosáhneme buněčného růstu nebo buněčné smrti, což jen zdůrazňuje důležitost odhalení všech detailů tohoto mechanismu. Pro klinickou onkologii je tedy důležité determinovat typy nádorových onemocnění, u kterých nejčastěji dochází k autofagii v odpovědi na léčbu a zdali je to známka rezistence nebo účinnosti dané léčby (Kondo *et al.*, 2005).

Reaktivní formy kyslíku vznikající během PDT jsou mimo jiné i signální molekuly pro makroautofagii (Azad *et al.*, 2009). Různé ROS generující molekuly nebo signály, které aktivují apoptózu, taktéž podněcují makroautofagii (Chen *et al.*, 2008) či CMA (Kiffin *et al.*, 2004). Funkce makroautofagie v buněčné signalizaci ROS je značně závislá na typu stresového signálu a může být pro buňku ochranná, ale může vést i k apoptóze nebo k autofagické buněčné smrti. Zároveň bylo zjištěno, že PDT stimuluje makroautofagii i CMA a ačkoli jsou tyto dráhy funkčně propojeny tak, že snižují účinky ROS odstraňováním oxidativně poškozených proteinů, CMA je hlavním obranným mechanismem buněk před PDT (Dewaele *et al.*, 2011).

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Materiál

2.1.1 Buněčné linie

- HeLa (buněčná linie lidských epiteliálních buněk z nádoru děložního hrdla)
- NIH3T3 (buněčná nenádorová linie myších fibroblastů)
- G361 (buněčná linie lidského melanomu)

Buněčné linie pro MTT test a ověření produkce reaktivních forem kyslíku či samotného singletního kyslíku bez ozáření i po ozáření byly připraveny do 96 jamkových mikrotitračních desek. Stejným způsobem byly dané buněčné linie připraveny pro pozorování pomocí světelného mikroskopu s fázovým kontrastem. Buňky pro konfokální mikroskopii byly kultivovány na krycím sklíčku v Petriho misce o průměru 33 mm. Buněčné linie byly kultivovány v inkubačním médiu DMEM v inkubátoru při 37 °C a atmosféře 5% CO₂ ve tmě.

2.1.2 Fotosenzitizér

- TMPyP (5, 10, 15, 20–Tetrakis (1–methyl–4–pyridinio) porphyrin tetra (*p*-toluenesulfonát))

V návaznosti na bakalářskou práci byl použit fotosenzitizér TMPyP. Pro ověření produkce ROS a pro MTT test byl TMPyP aplikován v koncentracích 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 a 3,2 μM na buněčné linie HeLa, G361 a NIH3T3. Pro pozorování morfologických buněčných změn po aplikaci jednotlivých složek PDT a následně i jejich kombinace byla použita koncentrace fotosenzitizéru 3,2 μM. Pro určení lokalizace fotosenzitizéru v živých buňkách bez ozáření byla použita koncentrace 9,6 μM, avšak pro určení lokalizace TMPyP po jeho ozáření byla zvolena koncentrace 4,8 μM.

2.1.3 Roztoky a média

- PBS 1× (Phosphate Buffered Saline), pH 7,4
 - 2 g KCl
 - 80 g NaCl
 - 2,4 g KH₂PO₄
 - 14,4 g Na₂HPO₄
 - HCl pro úpravu pH
 - obsah doplněn destilovanou vodou do 1 litru

- DMSO (Dimethyl sulfoxid) 99,97% (Lach–Ner)
- DMEM kultivační médium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
 - práškové DMEM (D 5523–10 L, Sigma)
 - 500 ml 10% fetálního séra (F 7524, Sigma)
 - 100 ml 1% penicilinu/streptomycinu (P 4333, Sigma)
 - 100 ml 1% glutaminu (G 7513, Sigma)

2.1.4 Komerční kity

- CM–H₂DCFDA (2',7'–dichlorodihydrofluorescein diacetát) (C 6827, Invitrogen)
- Hoechst 33258 (94403, Sigma)
- LysoTracker Green DND–26 (L 7526, Life Technologies)
- Mitotracker Green FM (M 7514, Life Technologies)
- MTT (3–(4,5–dimethyl–2–thiazolyl)–2,5–diphenyl2H–tetrazolium bromide) (M 5655, Sigma)
- Singlet Oxygen Sensor Green (S 36002, Life Technologies)
- TmPyP (5, 10, 15, 20–Tetrakis (1–methyl–4–pyridinio) porphyrin tetra (*p*–toluenesulfonát))

2.1.5 Laboratorní pomůcky

- Analytické váhy (Boeco)
- CO₂ inkubátor (BioTek, USA) nastavený na 37 °C a 5% atmosféru CO₂
- Fluorescenční reader Tecan Infinite 2000pro (Tecan Group, Švýcarsko)
- Fluorescenční mikroskop Olympus IX81
- Flow box (Biotech)
- Konfokální laserový skenovací mikroskop Olympus FV3000
- LED diodový zářič s vlnovou délkou 414 nm
- Mikrotitrační desky (TPP Techno Plastic Products AG, Switzerland)
- Multikanálové pipety
- Program Excellence
- Program ImageJ / Fiji
- Program Microsoft Excel
- Program ZEN Blue
- Program 3T3 NRU PT Phototox 2.0 (BfR Berlín)
- Spinning disk konfokální mikroskop Yokogawa CSU–X1

- Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (BioTek, USA)

2.2 Metody

2.2.1 Produkce ROS a MTT test

Při fotodynamické terapii dochází k tvorbě reaktivních forem kyslíku. Pro ověření produkce reaktivních forem kyslíku po ozáření byla použita fluorescenční sonda H₂DCFDA. Tato sonda zejména detekuje hydroxylový a superoxidový radikál a různé peroxidy či hydroperoxidy. Po vstupu do buněk tato nefluorescenční sonda podstupuje oxidaci a deacetylaci prostřednictvím buněčných esteráz a vzniká nerozpustný produkt, který je v přítomnosti ROS oxidován na fluorescenční produkt DCF (2',7' – dichlorofluorescein). DCF je fluorescenční sloučenina, která má excitační spektrum v oblasti 495 nm a emisní spektrum se nachází v oblasti 529 nm.

Prvním krokem pro měření produkce ROS byla aplikace fotosenzitizeru TMPyP v dané koncentraci do jamek mikrotitračních desek pro všechny použité buněčné linie. Po 24hodinové inkubaci byla mikrotitrační deska 2x promyta v PBS a poté následovalo přidání sondy. Do každé jamky mikrotitrační desky pro danou buněčnou linii byla aplikována H₂DCFDA sonda v koncentraci 5 μM a následná inkubace probíhala po dobu 30 minut v inkubátoru při 37 °C a 5% atmosféře CO₂. Ihned po inkubaci byla mikrotitrační deska s danou buněčnou linií ozářena 5 J.cm⁻² po dobu 3 minut a 30 sekund. Pro ozáření byl použit LED diodový zářič, který poskytuje záření o vlnové délce 414 nm při hustotě výkonu 23,8 mW/cm². Intenzita fluorescence může být kvantifikována různými fluorescenčními technikami, jako je například konfokální mikroskopie nebo průtoková cytometrie. Pro tento experiment byla vybrána metoda detekce fluorescence pomocí multidetekčního Synergy HT readeru.

Po změření produkce ROS pomocí Synergy HT readeru následoval MTT test pro určení viability buněk po ozáření ve srovnání s množstvím vzniklých ROS. MTT test funguje jako kolorimetrický test, který je založen na redukci žlutého solubilního MTT roztoku na fialově zbarvené krystaly formazanu, které jsou nerozpustné. Tyto fialové krystalky lze rozpustit přidáním silného detergentu, například DMSO. Vznikne tedy fialové zbarvení, jehož intenzita je úměrná množství živých buněk. Tato reakce probíhá na mitochondriální membráně živých buněk, a proto lze tento experiment využít pro porovnání viability buněk a množství ROS bez ozáření i po ozáření. Pro tento experiment byla mikrotitrační deska s danou buněčnou linií promyta v PBS za účelem odstranění H₂DCFDA sondy a bylo přidáno 100 μl DMEM kultivačního média, následně

proběhla 24hodinová inkubace v inkubátoru při 37 °C a 5% atmosféře CO₂. Poté bylo odstraněno DMEM kultivační médium a mikrotitrační deska byla promyta v PBS. Následně byla přidána MTT sonda v koncentraci 1,2 mM. Inkubace s MTT sondou probíhala po dobu 4 hodin v inkubátoru při 37 °C a 5% atmosféře CO₂. Po skončení inkubace byla sonda odstraněna a bylo přidáno 100 µl DMSO. Stanovení viability buněk bylo provedeno při 570 nm (vlnová délka absorbance formazanu) a 690 nm (referenční vlnová délka pro korekci optických jevů mikrotitrační desky) pomocí multidetekčního Synergy HT readeru.

Naměřené hodnoty z MTT testu byly následně zpracovány v programu Microsoft Excel, kde byly vytvořeny grafy závislosti viability buněk na koncentraci fotosenzitizéru bez ozáření i po ozáření. Ve stejném programu byly do grafů zpracovány i naměřené hodnoty produkce ROS. Výsledky pro každou buněčnou linii byly vyvozeny ze tří na sobě nezávislých opakování.

2.2.2 Určení hodnoty IC₅₀

Hodnota IC₅₀ slouží jako kvantitativní parametr představující inhibiční koncentraci látky, která je potřebná pro snížení buněčné životnosti na 50 %. Slouží k určení efektivity dané látky na inhibici specifického biologického procesu nebo biochemické funkce. Tato hodnota pro buněčné linie HeLa, NIH3T3 a G361 byla zjištěna pomocí programu Phototox 2.0 z dat naměřených po provedení MTT testu na buněčných liniích po ozáření. Data byla získána zprůměrováním ze tří na sobě nezávislých experimentů.

2.2.3 Produkce singletního kyslíku

Při PDT vzniká singletní kyslík druhým typem fotochemické reakce a výrazně se podílí na buněčné smrti nežádoucích buněk. Pro měření produkce singletního kyslíku bez ozáření i po ozáření jednotlivých buněčných linií byla použita SOSG sonda, která je vysoce specifická právě pro singletní kyslík. Tato sonda vykazuje v nepřítomnosti singletního kyslíku slabou fluorescenci v modré oblasti viditelného spektra, avšak v přítomnosti singletního kyslíku dochází k posunu do zelené oblasti (excitace/emise ~504/525 nm).

Prvním krokem pro tento experiment byla aplikace fotosenzitizéru TMPyP v daných koncentracích a následná 24hodinová inkubace v inkubátoru při 37 °C a 5% atmosféře CO₂. Po skončení inkubace byly buňky promyty v PBS pro odstranění přebytečného fotosenzitizéru a následně byla aplikována SOSG sonda v koncentraci 2 µM. Buňky byly se sondou inkubovány 20 minut v inkubátoru při 37 °C a 5% atmosféře

CO₂. Ihned po inkubaci byly buňky ozářeny 5 J.cm⁻² po dobu 3 minut a 30 sekund a následně byla změřena produkce singletního kyslíku pomocí fluorescenčního readeru Tecan Infinite 2000pro.

Získaná data byla poté zpracována do grafů v programu Microsoft Excel. Výsledky byly vyvozeny ze tří na sobě nezávislých opakování.

2.2.4 Mikroskopie s fázovým kontrastem

Pro pozorování morfologických změn buněk v závislosti na tom, zda byly buňky ozářeny nebo neozářeny s přítomností fotosenzitizeru či nikoli, byl použit mikroskop Olympus IX81 s fázovým kontrastem s daným nastavením (Tab. 1). Tento typ mikroskopie detekuje amplitudové i fázové změny. Amplitudové objekty jsou ty, které pohlcením procházejícího světla mění amplitudu elektromagnetického vlnění. Změna amplitudy je okem vnímána jako změna v intenzitě světla. Většina světelných mikroskopů využívá pozorování právě těchto objektů. Mezi fázové objekty patří transparentní biologické vzorky, které místo absorpce způsobují difrakci světla, a tedy i změnu fáze paprsků světla, které vzorkem prochází. Nicméně, tyto fázové změny není lidské oko schopno rozeznat, proto se využívají objektivy s fázovým kontrastem, kde je možné převést fázové změny na amplitudové, tedy lidským okem pozorovatelné (Murphy D., 2001). Pro tento typ mikroskopie byl fotosenzitizer do buněk aplikován v koncentraci 3,2 μM. U všech tří buněčných linií byly nejprve pořízeny snímky buněk bez fotosenzitizeru a bez ozáření. Poté byly získány snímky, kde byly buňky ozářeny 5 J.cm⁻² LED diodovým zářičem po dobu 3 minut a 30 sekund, ale nebyl aplikován fotosenzitizer TMPyP. Taktéž byly snímány buňky, kde byl aplikován fotosenzitizer TMPyP, ale po jeho 24hodinové inkubaci v inkubátoru při 37 °C a 5% atmosféře CO₂ nedošlo k ozáření. Nakonec byly vyfoceny buňky, u kterých proběhla aplikace PDT, tedy byl aplikován fotosenzitizer TMPyP, který byl po 24hodinové inkubaci v inkubátoru při 37 °C a 5% atmosféře CO₂ ozářen 5 J.cm⁻² LED diodovým zářičem po dobu 3 minut a 30 sekund. V tomto případě byly snímky získány dvě hodiny po ozáření.

Mikroskopem Olympus IX81 byly také získány snímky negativních kontrol buněčných linií pro studium lokalizace fotosenzitizeru.

Olympus IX81 s fázovým kontrastem	
Objektiv	LUCPLFLN 40×, 20×
Celkové zvětšení mikroskopu	400×, 200×
NA	0.6
Skenovací mód	XY

Tab. 1 Nastavení mikroskopu s fázovým kontrastem

2.2.5 Konfokální mikroskopie

Pro zobrazení buněk pomocí konfokální mikroskopie byl využit konfokální laserový skenovací mikroskop Olympus FV3000 a Spinning disk konfokální mikroskop Yokogawa CSU-X1. Tento experiment byl zejména zaměřen na intracelulární lokalizaci fotosensitizeru TMPyP v živých buňkách bez ozáření i po ozáření se zaměřením na jádro, lysozomy a mitochondrie.

Snímky ze Spinning disk konfokálního mikroskopu Yokogawa CSU-X1 a z konfokálního laserového skenovacího mikroskopu Olympus FV3000 byly pořízeny s daným nastavením (Tab. 2).

Princip konfokálního laserového skenovacího mikroskopu (CLSM) je založen na úzkém paprsku laseru, který prochází první konfokální clonou na dichroické zrcadlo, které tento paprsek objektivem zaměří na určitý bod preparátu, který je umístěn v ohniskové rovině. Světlo, které je emitované, prochází objektivem, dichroickým

Spinning disk konfokální mikroskop Yokogawa CSU-X1	
Objektiv	Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil M27
celkové zvětšení mikroskopu	630×
NA	1.4
Světelný zdroj	Halogenová lampa (mód pro procházející světlo), AOTF1.LaserLine1 pro Hoechst (404–406 nm), AOTF1.LaserLine2 pro TMPyP (560–562 nm), AOTF1.LaserLine3 pro MitoTracker/LysoTracker (487–489 nm) (fluorescenční mód)
Intenzita světelného zdroje	50 %
velikost pinhole	50 μm
Skenovací mód	Z rovina
Nekonfokální snímky	DIC
Konfokální laserový skenovací mikroskop Olympus FV3000	
Objektiv	UPLXAPO 40x suchý
Celkové zvětšení mikroskopu	400×
NA	0.95
Světelný zdroj	Excitační laser 1 pro Hoechst (405 nm), 2 pro MitoTracker/LysoTracker (488 nm), 3 pro TMPyP (445 nm)
Intenzita světelného zdroje	100 %
Skenovací mód	XY
Nekonfokální snímky	DIC

Tab. 2 Nastavení konfokálních mikroskopů

zrcadlem, bariérovým filtrem a druhou konfokální clonou, která odfiltruje světlo pocházející z oblasti mimo ohniskovou rovinu. Takto upravené emitované světlo pak dopadá před fotonásobič. Obraz není tvořen najednou, ale bod po bodu. Snímají se jednotlivé optické body v rovině XY, ale také jednotlivé optické řezy z osy Z. Omezením CLSM je nízká rychlost snímání preparátu. Tento typ mikroskopie tedy není vhodný pro studium procesů v živých buňkách, které se odehrávají v řádu milisekund (Ockleford, 1995; Sedlářová, 2010)

Spinning disk konfokální laserová mikroskopie je modifikací klasické konfokální mikroskopie, kdy se využívá systému clon, které jsou spirálovitě seskládané v rotujícím disku, který je známý také jako Nipkowův kotouč. Jako zdroj světla se zde používá laser, který je z tenkého paprsku rozprostřen na celou délku Nipkowového kotouče. Místo skenování jednoho bodu v čase, jako je tomu u CLSM, zde dochází ke skenování téměř tisíc bodů v čase. U klasické spinning disk mikroskopie se nachází tyto kotouče dva, přičemž první z nich slouží jako kolekce malých mikročoček, které koncentrují světlo do druhého kotouče. Tímto se výrazně zvyšuje poměr signálu a šumu, a dochází tak k odstranění nespecifického signálu. Tato metoda je ideální pro procesy, které probíhají v buňkách rychle. Je zde sice velmi vysoká frekvence osvětlení, ale reálně dostává každý bod mnohonásobně méně intenzity světla, čímž odpadá problém fototoxicity a fotovypalování buněk (Ockleford, 1995).

Pro nekonfokální pozorování byla použita mikroskopie s diferenčním interferenčním kontrastem (DIC), taktéž známá jako Normanského interferenční kontrast, kdy se zvětšený obraz vzorku jeví jako osvětlený trojrozměrný objekt. Jedná se o mikroskopickou techniku, která se používá ke zvýraznění kontrastu nebarvených vzorků. Nepolarizované světlo vstoupí do mikroskopu, kde je polarizováno polarizátorem. Následně projde Wollastonovým hranolem, kde je rozděleno na dvě složky, které pak procházejí přes kondenzor, který oba paprsky zacílí na preparát a následně na objektiv. Preparát je tak ozařován dvěma koherentními paprsky, přičemž jeden má 0° polarizaci a druhý 90° . Proměnlivá tloušťka preparátu způsobí posun ve fázi jednoho paprsku oproti druhému, vzniknou tak dva stejné obrazy objektu, které jsou vůči sobě fázově posunuty. Následně prochází oba paprsky druhým Wollastonovým hranolem, kde dochází k jejich rekombinaci do jednoho polarizovaného paprsku a ke srovnání fázových rozdílů v celé ploše obrazu, což vede k interferenci. Následně se určitá místa snímku jeví jako světlé, respektive tmavé, v závislosti na odlišné optické dráze (Murphy D., 2001)

Prvním krokem byla aplikace fotosenzitizéru TMPyP s koncentrací 9,6 μM . Fotosenzitizér TMPyP je excitován v oblasti 420 nm a jeho maximální emisní pík je 650 nm, detekujeme tedy červenou fluorescenci. Po aplikaci fotosenzitizéru na danou buněčnou linii následovala 24hodinová inkubace v inkubátoru při 37 °C a 5% atmosféře CO₂. Následovalo promytí v PBS a ozáření LED diodovým zářičem po dobu 3 minut a 30 sekund s hustotou energie 5 J.cm⁻². V případě experimentu bez ozáření byl tento krok vynechán a buňky byly pouze promyty v PBS. Následně byly buňky připravené na barvení. Na vizualizaci buněčných jader, respektive nukleové kyseliny, bylo použito Hoechstovo barvivo 33258 s koncentrací 9,3 μM . Excitace/emise barviva Hoechst 33258 je v oblasti ~377/451 nm. Pro barvení mitochondrií bylo zvoleno barvivo MitoTracker Green FM s koncentrací 200 nM. MitoTracker Green FM je zelené fluorescenční barvivo, které pasivně difunduje přes plazmatickou membránu a je specifické na mitochondrie živých buněk nezávisle na membránovém potenciálu. Excitační/emisní spektrum je ~490/516 nm. Na barvení lysozomů bylo použito barvivo LysoTracker Green DND-26 s koncentrací 75 nM. LysoTracker Green DND-26 je zelené fluorescenční barvivo, kterým lze obarvit kyselé buněčné kompartmenty v živých buňkách. Excitační/emisní spektrum tohoto barviva je ~504/511 nm. Protože LysoTracker Green DND-26 i MitoTracker Green FM poskytují emisi ve stejné oblasti spektra a nebylo by možné je od sebe rozlišit, bylo nutné tyto dvě barviva od sebe fyzicky oddělit ve dvou separátních experimentech.

Inkubace s barvivy v inkubátoru nastaveném na 37 °C a 5 % CO₂ trvala 20 minut a poté bylo barvivo několikrát promyto v PBS. Následně byly připraveny preparáty pro pozorování konfokálním mikroskopem. Snímky buněk, u kterých byla aplikována PDT, tedy byl přidán fotosenzitizér a následně ozářen, byly získány již hodinu po ozáření. V případě kontrol byla přidána jednotlivá barviva k buňkách, do kterých nebyl aplikován fotosenzitizér a nebyly ozářeny, případně k buňkách, do kterých taktéž nebyl aplikován fotosenzitizér, ale byly ozářeny.

2.2.6 Kolokalizace

Kolokalizace znamená vzájemný výskyt dvou signálů na dvou snímcích. V případě této diplomové práce se jedná zejména o kolokalizaci fotosenzitizéru TMPyP s buněčnými jádry, lysozomy či mitochondriemi. Pro určení kolokalizace byl zvolen program Fiji s pluginem Colocalization Threshold. Prvním krokem pro správnou kolokalizaci je vymezení pixelů, které představují důležitá data. Nedůležité pixely tak mohou být

ignorovány, což zrychlí celý proces kolokalizace. Jednoduchý způsob, jak odlišit důležité pixely od těch nedůležitých, je určení prahu. Všechny pixely pod hladinou tohoto prahu jsou pak považovány za pozadí, zatímco pixely nad hladinou prahu jsou použity pro kolokalizační analýzu. V pluginu Colocalization Threshold je prah určen automaticky na principu podle Costes *et al.* (2004). Touto metodou jsou determinovány dva prahy pro dva kanály tečkového diagramu, pro které platí, že Pearsonův korelační koeficient pro pixely pod hodnotou těchto prahů je 0. Zároveň korelace všech pixelů, jejichž intenzity jsou nad hodnotou těchto prahů, je vyšší než 0. Prahová hodnota je tedy úroveň intenzity, nad kterou jsou oba kanály kolokalizované (ImageJ, 2020).

Stupeň kolokalizace na snímku lze vyjádřit hodnotou koeficientu. Mezi nejvýznamnější koeficienty patří Pearsonův korelační koeficient a Mandersonovy koeficienty. Hodnota Pearsonového koeficientu se pohybuje od +1 (vysoký stupeň korelace), přes 0 (žádné korelace) až po -1 (anti-korelace). Šum z pozadí snímku způsobuje snížení hodnoty směrem k nule (Klouček, 2007).

Mandersonovy koeficienty byly popsány v práci Manders *et al.* (1993). Jejich hodnota se nachází v rozsahu od 0 do 1. Hlavní rozdíl od Pearsonova koeficientu je, že tyto koeficienty vyjadřují míru kolokalizace zvláště pro oba snímky. Jejich použití je vhodné zejména tehdy, kdy se výrazně liší počet objektů v daných snímcích. Mandersonovy koeficienty byly definovány takto: M_1 procent objektů z prvního snímku kolokalizuje s objekty v druhém snímku, a naopak M_2 procent objektů z druhého snímku kolokalizuje s objekty z prvního snímku. V této práci jsou pro určení kolokalizace taktéž použity modifikované Mandersonov koeficienty, a to tM_1 (hodnoty nad prahem pro kanál s fotosenzitizérem) a tM_2 (hodnoty nad prahem pro kanál s mitochondriemi/lysozomy), u kterých byla vypočtena hodnota s použitím nastavených prahů (Klouček, 2007).

Mimo koeficienty je kolokalizace vyjádřena i snímkem, ve kterém je zobrazena mapa pixelů, která vypovídá o četnosti pixelů v původních snímcích. Dále je míra kolokalizace vyjádřena i tečkovým diagramem, který je proložen přímkou lineární regrese (Klouček, 2007). Tato přímka představuje závislost y osy (kanál pro mitochondrie/lysozomy) na x ose (kanál pro fotosenzitizér) a slouží tak k určení hodnoty prahu v druhém kanálu, která je pak použita pro určení přibližné hodnoty prahu v prvním kanálu. Přímka lineární regrese může být pozitivní (hodnota osy x se zvyšuje zároveň s hodnotou osy y, respektive hodnota osy x se snižuje zároveň s hodnotou osy y) i negativní (hodnota osy x se zvyšuje a zároveň hodnota osy y se snižuje, respektive hodnota osy x se snižuje a zároveň hodnota osy y se zvyšuje). Tato

kolokalizační analýza prostřednictvím tečkového diagramu je provedena na bázi pixelů, kde je každý pixel vynesena do diagramu na základě jeho intenzity v každém kanálu. Tečkový diagram je rozdělen do čtyř pomyslných kvadrantů. Kvadrant, který je umístěn vlevo dole, představuje pixely s nízkou intenzitou v obou kanálech. Jsou zde zahrnuty pixely pod hodnotou prahu pro oba kanály. Tyto pixely jsou považovány jako pozadí a neberou se do úvahy v kolokalizační analýze. Kvadrant vpravo dole znázorňuje pixely s nízkou intenzitou v kanálu na y ose (mitochondrie/lysozomy) a zároveň pixely s vysokou intenzitou v kanálu na x ose (kanál pro fotosenzitizér). Jsou zde tedy zahrnuty pixely nad hodnotou prahu kanálu pro fotosenzitizér a zároveň pixely pod hodnotou prahu kanálu pro mitochondrie/lysozomy. Kvadrant vlevo nahoře reprezentuje pixely s nízkou intenzitou v kanálu na x ose (kanál pro fotosenzitizér), tedy pixely pod hodnotou prahu, a zároveň pixely s vysokou intenzitou v kanálu na y ose (mitochondrie/lysozomy), tedy pixely nad hodnotou prahu. Kvadrant vpravo nahoře představuje pixely s vysokou intenzitou v obou kanálech, tedy pixely, které kolokalizují a jsou nad hodnotou prahu v obou kanálech. Podle bodů, které se v tečkovém diagramu nacházejí, lze kvantitativně hodnotit i těsnost (sílu) vzájemné závislosti obou os. Tato síla je určena podle toho, v jaké blízkosti přímky lineární regrese se body nacházejí. Pokud je tato přímka přesně obklopena body, jedná se o perfektní závislost. Pokud je přímka lineární regrese těsně obklopena body, jedná se o silnou závislost. Jsou-li body v okolí přímky lineární regrese spíše volněji, jedná se o mírnou závislost. Body, které nenásledují směr přímky lineární regrese značí slabou závislost. Pokud se v tečkovém diagramu objevují body naprosto náhodně a nenásledují v žádném případě přímku lineární regrese, není mezi body osy y a x žádná závislost.

3 VÝSLEDKY

Výsledky pro ROS, MTT, IC₅₀ a singletní kyslík byly vyvozeny ze tří stejných a na sobě nezávislých experimentů, které probíhaly při stejných podmínkách.

Experimentální část této diplomové práce je rozdělena do několika bloků. V prvním z nich byla měřena produkce ROS na daných buněčných liniích bez ozáření i po ozáření. Po změření produkce ROS byl ve stejném experimentu proveden i MTT test. Z MTT testu byla taktéž byla zjištěna hodnota IC₅₀ pro všechny tři buněčné linie. V návaznosti na měření produkce ROS bylo také provedeno měření produkce singletního kyslíku po ozáření.

