



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

**Fotodynamické vlastnosti nových
heterocyklických sloučenin a jejich účinky
na lidské nádorové buněčné linie**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Alena Opichalová**
Studijní program: B1501 Experimentální biologie
Studijní obor: Experimentální biologie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **Mgr. Eva Řezníčková, Ph.D.**
Termín odevzdání práce: 2024

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Alena Opichalová
Název práce	Fotodynamické vlastnosti nových heterocyklických sloučenin a jejich účinky na lidské nádorové buněčné linie
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Eva Řezníčková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2024
Abstrakt	

Fotodynamická terapie je léčebná metoda využívající fotosenzitivní látky a světelného záření k léčbě řady maligních onemocnění. V terapii je využita tvorba reaktivních forem kyslíku v nádorových tkáních vedoucí k usmrcení buněk. V současné době je výzkum zaměřen hlavně na hledání nových fotosenzitivních látek, a dále také na hledání účinných mechanismů aktivního cílení na nádorové buňky, za účelem snížení nežádoucích účinků léčby.

V praktické části byl zkoumán fotodynamický účinek fotosenzitivní látky **8656** na buněčnou linii MCF-7. Byl potvrzen její cytotoxický účinek v závislosti na intenzitě ozáření modrým světlem o vlnové délce 414 nm, za kterým pravděpodobně stojí reaktivní formy kyslíku, jejichž produkce působením testované látky **8656** v kombinaci s ozářením byla prokázána. Analýza exprese proteinů pomocí imunoblottingu a sledování morfologie buněk odhalila výskyt různých druhů buněčných smrtí po aplikaci látky a světla. Výsledky naznačují potenciál látky **8656** pro fotodynamickou terapii rakoviny prsu.

Klíčová slova	fotodynamická terapie, rakovina prsu, reaktivní formy kyslíku, heterocyklická sloučenina
Počet stran	60
Počet příloh	0
Jazyk	Český (anglický)

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Alena Opichalová
Title of thesis	Photodynamic properties of novel heterocyclic compounds and their effects on human cancer cell lines
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Eva Řezníčková, Ph.D.
The year of presentation	2024

Abstract

Photodynamic therapy is a therapeutic method that uses photosensitive substances and light radiation to treat several malignant diseases. The therapy uses the production of reactive oxygen species in tumor tissues, leading to cell death. Currently, research is mainly focused on the development of new photosensitizing agents, as well as on the search for effective mechanisms to actively target cancer cells to reduce the side effects of treatment.

In the experimental part, the photodynamic effect of photosensitizer **8656** was investigated in the MCF-7 cell line. Its cytotoxic effect was confirmed to be dependent on the intensity of irradiation with blue light of 414 nm wavelength, which is probably due to reactive oxygen species, the production of which was demonstrated by the test substance **8656** in combination with irradiation. Analysis of protein expression by immunoblotting and observation of cell morphology revealed different types of cell death after treatment with the substance and light. The results suggest the potential of substance **8656** for photodynamic therapy of breast cancer.

Keywords	photodynamic therapy, breast cancer, reactive oxygen species, heterocyclic compound
Number of pages	60
Number of appendices	0
Language	Czech (English)

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské 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

Alena Opichalová

Podpis:

Ráda bych vyjádřila upřímné poděkování Mgr. Evě Řezníčkové, Ph.D., za její odborné vedení práce, cenné rady a vstřícnost, kterou projevila vždy, když jsem potřebovala pomoc. Děkuji také všem členům laboratoře za jejich podporu a rady. Velké díky patří rovněž Katedře experimentální biologie za poskytnutou příležitost vypracovat mou bakalářskou práci na tomto pracovišti.

Poděkování dále patří Ing. Gabrielė Varvuolytė a prof. Algirdasu Šačkusovi z Kaunas University of Technology v Litvě a dr. Astė Žukauskaitė, Ph.D. z Katedry chemické biologie, Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci za poskytnutí testovaných látek a MUDr. Petru Müllerovi, Ph.D. z Masarykova onkologického ústavu v Brně za poskytnutí buněk MCF-7-HSF1-mCherry.

Bakalářská práce byla podpořena Univerzitou Palackého v Olomouci (IGA_PrF_2024_005) a projektem Národního ústavu pro výzkum rakoviny (Program EXCELES, ID: LX22NPO5102) financovaného Evropskou unií – Next Generation EU.

Obsah

1. Úvod a cíle práce	8
2. Fotodynamická terapie	9
2.1. Historie fotodynamické terapie	9
2.2. Mechanismus účinku	10
2.2.1. Reakce typu I	12
2.2.2. Reakce typu II	12
2.3. Buněčná smrt ve fotodynamické terapii	13
2.3.1. Apoptóza	14
2.3.2. Nekróza	16
2.3.3. Autofagie	17
2.4. Zdroje záření	18
2.5. Fotosenzitizéry	20
2.5.1. Příklady klinicky schválených a používaných fotosenzitizérů	22
2.6. Rakovina prsu a fotodynamická terapie	24
3. Praktická část	26
3.1. Materiál	26
3.1.1. Chemikálie	26
3.1.2. Roztoky	27
3.1.3. Biologický materiál	28
3.1.4. Protilátky	29
3.1.5. Testované látky	29
3.1.6. Přístrojové vybavení a příslušenství	30
3.2. Metody	31
3.2.1. Měření absorpčních a fluorescenčních spekter zkoumaných látek	31
3.2.2. Kultivace nádorových buněk MCF-7	31
3.2.3. MTT test	31
3.2.4. Detekce reaktivních forem kyslíku	32
3.2.5. Detekce stresových tělísek HSF1 v jádře buněk pomocí fluorescenční mikroskopie	32
3.2.6. Imunoblotting	33
4. Výsledky a diskuse	35
4.1. Absorpční a fluorescenční spektra testovaných látek	35
4.2. Analýza cytotoxicity látek pomocí MTT testu	37

4.3. Morfologie buněk	38
4.4. Produkce ROS.....	40
4.1. Analýza exprese proteinů pomocí imunoblottingu.....	41
4.2. Jaderná stresová tělíska	44
5. Závěr.....	47
Zkratky.....	49
Reference.....	51

1. Úvod a cíle práce

Rakovina je rozsáhlá skupina onemocnění vyznačující se nekontrolovaným růstem buněk. Celosvětově je onkologické onemocnění jednou z nejčastějších příčin úmrtí, s téměř 10 miliony obětí v roce 2022. Po rakovině plic je druhým nejběžnějším onkologickým onemocněním rakovina prsu, která představuje jedno z nejzávažnějších onemocnění žen po celém světě (Ferlay et al., 2021). Navzdory pokroku v diagnostice a léčbě zůstává rakovina prsu stále významnou příčinou úmrtí. S narůstajícím povědomím o individuálním charakteru této nemoci se stává stále naléhavější potřeba hledat inovativní a efektivní terapeutické přístupy s minimálními vedlejšími účinky.

Mezi slibné terapeutické metody patří fotodynamická terapie, která kombinuje aplikaci fotosenzitizéru s následným ozářením světlem o vhodné vlnové délce. Tímto způsobem je selektivně cíleno na rakovinné buňky, přičemž se minimalizuje poškození okolních tkání a systémové vedlejší účinky. Právě schopnost minimalizovat negativní dopady na pacienty a zachovat kvalitu jejich života činí z této metody atraktivní alternativu v léčbě rakoviny prsu.

Cílem této bakalářské práce bylo vypracovat literární rešerši na téma fotodynamická terapie a její využití v léčbě maligních onemocnění. Tato rešerše zahrnovala studium mechanismu působení fotodynamické terapie, aktuálně používané fotosenzitizéry a jejich účinky, a také vhodné zdroje záření, které jsou klíčové pro účinnost této terapeutické metody. Cílem experimentální části bakalářské práce pak bylo stanovit fotodynamické účinky nových heterocyklických sloučenin na lidské nádorové buněčné linie odvozené od karcinomu prsu. Byly využity vybrané biologické a biochemické metody, včetně práce s tkáňovými kulturami, stanovení cytotoxicity, imunoblotting a měření reaktivních forem kyslíku, které jsou klíčové pro posouzení účinků fotodynamické terapie na rakovinné buňky. Posledním cílem práce bylo zanalyzovat a zpracovat získaná data a začlenit je do kontextu s publikovanými pracemi.

2. Fotodynamická terapie

Fotodynamická terapie (PDT) je léčebná metoda používající světlo s vhodnou vlnovou délkou a lokalizovanou světlo-senzitivní látku, známou jako fotosenzitizér (PS), k léčbě mnoha vážných nemocí. Fotodynamická terapie pomáhá v současné chvíli s léčbou jak nemaligních, tak maligních onemocnění, jako je například rakovina plic, jícnu, melanomy a nádory mozku. Příkladem nemaligních onemocnění pak může být věkem podmíněná makulární degenerace, ateroskleróza a psoriáza (Josefsen & Boyle, 2008).

V případě maligního onemocnění může být fotodynamická terapie použita samostatně, jako primární léčebný přístup, nebo v kombinaci s jinou konvenční léčbou (chemoterapie, radioterapie, operace a imunoterapie). Pokud je PDT kombinována s dalšími léčebnými postupy, jako je již zmiňovaná chemoterapie, radioterapie a imunoterapie, může přinést ještě lepší výsledky než samotná PDT, nebo konvenční metody. Tímto způsobem se nejen ušetří na dávkách léků, ale také se sníží riziko vedlejších účinků a může se dosáhnout ještě efektivnějšího a účinnějšího výsledku ve srovnání se samostatným využitím PDT (Gunaydin et al., 2021).