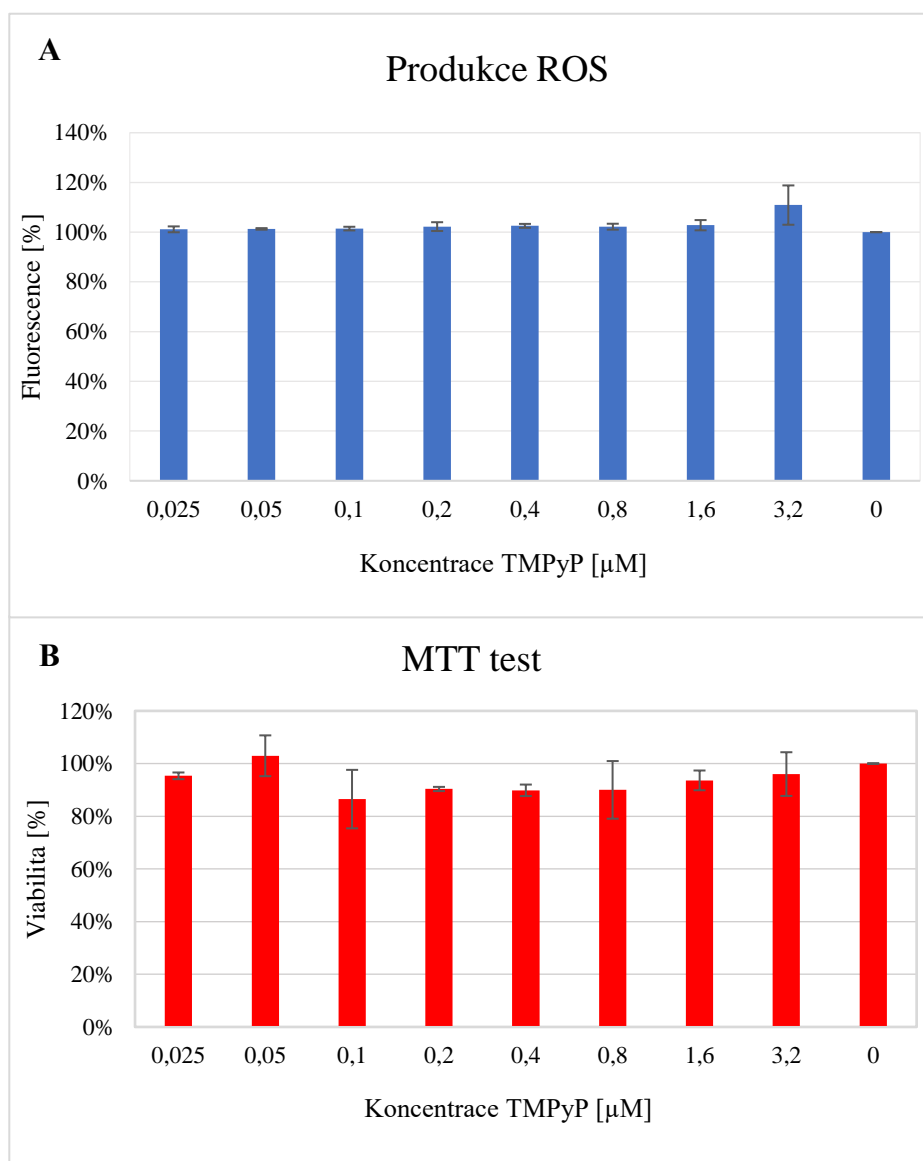
Druhý blok je zaměřen na mikroskopii. Pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem byly zobrazeny buňky, na které byly aplikovány jednotlivé kroky PDT zvlášť a poté dohromady. S využitím konfokální mikroskopie byla určena lokalizace fotosensitizeru TMPyP se zaměřením na mitochondrie, lysozomy a jádro, a to bez ozáření i po ozáření. K potvrzení lokalizace byla taktéž provedena kolokalizační analýza.

3.1 Měření produkce ROS a MTT test

Aplikace PDT vyžaduje přítomnost tří složek, a to kyslíku, fotodynamicky aktivní látky a ozáření příslušnou vlnovou délkou, která je shodná s absorpčním maximem konkrétního fotosensitizeru. Pro měření produkce ROS bez ozáření bylo nutné provést experiment, kde byl krok ozáření vynechán. Pro experiment s ozářením musely být přítomny všechny tři složky PDT.

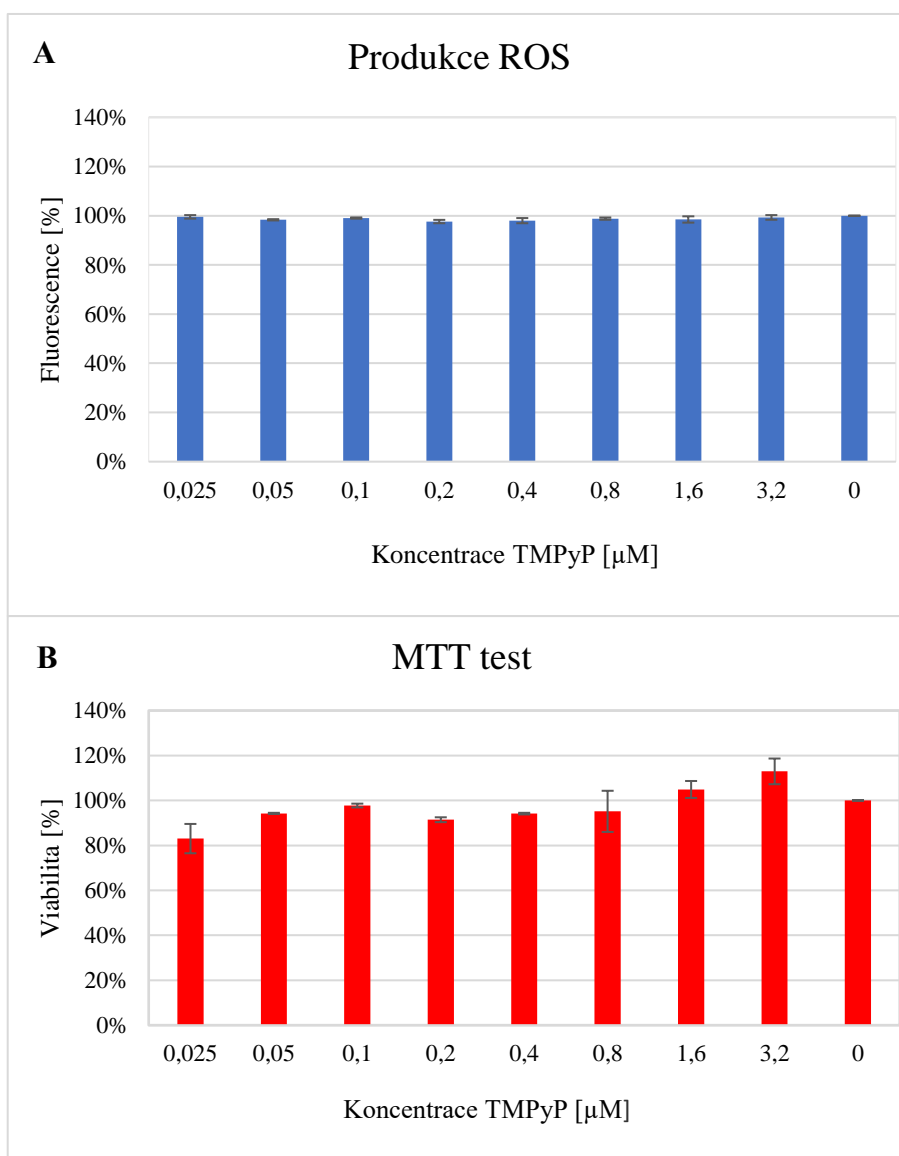
3.1.1 Bez ozáření

Výsledky z experimentu bez ozáření naznačují, že samotný fotosensitizer a kyslík nezapříčiní usmrcení buněk. Produkce ROS u HeLa buněčné linie je neměnná u všech použitých koncentrací (Obr. 14 A). Jisté množství ROS je přirozeně přítomné v buňkách a jeho množství se nemění v závislosti na koncentraci fotosensitizeru. Z MTT testu pro HeLa buněčnou linii lze vyčíst, že v daném experimentu bez ozáření nebyla nijak výrazně snížena viabilita buněk v závislosti na koncentraci použitého fotosensitizeru (Obr. 14 B). Mírné odchylky v produkci ROS či ve viabilitě buněk lze přisuzovat manipulaci s buňkami.



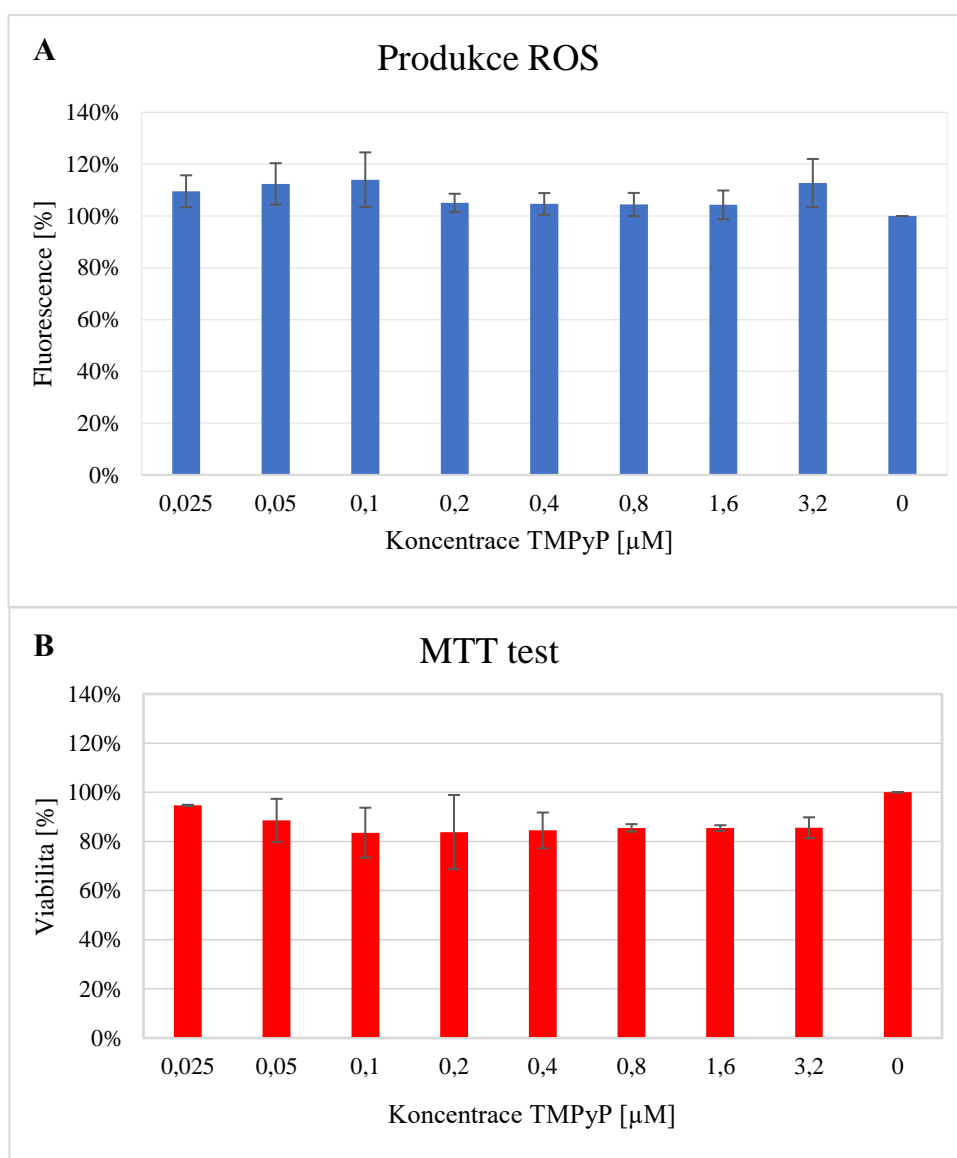
Obr. 14 Produkce ROS a MTT test na buněčné linii HeLa bez ozáření

U G361 buněčné linie lze pozorovat stejný trend jako u linie HeLa. Samotný fotosensitizer TMPyP nezpůsobil nárůst ROS při žádné z použitých koncentrací (Obr. 15 A). MTT testem bylo zjištěno, že viabilita buněk je v určitých případech mírně snížena nezávisle na koncentraci fotosensitizeru (Obr. 15 B). Stejně jako v předchozím případě, tuto ztrátu na viabilitě buněk přisuzují faktorům jako je manipulace s buněčnou linií a nestálé teplotě, které byly buněčné linie vystaveny během samotné aplikace fotosensitizeru.



Obr. 15 Produkce ROS a MTT test na buněčné linii G361 bez ozáření

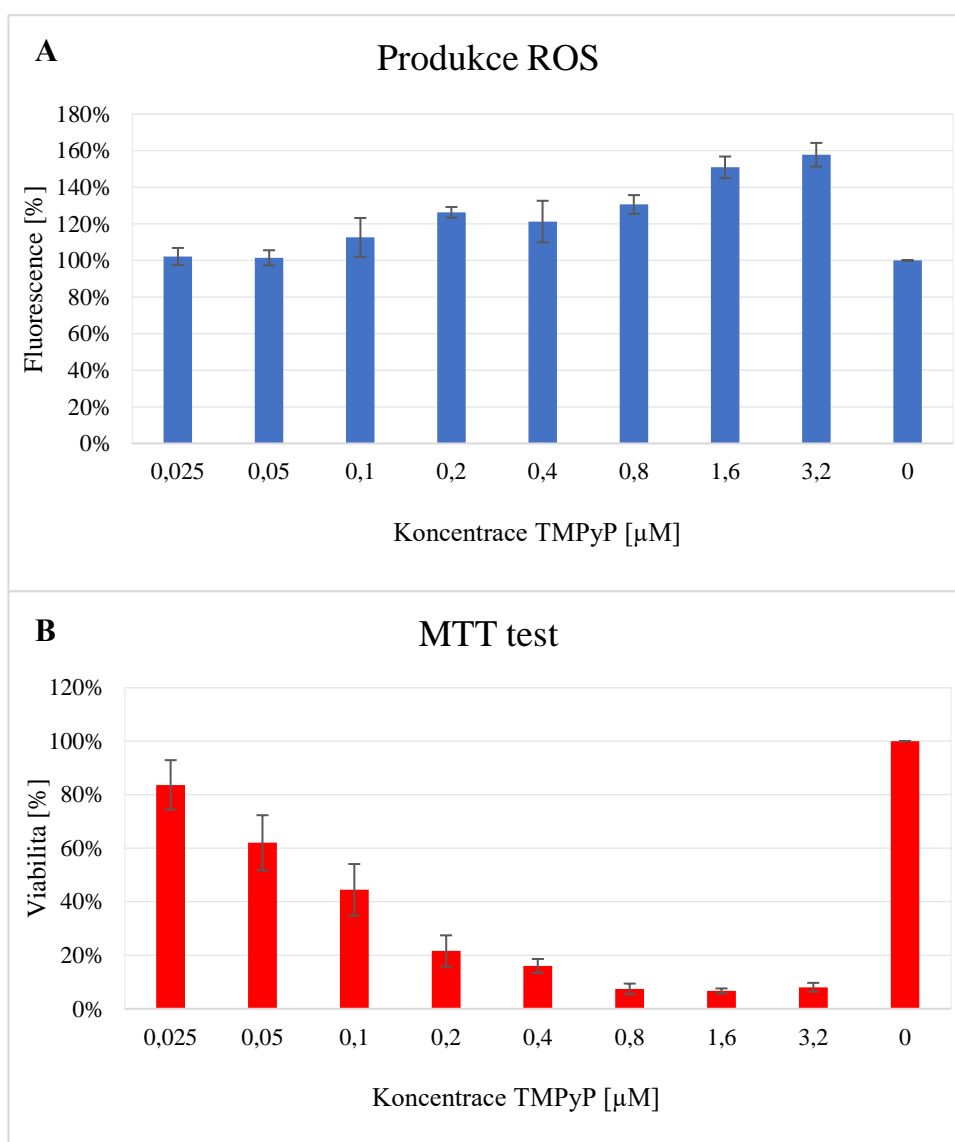
Chování nenádorové linie NIH3T3 na přítomnost fotosensitizeru bez ozáření není nijak významně odlišné od nádorových linií. Co se týče produkce ROS, u všech použitých koncentrací bylo zaznamenáno minimální zvýšení hladin (Obr. 16 A). Výsledky z MTT testu naznačují, že nedošlo k výraznému snížení viability buněk (Obr. 16 B).



Obr. 16 Produkce ROS a MTT test na buněčné linii NIH3T3 bez ozáření

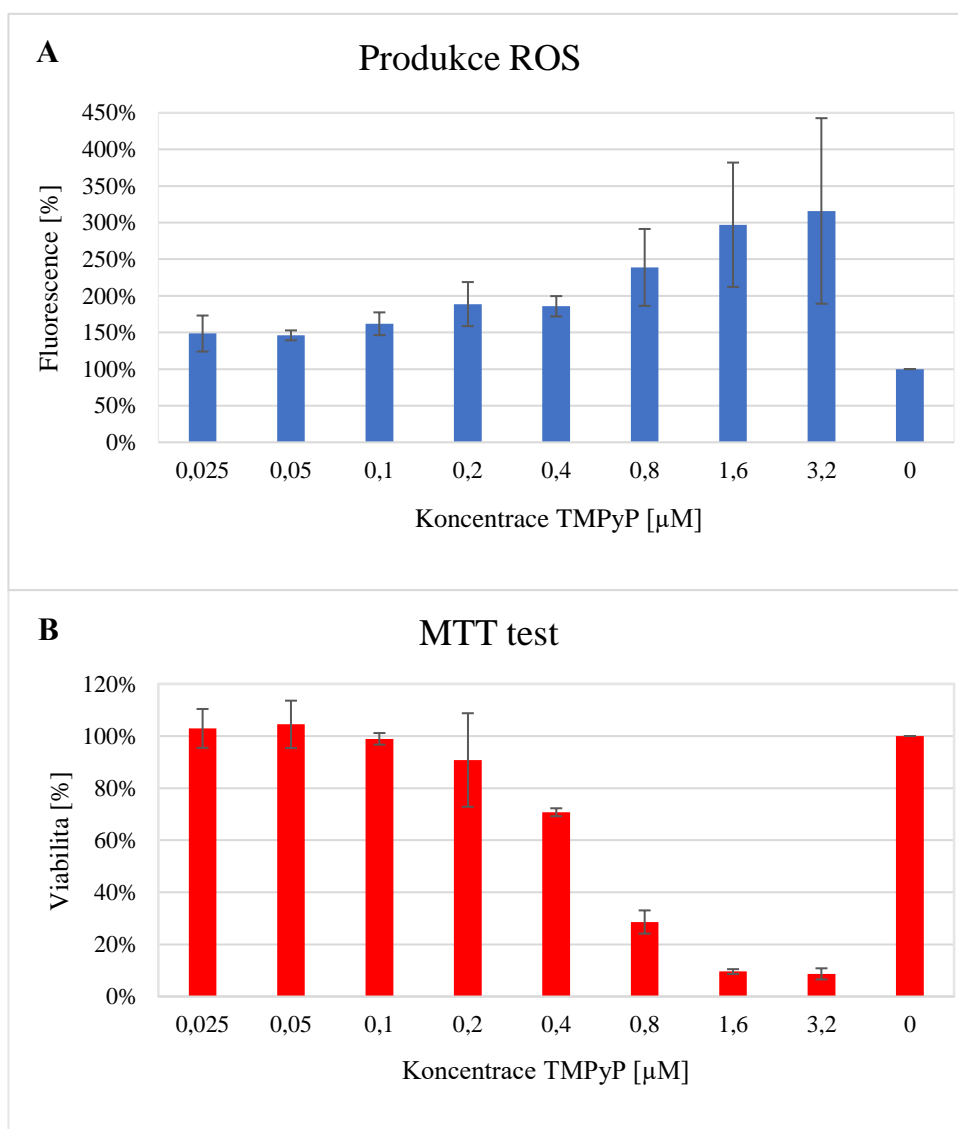
3.1.2 Po ozáření

Po akumulaci fotosenzitizeru v daných koncentracích, který je následně ozářen $5 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ po dobu 3 minut a 30 sekund, dochází u buněčné linie HeLa k nárůstu ROS v závislosti na koncentraci (Obr. 17 A). Z MTT testu vyplývá, že viabilita buněk je také snížena v závislosti na použité koncentraci fotosenzitizeru TMPyP (Obr. 17 B). Snižující se viabilita buněk v případě linie HeLa tedy koreluje se zvyšující se produkcí ROS v závislosti na koncentraci.



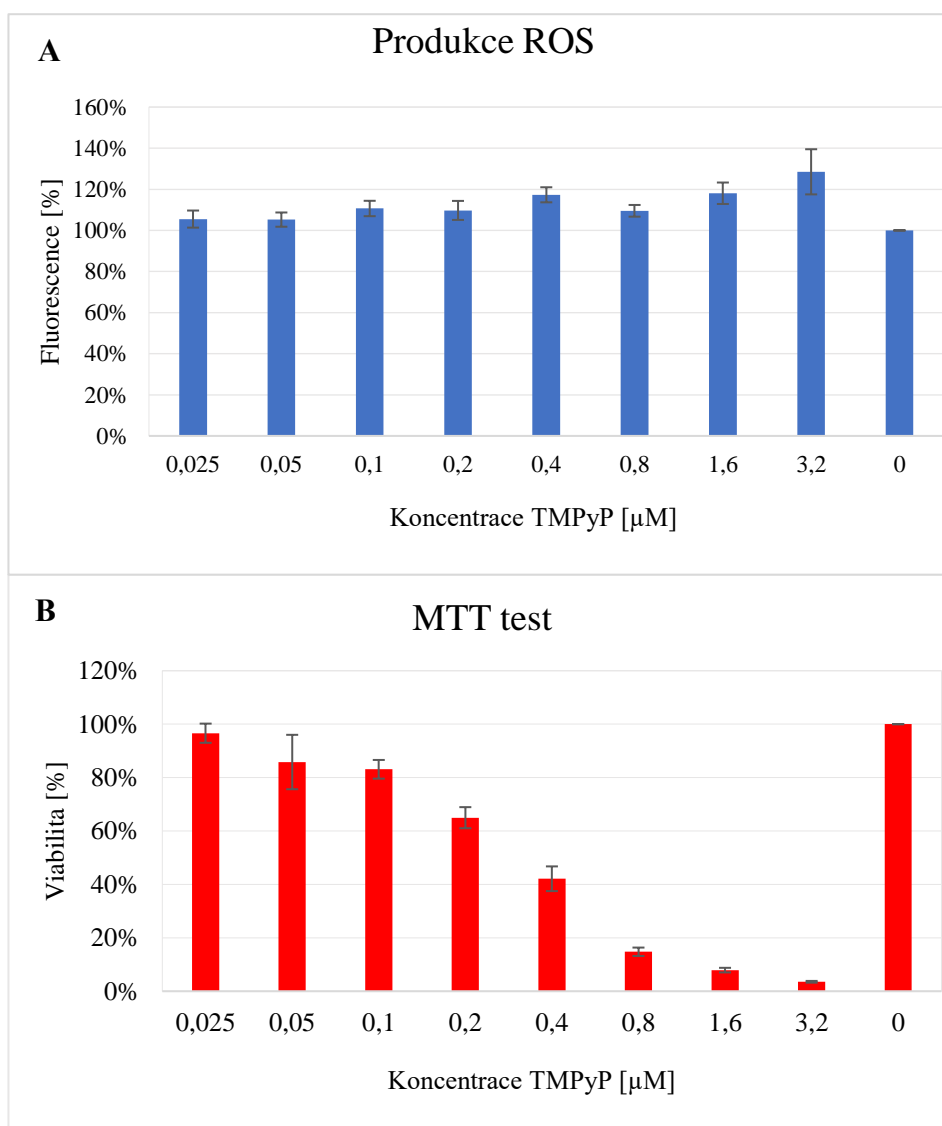
Obr. 17 Produkce ROS a MTT test na buněčné linii HeLa po ozáření

Po ozáření buněk linie G361 byla zaznamenána zvýšená produkce ROS v závislosti na koncentraci fotosensitizeru (Obr. 18 A). Testem viability bylo zjištěno výrazné snížení životnosti buněk zejména v případě použití vysokých koncentrací (0,8 μM až 3,2 μM), kdežto viabilita HeLa linie byla markantně snížena již při použití koncentrace 0,2 μM (Obr. 17 B, 18 B).



Obr. 18 Produkce ROS a MTT test na buněčné linii G361 po ozáření

Nenádorová buněčná linie NIH3T3 vykazuje po ozáření jen mírné zvýšení produkce ROS (Obr. 19 A). Nicméně i v tomto případě je zde pozorován trend růstu produkce ROS v závislosti na koncentraci. MTT test prokázal snížení viability buněk této nenádorové linie vzhledem na zvyšující se koncentraci fotosensitizeru. Výrazné snížení viability buněk bylo pozorováno zejména při použití vysokých koncentrací fotosensitizeru (0,4 μ M až 3,2 μ M) (Obr. 19 B).



Obr. 19 Produkce ROS a MTT test na buněčné linii NIH3T3 po ozáření

3.2 Hodnota IC₅₀

Z naměřených hodnot MTT testu po ozáření byly pro všechny buněčné linie vypočteny hodnoty IC₅₀ (Tab. 3). Tato hodnota byla získána pro všechny tři testované buněčné linie zprůměrováním tří na sobě nezávislých měření po ozáření.

Pro buněčnou linii HeLa je tato hodnota 0,09 μM s odchylkou ±0,03. Při použití této koncentrace tedy dojde k 50% usmrcení buněk této nádorové buněčné linie. Při použití blízké koncentrace k IC₅₀ pro buněčnou linii HeLa došlo pouze k minimálnímu nárůstu ROS, zatímco viabilita buněk byla snížena o 50 % (Obr. 17 A, B). Hodnota IC₅₀ pro buněčnou linii G361 je 0,54 μM s odchylkou ±0,07. V porovnání s buněčnou linií HeLa je pro tuto linii potřeba až 6krát vyšší koncentrace fotosensitizeru TMPyP pro snížení viability buněk na 50 %. V tomto případě byla naměřena vyšší hladina ROS než v případě IC₅₀ u linie HeLa (Obr. 18 A). Pro buněčnou nenádorovou linii NIH3T3 je hodnota IC₅₀ v oblasti 0,31 μM s odchylkou ±0,01. Podobně jako u linie HeLa byla v případě koncentrace IC₅₀ zjištěna mírně zvýšená hladina ROS (Obr. 19 A) s 50% snížením buněčné viability.

Buněčná linie	IC ₅₀ [μM] TMPyP
HeLa	0,09±0,03
G361	0,54±0,07
NIH3T3	0,31±0,01

Tab. 3 Hodnoty IC₅₀ pro jednotlivé nádorové linie a nenádorovou linii při 5 J.cm⁻² TMPyP

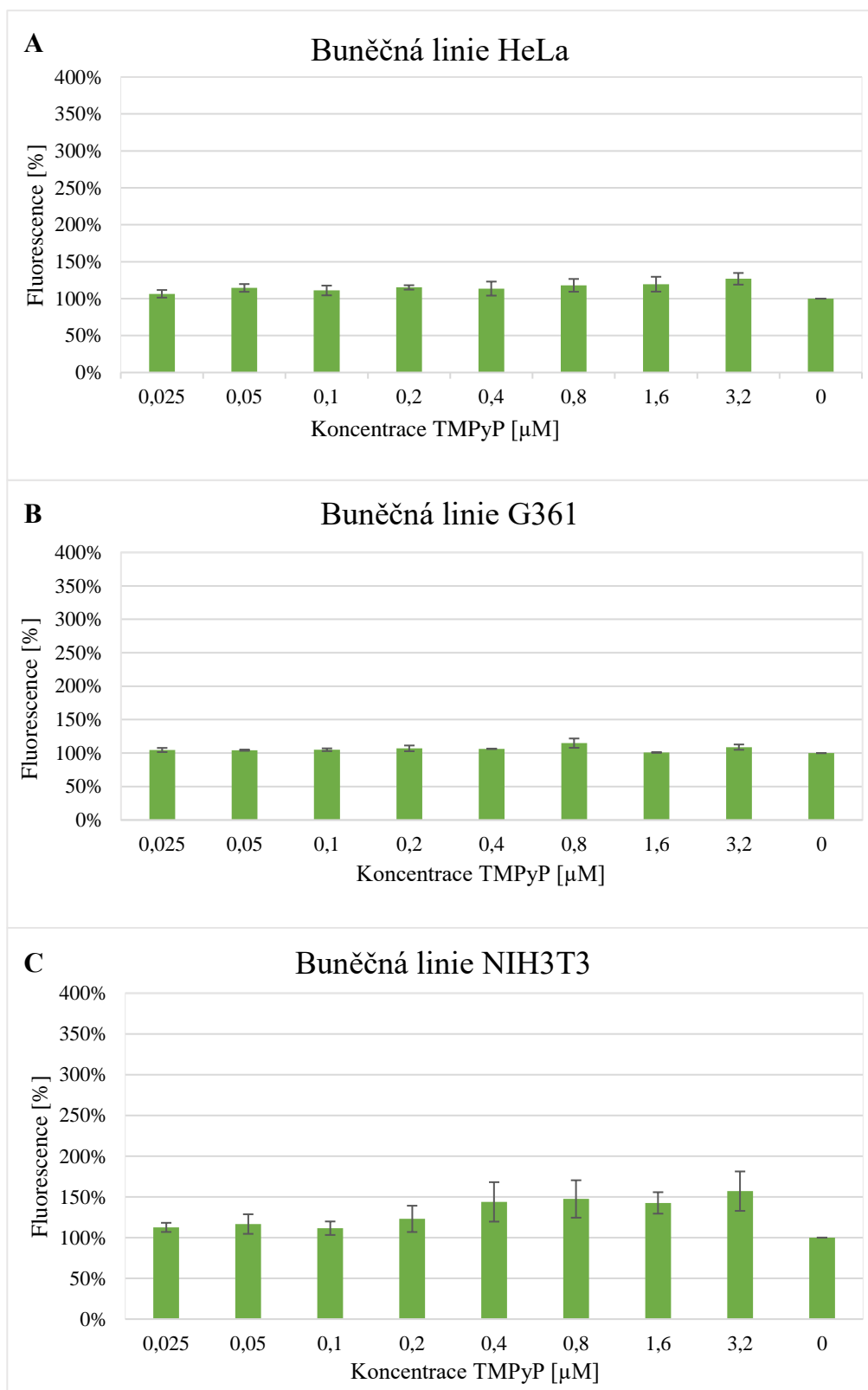
3.3 Měření produkce singletního kyslíku

Pro měření produkce singletního kyslíku byly použity stejné podmínky jako pro měření produkce ROS. V případě experimentu bez ozáření byl pouze aplikován fotosensitizer v dané koncentraci a následující krok ozáření byl vynechán.

V případě experimentu bez ozáření byl u nádorové buněčné linie HeLa pozorován pouze mírný nárůst singletního kyslíku, který se zvyšoval zároveň se zvyšující se koncentrací fotosensitizeru (Obr. 20 A). U G361 nádorové linie nebyl zaznamenán téměř žádný nárůst singletního kyslíku (Obr. 20 B). Z grafu pro nenádorovou linii NIH3T3 můžeme pozorovat určitý nárůst hladin singletního kyslíku zejména v případě vyšších koncentrací (Obr. 20 C). V případě hodnot IC_{50} pro jednotlivé linie bylo naměřeno pouze minimální zvýšení hladiny singletního kyslíku. Z těchto výsledků vyplývá, že hladiny singletního kyslíku v buňkách testovaných buněčných linií mohou být mírně zvýšeny v reakci na přítomnost samotného fotosensitizeru, aniž by došlo k jeho ozáření.

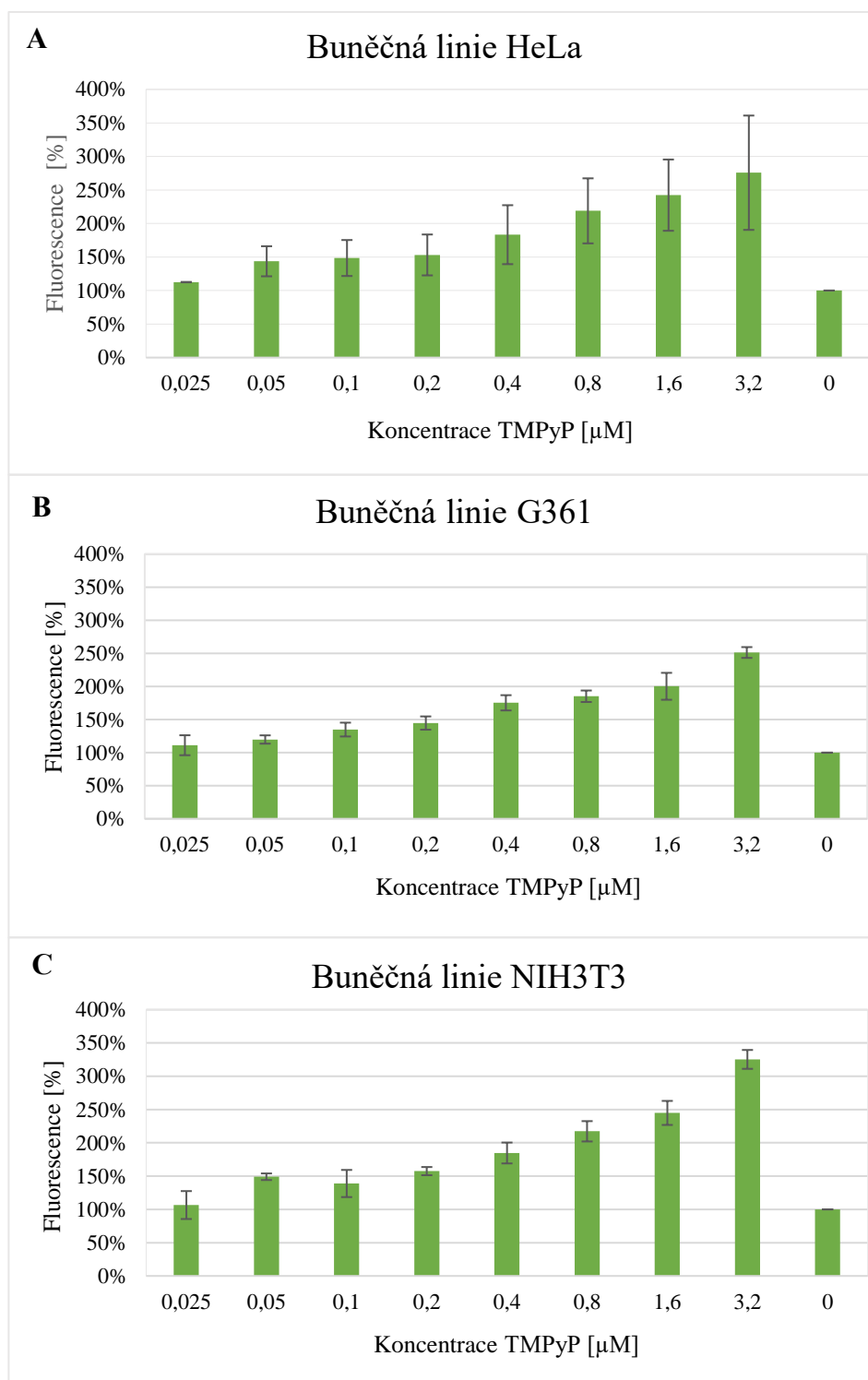
Po ozáření lze u všech tří buněčných linií pozorovat stejný trend růstu hladin singletního kyslíku v závislosti na koncentraci fotosensitizeru (Obr. 21). Se zvyšující se koncentrací fotosensitizeru se také zvyšuje množství singletního kyslíku. U všech tří testovaných linií byl v případě koncentrací v oblasti IC_{50} zaznamenán srovnatelný nárůst hladiny singletního kyslíku, který byl vyšší než v případě experimentu bez ozáření (Obr. 21).

3.3.1 Bez ozáření



Obr. 20 Produkce singletního kyslíku bez ozáření

3.3.2 Po ozáření

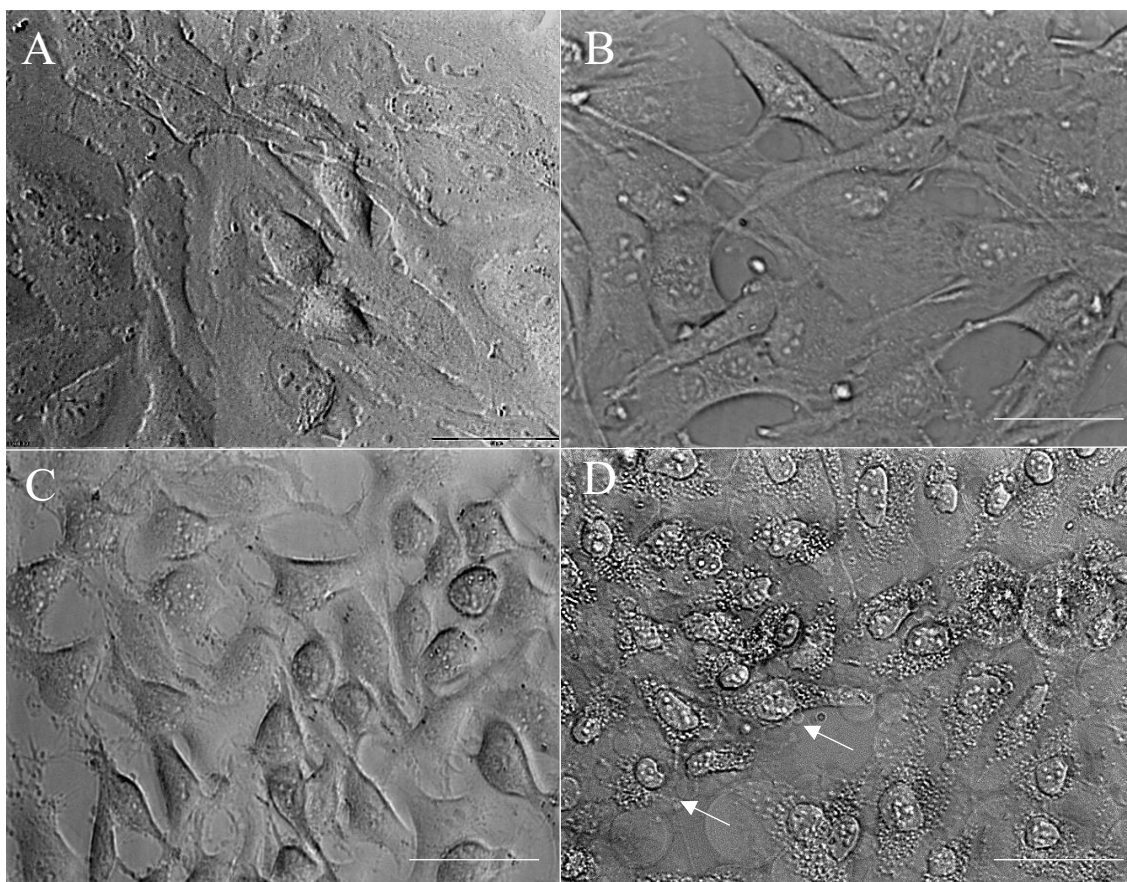


Obr. 21 Produkce singletního kyslíku po ozáření

3.4 Vliv jednotlivých složek PDT na morfologii buněk

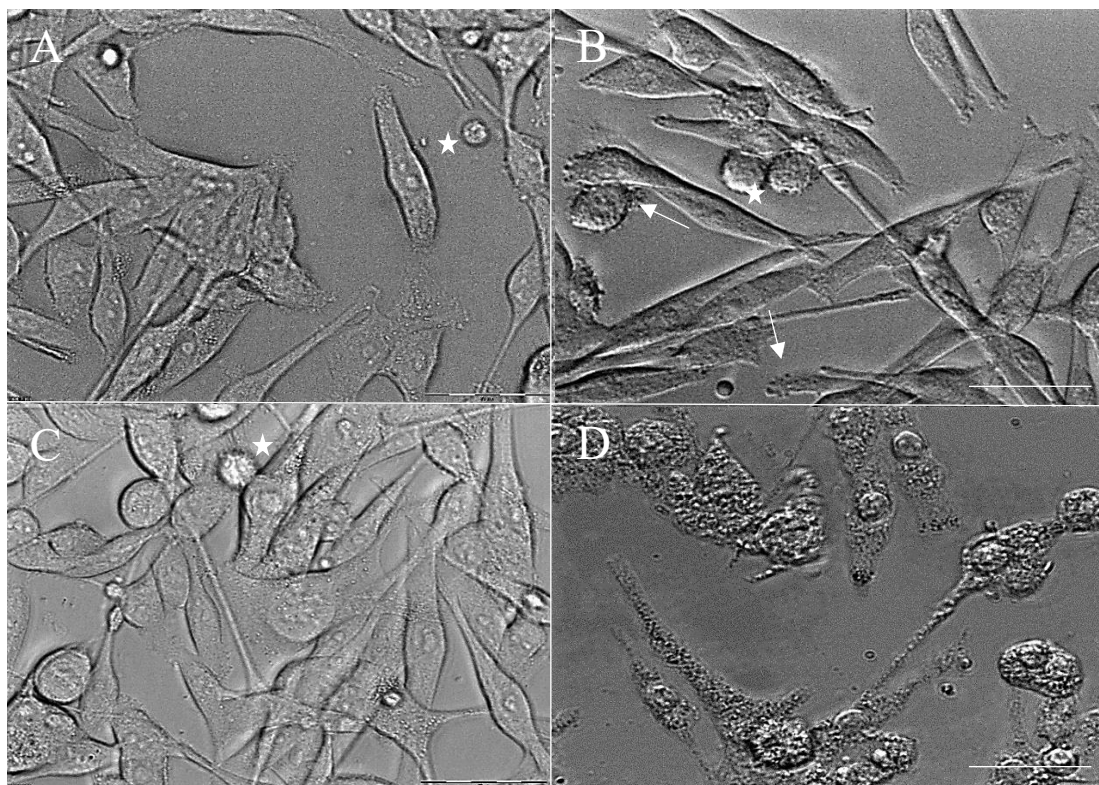
Pro potvrzení, že pouze kombinaci tří složek PDT způsobuje buněčnou smrt, byl proveden experiment, kde byly jednotlivé komponenty PDT zvlášť aplikovány na buněčné linie. Pro porovnání byla na buněčných liniích taktéž provedena terapie, tedy přítomnost všech tří složek nutných pro kompletní a účinnou PDT. Pro zobrazení případných morfologických změn buněk byla použita mikroskopie s fázovým kontrastem.

Živé buňky HeLa linie mají za normálních podmínek typický protáhlý tvar a jsou adherentní k plastovému povrchu mikrotitrační desky, na kterém rostou. Tento morfologický znak je pozorovatelný za podmínek, kdy byl v buňkách pouze přidán fotosensitizer v koncentraci $3,2 \mu\text{M}$ (Obr. 22 A) nebo kdy byly buňky pouze ozářeny $5 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ bez aplikace fotosensitizeru (Obr. 22 B), případně za podmínek aplikace fotosensitizeru k buňkám bez následného ozáření (Obr. 22 C). V těchto případech vždy chyběla jedna důležitá složka PDT, bez které nemohla být tato terapie účinná a buňky tedy vykazují morfologii typickou pro živé buňky. Pouze v případě kombinace fotosensitizeru s ozářením byly pozorovány určité změny spojené s buněčnou smrtí (Obr. 22 D). Buňky, které podléhají nekróze jsou většinou vystaveny extrémním podmínkám. V tomto případě je jednou z extrémních podmínek velmi vysoká koncentrace fotosensitizeru, pokud bereme v úvahu hodnotu IC_{50} pro linii HeLa, která se pohybuje okolo $0,09 \mu\text{M}$. Dále k nekrotickému způsobu buněčné smrti přispívá i typ experimentu, jelikož jsou buňky kultivovány v monovrstvách a k apoptóze dochází spíše hlouběji v tkáních. Je zde tedy předpoklad, že buněčná smrt této nádorové linie proběhne procesem nekrózy. Nicméně pro PDT je typické, že buněčná smrt probíhá prostřednictvím apoptózy i nekrózy. Pro nekrózu je typická ztráta membránové integrity, bobtnání cytoplazmy a mitochondrií, bobtnání organel a celková lýze buňky. Mezi morfologické znaky apoptózy patří naopak celkové smrštění buňky, kondenzace chromatinu, jaderný kolaps, cytoplazmatické bobtnání či tvorba apoptotických tělísek. Z pozorovaných morfologických znaků lze pomocí fázového kontrastu rozpoznat například tvorbu vezikul, které se v procesu nekrózy objevují u periferie buňky (Obr. 22 D, bílé šipky).



Obr. 22 Buňky HeLa buněčné linie, měřítko 50 μm
(A) bez ozáření a bez přítomnosti fotosenzitizéru
(B) po ozáření bez přítomnosti fotosenzitizéru
(C) s fotosenzitizérem bez ozáření
(D) s fotosenzitizérem po ozáření, šipky poukazují na tvorbu vezikul

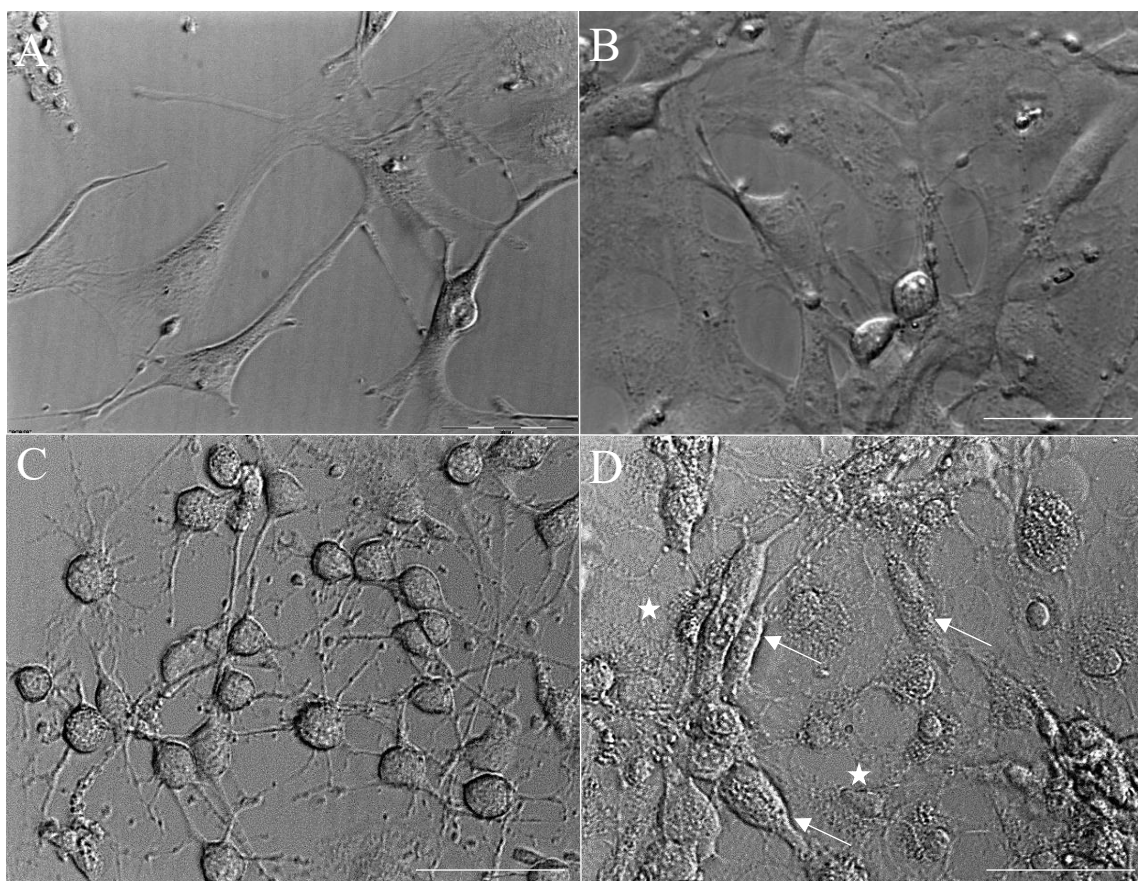
U linie G361 můžeme stejně jako v případě linie HeLa pozorovat adherentní buňky s protáhlým tvarem, které nepodléhají buněčné smrti. Tento morfologický znak je možné pozorovat v případě, že buňky nebyly ozářeny a nebyl k nim přidán fotosensitizer (Obr. 23 A), dále za podmínek, kdy nebyl k buňkám přidán fotosensitizer, ale došlo k ozáření (Obr. 23 B) anebo v případě, že byl k buňkám přidán fotosensitizer, ale nedošlo k ozáření (Obr. 23 C). Na Obr. 23 B, kde jsou zachyceny buňky po ozáření, lze pozorovat i počáteční fázi apoptózy (šipka) jako reakci na samotné ozáření. Taktéž je možné pozorovat občasný výskyt buněk s kulatým tvarem (hvězdička na Obr 23 A, B, C). Jedná se o buňky, které vykazují známky pozdní apoptózy, nejsou adherentní a pohybují se volně v médiu. Případně mohlo u těchto buněk dojít k nesprávnému přichycení na plastový povrch mikrotitrační desky. Tento jev je častý zejména u linie G361 a souvisí s její zvýšenou náročností na kultivaci. V případě kombinace fotosensitizeru a jeho ozáření můžeme pozorovat výrazné změny v buněčné morfologii (Obr. 23 D). Vzhledem k použité koncentraci fotosensitizeru se dá i v tomto případě předpokládat, že buněčná smrt zachycená na Obr. 23 D je nekróza.



Obr. 23 Buňky G361 buněčné linie, měřítko 50 μm

- (A) bez ozáření a bez přítomnosti fotosensitizeru, hvězdičky poukazují na kulovitý tvar buněk
- (B) po ozáření bez přítomnosti fotosensitizeru, šipka poukazuje na apoptotickou buňku
- (C) s fotosensitizerem bez ozáření
- (D) s fotosensitizerem po ozáření

Buněčná nenádorová linie nevykazuje žádné morfologické znaky typické pro buněčnou smrt v případě, že k buňkám nebyl přidán fotosensitizer a nebyly ozářeny (Obr. 24 A), případně že byly pouze ozářeny (Obr. 24 B) nebo k nim byl pouze přidán fotosensitizer (Obr. 24 C). Tato buněčná linie vykazuje morfologické známky stresu i v případě samotné aplikace fotosensitizeru (Obr. 24 C), a to mírným zakulacením buněk, což by mohla být známka počáteční fáze apoptózy. V případě, že byl k těmto nenádorovým buňkám aplikován fotosensitizer, který byl následně ozářen, lze pozorovat morfologické znaky typické buněčnou smrt (Obr. 24 D). Zejména se jedná o celkové zvětšení buňky a tvorbu vezikul, což jsou znaky typické pro nekrózu.



Obr. 24 Buňky NIH3T3 buněčné linie, měřítko 50 μm

(A) bez ozáření a bez přítomnosti fotosensitizeru

(B) po ozáření bez přítomnosti fotosensitizeru

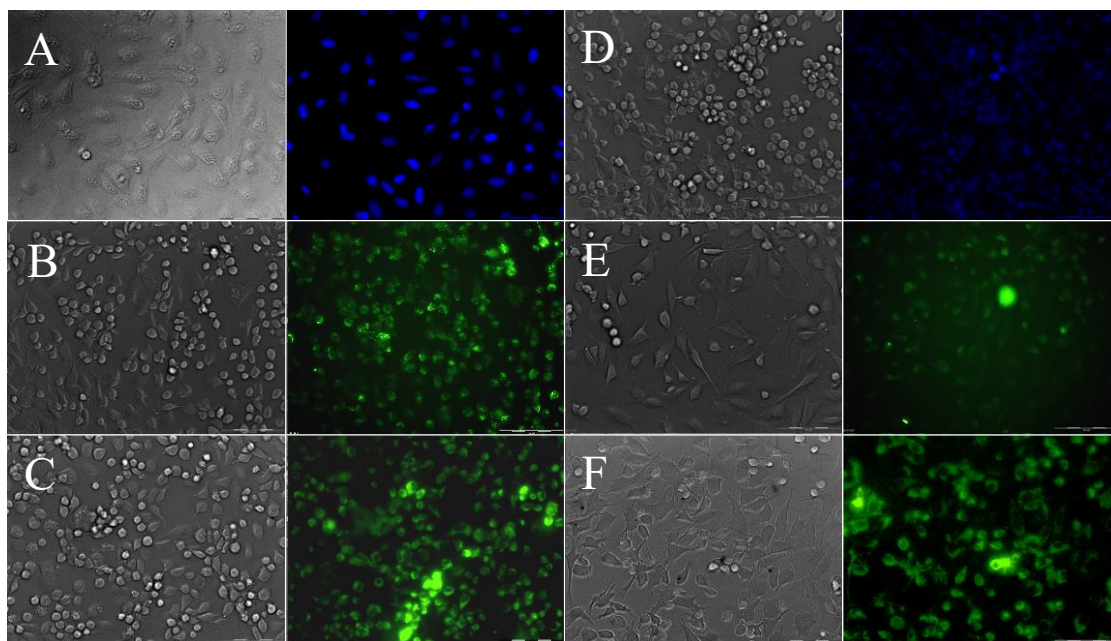
(C) s fotosensitizerem bez ozáření

(D) s fotosensitizerem po ozáření, šipky ukazují na zvětšený objem buněk, hvězdičky na tvorbu vezikul

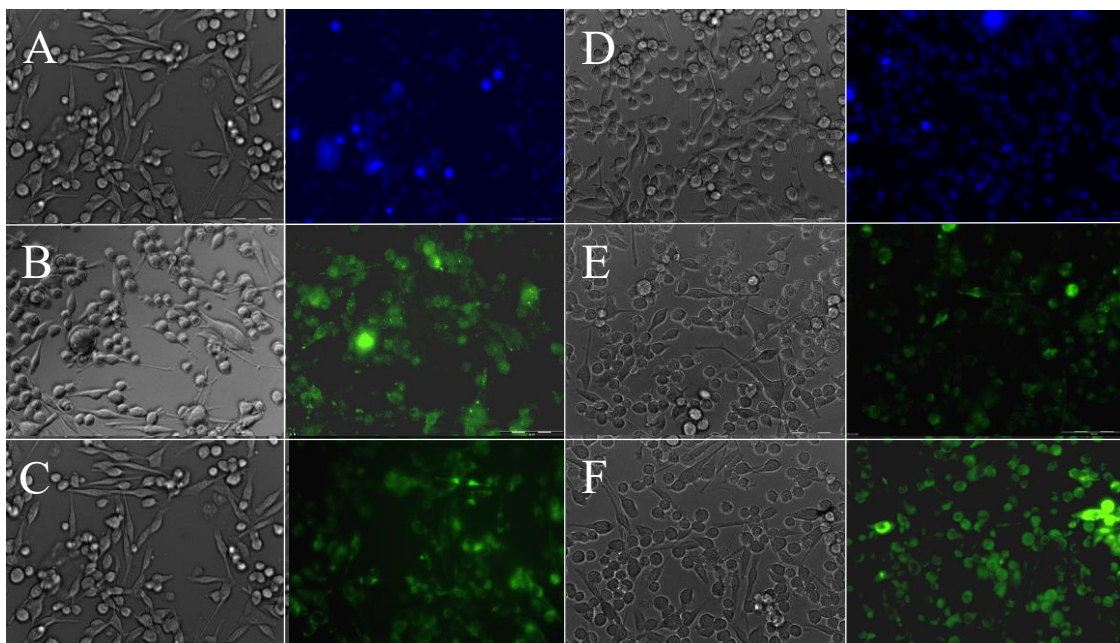
3.5 Lokalizace a kolokalizace TMPyP

Studium lokalizace fotosensitizeru TMPyP bylo na základě publikovaných poznatků (Patito *et al.*, 2001; Luksiene, 2003) zaměřeno zejména na buněčné jádro, lysozomy a mitochondrie. Lokalizace fotosensitizeru byla studována bez ozáření i po ozáření. Taktéž byly provedeny kontroly bez ozáření i s ozářením, kde nebyl aplikován fotosensitizer (Obr. 25–27). Kolokalizace fotosensitizeru byla v případě experimentu bez ozáření provedena s mitochondriemi/lysozomy. U experimentu, kde byla aplikována PDT, byla provedena kolokalizace fotosensitizeru jak s mitochondriemi/lysozomy, tak i s jádry. Důvodem je postupná relokalizace fotosensitizeru z mitochondrií/lysozomů do jádra. Nicméně kolokalizace byla provedena u reprezentativních buněk zájmu, její interpretace tedy může být zkreslena.