PDT vyžaduje tři klíčové složky – kyslík, PS a viditelné světlo. PS zůstává neaktivní, dokud není vystaven specifické vlnové délce světla, která ho aktivuje. Pokud je aktivován určeným druhem světla, pak interaguje s molekulárním kyslíkem, který je uvnitř buněk, a vytváří reaktivní formy kyslíku. Reaktivní formy kyslíku jsou velmi cytotoxické. Jsou schopné způsobit nejen poškození buněk, ale i mikrovaskulární poškození, což přispívá k další likvidaci maligních buněk (Hopper 2000).

2.1. Historie fotodynamické terapie

Světlo jako takové je používáno k léčbě po staletí. První zmínky o použití světla můžeme najít již ve Starověkém Egyptě, Indii nebo Číně, kde se používalo k léčbě psoriázy, křivice, vitiliga, rakoviny kůže, a dokonce i psychózy (Ackroyd et al. 2001). Starověká egyptská kultura využívala kombinace extraktu z anýzu velkého (*Amni majus*) a slunečního světla k léčbě leukodermie. Hlavní účinná látka obsažená v této rostlině, psoralen, je dodnes využívána ve výzkumu i terapii této nemoci (Josefsen & Boyle, 2008). Starověcí Řekové také používali

slunečních paprsků k léčbě nemocí, a to především prostřednictvím helioterapie, tedy vystavení celého těla slunci. Za otce terapie sluncem je považován Hérodotos, který vyzdvihoval význam slunění k obnovení celkového zdraví (Ackroyd et al. 2001).

V osmnáctém a devatenáctém století se léčba světlem dostala i do Francie. Zde ji využívali převážně při léčbě tuberkulózy, křivice a svalové slabosti. O pokrok ve fototerapii se dále zasloužil dánský lékař Niels Finsen, který zjistil, že červené světlo zabránilo u léčby neštovic vzniku hnisavých puchýřků. Dále se také podílel na demonstraci fototerapie při léčbě kožní tuberkulózy (lupus vulgaris) pomocí světelného záření. Finsen byl za tento objev oceněn Nobelovou cenou v oboru fyziologie a lékařství v roce 1903 (Ackroyd et al. 2001).

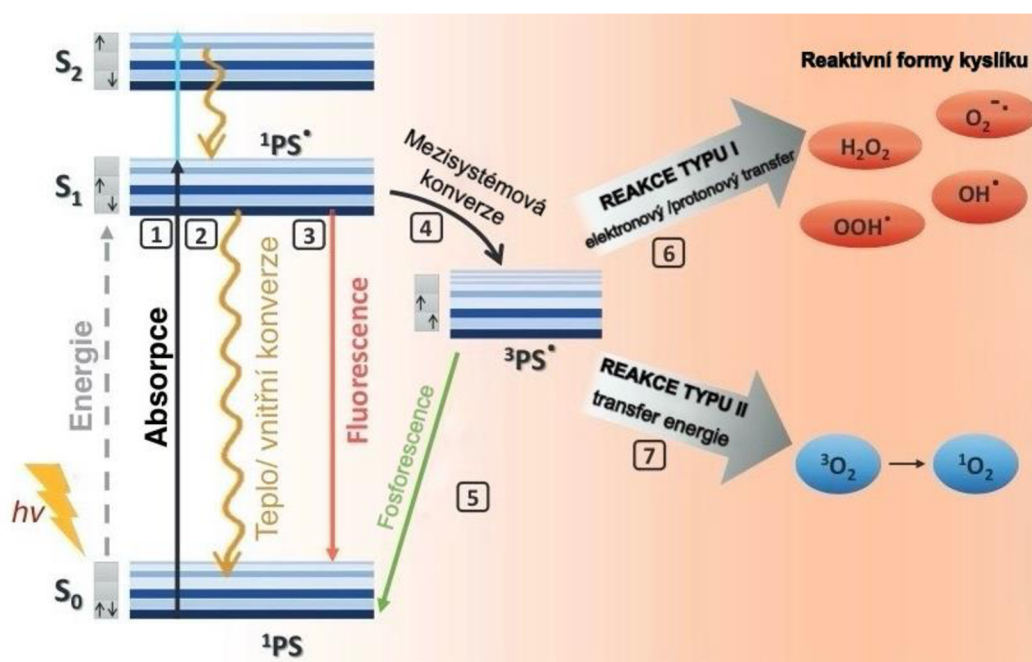
Fotodynamická terapie, jako ji známe dnes, se jako léčebná strategie objevila až v počátcích 20. století. Mezi první klinické aplikace patřilo využití hematoporphirinu (HpD) při léčbě rakoviny močového měchýře (Kelly et al., 1975). V roce 1978 doktor Dougherty s kolegy publikovali klinickou studii, ve které zkoumali účinky PDT na 25 pacientech s primární i sekundární rakovinou kůže. I když se u těchto pacientů po podání látky HpD objevila nepříjemná kožní reakce na světlo, studie prokázala, že PDT může být účinná při léčbě nádorů v případech, kde konvenční léčba selhala (Dougherty et al., 1978).

Od roku 1978 byla publikována spousta studií, které dokazovaly účinnost fotodynamické terapie u různých typů nádorů. Zejména kožní nádory se ukázaly jako ideální pro léčbu pomocí PDT, právě díky své poloze a snadné aplikaci světla (Ackroyd et al., 2001). I přes známé úspěchy PDT jsou stále zkoumány nové sloučeniny a přístupy, které by mohly zlepšit její účinnost v klinické onkologii.

2.2. Mechanismus účinku

V rámci fotodynamické terapie je pacientovi podávána senzibilizující látka, známá jako fotosenzitizér (PS). Tato látka může být aplikována různými způsoby, například intravenózně nebo lokálně na kůži. Způsob podání velmi ovlivňuje distribuci v těle, a tedy i konečnou účinnost. (Dolmans et al., 2003; Yanovsky et al., 2019). Po podání PS je látce umožněno difundovat a nahromadit se v buňkách nádoru. Tkáň je následně ozářena světlem o vlnové délce

korespondující s absorpčním spektrem PS. Časové rozmezí mezi podáním PS a následným ozářením je dáno druhem PS. Při ozáření dochází k absorpci fotonu, což způsobuje přechod jednoho elektronu PS z nízkoenergetického singletového stavu S^0 do excitovaného singletového stavu S^1 . PS se v S^1 stavu nemůže účastnit reakce s buňkami, protože singletový stav PS má velmi krátkou životnost. Aby se elektron vrátil do původního stavu, může vyzářit získanou energii ve formě fluorescence, nebo uvolnit teplo vnitřní přeměnou. Alternativně může excitovaný singletový stav projít intersystémovým přechodem za tvorby relativně dlouhotrvajícího excitovaného tripletového stavu T^1 . Právě tento tripletový stav PS je pro fungování fotodynamické terapie klíčový. Tripletový stav látky může přímo reagovat s buňkami pomocí dvou různých typů reakcí – reakce typu I a II. (Foote, 1991; Chilakamarthi & Giribabu, 2017; Kwiatkowski et al., 2018).



Obrázek 1: Mechanismus fotodynamické reakce. Fotosenzitizér (PS) se hromadí v nádorových buňkách, absorbuje fotony ($h\nu$) ze zdroje světla o vhodné vlnové délce a přechází do krátkotrvajícího excitovaného stavu (1PS) 1]. 1PS může ztrácet energii vnitřní konverzí na teplo 2 nebo vyzařováním světla fluorescencí 3. 1PS by se také mohl přeměnit na dlouhotrvající excitovaný tripletový stav (3PS) prostřednictvím procesu mezisystémové konverze 4. Kromě schopnosti návratu do singletového stavu (1PS) emisí světla (fosforescence) 5 může 3PS zahájit dva druhy reakcí se sousedními molekulami 6, 7. Výsledkem reakce typu I. 6 je přenos elektronu nebo protonu 3PS a vznik kyslíkových radikálů. Tyto radikály mohou interagovat s buněčným kyslíkem a vytvářet cytotoxické reaktivní formy kyslíku (ROS). Fotochemická reakce typu II 7 iniciuje přenos tripletové energie 3PS na molekulární kyslík, což vede ke vzniku singletového kyslíku (1O_2), který je silným oxidačním činidlem. (Mishchenko et al. 2022). upraveno

2.2.1. Reakce typu I

Excitovaný tripletový stav PS přenáší energii přímo na biomolekuly v jeho okolí. Mezi tripletovým stavem PS a rakovinnou tkání se přenáší elektron, což umožňuje produkci reaktivního kyslíku ve formě superoxidu, peroxidu vodíku či jiných kyslíkových radikálů jako je hydroxylový radikál. Superoxid je molekula, která obvykle není příliš aktivní a sama o sobě nezpůsobuje oxidativní poškození v buňkách. Může však reagovat s jinými molekulami za tvorby reaktivnějších forem kyslíku (ROS) a tím přispívat k poškození buněk. Při reakci dvou molekul superoxidu a vodíku vzniká peroxid vodíku a kyslík pomocí enzymu superoxiddismutázy. Tato reakce se nazývá dismutace a je důležitá právě pro tvorbu peroxidu vodíku. Superoxid může také reagovat s enzymy, jako je železnatá nebo manganová superoxiddismutáza, které také katalyzují konverzi superoxidu na peroxid vodíku a kyslík (Castano et al. 2004).