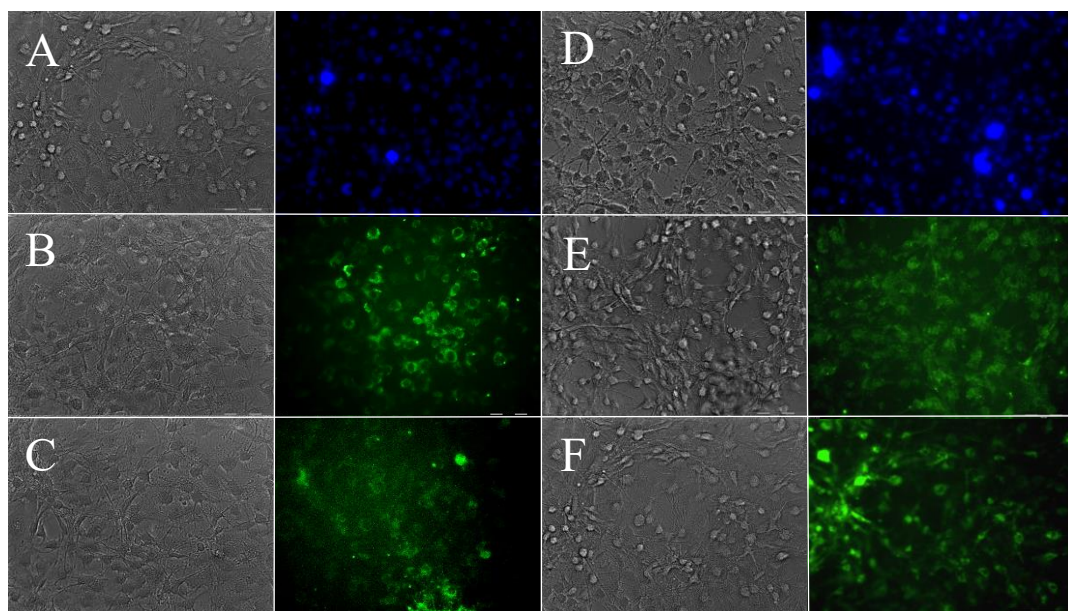
Nejprve byly získány snímky kontrolních buněčných linií bez fotosensitizeru s ozářením i bez ozáření. K daným buňkám bylo pouze přidáno barvivo pro obarvení jader, mitochondrií či lysozomů. Na snímcích kontrolních buněk, které nebyly ozářeny, lze pozorovat, že samotné barvivo nezpůsobuje buněčnou smrt (25–27 A, B, C). Stejně tak i na snímcích s buňkami, které byly ozářeny a bylo k nim přidáno dané barvivo, nedošlo k morfologické změně indikující buněčnou smrt (Obr. 25–27 D, E, F).



Obr. 25 Negativní kontrola HeLa buněčné linie bez fotosensitizeru, měřítko 100 μm
(A, B, C) kontrola s ozářením $5 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$
(D, E, F) kontrola bez ozáření
(A, D) vlevo fázový kontrast, vpravo jádra
(B, E) vlevo fázový kontrast, vpravo lysozomy
(C, F) vlevo fázový kontrast, vpravo mitochondrie



Obr. 26 Negativní kontrola G361 buněčné linie bez fotosensitizeru, měřítko 100 μm
 (A, B, C) kontrola s ozářením 5 J.cm^{-2}
 (D, E, F) kontrola bez ozáření
 (A, D) vlevo fázový kontrast, vpravo jádra
 (B, E) vlevo fázový kontrast, vpravo lysozomy
 (C, F) vlevo fázový kontrast, vpravo mitochondrie

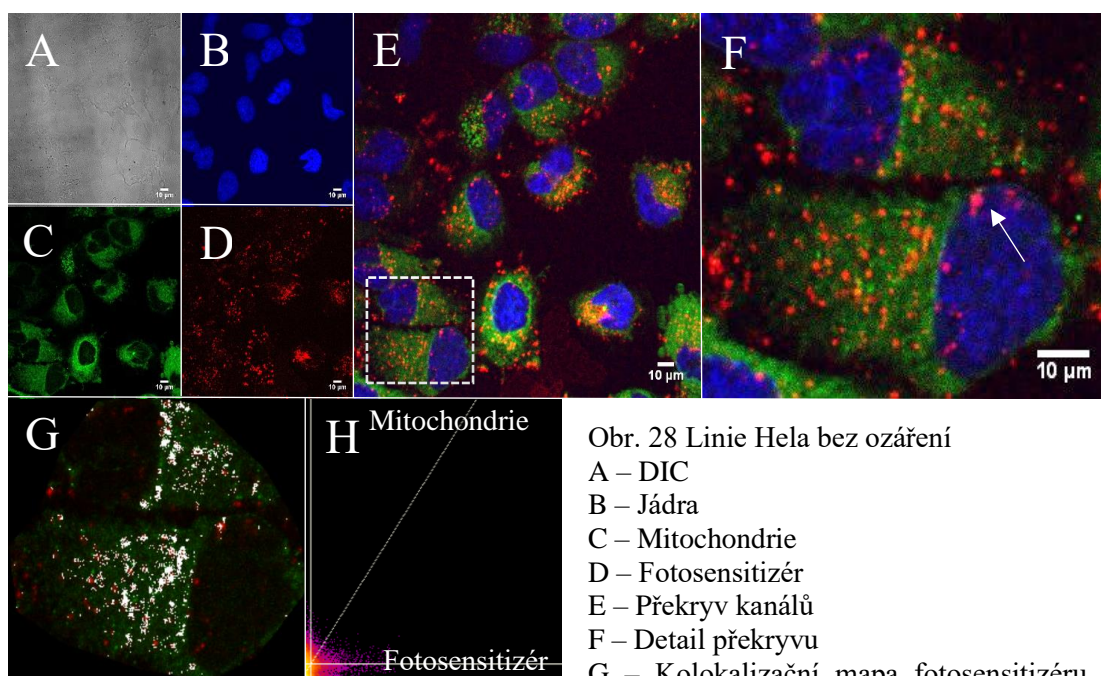


Obr. 27 Negativní kontrola NIH3T3 buněčné linie bez fotosensitizeru, měřítko 100 μm
 (A, B, C) kontrola s ozářením 5 J.cm^{-2}
 (D, E, F) kontrola bez ozáření
 (A, D) vlevo fázový kontrast, vpravo jádra
 (B, E) vlevo fázový kontrast, vpravo lysozomy
 (C, F) vlevo fázový kontrast, vpravo mitochondrie

3.5.1 Bez ozáření

V případě experimentu bez ozáření byl k buňkám přidán fotosensitizer v koncentraci 9,6 μM . Po 24hodinové inkubaci lze zaznamenat jeho lokalizaci v mitochondriích (Obr. 28, 30, 32) i v lysozomech (Obr. 29, 31, 33) u všech tří buněčných linií.

V případě linie HeLa má fotosensitizer tendenci se akumulovat i v periférii jádra (Obr. 28 F, 29 F, šipka), což je nejspíše způsobeno jeho velmi vysokou koncentrací. Kolokalizační analýzou byla zjištěna hodnota Pearsonova koeficientu pro mitochondrie a fotosensitizer ($r = 0,173$). Z kolokalizační mapy a tečkového diagramu (Obr. 28 G, H) lze usoudit, že kolokalizace fotosenzitiveru a mitochondrií se zde nachází, i když její hodnota není nijak vysoká. Navíc, intenzita pixelů v tečkovém diagramu představuje frekvenci pixelů reprezentujících danou kolokalizaci. Čím vyšší je frekvence pixelů s nízkou intenzitou, které představují pozadí, tím větší je kvadrant vlevo dole a tím jasnější je barva, která se v něm nachází. Z tečkového diagramu s pozitivní přímkou lineární regrese a s mírnou až nízkou závislostí lze tedy vyčíst, že část představující pozadí pro danou oblast zájmu je relativně nízká (Obr. 28 H). Pomocí Mandersonových koeficientů ($tM_1 = 0,3008$) bylo potvrzeno, že zde dochází k vyšší kolokalizaci fotosenzitiveru



Obr. 28 Linie Hela bez ozáření

A – DIC

B – Jádra

C – Mitochondrie

D – Fotosensitizer

E – Překryv kanálů

F – Detail překryvu

G – Kolokalizační mapa fotosenzitiveru a mitochondrií

H – Tečkový diagram

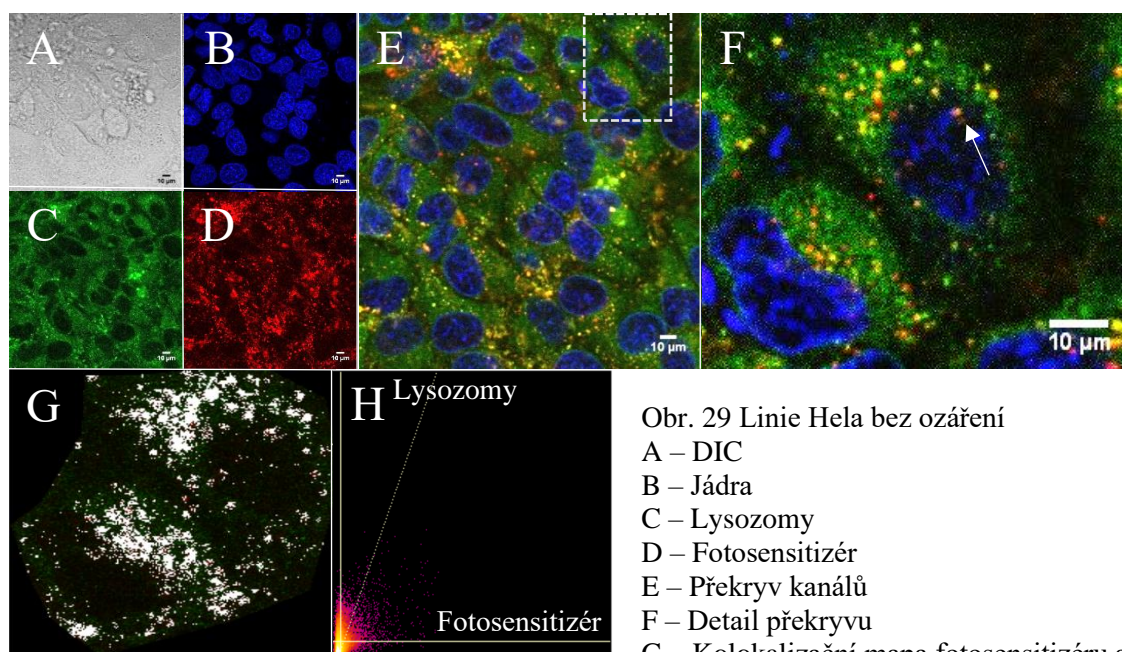
$r = 0,173$

$tM_1 = 0,3008$; $tM_2 = 0,1989$

Snímky byly pořízeny konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem Olympus FV3000

s mitochondriemi, než mitochondrií s fotosensitizerem ($tM_2 = 0,1989$).

Podle očekávání byla kolokalizační analýzou pro lysozomy a fotosensitizer potvrzena kolokalizace, která je podle Pearsonového koeficientu ($r = 0,390$) dokonce vyšší než v případě kolokalizace mitochondrií s fotosensitizerem. Podle Mandersonových koeficientů je míra překryvu fotosensitizeru s lysozomy ($tM_1 = 0,4046$) téměř identická s mírou překryvu lysozomů s fotosensitizerem ($tM_2 = 0,4389$). Vlivem vysoké koncentrace fotosensitizeru lze pozorovat jeho lokalizaci i na periferii jádra (Obr. 29 F, šipka). Hodnoty koeficientů jsou potvrzeny i kolokalizační mapou a tečkovým diagramem s mírnou až nízkou závislostí. Tečkový diagram je proložen pozitivní přímkou lineární regrese. Oblast představující pozadí v levém dolním kvadrantu je relativně nízká, což naznačuje nízký šum pozadí (Obr. 29 H).



Obr. 29 Linie Hela bez ozáření

A – DIC

B – Jádra

C – Lysozomy

D – Fotosensitizer

E – Překryv kanálů

F – Detail překryvu

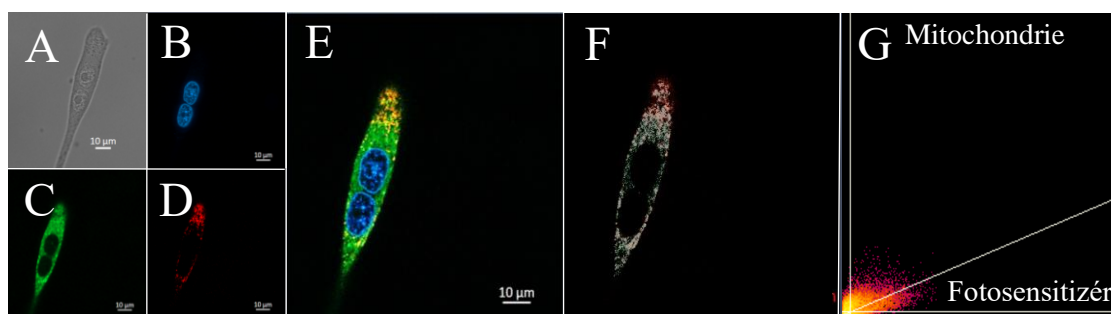
G – Kolokalizační mapa fotosensitizeru a lysozomů

H – Tečkový diagram

$r = 0,390$

$tM_1 = 0,4046$; $tM_2 = 0,4389$

Snímky byly pořízeny konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem Olympus FV3000



Obr. 30 Linie G361 bez ozáření

A – DIC

B – Jádra

C – Mitochondrie

D – FOTOSENSITIZÉR

E – Překryv kanálů

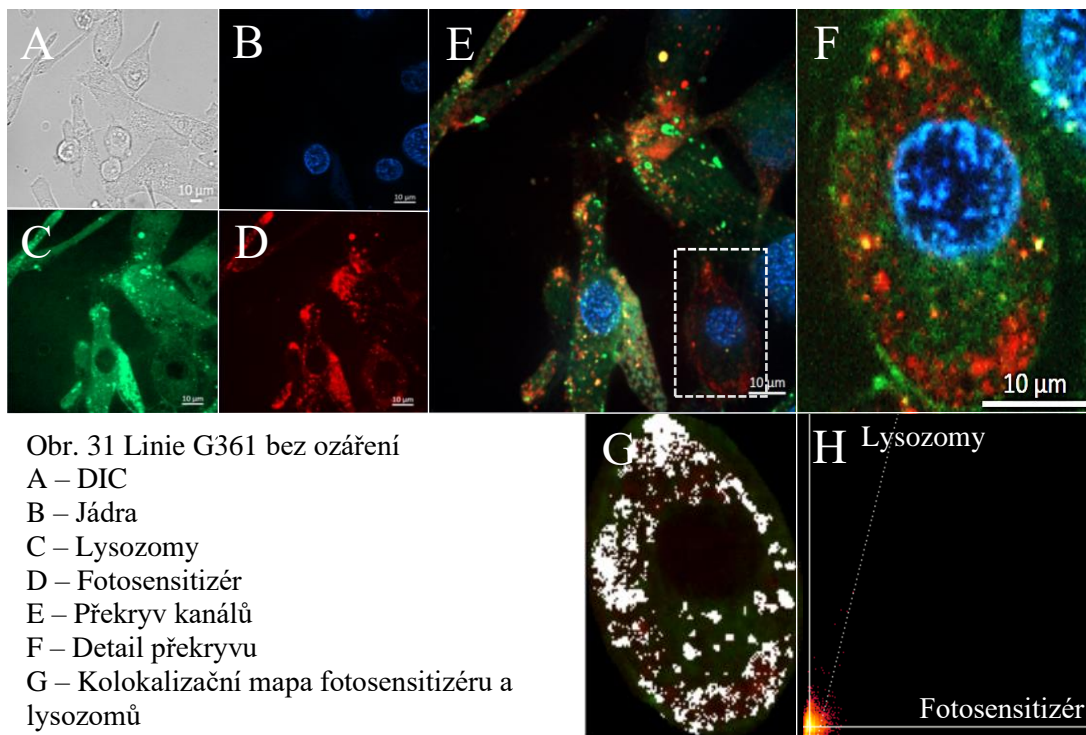
F – Kolokalizační mapa fOTOSENSITIZÉru a mitochondrií

G – Tečkový diagram

$r = 0,589$

$tM_1 = 0,7928$; $tM_2 = 0,7976$

Snímky byly pořízeny Spinning disk konfokálním mikroskopem Yokogawa CSU-X1



Obr. 31 Linie G361 bez ozáření

A – DIC

B – Jádra

C – Lysozomy

D – FOTOSENSITIZÉR

E – Překryv kanálů

F – Detail překryvu

G – Kolokalizační mapa fOTOSENSITIZÉru a lysozomů

H – Tečkový diagram

$r = 0,290$

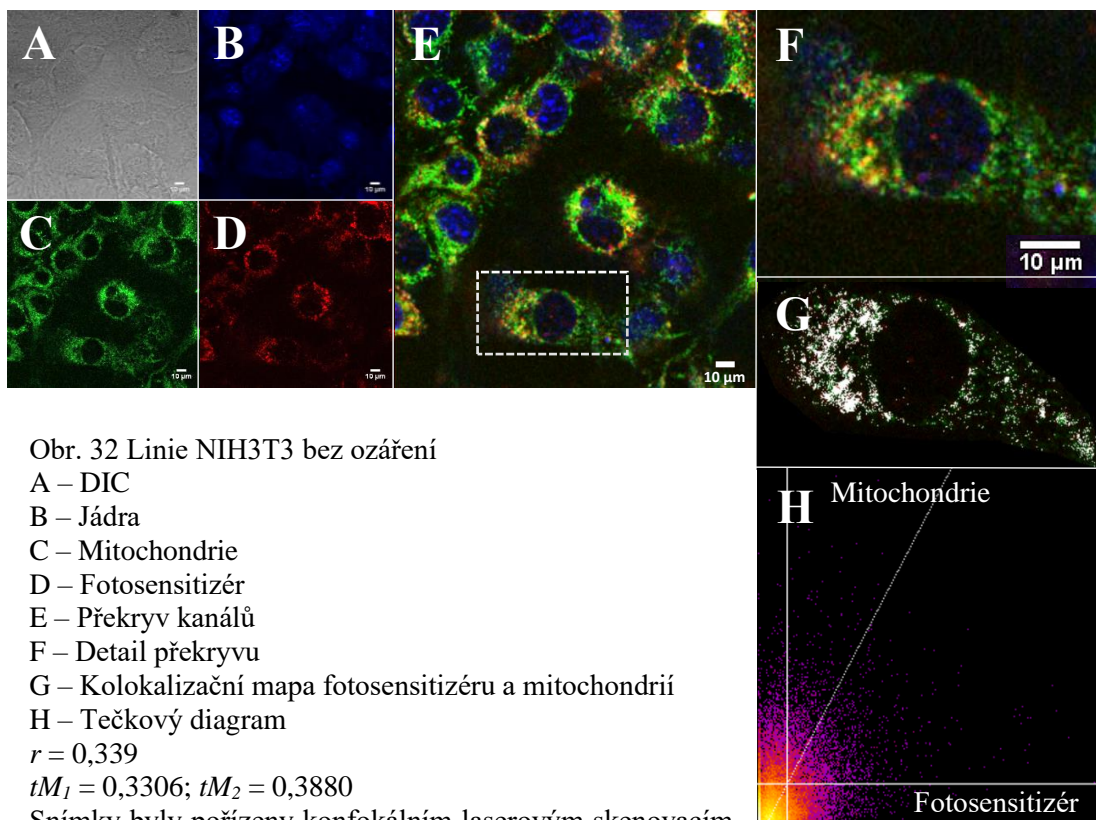
$tM_1 = 0,5777$; $tM_2 = 0,6432$

Snímky byly pořízeny Spinning disk konfokálním mikroskopem Yokogawa CSU-X1

Linie G361 vykazuje bez ozáření stejný trend, jako linie HeLa. Na příkladu dělící se buňky (Obr. 30) lze pozorovat lokalizaci fotosensitizeru v mitochondriích. Na kolokalizační mapě i tečkovém diagramu s pozitivní přímkou lineární regrese a s vysokou závislostí lze pozorovat vysokou míru kolokalizace, přičemž oblast pozadí v dolním levém kvadrantu je odpovídající (Obr. 30 F, G). Hodnota Pearsonového korelačního koeficientu ($r = 0,589$) potvrzuje kolokalizaci. Mandersonovými koeficienty byla zjištěna téměř identická míra překryvu fotosensitizeru s mitochondriemi ($tM_1 = 0,7928$) i mitochondrií s fotosensitizerem ($tM_2 = 0,7976$).

Na Obr. 31 lze pozorovat lokalizaci fotosensitizeru v lysozomech buněk G361 linie bez ozáření. Míra kolokalizace není podle Pearsonova korelačního koeficientu příliš vysoká ($r = 0,290$), nicméně Mandersonovými koeficienty byla kolokalizace potvrzena. Těmto hodnotám také odpovídá kolokalizační mapa a tečkový diagram s pozitivní přímkou lineární regrese a s mírnou závislostí. Oblast pozadí je velmi nízká (Obr. 31 G, H).

V případě nenádorové buněčné linie byla taktéž pozorována lokalizace fotosensitizeru v mitochondriích (Obr. 32 F). Z typické kolokalizační mapy i z tečkového diagramu je zřejmé, že se zde nachází jistá kolokalizace fotosensitizeru v mitochondriích, což je potvrzeno i Pearsonovým korelačním koeficientem ($r = 0,339$) (Obr. 32 G, H). Mandersonovy koeficienty poukazují na to, že je zde o něco vyšší míra kolokalizace mitochondrií s fotosensitizerem ($tM_2 = 0,3880$) než fotosensitizeru s mitochondriemi ($tM_1 = 0,3306$). Z tečkového diagramu s pozitivní přímkou lineární regrese lze pozorovat, že body překryvu (kvadrant vpravo nahoře) jsou spíše prostorově rozmístěné, což je způsobeno nižší hodnotou kolokalizace. Závislost je tedy poměrně slabá. Zároveň oblast pozadí v levém dolním kvadrantu je o něco vyšší, než v předchozích případech (Obr. 32 H).



Obr. 32 Linie NIH3T3 bez ozáření

A – DIC

B – Jádra

C – Mitochondrie

D – Fotosensitizer

E – Překryv kanálů

F – Detail překryvu

G – Kolokalizační mapa fotosensitizeru a mitochondrií

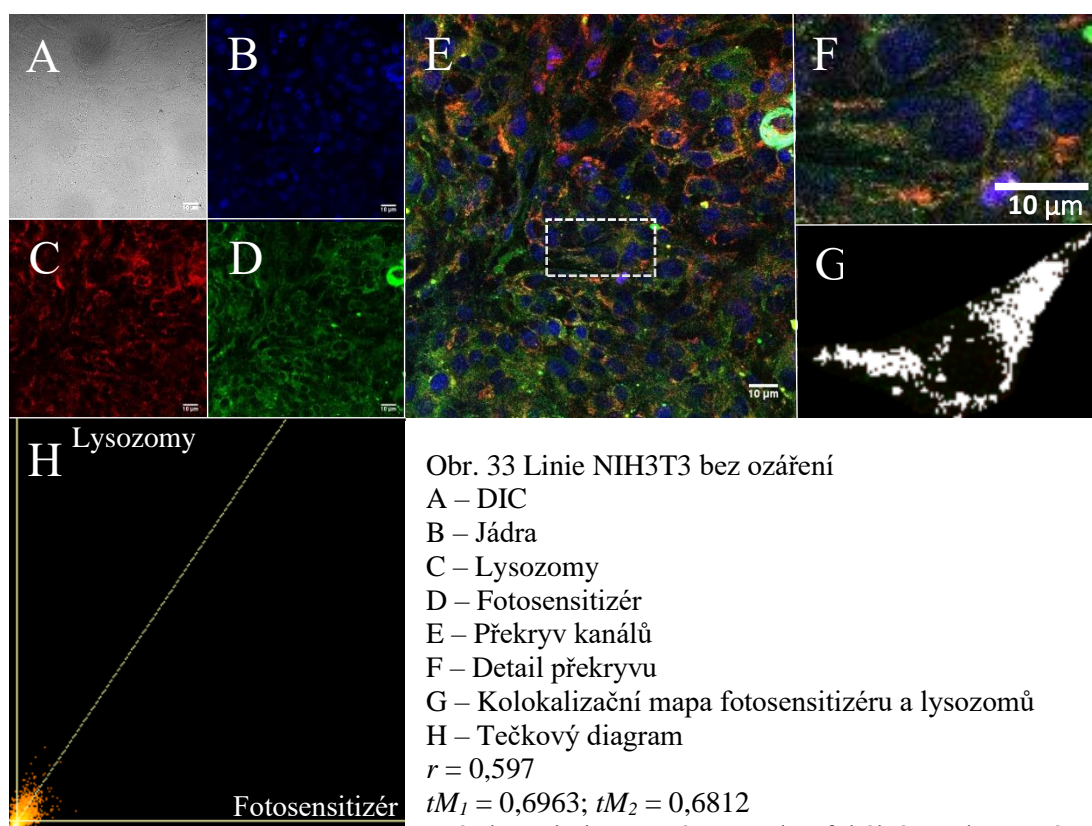
H – Tečkový diagram

$r = 0,339$

$tM_1 = 0,3306$; $tM_2 = 0,3880$

Snímky byly pořízeny konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem Olympus FV3000

Stejně jako v případě ostatních buněčných linií, i zde byla potvrzena lokalizace fotosensitizeru v lysozomech (Obr. 33). Kolokalizační analýzou bylo zjištěno, že kolokalizace fotosensitizeru a lysozomů je o něco vyšší než v případě fotosensitizeru a mitochondrií. Hodnota Pearsonového korelačního koeficientu ($r = 0,597$) představuje poměrně vysokou míru kolokalizace. Z tečkového diagramu s pozitivní přímkou lineární regrese a s mírnou závislostí lze pozorovat, že signál je specifitější než v případě kolokalizace s mitochondriemi a oblast pozadí je taktéž velmi nízká (Obr. 32 H–33 H). Mandersonovými koeficienty byla zjištěna téměř identická míra překryvu fotosensitizeru s lysozomy ($tM_1 = 0,6963$) a lysozomů s fotosensitizerem ($tM_2 = 0,6812$).