Peroxid vodíku je důležitým reaktivním druhem kyslíku. Jestliže peroxid vodíku interaguje s železnatým kationtem, který se nachází ve všech buňkách, vzniká hydroxylový radikál. Hydroxylový radikál je jednou z nejvíce reaktivních molekul ROS vůbec. Je velmi nestabilní a má velmi krátký poločas rozpadu. Po svém vzniku téměř okamžitě reaguje s jakoukoli molekulou v jeho okolí. Hydroxylový radikál může reagovat s organickými substráty, například s mastnými kyselinami, a vytvářet další reaktivní produkty (Castano et al., 2006). Při iniciaci radikálové kaskády a následné nadměrné produkci ROS dochází v buňce k oxidačnímu stresu. V té chvíli nejsou buněčné antioxidanty (glutathion, kataláza, superoxiddismutáza či vitamíny C a E) schopny neutralizovat ROS v buňkách a dojde tak k poškození biomolekul jako jsou lipidy, proteiny i DNA a dochází následně k iniciaci buněčné smrti. Reakce typu I je méně běžná než reakce typu II a obvykle se vyskytuje pouze ve specifických případech jako je nízká koncentrace kyslíku. (Castano et al., 2004, 2006; Kwiatkowski et al., 2018; Lukšienė, 2003).

2.2.2. Reakce typu II

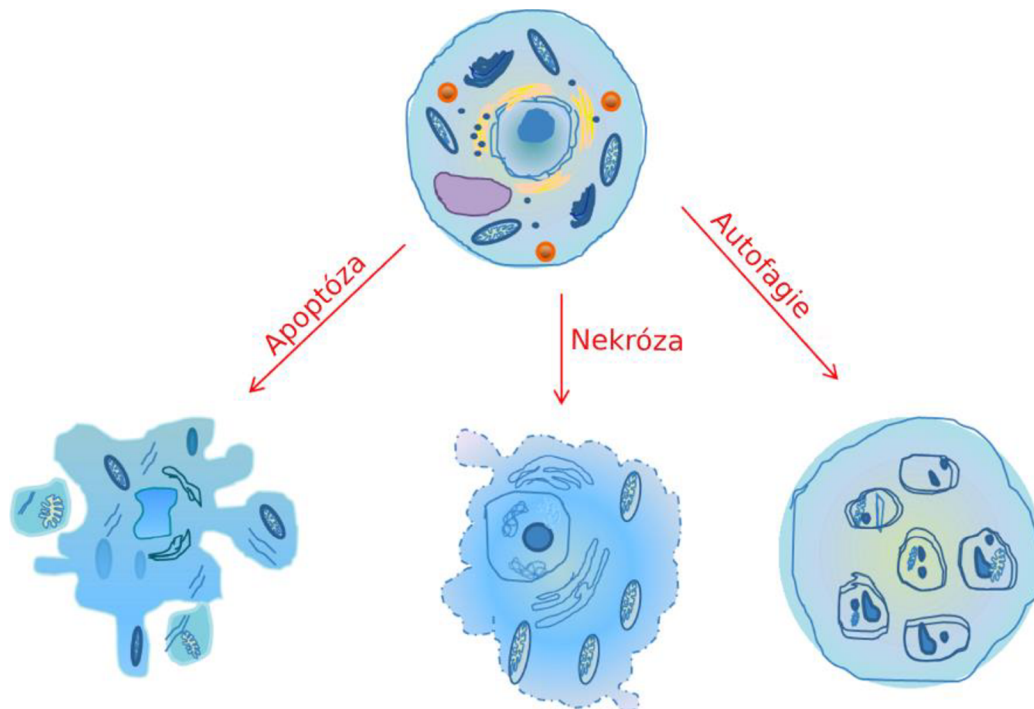
V rámci reakce typu II je energie z tripletového stavu PS přímo přenesena na molekulový kyslík rozpuštěný v cytoplazmě. Molekulový kyslík se následně z tripletového základního stavu excituje do singletového stavu. Tímto přenosem energie vznikne excitovaná částice kyslíku – singletový kyslík. Singletový kyslík

má mimořádně silné oxidační vlastnosti, díky kterým je schopen poškození proteinů, tuků a dalších molekul ve fotosenzibilizované oblasti. Mezi důležité cíle patří aminokyseliny v proteinech jako je cystein, methionin, tyrosin, histidin a tryptofan, dále také nenasycené lipidy nebo DNA (Berra et al., 2010). I přes to, že všechny buňky mají mechanismy na opravu oxidativního poškození, tak destrukce hlavních komponent buňky vede ke zničení buněk (Castano et al., 2004; Foote, 1991; Kwiatkowski et al., 2018).