Obr. 33 Linie NIH3T3 bez ozáření

A – DIC

B – Jádra

C – Lysozomy

D – Fotosensitizer

E – Překryv kanálů

F – Detail překryvu

G – Kolokalizační mapa fotosensitizeru a lysozomů

H – Tečkový diagram

$r = 0,597$

$tM_1 = 0,6963$; $tM_2 = 0,6812$

Snímky byly pořízeny konfokálním laserovým
skenovacím mikroskopem Olympus FV3000

3.5.2 Po ozáření

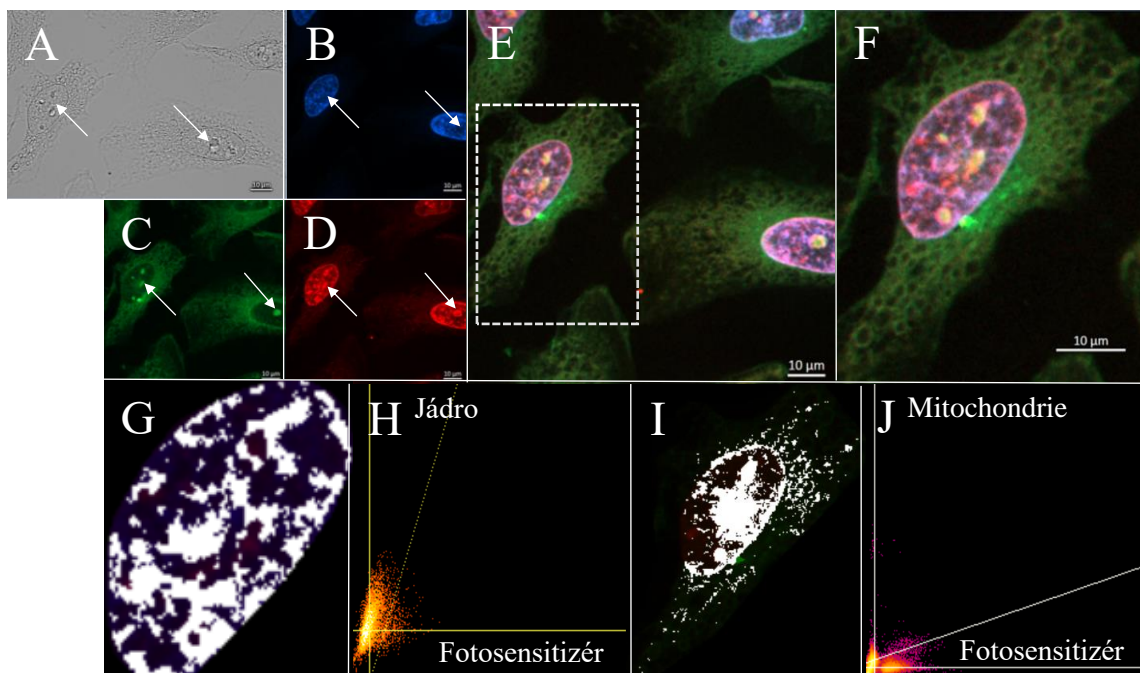
V případě experimentu po ozáření byl k buňkám přidán fotosensitizer v koncentraci 4,8 μM . Po 24hodinové inkubaci byly buňky s fotosensitizerem ozářeny v 1 ml PBS hustotou energie 5 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ po dobu 3 minut a 30 sekund LED diodovým zářičem. Následně byly buňky vloženy do inkubátoru při 37 °C a atmosféře 5 % CO_2 . Po hodině byly připraveny preparáty s živými buňkami a ihned následovala konfokální mikroskopie. Na snímcích lze zaznamenat jistou relokalizaci fotosensitizeru z mitochondrií/lysozomů do jádra. Z tohoto důvodu byla provedena kolokalizace fotosensitizeru jak s mitochondriemi/lysozomy, tak i s buněčnými jádry.

Na buňkách linie HeLa lze již hodinu po ozáření sledovat poměrně silnou lokalizaci fotosensitizeru v jádře, nicméně lokalizaci lze zaznamenat i v mitochondriích (Obr. 34). Pearsonovým korelačním koeficientem byla potvrzena kolokalizace fotosensitizeru v jádře ($r = 0,415$).

Hodnota Mandersonového koeficientu pro fotosensitizer a jádro ($r = 0,6860$) je téměř stejná jako pro jádro a fotosensitizer (0,6308). Tečkový diagram vykazuje spíše slabší závislost s pozitivní přímkou lineární regrese. V levém dolním kvadrantu lze taktéž zaznamenat značný signál pozadí (Obr. 34 H).

Kolokalizační mapou a tečkovým diagramem byla určena i míra překryvu fotosensitizeru a mitochondrií (Obr. 34 I, J), která je poněkud slabší, než v případě fotosensitizeru a jádra. Tomu odpovídá i Pearsonův korelační koeficient s hodnotou $r = 0,261$. Mandersonovými koeficienty byl zjištěn větší překryv fotosensitizeru s mitochondriemi ($tM_1 = 0,6426$) než mitochondrií s fotosensitizerem ($tM_2 = 0,3797$). Tečkový diagram je proložen pozitivní přímkou lineární regrese a vykazuje mírnou závislost. Nicméně, i v tomto případě lze v levém dolním kvadrantu detekovat jistý signál pozadí.

Po ozáření lze u buněk všech tří linií zaznamenat zelený signál pro mitochondrie/lysozomy i v jádře, kde byl taktéž zaznamenán červený signál (Obr. 34–39 A–D, šipky). Tento poznatek může souviset s probíhajícími změnami po ozáření a bude blíže rozebrán v diskuzi.



Obr. 34 Linie HeLa s ozářením 5 J.cm^{-2}

A – DIC

B – Jádra

C – Mitochondrie

D – Fotosensitizér

E – Překryv kanálů

F – Detail překryvu

G – Kolokalizační mapa fotosensitizéru a jádra

H – Tečkový diagram fotosensitizéru a jádra

I – Kolokalizační mapa fotosensitizéru a mitochondrií

J – Tečkový diagram fotosensitizéru a mitochondrií

Pearsonův korelační koeficient pro fotosensitizér a jádro: $r = 0,415$

$tM_1 = 0,6860$; $tM_2 = 0,6308$

Pearsonův korelační koeficient pro fotosensitizér a mitochondrie: $r = 0,261$

$tM_1 = 0,6426$; $tM_2 = 0,3797$

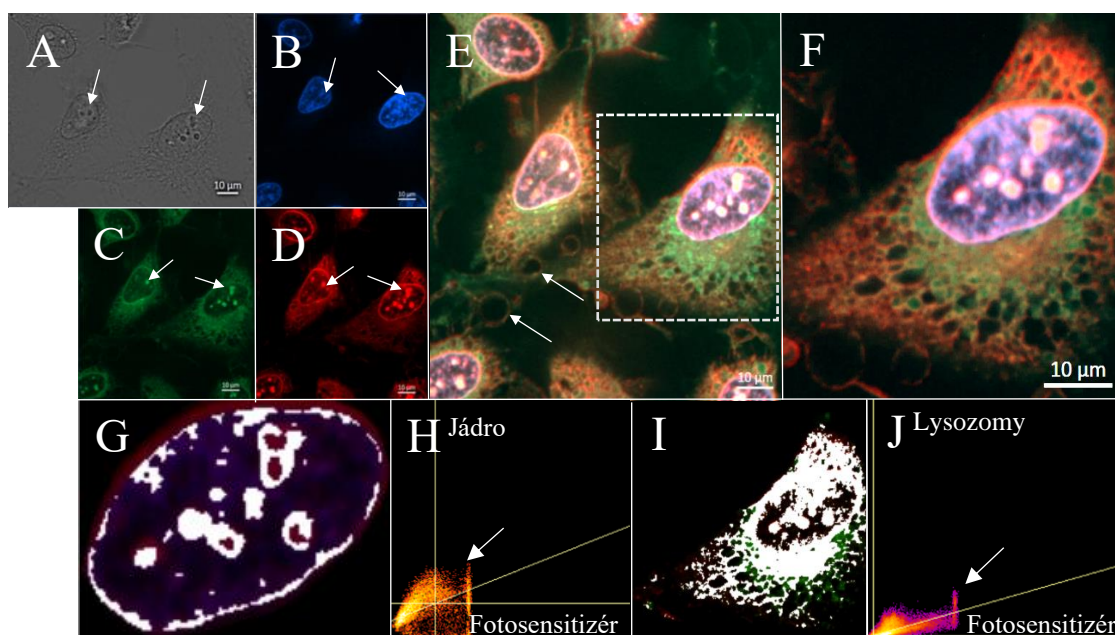
Snímky byly pořízeny Spinning disk konfokálním mikroskopem Yokogawa CSU-X1

A, B, C, D – Šipky poukazují na struktury v jádře, kde se hromadí fotosensitizér a barvivo pro mitochondrie

Na buňkách linie HeLa byla taktéž zaznamenána lokalizace fotosensitizeru v jádrech i v lysozomech po ozáření. Kolokalizační mapou a tečkovým diagramem byla potvrzena lokalizace fotosensitizeru v jádře s poměrně vysokou hodnotou Pearsonova korelačního koeficientu ($r = 0,676$) (Obr. 35 G, H).

Mandersonovy koeficienty popisují vyšší korelaci jádra s fotosensitizerem ($tM_2 = 0,9733$) než fotosensitizeru s jádrem ($tM_1 = 0,9522$). Kolokalizační mapou a tečkovým diagramem lysozomů a jádra (Obr. 35 I, J) je možné zaznamenat jistou kolokalizaci s hodnotou Pearsonova korelačního koeficientu $r = 0,283$. Podle Mandersonových koeficientů je zde vyšší překryv fotosensitizeru s lysozomy ($tM_1 = 0,5318$) než lysozomů s fotosensitizerem ($tM_2 = 0,3171$).

Oba tečkové diagramy jsou proloženy pozitivní přímkou lineární regrese s mírnou závislostí. U obou tečkových diagramů lze také zaznamenat takzvané „outliers“, tedy body ležící výrazně mimo (Obr. 35 H, J, šipka). Tyto body leží ve směru přímky lineární regrese, takže nijak výrazně neovlivňují výsledné koeficienty, nicméně jsou považovány za odchylku a neberou se do úvahy. Také zde lze zaznamenat tvorbu vezikul, které jsou typické pro ranou fázi apoptózy, ale vyskytují se i u nekrózy (Obr. 35 E, šipky). Vzniklé struktury v jádře, kde se hromadí fotosensitizer a barvivo pro lysozomy, jsou označeny šipkami (Obr. 35 A–D).



Obr. 35 Linie HeLa s ozářením $5 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$

A – DIC

B – Jádra

C – Lysozomy

D – Fotosenzitizér

E – Překryv kanálů

F – Detail překryvu

G – Kolokalizační mapa fotosenzitizéru a jádra

H – Tečkový diagram fotosenzitizéru a jádra

I – Kolokalizační mapa fotosenzitizéru a lysozomů

J – Tečkový diagram fotosenzitizéru a lysozomů

Pearsonův korelační koeficient pro fotosenzitizér a jádro: $r = 0,676$

$tM_1 = 0,9522$; $tM_2 = 0,9733$

Pearsonův korelační koeficient pro fotosenzitizér a lysozomy: $r = 0,283$

$tM_1 = 0,5318$; $tM_2 = 0,3171$

Snímky byly pořízeny Spinning disk konfokálním mikroskopem Yokogawa CSU-X1

H, J – Šipky znázorňují body ležící výrazně mimo přímku lineární regrese

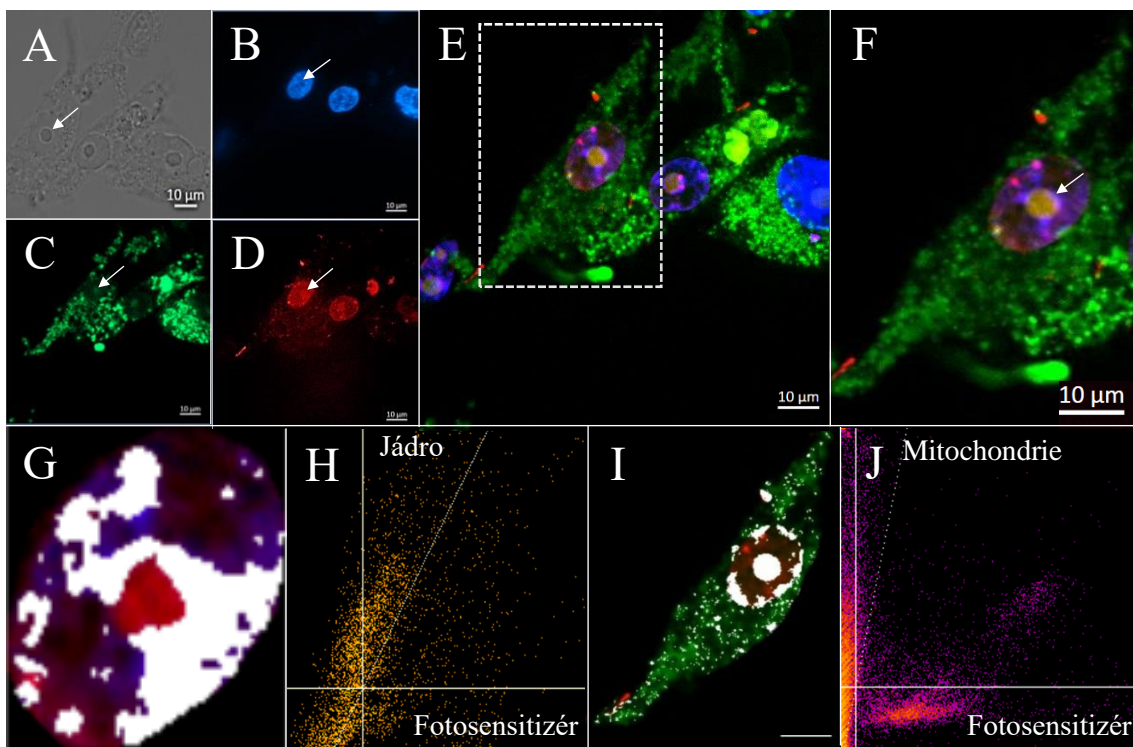
E – Šipky znázorňují tvorbu vezikul

A, B, C, D – Šipky poukazují na struktury v jádře, kde se hromadí fotosenzitizér a barvivo pro lysozomy

U Buněčné linie G361 po ozáření byl pozorován stejný trend lokalizace fotosenzitizéru jako u linie HeLa. Fotosenzitizér je zde lokalizován především v jádře (Obr. 36 F, G), čemuž odpovídá i Pearsonův korelační koeficient s hodnotou $r = 0,471$. Lokalizace fotosenzitizéru byla zaznamenána taktéž v mitochondriích, nicméně v daleko menší míře (Obr. 36 I). Tomu odpovídá i Pearsonův korelační koeficient s hodnotou $r = 0,156$.

Mandersonovými koeficienty bylo zjištěno, že zde dochází k vyššímu překryvu jádra s fotosenzitizérem ($tM_2 = 0,7094$) než fotosenzitizéru s jádrem ($tM_1 = 0,6499$) a zároveň se z větší části kolokalizuje fotosenzitizér s mitochondriemi ($tM_1 = 0,4228$) než mitochondrie s fotosenzitizérem ($tM_2 = 0,2243$).

Tečkový diagram je v obou případech proložen pozitivní přímkou lineární regrese s mírnou závislostí případě kolokalizace fotosenzitizéru a jádra a s velmi slabou závislostí v případě kolokalizace fotosenzitizéru a mitochondrií (Obr. 36 H, J). I v tomto případě byl zaznamenán překryv signálů pro fotosenzitizér a mitochondrie v jádře (Obr. 36 A, B, C, D, F, šipka).



Obr. 36 Linie G361 s ozářením 5 J.cm^{-2}

A – DIC

B – Jádra

C – Mitochondrie

D – Fotosensitizer

E – Překryv kanálů

F – Detail překryvu

G – Kolokalizační mapa fotosensitizeru a jádra

H – Tečkový diagram fotosensitizeru a jádra

I – Kolokalizační mapa fotosensitizeru a mitochondrií

J – Tečkový diagram fotosensitizeru a mitochondrií

Pearsonův korelační koeficient pro fotosensitizer a jádro: $r = 0,471$

$tM_1 = 0,6499$; $tM_2 = 0,7094$

Pearsonův korelační koeficient pro fotosensitizer a mitochondrie: $r = 0,156$

$tM_1 = 0,4228$; $tM_2 = 0,2243$

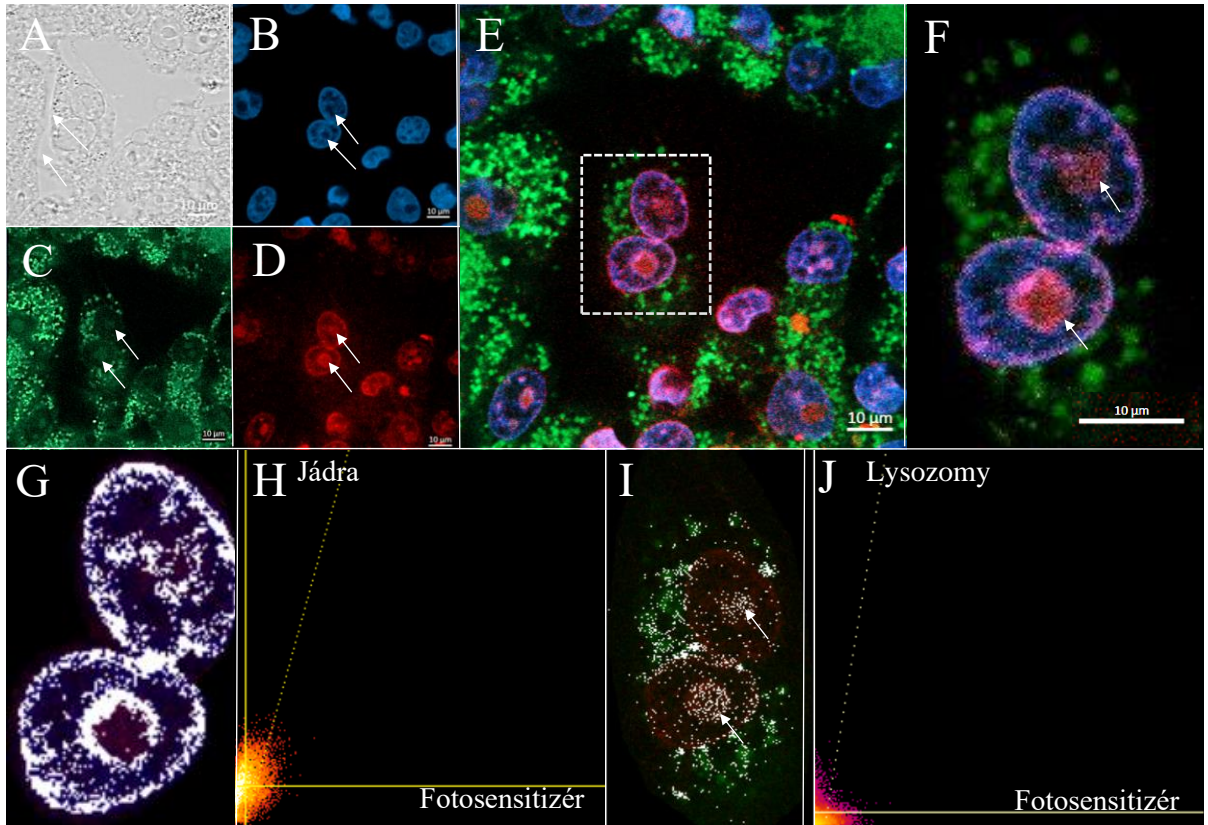
Snímky byly pořízeny Spinning disk konfokálním mikroskopem Yokogawa CSU-X1

A, B, C, D, F – Šipky poukazují na struktury v jádře, kde se hromadí fotosensitizer a barvivo pro mitochondrie

Po ozáření byla u linie G361 také zaznamenána lokalizace fotosensitizeru v lysozomech. Nicméně, tato lokalizace byla minimální, čemuž odpovídá i hodnota Pearsonova korelačního koeficientu ($r = 0,074$). Daleko vyšší hodnota Pearsonova korelačního koeficientu byla opět získána v případě lokalizace fotosensitizeru v jádře ($r = 0,393$).

Mandersonovými koeficienty bylo zjištěno, že dochází k téměř stejnému překryvu fotosensitizeru s jádrem ($tM_1 = 0,6301$), jako jader s fotosensitizerem ($tM_2 = 0,5487$). V případě lokalizace fotosensitizeru v lysozomech bylo Mandersonovými koeficienty zjištěno, že dochází k většímu překryvu lysozomů s fotosensitizerem ($tM_2 = 0,3699$) než fotosensitizeru s lysozomy ($tM_1 = 0,1639$).

Kolokalizace byla potvrzena i kolokalizační mapou a tečkovým diagramem (Obr. 37 G, H, I, J). Oba tečkové diagramy jsou proloženy pozitivní přímkou lineární regrese s mírnou závislostí v případě kolokalizace fotosensitizeru a jader a s velmi slabou závislostí v případě kolokalizace fotosensitizeru a lysozomů. I zde byly pozorovány struktury v jádře, kde se hromadí fotosensitizer a barvivo pro lysozomy (Obr. A, B, C, D, F, I, šipky)



Obr. 37 Linie G361 s ozářením 5 J.cm^{-2}

A – DIC

B – Jádra

C – Lysozomy

D – Fotosensitizér

E – Překryv kanálů

F – Detail překryvu

G – Kolokalizační mapa fotosensitizéru a jader

H – Tečkový diagram fotosensitizéru a jader

I – Kolokalizační mapa fotosensitizéru a lysozomů

J – Tečkový diagram fotosensitizéru a lysozomů

Pearsonův korelační koeficient pro fotosensitizér a jádro: $r = 0,393$

$tM_1 = 0,6301$; $tM_2 = 0,5487$

Pearsonův korelační koeficient pro fotosensitizér a lysozomy: $r = 0,074$

$tM_1 = 0,1639$; $tM_2 = 0,3699$

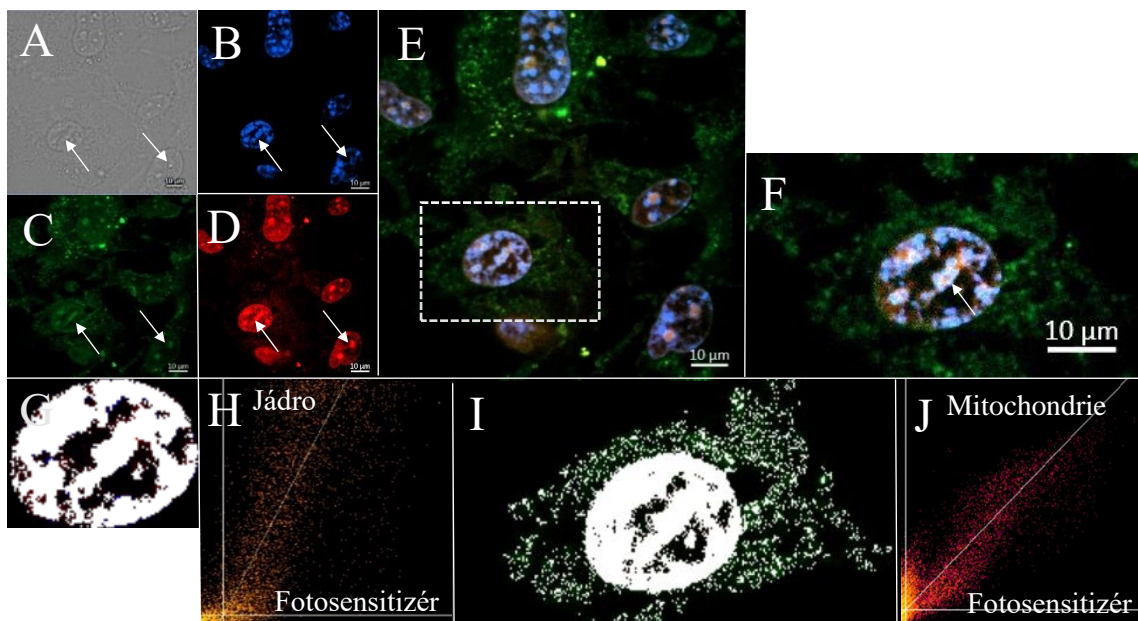
Snímky byly pořízeny Spinning disk konfokálním mikroskopem Yokogawa CSU-X1

A, B, C, D, F, I – Šipky poukazují na struktury v jádře, kde se hromadí fotosensitizér a barvivo pro lysozomy

I v případě nenádorové buněčné linie NIH3T3 po ozáření došlo k akumulaci fotosenzitizéru zejména v jádře, nicméně signál pro fotosenzitizér byl pozorován i v mitochondriích. Hodnota Pearsonova korelačního koeficientu pro kolokalizaci fotosenzitizéru a jádra je $r = 0,802$, zatímco hodnota tohoto koeficientu pro kolokalizaci fotosenzitizéru s mitochondriemi je $r = 0,894$.

Mandersonovy koeficienty popisují, že došlo k téměř stejnému překryvu jádra s fotosenzitizérem ($tM_2 = 0,9693$) jako fotosenzitizéru s jádrem ($tM_1 = 0,9276$), a zároveň byl zaznamenán větší překryv fotosenzitizéru s mitochondriemi ($tM_1 = 0,9655$) než mitochondrií s fotosenzitizérem ($tM_2 = 0,7505$).

Kolokalizace byla potvrzena i kolokalizační mapou a tečkovým diagramem (Obr. 38 G, H, I, J). Tečkové diagramy jsou v obou případech proloženy pozitivní přímkou lineární regrese s poměrně vysokou závislostí v případě kolokalizace fotosenzitizéru s jádrem (Obr. 38 H) a se spíše nižší závislostí v případě kolokalizace fotosenzitizéru s mitochondriemi (Obr. 38 J). Šipky znázorňují struktury v jádře, kde se lokalizuje fotosenzitizér a barvivo pro mitochondrie (Obr. A, B, C, D, F).



Obr. 38 Linie NIH3T3 s ozářením 5 J.cm^{-2}

A – DIC

B – Jádra

C – Mitochondrie

D – Fotosensitizér

E – Překryv kanálů

F – Detail překryvu

G – Kolokalizační mapa fotosensitizéru a jádra

H – Tečkový diagram fotosensitizéru a jádra

I – Kolokalizační mapa fotosensitizéru a mitochondrií

J – Tečkový diagram fotosensitizéru a mitochondrií

Pearsonův korelační koeficient pro fotosensitizér a jádro: $r = 0,802$

$tM_1 = 0,9276$; $tM_2 = 0,9693$

Pearsonův korelační koeficient pro fotosensitizér a mitochondrie: $r = 0,894$

$tM_1 = 0,9655$; $tM_2 = 0,7505$

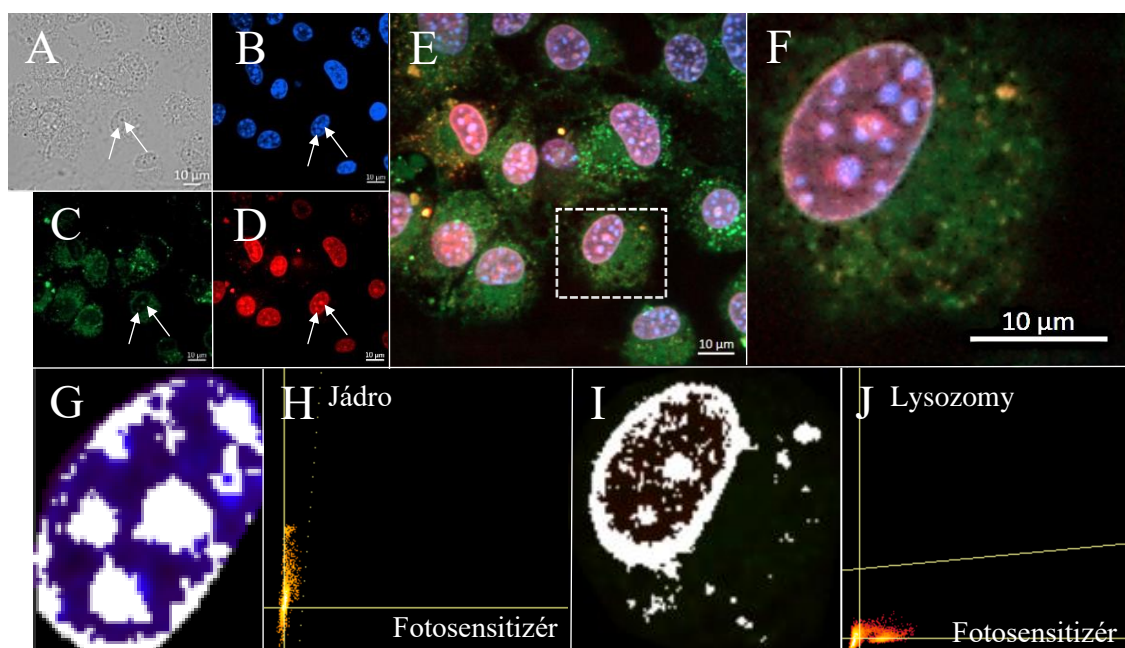
Snímky byly pořízeny Spinning disk konfokálním mikroskopem Yokogawa CSU-X1

A, B, C, D, F – Šipky poukazují na struktury v jádře, kde se hromadí fotosensitizér a barvivo pro mitochondrie

U nenádorové buněčné linie NIH3T3 byla pozorována po ozáření lokalizace fotosensitizeru zejména v buněčných jádrech, nicméně jeho určitá frakce byla zaznamenána i v lysozomech. Hodnota Pearsonova korelačního koeficientu pro kolokalizaci fotosensitizeru a jádra je $r = 0,507$, tedy poměrně vysoká. Zatímco hodnota tohoto koeficientu pro kolokalizaci fotosensitizeru s lysozomy je $r = 0,215$.

Mandersonovými koeficienty byl potvrzen téměř identický překryv fotosensitizeru s jádrem ($tM_1 = 0,8067$) jako jádra s fotosensitizerem ($tM_2 = 0,8322$), a zároveň byl zaznamenán větší překryv fotosensitizeru s lysozomy ($tM_1 = 0,6531$) než lysozomů s fotosensitizerem ($tM_2 = 0,4360$).

Kolokalizace byla potvrzena i kolokalizační mapou a tečkovým diagramem (Obr. 39 G, H, I, J). Tečkové diagramy jsou v obou případech proloženy pozitivní přímkou lineární regrese. V případě kolokalizace fotosensitizeru s jádrem (Obr. 39 H) lze pozorovat určitou závislost, nisméně v případě kolokalizace fotosensitizeru s lysozomy nelze zaznamenat téměř žádnou kolokalizaci, což jen potvrzuje velmi nízkou hodnotu Pearsonova korelačního koeficientu (Obr. 38 J). Struktury v jádre, kde se hromadí fotosensitizer a barvivo pro lysozomy, jsou označeny šipkami (Obr. A, B, C, D).



Obr. 39 Linie NIH3T3 s ozářením 5 J.cm^{-2}

A – DIC

B – Jádra

C – Lysozomy

D – Fotosenzitizér

E – Překryv kanálů

F – Detail překryvu

G – Kolokalizační mapa fotosenzitizéru a jádra

H – Tečkový diagram fotosenzitizéru a jádra

I – Kolokalizační mapa fotosenzitizéru a lysozomů

J – Tečkový diagram fotosenzitizéru a lysozomů

Pearsonův korelační koeficient pro fotosenzitizér a jádro: $r = 0,507$

$tM_1 = 0,8067$ $tM_2 = 0,8322$

Pearsonův korelační koeficient pro fotosenzitizér a lysozomy: $r = 0,215$

$tM_1 = 0,6531$; $tM_2 = 0,4360$

Snímky byly pořízeny Spinning disk konfokálním mikroskopem Yokogawa CSU-X1

A, B, C, D – Šipky poukazují na struktury v jádře, kde se hromadí fotosenzitizér a barvivo pro lysozomy

4 Diskuze

4.1 Měření produkce ROS a MTT test

4.1.1 Bez ozáření

Podle Patel *et al.* (2018) mají ROS dvojí působení. Prospěšný mód ROS je spojen s jejich vlivem na redoxní stav buněk, ale také se signální funkcí, kdežto ke škodlivým efektům ROS dochází při jejich nadměrné produkci vlivem nadbytku a/nebo nedostatečnosti endogenních antioxidantů. Kontroly (0 μM koncentrace fotosensitizeru) v grafech získaných z produkce ROS bez ozáření naznačují, že určité množství ROS je přirozeně přítomné v buňkách testovaných buněčných linií, aniž by došlo k ovlivnění intracelulárního prostředí buněk aplikací fotosensitizeru nebo jinou manipulací s buňkami (Obr. 14–16 A).

Po 24hodinové inkubaci buněčné linie HeLa s fotosensitizerem nebyl v porovnání s kontrolou zaznamenán téměř žádný nárůst ROS (Obr. 14). Následně provedeným MTT testem bylo zjištěno mírné snížení buněčné viability nezávisle na koncentraci. Tato redukce buněčné viability však nebyla v porovnání s kontrolou nijak výrazná. Velmi podobné výsledky byly zaznamenány i v případě buněčné linie G361, kde nenastal vůbec žádný nárůst ROS, zatímco buněčná viabilita snížena nezávisle na koncentraci (Obr. 15). Pozorovaná redukce buněčné viability G361 linie byla srovnatelná s linií HeLa. Podle těchto výsledků může být snížení buněčné viability zapříčiněno reakcí buněk na fyzickou manipulaci při aplikaci fotosensitizeru.

Použitím sondy H_2DCFDA však nebylo možné detekovat všechny typy ROS. Touto sondou je možné detekovat například peroxid vodíku, hydroxylové radikály nebo peroxyinitrit. Není však možná například detekce singletního kyslíku, který vzniká během druhého typu fotochemické reakce PDT. Výsledky naměřené pomocí této sondy tedy nelze pokládat za kompletní, proto byla detekce singletního kyslíku provedena v separátním experimentu pomocí sondy SOSG.

4.1.2 Po ozáření

Po ozáření byl u linie HeLa pozorován trend nárůstu ROS v závislosti na koncentraci (Obr. 17 A). MTT test ukázal výrazné snížení buněčné viability, které bylo závislé na koncentraci fotosensitizeru, přičemž u koncentrací 0,8–3,2 μM byla zaznamenána minimální hladina viability buněk, u které již nedošlo k další redukci (Obr. 17 B). U G361 linie je opět možné pozorovat nárůst ROS v závislosti na koncentraci fotosensitizeru (Obr. 18 A). Viabilita buněk zde byla výrazněji snížena až s vysokým nárůstem ROS

u koncentrací 0,8–3,2 μM (Obr. 18 B).

U NIH3T3 linie po ozáření došlo jen k minimálnímu nárůstu ROS v porovnání s nádorovými liniemi (17, 18, 19 A). Viabilita buněk této linie je, stejně jako v předešlých případech, výrazně snížena zejména při použití velmi vysokých koncentrací (Obr. 19 B).

Každá z testovaných buněčných linií se liší v citlivosti na fotodynamickou terapii. Všechny buněčné linie byly pěstovány v monovrstvách v *in vitro* podmínkách, což může také ovlivnit citlivost buněk k PDT. Podle Dos Santos *et al.* (2017) jsou zejména nenádorové buňky pěstované v monovrstvách citlivější na PDT než buňky kultivované za účelem formace sféroidu. Daná koncentrační řada fotosenzitizeru poskytuje určitou variaci v produkci ROS u testovaných buněčných linií. Například v případě hodnot IC_{50} byla zaznamenána podstatně vyšší hladina ROS u G361 buněčné linie v porovnání s liniemi HeLa a NIH3T3, kde byla hladina ROS srovnatelná.

4.2 Měření produkce singletního kyslíku

Fotodynamická terapie je postavena na tvorbě vysoce reaktivního singletního kyslíku, který vzniká v druhém typu fotochemické reakce interakcí fotosenzitizeru, světla a molekulárního kyslíku (Jarvi *et al.* 2012). Singletní kyslík, který patří do skupiny reaktivních forem kyslíku, má unikátní vlastnosti, díky kterým dochází k oxidativní modifikaci různých biomolekul (Davies, 2003). Navíc má roli jako primární mediátor nekrotické i apoptotické buněčné smrti způsobené PDT (Oleinick *et al.*, 2002; Redmond a Kochevar, 2006). Úkolem singletního kyslíku a dalších ROS, které naopak vznikají v prvním typu fotochemické reakce, je eliminace nežádoucích buněk. Hrají tedy poměrně velkou roli v efektivitě PDT. Samotná oxygenace tkáně je klíčová pro úspěšnou PDT a je potřeba jí věnovat stejnou pozornost, jako například distribuci fotosenzitizeru nebo optickým vlastnostem dané tkáně (Jarvi *et al.* 2012). Pro ověření, jaké množství singletního kyslíku je produkováno po ozáření byl navrhnout experiment pro tři testované buněčné linie, kde byl aplikován fotosenzitizer v dané koncentrační řadě, který byl po 24hodinové inkubaci aktivován. Pro porovnání byl proveden stejný experiment bez ozáření.

U detekce singletního kyslíku bez ozáření nebyl předpokládán žádný, případně pouze minimální nárůst. U nádorové linie HeLa byl pozorován nepatrný nárůst singletního kyslíku, který se zdá být závislý na koncentraci (Obr. 20 A). V případě nádorové linie byla hladina singletního kyslíku spíše konstantní v porovnání s kontrolou a pokud došlo ke zvýšení produkce singletního kyslíku, jednalo se pouze o minimální

změnu nezávislou na koncentraci fotosensitizeru (Obr. 20 B).

Po ozáření, tedy po aktivaci fotosensitizeru, který byl inkubován s buňkami 24 hodin, byl u všech buněčných linií pozorován markantní nárůst singletního kyslíku v závislosti na koncentraci fotosensitizeru. Trend nárůstu singletního kyslíku po ozáření byl srovnatelný u všech buněčných linií. V případě hodnot IC₅₀ byla naměřena porovnatelná hladina singletního kyslíku u všech testovaných buněčných linií (Obr. 21).

Podle Riethmüller *et al.* (2015) způsobuje intracelulární tvorba singletního kyslíku po PDT s Photofrinem, což je fotosensitizer druhé generace, buněčnou smrt nezávisle na tom, zda se jedná o nádorové či nenádorové buňky. Toto tvrzení částečně vysvětluje fakt, že v tvorbě singletního kyslíku nebyl pozorován žádný výrazný rozdíl mezi nádorovými liniemi a nenádorovou linií. Podle Kwiatkowski *et al.* (2018) se fotosensitizer akumuluje přednostně v nádorové tkáni. Lze tedy předpokládat, že v případě současného výskytu nádorových a zároveň i nenádorových buněk, by byl fotosensitizer vychytáván ve větším množství nádorovými buňkami. V takovém případě by bylo méně fotosensitizeru pohlceno nenádorovými buňkami a docházelo by tak k nižší produkci singletního kyslíku. Taktéž je známo, že vlivem disfunkčních mitochondrií nádorových buněk dochází ke zvýšené citlivosti těchto buněk na oxidativní stres, než je tomu u nenádorových buněk s přirozeně nižší hladinou ROS (Trachootham *et al.*, 2009).

Je také potřeba brát v úvahu limitace, které přináší produkce singletního kyslíku s použitím intracelulárního fotosensitizeru. Rozptyl světla buněčnými komponentami totiž znemožňuje určení přesné korelace mezi fotony, které se do buňky dostanou a fotony, u nichž dojde k absorpci. Dále může být kvantový výtěžek singletního kyslíku ovlivněn vazbou fotosensitizeru na proteiny, nebo samotnou agregací fotosensitizeru (Jarvi *et al.*, 2006; Snyder *et al.*, 2006; Pedersen *et al.*, 2010).

Za hlavní faktor, který způsobuje buněčnou smrt po ozáření, je považován singletní kyslík, který je generován fotochemickou reakcí druhého typu. Avšak i fotosensitizery, které generují ROS prostřednictvím prvního typu fotochemické reakce mohou být velmi efektivní (Ashur *et al.*, 2009). Fotosensitizery ale jen zřídka fungují pouze prostřednictvím jednoho typu fotochemické reakce. Daleko častěji dochází k tvorbě směsi singletního kyslíku a radikálů (Pattison *et al.*, 2012). Mnoho studií zdůrazňuje, že vysoká úspěšnost PDT tkví ve spolupráci ROS generovaných prvním typem fotochemické reakce (zejména O₂^{-•}, HO[•]) a singletního kyslíku, který je produkován druhým typem fotochemické reakce (Dąbrowski *et al.*, 2012). Dle výsledků uvedených v této diplomové práci se na snížení viability buněk po ozáření podílí jak

singletní kyslík produkovaný druhým typem fotochemické reakce, tak i jiné ROS produkované prvním typem fotochemické reakce.

4.3 Vliv jednotlivých složek PDT na morfologii buněk

Po ozáření může dojít k buněčné smrti několika způsoby. Velmi přitom záleží na typu fotosensitizeru, typu nádoru a jeho lokalizaci či použité hustotě energie. Obecně byla při PDT zaznamenána jak apoptóza, tak i nekróza. Nicméně, v některých studiích byla po ozáření zaznamenána i paraptóza, což je typ programované buněčné smrti odlišný od apoptózy či nekrózy. Avšak, stejně jako nekróza je paraptóza vyvolaná buněčným poškozením, konkrétně fotopoškozením endoplazmatického retikula. Typickým znakem pro tento typ buněčné smrti je vakuolizace cytoplazmy (Kessel, 2019).

Pro úspěšnou PDT je zapotřebí tří složek, a to fotosensitizeru, kyslíku rozpuštěného v buňkách a světla s příslušnou vlnovou délkou nutnou pro aktivaci fotosensitizeru. Pro potvrzení, že samostatná aplikace jednotlivých složek není zodpovědná za buněčnou smrt, byl proveden experiment s využitím mikroskopu s fázovým kontrastem. Na snímcích, kde nebyl aplikován fotosensitizer a zároveň nedošlo k ozáření, lze pozorovat ničím neovlivněné živé buňky u všech tří buněčných linií (22, 23, 24 A). Tyto buňky mají protáhlý adherentní tvar zvláště typický pro každou použitou buněčnou linii a jsou adherentní k plastové mikrotitrační desce. Na snímcích po ozáření 5 J.cm^{-2} po dobu 3 minut a 30 sekund lze u buněk linie HeLa a NIH3T3 pozorovat stejnou morfologii jako v případě vzorků bez aplikace fotosensitizeru a bez ozáření (Obr. 22, 24 B). Avšak, na snímku linie G361 se u několika buněk po ozáření vyskytuje typický morfologický projev buněčné smrti. Jedná se o váčkovité výrůstky, které vystupují z buněčné membrány. Tento znak je sice typický pro apoptózu, ale vyskytuje se i u počáteční fázi nekrózy. Vzhledem k tomu, že apoptóza je programovaná buněčná smrt, zatímco nekróza je výsledkem buněčného poškození, je velice pravděpodobné, že na snímku po ozáření je zachycena nekróza v počáteční fázi. Lze také zaznamenat kulovité buňky, které nejsou adherentní, a tedy došlo k jejich odumření. Tento jev je typický pro linii G361 a stejně jako tvorba váčků z membrány je výsledkem vyšší citlivosti této buněčné linie. Také byl zhodnocen vliv samostatné aplikace fotosensitizeru k jednotlivým buněčným liniím. Pro tento účel byla vybrána jednotná koncentrace $3,2 \text{ }\mu\text{M}$, která je výrazně vyšší než hodnota IC_{50} u jakékoli z použitých buněčných linií. U linie HeLa nebyla pozorována žádná morfologická změna buněk po pouhé aplikaci dané koncentrace fotosensitizeru (Obr. 22 C). Stejný výsledek

byl zaznamenán i u linie G361, nicméně u této linie se opět objevují i buňky s kulovitým tvarem, pro který je typická apoptóza (Obr. 23 C). U těchto buněk je velmi pravděpodobné, že došlo k buněčné smrti vlivem manipulace. U linie NIH3T3 došlo při dané koncentraci fotosensitizeru po 24hodinové inkubaci k jisté morfologické změně buněk v reakci na přítomnost dané látky. Tyto buňky jsou sice stále adherentní, nicméně je možné u nich pozorovat známky stresu jako je kulacení buněk, což je příčinou apoptózy (Obr. 24 C). I na tomto příkladu lze tedy pozorovat, že pokud nedochází k přednostní akumulaci fotosensitizeru v nádorových buňkách, které nebyly v této nenádorové linii přítomny, fotosensitizer se akumuluje i v nenádorových buňkách. Zároveň použitá koncentrace, která je přibližně 9krát vyšší než IC_{50} pro tuto linii, mohla způsobila u těchto buněk pozorované apoptotické změny.

Pouze v případě kombinace aplikace fotosensitizeru a jeho aktivace ozářením po 24hodinové inkubaci lze pozorovat výrazné morfologické změny buněk indikující probíhající buněčnou smrt způsobenou PDT (Obr. 22–24 D). Tyto snímky, které byly pořízeny přibližně hodinu po aktivaci fotosensitizeru, zachycují počáteční fázi nekrózy, tedy zejména zvětšené buněčné jádro a tvorbu vezikul u periferie buňky.

Nicméně, i PDT v *in vitro* a *in vivo* podmínkách se zásadně liší, a to zejména proto, že v *in vivo* podmínkách dochází k nerovnoměrné distribuci světla či nehomogenní akumulaci fotosensitizeru, což následně vede k různým buněčným odpovědím léčené tkáně (Mroz *et al.*, 2011).

4.4 Lokalizace a kolokalizace TMPyP

Zvýšenou pozornost je potřeba věnovat buněčné morfologii jádra a jadérka po ozáření. Jádro je vysoce organizovaná struktura, nicméně jaderné substrukтуры nejsou ohraničeny membránami, ale jsou drženy pohromadě interakcemi proteinů a nukleových kyselin. Nejvýraznější z těchto substruktur je jadérko. Jadérko je místem transkripce rDNA a rRNA, ale také zde dochází ke skládání a maturaci ribozomů a ribonukleoproteinů. Po barvení jader fluorescenčními DNA barvivy, jako je například Hoechst, lze jadérko pozorovat jako tmavý region mezi intenzivně zbarveným jaderným chromatinem. Je to způsobeno aktivní rDNA, která je rozprostřena v jadérku. V mnoha živočišných buňkách je jadérko popsáno jako trojdílná struktura s drobnými lehce zbarvenými regiony, které se nazývají fibrilární centra. Fibrilární centra hraničí s denzním fibrilárním komponentem, který je výrazně obarven. Zbytek jadérka je vyplněn granulárním komponentem (Shaw *et al.*, 1995; Shaw a Brown, 2012). Jadérko se řídí buněčným cyklem a rozpadá se

na konci G2 fáze s rozpadem jaderné membrány. K jeho složení dochází s počátkem rDNA transkripce následující G1 fáze (Hernandez-Verdun, 2011). Jadérko je tedy možné pozorovat jen v interfázi, tedy mimo buněčné dělení. Jádro lidské buňky obsahuje po mitóze až deset jadérek, které později splynou a jejich počet se tak sníží (Savino *et al.*, 2001). Jadérko má taktéž roli v odpovědi na stres (Boulon *et al.*, 2010). V několika studiích bylo zjištěno, že dráha zahrnující P53 byla vyvolána mnoha odlišnými ošetřeními, která byla zacílena na jadérko. Stresové podmínky, jako je například UV, hypoxie, tepelný šok, nukleotidová deplece nebo chemoterapeutické látky vyvolávají aktivaci P53 a tím i stres jadérka (Rubbi a Milner, 2003). Morfologie a velikost jadérka jsou spojeny s jeho aktivitou, která je pozměněna za stresových podmínek, kdy vykazuje vysokou škálu reorganizace. Mezi obecné morfologické změny, které byly pozorovány v souvislosti se stresem jadérka, patří redukce jeho velikosti a rozrušení, dále tvorba tzv. jadérkových čepiček či jadérkových kruhů a segregace, která je charakterizována kondenzací s následnou separací fibrilárního centra a granulárního komponentu společně s tvorbou jadérkových čepiček (Yang *et al.*, 2018).

V souvislosti s ozáření buněk po aplikaci fotosensitizeru lze u všech tří buněčných linií zaznamenat morfologické změny u jader. Jedná se o tvorbu jaderných struktur, které byly pozorované jen v případě experimentu po ozáření (Obr. 34–39 A, B, C, D). Je známo, že fotosensitizer TMPyP se po ozáření relokuluje z lysozomů/mitochondrií do jádra a jadérka a způsobuje jeho oxidaci (Tada-Oikawa S., 2009). Nicméně použitím barviva MitoTracker Green a LysoTracker Green DND–26 byl získán falešně pozitivní signál v již zmíněných strukturách jádra, který značil falešně pozitivní kolokalizaci TMPyP a mitochondrií/lysozomů. Tento artefakt se objevuje i v jiných studiích a může být způsoben pozitivním nábojem barviva, které se tak váže na záporný náboj nukleové kyseliny v jadérku. Také by se ale mohlo jednat o intranukleární inkluze, které byly pozorovány u mnoha nádorových i nenádorových linií a jsou spojeny se stresovou buněčnou morfologií. Bylo potvrzeno, že tyto intranukleární inkluze vznikají v reakci na chemické látky (Olitsky a Harford, 1937). Intranukleární inkluze jsou výsledkem invaginace jaderné membrány a dojde tak k pohlcení metabolicky neaktivního materiálu z cytoplazmy dovnitř jádra (Rose, 1964). Tímto způsobem, který je pravděpodobnější než vazba barviva na jadérko, by se tedy mohl dostat fotosensitizer, ale také barvivo na mitochondrie/lysozomy z cytoplazmy do jádra, kde zůstávají zapouzdřeny ve formě intranukleárních inkluzí. Tento trend byl ve vyšší míře pozorovatelný po ozáření, což může souviset s vyvoláním stresu ozářením, a

tedy i aktivací fotosensitizeru. Popisované buněčné struktury tedy mohou být jádérka, která jsou pozměněna vlivem buněčného stresu, anebo intranukleární inkluze obklopující fotosensitizer a barvivo pro lysozomy/mitochondrie.

Typ buněčné smrti po ozáření závisí na použitém fotosensitizeru a jeho koncentraci, hustotě energie při ozáření, subcelulární lokalizaci fotosensitizeru a typu buněk. Jelikož byla pro konfokální mikroskopii zvolena velmi vysoká koncentrace fotosensitizeru, je pravděpodobné, že po ozáření jsou buňky na snímcích zachyceny v procesu nekrózy. Mimo jiné morfologické znaky typické pro nekrotickou buňku je velmi dobrým ukazatelem i buněčné jádro. Buněčné jádro může při nekróze podstupovat například karyolýzu, kdy dochází k degradaci DNA a chromatin v jádře se tak vytrácí. Taktéž ale může docházet ke karyorhýze, kdy se buněčné jádro zmenšuje a rozpadá se až do úplného ztracení. Případně se může objevovat i pyknóza jádra, tedy jeho smrsknutí a kondenzace chromatinu (Kumar *et al.*, 2010). V případě experimentu bez ozáření byla u všech tří buněčných linií pozorována neporušená buněčná jádra (Obr. 28–33 B), což podporuje tvrzení, že u těchto buněk nedochází při pouhé aplikaci fotosensitizeru k buněčné smrti. Nicméně, pouhou hodinu po ozáření nebyla pozorována u jader těchto tří buněčných linií výrazná změna, která by indikovala nekrózu, tedy nebyla pozorovaná pyknóza ani karyolýza (Obr. 34–39 B). Pouze v případě nenádorové linie NIH3T3 byla pozorována jistá změna v morfologii jádra, která by mohla značit karyorhýzu (Obr. 38 F). V těchto případech nebyla pozorována ani apoptotická jádra. Avšak, určité morfologické změny buněk byly po ozáření pozorovány. Jedná se zejména o vakuolizaci cytoplazmy, která byla pozorována u všech buněčných linií po ozáření (Obr. 34–39 A).

Bez ozáření byla potvrzena kolokalizace fotosensitizeru v mitochondriích a lysozomech. Na základě provedených experimentů a následné kolokalizace lze pomocí hodnot Pearsonova korelačního koeficientu vyvodit, že fotosensitizer se nacházel u linie HeLa a NIH3T3 ve větším množství v lysozomech než v mitochondriích. Naopak u linie G361 byl zaznamenán ve větším množství v mitochondriích. Po ozáření se většina fotosensitizeru relokalizovala z mitochondrií/lysozomů do jader. Tento trend byl pozorován u všech tří studovaných buněčných linií. Zároveň hodnota Pearsonova korelačního koeficientu pro kolokalizaci fotosensitizeru s jádrem po ozáření se po zprůměrování ze dvou experimentů u těchto tří buněčných linií nacházela v rozmezí od $r = 0,43$ – $0,65$. U linie HeLa a NIH3T3 byla zaznamenána téměř stejná hodnota Pearsonova korelačního koeficientu u kolokalizace fotosensitizeru s lysozomy, nicméně ostatní hodnoty tohoto koeficientu se poměrně lišily v závislosti na použité buněčné linii.

Zejména u linie NIH3T3 byla Pearsonovým korelačním koeficientem zjištěna až 5krát vyšší lokalizace fotosensitizeru v mitochondriích, než je tomu u linie G361, a 3krát v porovnání s linií HeLa. Obecně lze z daných hodnot Pearsonova korelačního koeficientu vyvodit, že fotosensitizer se nacházel přibližně ve stejném množství v mitochondriích a v lysozomech u linie HeLa, zatímco u linie G361 bylo zjištěno asi o polovinu více fotosensitizeru v mitochondriích než v lysozomech a u Linie NIH3T3 bylo zaznamenáno 4krát více fotosensitizeru v mitochondriích v porovnání s lysozomy.

Byla tedy potvrzena lokalizace fotosensitizeru TMPyP v mitochondriích/lysozomech, a to bez ozáření i po ozáření. Stejný výsledek byl popsán i ve studii Zhu *et al.* (2015), kde byla zjištěna lokalizace fotosensitizeru H₂TMPyP jak v mitochondriích, tak i v lysozomech buněk nasofaryngeálního karcinomu. Lysozomální membrána se skládá zejména z glykoproteinů nesoucích záporný náboj, na který se tak váže TMPyP s kladným nábojem (Zhu *et al.*, 2015). Biologické membrány jsou obecně cílem PDT, což vede k buněčné smrti následkem lokálního oxidativního poškození. Je známo, že mitochondrie jsou zahrnuty v procesu apoptózy zprostředkované PDT tím, že akumulují fotosensitizer nebo aktivují vnitřní apoptotickou dráhu v reakci na poškození ostatních buněčných struktur (Almeida *et al.*, 2004; Nowis *et al.*, 2005). Ve studii Inada *et al.* (2007) bylo potvrzeno, že dochází k interakci mezi kationtovým porfyrinem TMPyP a záporně nabitou vnitřní mitochondriální membránou, což souhlasí s výsledky, které jsou uvedeny v této diplomové práci. Podle Kessel *et al.* (2000) navíc existuje po ozáření s fotosensitizerem, který se přednostně akumuluje v lysozomech, interakce mezi lysozomy a mitochondriemi vedoucí k uvolnění cytochromu *c* s následnou aktivací prokaspázy 3 vedoucí k apoptóze. Nicméně, lokalizace fotosensitizeru TMPyP byla potvrzena také v jádře, a to zejména po ozáření, což je pravděpodobně způsobeno asociací TMPyP s proteiny, které po oxidaci migrují do jádra (Patito *et al.*, 2001).