Reakce typu II je hlavním mechanismem účinku PDT a je odpovědná za biologický účinek léčby. Singletový kyslík je totiž považován za primární terapeutický ROS. Bohužel, reakce typu II je vysoce závislá na obsahu kyslíku v tkáni. Proto obě reakce hrají roli ve funkčnosti terapie a mohou probíhat současně. V závislosti na podmínkách jako je pH, koncentrace kyslíku, dielektrická konstanta tkáně nebo struktura PS může být různý poměr reakcí typu I a II. (Ding et al., 2011; Kwiatkowski et al., 2018; Robertson et al., 2009).

2.3. Buněčná smrt ve fotodynamické terapii

Fotodynamická terapie vede k přímé i nepřímé buněčné smrti. Mezi přímou buněčnou smrt se řadí apoptotická a neapoptotická (nekróza a autofagie) buněčná smrt. Nepřímou buněčnou smrtí se pak rozumí poškození nádorových cév, které zásobují rakovinné buňky živinami a kyslíkem. Poškození cév následně vede k jejich celkovému kolapsu, zastavení krevního toku do tkáně, hypoxii, a nakonec k odumření tkáně (Star et al., 1986). Jednotlivé mechanismy účinku jsou vyvolávány různými signálními drahami v závislosti na PS (dávce a intracelulární lokalizaci), intenzitě ozáření, druhu buněk, hladině kyslíku a na použitém protokolu léčby (Chilakamarthi & Giribabu, 2017; Luo & Kessel, 1997).



Obrázek 2: Morfologie buněk podléhajících apoptóze, nekróze a autofagii. Apoptotická buňka vykazuje charakteristické smrštění buňky a apoptotická tělíška. Nekrotická buňka vykazuje rozšířené mitochondrie a buněčné organely v důsledku zvýšení propustnosti buněčné membrány pro malé nabitě molekuly. Autofagická buňka s autofagosomy obsahujícími organely a cytoplazmu. (Chilakamarthi & Giribabu, 2017) upraveno

2.3.1. Apoptóza

Apoptóza je programovaná buněčná smrt, která kontrolovaně zbavuje organismus poškozených či nepotřebných buněk. Proces je řízen aktivací cysteinových proteáz kaspáz a také endonukleáz. Během apoptózy dochází k pyknotizaci jádra, svraštění celé buňky a také ke tvorbě apoptotických tělísek obsahujících fragmenty buňky, která jsou následně fagocytována. Jelikož se jedná o buňkou kontrolovaný proces, tak je to energeticky náročný děj se spotřebou ATP (Alberts et al., 2006).

Proces apoptózy se skládá z iniciační a efektorové fáze. Iniciační fáze může být spouštěna různými faktory, jako je porušení DNA, změna funkčního stavu mitochondrií nebo působením imunitních buněk. Navození procesu může probíhat vnitřní či vnější apoptotickou cestou. Vnitřní cesta zahrnuje mitochondriální apoptotickou dráhu, zatímco vnější cesta je aktivována interakcí Fas a TNF ligandů imunitních buněk s receptory smrti na buněčné membráně (TNF-receptor, Fas-receptor). V rámci fotodynamické terapie se uplatňuje vnitřní

cesta aktivace apoptózy zahrnující aktivaci kaspáz a endonukleáz (Alberts et al., 2006).

Vnitřní cesta může být iniciována řadou změn vedoucích k poškození DNA, nesprávným dělením buňky, stresem či přítomností ROS. V buňce se vyskytují faktory regulující apoptózu a to proapoptotické (Bax, Bak) a antiapoptotické faktory (Bcl-2, Bcl-Xl) na vnější membráně mitochondrie a pro buňku je nezbytné udržovat mezi nimi rovnováhu. V případě deregulace dochází k apoptóze. Při působení inhibičních faktorů Bim a Bid dochází k potlačení antiapoptotických a posílení účinků proapoptotických faktorů. Tento proces vede k vytvoření kanálů ve vnější membráně mitochondrií a uvolnění cytochromu C do cytoplazmy. Cytochrom C se váže na APAF 1 (apoptotic peptidase activating factor 1), na které se následně naváže kaspáza 9, čímž se vytvoří komplex apoptozom. Funkcí apoptozomu je vznik aktivní kaspázy 9, která aktivuje efektorové kaspázy 3, 6 a 7, jejichž funkcí je nejen štěpení buněčných proteinů, ale také aktivace endonukleáz účastnících se fragmentace DNA (Alberts et al., 2006).

V rámci fotodynamické terapie slouží jako spouštěč apoptózy fotopoškození organel po aplikaci PS a světla. Během prvních studií mechanismů PDT bylo pozorováno, že mezi hlavní cíle fotopoškození patří mitochondrie. Nicméně již byly identifikovány i další subcelulární cíle pro PS jako je membrána endoplazmatického retikula či lysosomy (Kessel & Oleinick, 2018).