Lokalizace fotosensitizeru se u nenádorové linie NIH3T3 nelišila od národových linií HeLa a G361. Principem PDT je preferenční příjem fotosensitizeru nádorovými buňkami z důvodu jejich zrychlené metabolické aktivity, přičemž je fotosensitizer následně aktivován příslušnou vlnovou délkou světla (Dougherty *et al.*, 1998). Pokud je tedy akumulace fotosensitizeru v nádorových buňkách preferenční, znamená to, že v určité míře se daný fotosensitizer dostane i do nenádorových buněk. Nicméně, výsledky popsané v této diplomové práci byly získány z buněčných linií, které byly odděleně kultivovány v mikrotitračních deskách, a tedy zde nedocházelo k přednostnímu vychytávání fotosensitizeru nádorovými buňkami, přičemž do nenádorových buněk by se

dostala jen minimální část tohoto fotosensitizeru. Z tohoto důvodu byla tedy zaznamenána stejná lokalizace fotosensitizeru v nádorových i nenádorových buňkách.

Toxicita PDT závisí především na subcelulární lokalizaci fotosensitizeru (Oliveira *et al.*, 2011). Jelikož je singletní kyslík vysoce reaktivní, místo jeho produkce je zároveň i místem oxidativního poškození (Redmond a Kochevar, 2006). Je přitom vhodné, aby se fotosensitizer lokalizoval v mitochondriích, které obsahují vysoké koncentrace kyslíku (Kurokawa *et al.*, 2015). Bylo totiž zjištěno, že i nízká hladina singletního kyslíku produkovaného v mitochondriích je více toxická, než vysoká hladina singletního kyslíku v jádře (Rubio *et al.*, 2009). PDT v kombinaci s fotosensitizerem TMPyP je tedy považována za slibnou i z toho důvodu, že po aktivaci fotosensitizeru dochází k jeho částečné lokalizaci i v mitochondriích.

5 ZÁVĚR

Bylo potvrzeno, že určité množství ROS je přirozeně přítomné v buňkách. U buněk bez ozáření, tedy s pouhou aplikací fotosensitizeru, nebyl zaznamenán téměř žádný nárůst ROS, zatímco po ozáření byl pozorován trend nárůstu hladiny ROS u všech buněčných linií. Množství vznikajících ROS se liší v závislosti na testované buněčné linii. Zatímco u G361 linie byl v případě nejvyšší použité koncentrace zaznamenán nárůst ROS přibližně až o 350 %, u linie NIH3T3 byla hladina ROS zvýšena asi o 40 %. MTT testem bylo prokázáno snížení viability buněk po ozáření. Tato redukce životnosti buněk je závislá na použité koncentraci fotosensitizeru, a tedy i na vznikajících ROS. Po ozáření byl také zaznamenán markantní nárůst singletního kyslíku u všech buněčných linií. Tento nárůst se lišil mezi jednotlivými liniemi, nicméně u všech linií byl v případě nejvyšší použité koncentrace vyšší jak 100 %. Z naměřených dat je zřejmé, že singletní kyslík vzniká v souvislosti s aplikací fotosensitizeru TMPyP a s jeho následnou aktivací ozářením. Terapeutický účinek fotodynamické terapie je založen na tvorbě ROS, zejména pak na singletním kyslíku. Jelikož intracelulární tvorba singletního kyslíku způsobuje buněčnou smrt nezávisle na tom, zda se jedná o nádorovou či nenádorovou buněčnou linii, byla u všech testovaných buněčných linií MTT testem zjištěna značná redukce viability buněk. V *in vitro* podmínkách tedy nedošlo u nenádorové linie k preferenčnímu vychytávání fotosensitizeru nádorovými buňkami, což zapříčinilo snížení životnosti této linie po ozáření. Měření produkce ROS a singletního kyslíku byla tedy ověřena efektivita fotosensitizeru TMPyP na dané buněčné linie v *in vitro* podmínkách.

Po aplikaci jednotlivých složek PDT byla studována morfologie buněk daných linií v *in vitro* podmínkách. Samotný fotosensitizer nemůže vyvolat terapeutický účinek, a proto bez přítomnosti této látky a bez následného ozáření nedošlo k žádným změnám v buněčné morfologii ani u jedné z testovaných buněčných linií. Po ozáření bez přítomnosti fotosensitizeru nebyly pozorovány téměř žádné morfologické změny. Pouze v případě linie G361 bylo početně pozorovat počátek buněčné smrti prostřednictvím váčků tvořících se z buněčné membrány. Pouhá přítomnost fotosensitizeru bez jeho následné aktivace ozářením způsobila apoptotické změny pouze v případě nenádorové linie, což může být známkou její zvýšené citlivosti na přítomnost daného fotosensitizeru. Očekávané morfologické buněčné změny byly pozorovány po aplikaci fotosensitizeru a jeho následné aktivaci ozářením. Po ozáření dochází k buněčné smrti jak procesem apoptózy, tak i nekrózy. Nicméně vzhledem k poměrně vysoké koncentraci aplikovaného

fotosensitizeru a k ozáření monovrstvy buněk došlo především k indukci nekrózy s typickými morfologickými znaky jako je zvětšené buněčné jádro a bobtnatění plazmatické membrány.

Studium lokalizace fotosensitizeru bylo provedeno se zaměřením na mitochondrie, lysozomy a jádro buněk pomocí konfokální mikroskopie. Bez ozáření fotosensitizeru byla pozorována jeho lokalizace v mitochondriích i v lysozomech, nikoli však v jádře. Nicméně po ozáření má fotosensitizer tendenci se relokalizovat z mitochondrií a lysozomů do jádra, přičemž nebyl pozorován rozdíl mezi nádorovými liniemi a nenádorovou linií. Snímky, ze kterých byla získána tato data, byly pořízeny pouhou hodinu po aktivaci fotosensitizeru. Z tohoto důvodu byla zaznamenána i značná část fotosensitizeru v mitochondriích a lysozomech. Dále byly po ozáření pozorovány jisté morfologické změny buněk u všech buněčných linií. Jedná se především o intranukleární inkluze, které z cytoplazmy pohltily barvivo pro mitochondrie/lysozomy a fotosensitizer.

V této práci byly ověřeny účinky fotosensitizeru TMPyP na nádorové linie v porovnání s nenádorovou linií. Z výše uvedených výsledků lze tento fotosensitizer považovat za perspektivní pro fotodynamickou terapii. Nicméně pro určení, zda jsou jeho vlastnosti dostatečně vhodné pro léčbu nádorových onemocnění, jsou potřeba další *in vitro* i *in vivo* experimenty. Přínosem pro zvýšení účinnosti PDT v kombinaci s TMPyP by mohlo být využití liposomů jako nosičů fotosensitizeru nebo konjugace fotosensitizeru s protilátkami.

6 LITERATURA

- Agostinis P., Buytaert E., Breyskens H. (2004): Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. *Photochemical and Photobiological Sciences* **3**, 721-729.
- Allison R.R., Moghissi K. (2013): Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms. *Clinical Endoscopy* **46**, 24-29.
- 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**, 27-42.
- Almeida R.D., Manadas B.J., Carvalho A.P., Duarte C.B. (2004) Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta* **1704**, 59-86.
- Arnaut L.G., Pereira M.M., Dabrowski J.M., Silva E.F., Schaberle F.A., Abreu A.R., Rocha L.B., Barsan M.M., Urbanska K., Stochel G., Brett C.M. (2014): Photodynamic therapy efficacy enhanced by dynamics: the role of charge transfer and photostability in the selection of photosensitizers. *Chemistry* **20**, 5346-5357.
- Ashkenazi A. (2002): Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nature Reviews Cancer* **2**, 420-430.
- Ashur I., Goldschmidt R., Pinkas I., Salomon Y., Szweczyk G., Sarna T., Scherz A. (2009): Photocatalytic generation of oxygen radicals by the water-soluble bacteriochlorophyll derivative WST11, noncovalently bound to serum albumin. *The Journal of Physical Chemistry A* **113**, 8027-37.
- Azad M.B., Chen Y., Gibson S.B. (2009): Regulation of autophagy by reactive oxygen species (ROS): implications for cancer progression and treatment. *Antioxidants and Redox Signalling* **11**, 777-90.
- Azzouzi A.-R., Lebdaï S., Benzaghoul F., Stief C. (2015): Vascular-targeted photodynamic therapy with TOOKAD® Soluble in localized prostate cancer. Standardization of the procedure, *World Journal of Urology* **33**, 937-944.
- Bauer M.K., Vogt M., Los M., Siegel J. (1998) Role of reactive oxygen intermediates in activation-induced CD95 (APO-1/Fas) ligand expression. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 8048-8055.
- Berg K., Bommer J.C., Moan J. (1989): Evaluation of pulphonated aluminium phtalocyanines for use in photochemotherapy. Cellular uptake studies. *Cancer Letters* **44**, 7-15.
- Berlett B.S., Stadtman E.R. (1997): Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 20313-20316.
- Bezu L., Sauvat A., Humeau J., Gomes-da-Silva L.C., Iribarren K., Forveille S., Garcia P., Zhao L., Liu P., Zitvogel L., Senovilla L., Kepp O., Kroemer G. (2018): eIF2alpha phosphorylation is pathognomonic for immunogenic cell death. *Cell Death and Differentiation* **25**, 1375-1393.
- Bissa B., Beedle A.M., Govindarajan R. (2016): Lysosomal solute carrier transporters gain momentum in research. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **100**, 431-436.
- Boulon S., Westman B.J., Hutten S., Boisvert F.-M., Lamond A.I. (2010): The nucleolus under stress. *Molecular Cell* **40**, 216-227.
- Breitschopf K., Haendeler J., Malchow P., Zeiher A.M., Dimmeler S. (2000): Posttranslational modification of Bcl-2 facilitates its proteasome-dependent degradation: molecular characterization of the involved signaling pathway. *Molecular and Cellular Biology* **20**, 1886-1896.
- Buja L.M., Eigenbrodt M.L., Eigenbrodt E.H. (1993): Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* **117**, 1208-1214.
- Buytaert E., Callewaert G., Hendrickx N., Scorrano L., Hartmann D., Missiaen L., (2006): Role of endoplasmic reticulum depletion and multidomain proapoptotic BAX and BAK proteins in shaping cell death after hypericin-mediated photodynamic therapy. *FASEB Journal* **20**, 756-8.
- Buytaert E., Dewaele M., Agostinis P. (2007): Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta* **1776**, 86-107.
- Cairns R.A., Harris I.S., Mak T.W. (2011): Regulation of cancer cell metabolism. *Natural Reviews in Cancer* **11**, 85-95.

- Calfon M., Zeng H., Urano F. (2002): IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* **415**, 92-96.
- Carrara G., Saraiva N., Parsons M., Byrne B., Prole D.L., Taylor C.W., Smith G.L. (2015): Golgi anti-apoptotic proteins are highly conserved ion channels that affect apoptosis and cell migration. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 11785-11801.
- Carrera A.C. (2004): TOR signaling in mammals. *Journal of Cell Science* **117**, 4615-4616.
- Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R. (2005a): Mechanisms in photodynamic therapy: part two—cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2**, 1-23.
- Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R. (2005b): Mechanisms in photodynamic therapy: Part three—Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2**, 91-106.
- Castano A.P., Mroz P., Hamblin M.R. (2006): Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nature Reviews Cancer* **6**, 535-545.
- Chen Y., Millan-Ward E., Kong J., Israels S.J., Gibson S.B. (2008): Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. *Cell Death and Differentiation* **15**, 171-82.
- Chen Y., Lewis W., Diwan A., Cheng E.H.Y., Matkovich S.J., Dorn G.W. (2010): Dual autonomous mitochondrial cell death pathways are activated by Nix/BNIP3L and induce cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 9035-9042.
- Cheng M-J., Cao Y-G. (2017): TMPYP4 exerted antitumor effects in human cervical cancer cells through activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biological Research*, **50**:24 <https://biolres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40659-017-0129-4>.
- Chinnadurai G., Vijayalingam S., Gibson S.B. (2008): BNIP3 subfamily BH3-only proteins: Mitochondrial stress sensors in normal and pathological functions. *Oncogene* **27**, S114-S127.
- Chinnaiyan A. M., O'Rourke K., Tewari M., Dixit V. M. (1995): FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**, 505-512.
- Choromańska, J. Kulbacka, J. Saczko (2013): Photodynamic therapy – principles, mechanism, clinical applications. *Nowa Medycyna* **1**, 26-30.
- Cenklova V. (2017): Photodynamic therapy with TMPyP-Porphyrine induces mitotic catastrophe and microtubule disorganization in HeLa and G361 cells, a comprehensive view of the action of the photosensitizer. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*. **173**, 522-537.
- Cory S., Adams J.M. (1998): The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**, 1322-1326.
- Cory S., Adams J.M. (2002): The Bcl2 family: Regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer* **2**, 647-656.
- Costes S.V., Daelemans D., Cho E.H., Dobbin Z., Pavlakis G., Lockett S. (2004): Automatic and Quantitative Measurement of Protein-Protein Colocalization in Live Cells. *Biophysical Journal* **86**, 3993-4003.
- Cruz P.M.R, Mo H., McConathy W.J., Sabnis N., Lacko A.G. (2013): The role of cholesterol metabolism and cholesterol transport in carcinogenesis: a review of scientific findings, relevant to future cancer therapeutics. *Frontiers in Pharmacology* **4**, 119.
- Curry P.M., Levy J.G. (1993): Stress protein expression in murine tumor cells following photodynamic therapy with benzoporphyrin derivative. *Photochemistry and Photobiology* **58**, 374-379.
- Dabrowski J.M. (2017): Chapter Nine-Reactive Oxygen Species in Photodynamic Therapy: Mechanisms of Their Generation and Potentiation. *Advances in Inorganic Chemistry* **70**, 343-394.
- Dąbrowski J.M., Arnaut L.G., Pereira M.M., Urbańska K., Simões S., Stochel G., Cortes L. (2012): Combined effects of singlet oxygen and hydroxyl radical in photodynamic therapy with photostable bacteriochlorins: evidence from intracellular fluorescence and increased photodynamic efficacy in vitro. *Free Radical Biology and Medicine* **52**, 1188-200.

Dąbrowski J.M., Pucelik B., Regiel-Futyra A., Brindell M., Mazuryk O., Kyzioł A., Stochel G., Macyk W., Arnaut L.G. (2016): Engineering of relevant photodynamic processes through structural modifications of metallotetrapyrrolic photosensitizers. *Coordination Chemistry Reviews* **325**, 67-101.

Davis R.J. (1994): MAPKs: New JNK expands the group. *Trends in Biochemical Sciences* **19**, 470-473.

Davies M.J. (2003): Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **305**, 761-70.

De Rosa M.C., Crutchley R.J. (2002): Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews* **233-234**, 351-371.

Dewaele M., Maes H., Agostinis P. (2010): Ros-mediated mechanisms of autophagy stimulation and their relevance in cancer therapy. *Autophagy* **6**, 838-854.

Dewaele M., Martinet W., Rubio N., Verfaillie T., de Witte P. A., Piette J., Agostinis, P. (2011): Autophagy pathways activated in response to PDT contribute to cell resistance against ROS damage. *Journal of cellular and molecular medicine* **15**, 1402-1414.

Dos Santos A.F., Terra L.F., Wailemann R.A., Oliveira T.C., Gomes V.M., Mineiro M.F., Meotti F.C., Bruni-Cardoso A., Baptista M.S., Labriola L. (2017): Methylene blue photodynamic therapy induces selective and massive cell death in human breast cancer cells. *BMC Cancer* **17**, 194.

Dougherty TJ., Gomer C.J., Henderson B.W., Jori G., Kessel D., Korbek M., Moan J., Peng Q. (1998): Photodynamic Therapy. *Journal of National Cancer Institute* **90**, 889-905.

Du C., Fang M., Li Y., Li L., Wang X (1995): Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**, 33-42.

Earnshaw W. C. (1995): Nuclear changes in apoptosis. *Current Opinion in Cell biology* **7**, 337-343.

Enoksson M., Robertson J.D., Gogvadze V., Bu P., Kropotov A., Zhivotovsky B., Orrenius S. (2004): Caspase-2 permeabilizes the outer mitochondrial membrane and disrupts the binding of cytochrome c to anionic phospholipids. *Journal Biological Chemistry* **279**, 49575-49578.

Evans J.L., Maddux B.A., Goldfine I.D. (2005): The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. *Antioxidants and Redox Signalling* **7**, 1040-52.

Firczuk M., Nowis D., Gołab J. (2011): PDT-induced inflammatory and host responses. *Photochemical & Photobiological Sciences* **10**, 653.

Foster T.H., Primavera M.C., Marder V.J., Hilf R., Sporn L.A. (1991): Photosensitized release of von Willebrand factor from cultured human endothelial cells. *Cancer Research* **51**, 3261-6.

Fonseca S.M., Pina J., Arnaut L.G., Seixas de Melo J., Burrows H.D., Chattopadhyay N., Alcácer L., Charas A., Morgado J., Monkman A.P., Asawapirom U., Scherf U., Edge R., Navaratnam S. (2006): Triplet-state and singlet oxygen formation in fluorene-based alternating copolymers. *The Journal of Physical Chemistry B* **110**, 8278-8283.

Freitas de L.F., Hamblin M.R. (2016): Antimicrobial Photoinactivation with Functionalized Fullerenes. In: *Nanobiomaterials in Antimicrobial Therapy*. Vol 6, Applications of Nanobiomaterials (Grumezescu A.M.), Elsevier, Oxford, UK, 1-21.

Fuchs J. (2001): Environmental Stressors in Health and Disease. In: *Environmental Stressors in Health and Disease*. Vol 1, (Fuchs J., Packer L.), CRC Press, New York, USA.

Fujioka S., Niu J., Schmidt Ch., Sclabas G.M., Peng B., Uwagawa T., Li Z., Evans D.B., Abbruzzese J.L., Chiao P.J. (2004): NF- κ B and AP-1 Connection: Mechanism of NF- κ B-Dependent Regulation of AP-1 Activity. *American Society for Microbiology Journals* **24**, 7806-7819.

Fujimori J., Matsuo T., Shimose S., Kubo T., Ishikawa M., Yasunaga Y., Ochi M. (2011): Antitumor effects of telomerase inhibitor TMPyP4 in osteosarcoma cell lines. *Journal of Orthopaedic Research* **29**, 1707-1711.

Galluzzi L., Kepp O., Kroemer G. (2012): Enlightening the impact of immunogenic cell death in photodynamic cancer therapy. *The EMBO Journal* **31**, 1055-1057.

Garcia-Sampedro A., Tabero A., Mahamed I., Acedo P. (2019): Multimodal use of the porphyrin TMPyP: From cancer therapy to antimicrobial applications. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **23**, 1-17.

Garg A.D., Krysko D.V., Verfaillie T., Kaczmarek A., Ferreira G.B., Marysael T., Rubio N., Firczuk M., Mathieu C., Roebroek A.J., Annaert W., Golab J., de Witte P., Vandenamee P., Agostinis P. (2012): A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. *The EMBO Journal* **31**, 1062-1079.

Geiger P.G., Korytowski W., Girotti A.W. (1995): Photodynamically generated 3 β -hydroxy-5 α -cholest-6-ene-5-hydroperoxide: Toxic reactivity in membranes and susceptibility to enzymatic detoxification. *The Journal of Photochemistry and Photobiology* **62**, 580-7.

Geze M., Moliere P., Maziere J.C., Smith K.M., Santus R. (1993): Lysosomes, a key target of hydrophobic photosensitizers proposed for photochemotherapeutic applications. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **20**, 23-35.

Godar D.E. (1999): Light and death: photons and apoptosis. *Symposium Proceedings of Investigative Dermatology* **4**, 17-23.

Gomer C.J., Ryter S.W., Ferrario A., Rucker N., Wong S., Fisher A.M.R. (1996): Photodynamic therapy-mediated oxidative stress can induce expression of heat shock proteins. *Cancer Research* **56**, 2355-2360.

Gomes-da-Silva L.C., Zhao L., Bezu L., Zhou H., Sauvat A., Liu P., Durand S., Leduc M., Souquere S., Loos F., Mondragón L., Sveinbjörnsson B., Rekdal Ø., Boncompain G., Perez F., Arnaut L.G., Kepp O., Kroemer G. (2018): Photodynamic therapy with redaporfin targets the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *The EMBO journal*, **37**: e98354. doi:10.15252/emj.201798354.

Gong L., Ryu J.K., Kim B., Jang Y.J. (2012): DNA Mediated Energy Transfer from 4',6-Diamidino-2-phenylindole to tetra- and bis-cationic Porphyrins at Low Binding Densities. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **33**, 529-534.

Grand C.L., Han H., Muñoz R.M., Weitman S., Von Hoff D.D., Hurley L.H., Bearss D.J. (2002): The cationic porphyrin TMPyP4 down-regulates c-MYC and human telomerase reverse transcriptase expression and inhibits tumor growth in vivo. *Molecular Cancer Therapeutics* **1**, 565-573.

Guizzunti G., Seemann J. (2016): Mitotic Golgi disassembly is required for bipolar spindle formation and mitotic progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The USA* **113**, E6590-E6599.

Gunn J. M., Clark M. G., Knowles S. E., Hopgood M. F., Ballard F. J. (1977): Reduced rates of proteolysis in transformed cells. *Nature* **266**, 58-60.

Guo Y., Srinivasula S.M., Druilhe A., Fernandes-Alnemri T., Alnemri E.S. (2002): Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 13430-13437.

Hackbarth S., Islam W., Fang J., Šubr V., Röder B., Etrych T., Maeda H. (2019): Singlet oxygen phosphorescence detection in vivo identifies PDT-induced anoxia in solid tumors. *Photochemical & Photobiological Sciences* **18**, 1304-1314.

Hamblin M.R., Newman E.L. (1994): Photosensitizer targeting in photodynamic therapy. II. Conjugates of haematoporphyrin with serum lipoproteins. *The Journal of Photochemistry and Photobiology B* **26**, 147-157.

Harding H.P., Zhang Y., Bertolotti A., Zeng H., Ron D. (2000): Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Molecular Cell* **5**, 897-904.

Haze K., Yoshida H., Yanagi H., Yura T., Mori K. (1999): Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Molecular Biology of the Cell* **10**, 3787-3799.

Hernandez-Verdun D. (2011): Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle. *Nucleus* **2**, 189-194.

Hsu H., Xiong J., Goeddel D. (1995): The TNF receptor-associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation. *Cell* **81**, 495-504.

Hu J., Tang Y., Elmenoufy A.H., Xu H., Cheng Z., Yang X., (2015): Nanocomposite-Based

- Photodynamic Therapy Strategies for Deep Tumor Treatment. *Small* **11**, 5860-Fsmith5887.
- Huang Z., Xu H., Meyers A.D., Musani A.I., Wang L., Tagg R., Barqawi A.B., Chen Y.K. (2008): Photodynamic therapy for treatment of solid tumors—potential and technical challenges. *Technology in Cancer Research & Treatment* **7**, 309-320.
- Hunt A., Evan G. (2001): Till death us do part. *Science* **293**, 1784-1785.
- ImageJ: https://imagej.net/Colocalization_Analysis#Colocalization_Threshold (9. 4. 2020).
- Inada N.M., da Silva A.R., Jorge R.A., Borecký J., Vercesi A.E. (2007): Irradiated cationic mesoporphyrin induces larger damage to isolated rat liver mitochondria than the anionic form. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **457**, 217-224.
- Jarvi M.T., Niedre M.J., Patterson M.S., Wilson B.C. (2006): Singlet Oxygen Luminescence Dosimetry (SOLD) for Photodynamic Therapy: Current Status, Challenges and Future Prospects. *Photochemistry and Photobiology* **82**, 1198-1210.
- Jarvi M.T., Patterson M.S., Wilson B.C. (2012): Insights into photodynamic therapy dosimetry: simultaneous singlet oxygen luminescence and photosensitizer photobleaching measurements. *Biophysical journal* **102**, 661-671.
- Jiang H.-Y., Wek R.C. (2005): Phosphorylation of the α -subunit of the eukaryotic initiation factor-2 (eIF2 α) reduces protein synthesis and enhances apoptosis in response to proteasome inhibition. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 14189-14202.
- Jollivet F., Raposo G., Dimitrov A., Sougrat R., Goud B., Perez F. (2007): Analysis of de novo Golgi complex formation after enzyme-based inactivation. *Molecular Biology Cell* **18**, 4637-4647.
- Jori G., Beltramini M., Reddi E., Salvato B., Pagnan A., Ziron L. (1984): Evidence for major role of plasma lipoproteins as hematoporphyrin carriers in vivo. *Cancer Letters* **26**, 291-7.
- Juarranz A., Espada J., Stockert J.C., Villanueva A., Polo S., Dominguez V., Canete M. (2001): Photodamage induced by Zinc(II)-phthalocyanine to microtubules, actin, alpha-actinin and keratin of HeLa cells. *Photochemistry and Photobiology* **73**, 283-289.
- Kalka K., Merk H., Mukhtar H. (2000): Photodynamic therapy in dermatology. *Journal of the American Academy of Dermatology* **42**, 389-413.
- Kehrer J.P. (2000): The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* **149**, 43-50.
- Kennedy J.C., Marcus S.L., Pottier R.H. (1996): Photodynamic therapy (PDT) and photodiagnosis (PD) using endogenous photosensitization induced by 5-aminolevulinic acid (ALA): mechanisms and clinical results. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery* **14**, 289-304.
- Kessel D. (2019): Photodynamic Therapy and Paraptosis: An Update. In: *Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XXVIII*. Vol. 10860, (Kessel F.H., Hasan T.), SPIE BiOS, San Francisco, California, U.S.A, 1-5.
- Kessel D., Oleinick N.L. (2010): Photodynamic therapy and cell death pathways. In: *Methods in Molecular Biology*. (Gomer S.), vol. 635, Humana Press, Totowa, NJ, 35-46.
- Kessel D., Luo Y., Mathieu P., Reiners J.J. (2000): Determinants of the apoptotic response to lysosomal photodamage. *Photochemistry and Photobiology* **71**, 196-200.
- Kessel D., Poretz R.D. (2000): Sites of photodamage induced by photodynamic therapy with a chlorin e6 triacetoxymethyl ester (CAME). *Photochemistry and Photobiology* **71**, 94-96.
- Kessel D., Thompson P., Saatio K., Nanturi K.D. (1987): Tumor localization and photosensitization by sulfonated derivatives of tetraphenylporphyrine. *Photochemistry and Photobiology* **45**, 787-90.
- Kiffin R., Christian C., Knecht E., Cuervo A.M. (2004): Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. *Molecular Biology of The Cell* **15**, 4829-40.
- Kim H.R., Luo Y., Li G., Kessel D. (1999): Enhanced apoptotic response to photodynamic therapy after bcl-2 transfection. *Cancer Research* **59**, 3429-3432.
- Kimmelman A.C., White E. (2017): Autophagy and Tumor Metabolism. *Cell Metabolism* **25**, 1037-1043.
- Kisen G. Ø., Tessitore L., Costelli P., Gordon P.B., Schwarze Per E., Baccino F.M., Seglen Per O. (1993): Reduced autophagic activity in primary rat hepatocellular carcinoma and ascites

hepatoma cells. *Carcinogenesis* **14**, 2501-2505.

Kitsis R.N., Molkentin J.D. (2010): Apoptotic cell death “Nixed” by an ER–mitochondrial necrotic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 9031-9032.

Klionsky D.J. (2005): The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *Journal of Cell Science* **118**, 7-18.

Klouček V. (2007): *Kolokalizační míry ve fluorescenční mikroskopii*. Diplomová práce, Masarykova Univerzita Brno, Česká republika.

Klumpp S., Krieglstein J. (2002): Serine/threonine protein phosphatases in apoptosis. *Current Opinion in Pharmacology* **2**, 458-462.

Kramer A., Liashkovich I., Oberleithner H., (2010): Caspase-9-dependent decrease of nuclear pore channel hydrophobicity is accompanied by nuclear envelope leakiness. *Nanomedicine* **6**, 605-611.

Krammer B. (2001): Vascular effects of photodynamic therapy, *Anticancer Research* **21**, 4271-4277.

Kroemer G., El-Deiry W.S., Golstein P., Peter M.E., Vaux D., Vandenabeele P., Zhivotovskiy B., Blagosklonny M.V., Malorni W., Knight R.A., Piacentini M., Nagata S., Melino G. (2005): Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death and Differentiation* **12**, 1463-1467.

Krysko D., Garg A., Kaczmarek A. (2012): Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* **12**, 860-875.

Kondo Y., Kanzawa T., Sawaya R., Kondo S. (2005): The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *National Reviews Cancer* **5**, 726-734.

Kübler A.C. (2005): Photodynamic Therapy. *Medical Laser Application* **20**, 37–45.

Kumar V., Abbas A.K., Aster J.C., Fausto N. (2010): Cellular Responses to Stress and Toxic Insults: Adaptation, Injury, and Death. In: *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. 8th edition, (Kumar V., Saunders/Elsevier), Philadelphia, U.S.A, 12-41.

Kurokawa H., Ito H., Inoue M., Tabata K., Sato Y., Yamagata K. (2015): High resolution imaging of intracellular oxygen concentration by phosphorescence lifetime. *Scientific Reports* **5**, 10657.

Kwiatkowski S., Knap B., Przystupski D., Saczko J., Kędzierska E., Knap-Czope K., Kotlińska J., Michel O., Kotowski K., Kulbacka J. (2018): Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **106**, 1098-1107.

Lane D.P. (1992): p53, guardian of the genome. *Nature* **358**, 15-16.

Lavie G., Kaplinsky C., Toren A., Aizman I., Meruelo D., Mazur Y., Mandel M. A (1999): photodynamic pathway to apoptosis and necrosis induced by dimethyl tetrahydroxyhelianthron and hypericin in leukaemic cells: Possible relevance to photodynamic therapy. *British Journal of Cancer* **79**, 423-432.

Lee A.-H., Iwakoshi N.N., Glimcher L.H. (2003): XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Molecular and Cellular Biology* **23**, 7448-7459.

Lemasters J. J., Nieminen A. L., Qian T., Trost L. C., Elmore S. P., Nishimura Y., (1998): The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta* **1366**, 177-196.

Letai A., Bassik M.C., Walensky L.D., Sorcinelli M.D., Weiler S., Korsmeyer S.J. (2002): Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* **2**, 183-192.

Li Z., Zhang W. (2016): The 2016 Albert Lasker Basic Medical Research Award: Oxygen sensing—a mysterious process essential for survival. *Science China Life Sciences* **59**, 1195-1197.

Li H., Zhu H., Xu C.-J., Yuan J. (1998): Cleavage of BID by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway to apoptosis. *Cell* **94**, 491-501.

Liang X.H., Jackson S., Seaman M., Brown K., Kempkes B., Hibshoosh H., Levine B. (1999): Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* **402**, 672-676.

Lin M. T., Beal M. F. (2006): Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* **443**, 787-795.

Loewith R., Jacinto E., Wullschlegel S., Lorberg A., Crespo J.L., Bonenfant D., Oppliger W., Jenoe P., Hall M.N. (2002): Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Molecular Cell* **10**, 457-468.

Luksiene Z. (2003): Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. *Medicina (Kaunas, Lithuania)* **39**, 1137–1150.

Luo D., Carter K.A., Miranda D., Lovell J.F. (2017): Chemophototherapy: an emerging treatment option for solid tumors. *Advanced Science*, 1600106. <https://doi.org/10.1002/advs.201600106>.

Liu C.L., Chen S.F., Wu M.Z., Jao S.W., Lin Y.S., Yang C.Y., Lee T.Y., Wen L.W., Lan G.L., Nieh S. (2016): The molecular and clinical verification of therapeutic resistance via the p38 MAPK-Hsp27 axis in lung cancer. *Oncotarget* **7**, 14279-14290.

Malhotra J.D., Kaufman R.J. (2007): The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **18**, 716-731.

Manders E. M. M., Verbeek F. J., Aten J. A. (1993): Measurement of Co-localization of Objects in Dual-Color Confocal Images. *Journal of Microscopy* **169**, 375-382.

Martinou J.-C., Desagher J.-C., Antonsson B., Antonsson B. (2000): Cytochrome c release from mitochondria; all or nothing. *Nature Cell Biology* **2**, E41-E43.

Mathew R., Karantza-Wadsworth V., White E. (2007): Role of autophagy in cancer. *National Reviews Cancer* **7**, 961-967.

Melino G., de Laurenzi V., Vousden K.H. (2002): p73: friend or foe in tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer* **2**, 605-615.

Mikami-Terao Y., Akiyama M., Yuza Y., Yanagisawa T., Yamada O., Kawano T., Agawa M., Ida H., Yamada H. (2009): Antitumor activity of TMPyP4 interacting G-quadruplex in retinoblastoma cell lines. *Experimenta Eye Research* **89**, 200-208.

Miller D.K., Griffiths E., Lenard J., Firestone R.A. (1983): Cell killing by lysosomotropic detergents, *Journal of Cell Biology* **97**, 1841-1851.

Moan J., Berg K., Kvam E., Western A., Malik Z., Ruck A., Schneckenburger H. (1989): Intracellular localization of photosensitizers. In: *Photosensitizing compounds: their chemistry, biology and clinical use*. Vol. 146, (Bock G., Harnett S.), Wiley and Sons, New York, USA, 95-111.

Moor A.C.E. (2000): Signalling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* **57**, 1-13.

Mroz P., Yaroslavsky A., Kharkwal B.G., Hamblin M.R. (2011): Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer. *Cancers* **3**, 2516-2539.

Murphy D. (2001): Differential interference contrast (DIC) microscopy and modulation contrast microscopy. In: *Fundamentals of Light Microscopy and Digital Imaging*. (Sluder and Wolf, Shotton, John Wiley and sons), New York, U.S.A., 153-168.

Nagata S. (2000): Apoptotic DNA Fragmentation. *Experimental Cell Research* **256**, 12-18.

Nagaya T., Nakamura Y.A., Choyke P.L., Kobayashi H. (2017): Fluorescent-guided surgery. *Frontiers in Oncology*, **7**:314

<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2017.00314>.

Noda T., Ohsumi Y. (1998): Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 3963-3966.

Nowak-Stepniowska A., Pergoł P., Padzik-Graczyk A. (2013): Photodynamic method of cancer diagnosis and therapy—mechanisms and application. *Postepy Biochemii* **59**, 53-63.

Nowis D., Makowski M., Stokłosa T., Legat M., Issat T., Golab J. (2005): Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta Biochimica Polonica* **52**, 339-352.

Ockleford C. (1995): The confocal laser scanning microscope (CLSM). *The Journal of Pathology* **176**, 1-2.

Ogier-Denis E., Codogno P. (2003): Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* **1603**, 113-128.

Ogilby P.R. (2010): Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun. *Chemical Society Reviews* **39**, 3181-3209.

- Oleinick N.L. (1998): Apoptosis in response to photodynamic therapy. *Photodynamic News* **1**, 6-9.
- Oleinick N.L., Morris R.L., Belichenko I. (2002): The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochemical and Photobiological Sciences* **1**, 1-21.
- Olitsky P.K., Harford C.G. (1937): Intracellular Inclusion Bodies in the Tissue Reactions Produced by Injections of Certain Foreign Substances. *The American Journal of Pathology* **13**, 729.
- Oliveira C.S., Turchiello R., Kowaltowski A.J., Indig G.L., Baptista M.S. (2011): Major determinants of photoinduced cell death: Subcellular localization versus photosensitization efficiency. *Free Radical Biology and Medicine* **51**, 824-33.
- Oltvai Z.N., Millima C.L., Kosmeyer S.J. (1993): Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with the conserved homologue, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**, 609-619.
- Ormond B.A., Freeman H.S. (2013): Dye sensitizers for photodynamic therapy. *Materials* **6**, 817-840.
- Oszajca M., Brindell B., Orzeł L., Dąbrowski J.M., Śpiewak K., Łabuz P., Pacia M., Stochel-Gaudyn A., Macyk W., van Eldik R., Stochel G. (2016): Mechanistic studies on versatile metal-assisted hydrogen peroxide activation processes for biomedical and environmental incentives. *Coordination Chemistry Reviews* **327**, 143-165.
- Papandreou I., Krishna C., Kaper F., Cai D., Giaccia A.J., Denko N.C. (2005): Anoxia is necessary for tumor cell toxicity caused by a low-oxygen environment. *Cancer Research* **65**, 3171-3178.
- Patel R., Rinker L., Peng J., Chilian W. M. (2018): Reactive Oxygen Species: The Good and the Bad. In: *Reactive Oxygen Species (ROS) in Living Cells*. (C. Filip, E. Albu, Eds.), IntechOpen, Ohio, U.S.A, 8-20.
- Pattison DI, Rahmanto AS, Davies MJ (2012): Photo-oxidation of proteins. *Photochemical and Photobiological Sciences* **11**, 38-53.
- Patito I.A., Rothmann C., Malik Z. (2001): Nuclear transport of photosensitizers during photosensitization and oxidative stress. *Biology of the Cell* **93**, 285-291.
- Pedersen B.W., Breitenbach T., Redmond R.W., Ogilby P.R. (2010): Two-photon irradiation of an intracellular singlet oxygen photosensitizer: achieving localized subcellular excitation in spatially-resolved experiments. *Free Radical Research* **44**, 1383-1397.
- Pelicano H., Carney D., Huang P. (2004): ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resistance updates* **7**, 97-110.
- Pizova K., Bajgar R., Fillerova R., Kriegová E., Cenklová V., Langova K., Konecny P., Kolarova H. (2015): C-MYC and C-FOS expression changes and cellular aspects of the photodynamic reaction with photosensitizers TMPyP and ClAlPcS2. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* **142**, 186-196.
- Plaetzer K., Kiesslich T., Verwanger T., Krammer B. (2003): The modes of cell death induced by PDT: an overview. *Medicinal Laser Application* **18**, 7-19.
- Proskuryakov S.Y., Gabai V.L. (2010): Mechanisms of tumor cell necrosis. *Current Pharmaceutical Design* **16**, 56-68.
- Pucelik B, Arnaut LG, Stochel G, Dabrowski JM (2016) Design of pluronicbased formulation for enhanced redaporfin-photodynamic therapy against pigmented melanoma. *ACS Applied Materials and Interfaces* **8**, 22039-22055.
- Raymond B. (1999): Photodynamic therapy in historical perspective. *Reviews in contemporary pharmacotherapy* **10**, 1-14.
- Redmond R.W., Kochevar I.E. (2006): Spatially resolved cellular responses to singlet oxygen. *Photochemistry and Photobiology* **82**, 1178-1186.
- Reginato E., Wolf P., Hamblin M.R. (2014): Immune response after photodynamic therapy increases anti-cancer and anti-bacterial effects. *World Journal of Immunology* **4**, 1-11.
- Reiners J.J.Jr., Agostinis P., Berg K., Oleinick N.L., Kessel D. (2010): Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy. *Autophagy* **6**, 7-18.
- Rha S.Y., Izbiccka E., Lawrence R., Davidson K., Sun D., Moyer M.P., Roodman G.D., Hurley L., Von Hoff D. (2000): Effect of telomere and telomerase interactive agents on human

tumor and normal cell lines. *Clinical Cancer Research* **6**, 987-993.

Riethmüller M., Burger N., Bauer G. (2015): Singlet oxygen treatment of tumor cells triggers extracellular singlet oxygen generation, catalase inactivation and reactivation of intercellular apoptosis-inducing signaling. *Redox biology* **6**, 157-168.

Robertson C.A., Evans D.H., Abrahamse H. (2009): Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **96**, 1-8.

Robertson J.D., Gogvadze V., Orrenius S. (2004): Processed caspase-2 can induce mitochondria-mediated apoptosis independently of its enzymatic activity. *The EMBO Journal* **5**, 643-648.

Rocha L.B., Gomes-da-Silva L.C., Dabrowski J.M., Arnaut L.G. (2015): Elimination of primary tumours and control of metastasis with rationally designed bacteriochlorin photodynamic therapy regimens. *European Journal of Cancer* **51**, 1822-1830.

Ron D., Walter P. (2007): Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**, 519-529.

Roos W.P., Kaina B. (2006): DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends in Molecular Medicine* **12**, 440-450.

Rose G.G. (1964): Nuclear folds versus intranuclear inclusions in tissue cultures. *Journal of the Royal Microscopical Society* **83**, 377-390.

Rubbi C.P., Milner J. (2003): Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. *The EMBO Journal* **22**, 6068-6077.

Rubio N., Fleury S.P., Redmond R.W. (2009): Spatial and temporal dynamics of in vitro photodynamic cell killing: extracellular hydrogen peroxide mediates neighbouring cell death. *Photochemical and Photobiological Sciences* **8**, 457-464.

Rufo N., Garg A.D., Agostinis P. (2017): The unfolded protein response in immunogenic cell death and cancer immunotherapy. *Trends in Cancer* **3**, 643-658.

Sakharov D.V, Bunschoten A, van Weelden H., Wirtz W.A.K. (2003): Photodynamic treatment and H₂O₂ - induced oxidative stress result in different patterns of cellular protein oxidation. *European Journal of Biochemistry* **270**, 4859-4865.

Saggi S., Hung H.-I., Nieminen A.-L. (2012): Lysosomal Signaling Enhances Mitochondria-Mediated Photodynamic Therapy in A431 Cancer Cells: Role of Iron. *Photochemistry and Photobiology* **88**, 461-468.

Savino T.M., Gébrane-Younès J., Mey De J., Sibarita J.-B., Hernandez-Verdun D. (2001): Nucleolar Assembly of the Rrna Processing Machinery in Living Cells. *Journal of Cell Biology* **153**, 1097-1110.

Schafer F.Q., Buettner G.R. (1999): Singlet oxygen toxicity is cell line-dependent: a study of lipid peroxidation in nine leukemia cell lines. *Photochemistry and Photobiology* **70**, 858-867.

Schmitt F., Juillerat-Jeanneret L. (2012): Drug targeting strategies for photodynamic Therapy. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **12**, 500-525.

Schroder M., Kaufman R.J. (2005): The mammalian unfolded protein response. *Annual Review of Biochemistry* **74**, 739-789.

Sedlářová M. (2010). Botanika UPOL, <http://www.botanika.upol.cz/atlas/confmicro/principles.php> (3. 4. 2020).

Semenza G.L. (2001): Hypoxia-inducible factor 1: Regulator of mitochondrial metabolism and mediator of ischemic preconditioning. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1813**, 1263-1268.

Senge M.O, Davis M. (2010): Porphyrin (porphine) — A neglected parent compound with potential. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **14**, 557-567.

Senger D.R., Galli S.J., Dvorak A.M., Perruzzi C.A., Harvey V.S., Dvorak H.F. (1983): Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* **219**, 983-5.

Shammas M.A., Shmookler Reis R.J., Akiyama M., Koley H., Chauhan D., Hideshima T., Goyal R.K., Hurley L.H., Anderson K.C., Munshi N.C. (2003): Telomerase inhibition and cell growth arrest by G-quadruplex interactive agent in multiple myeloma. *Molecular Cancer*

Therapeutics **2**, 825-833.

Shamas-Din A., Kale J., Leber B., & Andrews D. W. (2013): Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **5**:a008714 <https://cshperspectives.cshlp.org/content/5/4/a008714>.

Shaw P., Brown J. (2012): Nucleoli: Composition, Function, and Dynamics. *Plant Physiology* **158**, 44-51.

Shaw P.J., Highett M.I., Beven A.F., Jordan E.G. (1995): The nucleolar architecture of polymerase I transcription and processing. *The EMBO Journal* **14**, 2896-2906.

Sibata C.H., Colussi V.C., Oleinick N.L., Kinsella T.J. (2001): Photodynamic therapy in oncology. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* **2**, 1-11.

Siskind L.J., Kolesnick R.N., Colombini M. (2002): Ceramide channels increase the permeability of the mitochondrial outer membrane to small proteins. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 26796-26803.

Smith A.M., Mancini M.C., Nie S. (2009): Bioimaging: second window for in vivo imaging. *Nature Nanotechnology* **4**, 710-711.

Snyder J.W., Lambert J.D.C., Ogilby P.R. (2006): 5,10,15,20-Tetrakis(N-Methyl-4-Pyridyl)-21H,23H-Porphine (TMPyP) as a Sensitizer for Singlet Oxygen Imaging in Cells: Characterizing the Irradiation-Dependent Behavior of TMPyP in a Single Cell. *Photochemistry and Photobiology* **82**, 177-184.

Soares H.T., Campos J.R., Gomes-da-Silva L.C., Schaberle F.A., Dabrowski J.M., Arnaut L.G. (2016): Pro-oxidant and Antioxidant Effects in Photodynamic Therapy: Cells Recognise that Not All Exogenous ROS Are Alike. *ChemBiochem. A European Journal of Chemical Biology* **17**, 836-42.

Sobolev A.S., Jans D.A., Rozenkranz A.A. (2000): Targeted intracellular delivery of photosensitizers. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **73**, 51-90.

Sorrentino V., Menzies K.J., Auwerx J. (2018): Repairing Mitochondrial Dysfunction in Disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **58**, 353-389.

Sperandio F.F., Huang Y.-Y., Hamblin M.R. (2013): Antimicrobial photodynamic therapy to kill Gram-negative bacteria. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery* **8**, 108-120.

Sundaresan M., Yu Z.-X., Ferrans V. J., Irani K., Finkel T. (1995): Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* **270**, 296-9.

Szaciłowski K., Macyk W., Drzewiecka-Matuszek A., Brindell M., Stochel G. (2005): Bioinorganic photochemistry: frontiers and mechanisms. *Chemical Reviews* **105**, 2647-2694.

Tada-Oikawa S., Oikawa S., Hirayama J., Hirakawa K., Kawanishi S. (2009): DNA Damage and Apoptosis Induced by Photosensitization of 5,10,15,20-Tetrakis (N-methyl-4-pyridyl)-21H,23H-porphyrin via Singlet Oxygen Generation. *Photochemistry and Photobiology* **85**, 1391-1399.

Tita S.P.S., Perussi J.R. (2001): The effect of porphyrins on normal and transformed mouse cell lines in the presence of visible light. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **34**, 1331-1336.

Trachootham D., Alexandre J., Huang P. (2009): Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms. A radical therapeutic approach? *Nature Reviews Drug Discovery* **8**, 579-591.

Uchiyama A., Kim J.S., Kon K., Jaeschke H., Ikejima K., Watanabe S., Lemasters J.J. (2008): Translocation of iron from lysosomes into mitochondria is a key event during oxidative stress-induced hepatocellular injury. *Hepatology* **48**, 1644-1654.

Vara-Perez M., Felipe-Abrio B., Agostinis P. (2019): Mitophagy in Cancer: A Tale of Adaptation. *Cells*, **8**:493. <https://doi.org/10.3390/cells8050493>.

Verhagen A. M., Ekert P.G., Pakusch M., Silke J., Connolly L.M., Reid G.E., Moritz R.L., Simpson R.J., Vaux D.L. (2000): Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to an antagonizing IAP protein. *Cell* **102**, 43-53.

Verheij M., Bose R., Lin X.H., Yao B., Jarvis W.D., Grant S., Birrer M.J., Szabo E., Leonard I.Z., Kyriakis J.M., Haimovitz-Friedman A., Fuks Z., Kolesnick R.N. (1996): Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* **380**, 75-79.

Vatanserver F., de Melo W.C., Avci P., Vecchio D., Sadasivam M., Gupta A., Chandran R.,

Karimi M., Parizotto N.A., Yin R. (2013): Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species-bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. *FEMS Microbiology Reviews* **37**, 955-989.

Villa E., Proics E., Rubio-Patino C., Obba S., Zunino B., Bossowski J.P., Rozier R.M., Chiche J., Mondragon L., Riley J.S. (2017): Parkin-Independent Mitophagy Controls Chemotherapeutic Response in Cancer Cells. *Cell Reports* **20**, 2846-2859.

Villanueva A., Jori G. (1993): Pharmacokinetic and tumour-photosensitizing properties of the cationic porphyrin meso-tetra (4N-methylpyridyl) porphine. *Cancer Letters* **73**, 59-64.

Vittar N.B.R., Awruch J., Azizuddin K., (2010): Caspase-independent apoptosis, in human MCF-7c3 breast cancer cells, following photodynamic therapy, with a novel water-soluble phthalocyanine. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **42**, 1123-1131.

Vrouenraets M.B., Visser G.W.M., Snow G.B., Dongen van G.A.M.S. (2003): Basic principles, applications in oncology and improved selectivity of photodynamic therapy. *Anticancer Research* **23**, 505-522.

Wagner E.F., Nebreda A.R. (2009): Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature Reviews Cancer* **9**, 537-549.

Weishaupt K., Gomer C.G., Dougherty T. (1976): Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photo-in-activation of murine tumor. *Cancer Research* **36**, 2326-2329.

Weyergang A., Berg K., Kaalhus O., Peng Q., Selbo P.K. (2009): Photodynamic therapy targets the mTOR signaling network in vitro and in vivo. *Molecular Pharmaceutics* **6**, 255-64.

Wen S., Zhu D., and Huang P. (2013): Targeting cancer cell mitochondria as a therapeutic approach. *Future Medicinal Chemistry* **5**, 53-67.

Wu J., Rutkowski D.T., Dubois M. (2007): ATF6 α optimizes long-term endoplasmic reticulum function to protect cells from chronic stress. *Developmental Cell* **13**, 351-364.

Yamamoto K., Sato T., Matsui T. (2007): Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6 α and XBP1. *Developmental Cell* **13**, 365-376.

Yang Z., Klionsky D. J. (2009): An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Current topics in microbiology and immunology* **335**, 1-32.

Yang K., Yang J., Yi J. (2018): Nucleolar Stress: hallmarks, sensing mechanism and diseases. *Cell Stress* **2**, 125-140.

Zapletalova H., Tomankova B.K., Malohlava J., Vujtek M., Kolarikova H. (2016): Combination of Atomic Force Microscopy and Comet Assay for Analysis of DNA Damage Induced by PDT. *Lékař a technika* **46**, 83-90.

Zhivotovsky B., Samali A., Gahm A., Orrenius S. (1999): Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death and Differentiation* **6**, 644-651.

Zhou C.N. (1989): Mechanisms of tumor necrosis induced by photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* **3**, 299-318.

Zhou Z., Song J., Nie L., Chen X. (2016): Reactive oxygen species generating systems meeting challenges of photodynamic cancer therapy. *Chemical Society Reviews* **45**, 6597-6626.

Zhu S., Wu F., Wang K., Zheng Y., Li Z., Zhang X., Wong W.-K. (2015): Photocytotoxicity, cellular uptake and subcellular localization of amidinophenylporphyrins as potential photodynamic therapeutic agents: An in vitro cell study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **25**, 4513-4517.

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

A	Absorpce
AIF	Apoptózu indukující faktor
Akt–mTOR	Protein kináza B / savčí cíl rapamycinu
AP1	Aktivátorový protein 1
Apaf–1	Apoptotický proteázový aktivační faktor 1

APO2L/TRAIL	Apo2 ligand / TNF apoptózu indukující ligand
ATF6	Aktivovaný transkripční faktor 6
Atg	Geny spojené s autofagií
Atg5	Autophagy related gene 5
Atg6/Vps30	S autofagií spojený gen 6/ vakuolární třídící protein 30
ATM	Ataxia telangiectasia mutovaný protein
ATR	Ataxia telangiectasia příbuzný protein
BAD	BCL-2 antagonist buněčné smrti
BALB/c	Bagg a Albino myš
BAX	Bcl-2 asociovaný protein X
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BCL-X _L	B-cell lymphoma extra large
BECN1	Bcl-2 interagující genový produkt
BH	Bcl-2 homology
BID	Bcl-2 interacting-domain death agonist
CDAMPs	Molekulární vzory asociované s buněčnou smrtí
CHK1/2	Checkpoint kináza 1/2
CMA	Autofagie zprostředkovaná chaperony
CM-H ₂ DCFDA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát
CLSM	Konfokální laserová skenovací mikroskopie
DAMPs	Molekulární vzory asociované s poškozením
DCF	2',7'-dichlorofluorescein
DIC	Diferenční interferenční kontrast
DISC	Death inducing signalling complex
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxid
E2F1	Transkripční faktor
eIF2 α	Eukaryotický translační faktor 2- α
EIF2AK3	Kináza 3 eukaryotického translačního faktoru 2- α
EIF2AK1	Kináza 1 eukaryotického translačního faktoru 2- α
ERAD	Degradace spojená s endoplazmatickým retikulem
ERK	Extracelulární signálem regulovaná kináza
F	Fluorescence
FADD	FAS associated death domain
FAS	Apoptózu stimulující fragment
FasL	Fas ligand
GAAP	Golgiho anti-apoptotický protein
G361	Buněčná linie lidského melanomu
GRP78	Glukosou regulovaný protein 78
HDL	Vysokodenzitní lipoproteiny
HeLa	Buněčná linie lidských epiteliálních buněk z nádoru děložního hrdla
HIF	Hypoxií inducibilní faktor
Hsp	Proteiny teplotního šoku
IAP	Inhibitory apoptózy
IC	Vnitřní konverze
IC ₅₀	Inhibiční koncentrace s 50% účinkem
ISC	Intersystémový přechod
IRE1	Inositol vyžadující enzym 1
JNK	C-Jun N-terminální kináza
LED	Světlo emitující diody
LDL	Nízkodenzitní lipoproteiny
M ₁ /M ₂	Mandersonův koeficient 1 / Mandersonův koeficient 2
tM1/tM2	Mandersonovy koeficienty využívající hodnotu prahu
MAPK	Mitogen aktivovaná protein kináza
MBR	Membrane binding region

MCF-7	Buněčná linie nádoru prsu
MKP1	Mitogen aktivovaná protein kináza fosfatáza 1
MPTP	Mitochondriální pór přechodné propustnosti
MS-2	Myeloidní fibrosarkom
MTT	Thiazolyl blue tetrazolium bromid
mTORC1	Komplex 1 cílu rapamycinu u savčích buněk
NA	Numerická apertura
NF-κB	Nukleární faktor κB
NF-κ1	Transkripční faktor NFκB a AP-1
NIH3T33	Buněčné linie myších fibroblastů
Nix/BNip3L	Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa interagující protein 3
NOXA	Protein indukovaný forbol-12-myristát-13-acetátem
P	Fosforescence
P21	Inhibitor cyklin-dependentních kináz
P53	Tumor supresorový protein
P73	Tumor supresorový protein
PBS	Phosphate buffered saline
PDT	Fotodynamická terapie
PS	Fotosensitizer
PUMA	P53 nadregulovaný modulátor apoptózy
<i>r</i>	Pearsonův korelační koeficient
ROS	Reaktivní formy kyslíku
S ₀	Základní energetický stav
S _{1,2,3}	Excitovaný singletní stav
SAPK	Stresem aktivovaná protein kináza
SLC	Transportér rozpustných nosičů
SMAC/DIABLO	Second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of Apoptosis-binding protein with low pI
SOSG	Singlet oxygen sensor green
T ₁	Excitovaný tripletní stav
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
TMPyP	5,10,15,20 - Tetrakis (1 - methyl - 4 - pyridinio) porphyrin tetra (<i>p</i> -toluenesulfonát)
Tor	Proteinový cíl rapamycinu
TORC1/2	Proteinový cíl rapamycinu komplex 1/2
TRADD	TNFR-associated death domain
UPR	Signální dráha nesbalených proteinů
VEGF	Vaskulární endoteliální růstový faktor
VR	Vibrační relaxace
XBP1	X-box vázající protein 1
¹ Δ _g	Singletní excitační stav 1 molekulárního kyslíku
¹ Σ _g ⁺	Singletní excitační stav 2 molekulárního kyslíku
³ Σ _g ⁻	Tripletní stav molekulárního kyslíku