Při cílení PDT na mitochondrie dochází k poškození antiapoptotického proteinu Bcl-2 a jeho následné degradaci. Tento protein byl v roce 1999 identifikován jako cíl PDT (Kim et al., 1999), při němž byl jako PS použit ftalocyanin hliníku (Agarwal et al., 1991). Bcl-2 vykazuje homologii s proapoptotickým proteinem Bax a jejich poměr přímo rozhoduje o osudu buňky. Fotopoškození a degradace proteinu Bcl-2 vede k nadbytku proteinu Bax, který je následně k dispozici pro interakci s mitochondriální membránou, ze které se uvolní cytochrom c a spustí se apoptóza (Kim et al., 1999). Další důležitou studií potvrzující roli cílení PDT na protein Bcl-2 byla studie z roku 2001 od týmu vedeného Kesselem (Kessel & Castelli, 2001). V jejich výzkumu byly použity tři různé mitochondriální fotosenzitizéry etiopurpurin (SnET2), porfycen (CPO) a temoporfin (mTHPC). Po ozařování těchto PS bylo pozorováno selektivní poškození proteinu Bcl-2, zvýšení poměru Bax/Bcl-2 a spuštění apoptózy. Tento

experiment již jen potvrdil klíčovou roli Bcl-2 v iniciaci apoptózy v PDT směřované na mitochondrie (Kessel & Castelli, 2001).

Lysozomální fotopoškození také vede k buněčné smrti s apoptotickým mechanismem. Tento proces zahrnuje uvolnění lysozomálních proteolytických enzymů do cytosolu, které způsobuje štěpení proapoptického proteinu Bid na proapoptický fragment tBid. Tento fragment následně interaguje s mitochondriemi za uvolnění cytochromu c a spouští apoptózu. K potvrzení této hypotézy byl použit specifický inhibitor interakce mezi tBid a mitochondriemi, což vedlo právě ke zrušení apoptotické reakce při lysozomálním fotopoškození (Chiu et al., 2010; Kessel, 2006; Reiners et al., 2002).

2.3.2. Nekróza

Nekróza je energeticky neregulovaný proces buněčné smrti postihující mnoho buněk či celou tkáň. V buňce dochází vlivem vnějších faktorů, jako je hypoxie, infekce či působení jedů, k degradaci jaderné DNA s následným rozpadem jádra. Nekróza je dále doprovázena ztrátou funkce mitochondrií a endoplazmatického retikula, což vede k potlačení energetického metabolismu buňky. Dochází k bobtnání organel, a nakonec k rozpadu všech buněčných membrán. Rozpad vede k uvolnění obsahu buňky do okolí a vytvoření zánětlivé reakce uvolněním lysozomálních enzymů. V blízkém okolí buňky totiž dochází k deregulaci homeostázy, tvorbě ROS a aktivaci proteáz.

V případě PDT-indukované buněčné nekrózy hraje hlavní roli právě proteolytická aktivita, nicméně konkrétní identifikace proteáz a jejich substrátů je stále nedostatečně prozkoumaná. Studium faktorů a podmínek, které vedou k buněčné nekróze po PDT, není tak jednoduché jako zkoumání faktorů vedoucích k apoptóze. Mezi klíčové faktory, které ovlivňují iniciaci buď apoptózy nebo nekrózy po PDT, patří typ buňky, přítomnost nedotčených apoptotických mechanismů, umístění a koncentrace fotosenzitizéru v buňce, dávka světla použitá k aktivaci PS a hladina okysličení. (Castano et al., 2006; Chilakamarthi & Giribabu, 2017; Piette et al., 2003)

Vyšší dávky PS a vyšší intenzita záření způsobují větší poškození membrán a vedou právě k nekróze (Dellinger, 1996; Luo & Kessel, 1997). Jestliže jsou PS lokalizovány v buněčné membráně, může proces ozáření vést ke ztrátě integrity buněčné membrány a rychlému vyčerpání intracelulárního

energetického zdroje ATP (Kessel & Poretz 2000). Existuje také možnost, že vysoké dávky PDT mohou fotochemicky inaktivovat klíčové enzymy apoptotické kaskády, a tím donutit buňku k nekrotické buněčné smrti. Po aplikaci PDT jsou prostřednictvím receptor-interagujícího proteinu 1 (RIP1) aktivovány tumor nekrotizující faktor (TNF) a Fas receptory. Ty vyvolávají nekrózu právě v případě inaktivace kaspáz (Berghe et al., 2003). Dále také tvorba ROS je jednou z dalších příčin nekrózy při fotodynamické terapii. (Chilakamarthi & Giribabu, 2017; Mroz et al., 2011).

2.3.3. Autofagie

Autofagie je proces buněčné samoregulace, který pomáhá buňkám přežít a obnovovat se. Buňka tak dokáže udržet rovnováhu mezi syntézou, degradací a recyklací produktů (Kroemer & Jäättelä, 2005). Autofagie může být odpovědí na stres, hladovění nebo zvýšený obsah ROS v buňkách (Chilakamarthi & Giribabu, 2017). Existuje mnoho variant mechanismu autofagie zahrnující lysozomální degradaci buněčných organel. Autofagie začíná vytvořením váčků se zdvojenou membránou, známých jako autofagozomy. Tyto struktury obalí cílovou poškozenou oblast v cytoplazmě a vytvoří vezikuly, kterými izolují svůj obsah od zbytku cytoplazmy. Vezikuly jsou následně transportovány k lysozomu, se kterým se spojí v autofagolysosomy. V těchto strukturách je následně jejich obsah rozložen a recyklován lysozomálními enzymy (Mathew et al., 2007). Autofagie usnadňuje likvidaci nežádoucích proteinů, organel a invazivních mikroorganismů. Dále také umožňuje redistribuci živin z nepotřebných procesů na životně důležité v době hladovění nebo stresu, čímž přispívá k buněčné adaptaci na nepříznivé podmínky (François et al., 2011; Chilakamarthi & Giribabu, 2017).

Autofagie může mít jak protinádorové, tak pronádorové účinky v závislosti na kontextu a fázi vývoje nádoru (Scherz-Shouval & Elazar, 2007). V souvislosti s fotodynamickou terapií bylo zjištěno, že autofagie může hrát klíčovou roli v odpovědi nádorových buněk. Beclin1, protein nezbytný pro proces autofagie, byl také identifikován jako nádorový supresor. Autofagie tedy může na začátku bránit růstu nádoru tím, že kontroluje buněčný cyklus a zabraňuje nekontrolovanému růstu buněk. Nicméně v pokročilých stádiích nádoru, může autofagie paradoxně podporovat růst nádoru tím, že poskytne zdroje energie pro

buněčné přežití v hypoxických nebo málo živinami zásobených oblastech nádoru (Maiuri et al., 2010). Obecně platí, že k indukci autofagie u buněk ošetřených PDT dochází nezávisle na apoptotickém výsledku, tedy může se projevit jak samostatně, tak v doprovodu apoptózy (Scherz-Shouval & Elazar 2007; Buytaert et al. 2006; Mroz et al. 2011).

Autofagie může také blokovat apoptotické dráhy a chránit tím buňky před smrtí, která je indukovaná léčbou (Maiuri et al., 2010). Nicméně, v některých případech, určité protinádorové terapie mohou způsobit autofagickou buněčnou smrt nádorových buněk. Z hlediska PDT je interakce s autofagií komplexní proces. Existuje řada faktorů, které ovlivňují, jak buňky reagují na tento terapeutický režim, mezi které patří typ nádorových buněk, použitý PS, dávky světla a ROS (Sasnauskienė et al., 2009). Jednou z pravděpodobných příčin účinnosti PDT v rámci vyvolání autofagické reakce může být snížení regulace Bcl-2. Tato změna následně vede k uvolnění a aktivaci proautofagického proteinu Beclin z komplexu Beclin:Bcl-2 (Pattinre et al., 2005). PS indukující autofagii cílí především na endoplazmatické retikulum, přesněji na již zmíněný protein Beclin. (François et al., 2011; Chilakamarthi & Giribabu, 2017; Kessel, 2006; Mroz et al., 2011).

2.4. Zdroje záření

Při fotodynamické terapii se používá několik typů zdrojů záření, mezi které patří lasery, žárovky a laserové diody (Yanovsky et al., 2019). Volba zdroje závisí především na absorpčním maximu PS, dále také na druhu, velikosti a umístění léze, a v neposlední řadě na ceně a velikosti zdroje. Hloubka průniku se zvyšuje ve viditelné a blízké infračervené spektrální oblasti (Lath et al. 1996; Mitton & Ackroyd 2008). Optimálním světlem pro tkáň je světlo o vlnové délce 600-1200 nm, nicméně je používané světlo o maximální vlnové délce 800 nm. Delší vlnové délky nemají dostatečnou energii pro zahájení fotodynamické reakce a tvorbu reaktivních forem kyslíku (Agostinis et al., 2011).

Mezi první používané zdroje ve fotodynamické terapii patřily nekoherentní světelné zdroje konvenčních lamp, které se využívaly zejména v oblasti dermatologie. Laserové systémy začaly být preferovány zejména díky schopnosti generovat koherentní světlo s monochromatickou vlnovou délkou. Tato vlastnost

usnadňuje výpočet světelné dávky, která je klíčová pro účinnost fotodynamické terapie a světlo lze také efektivně přivádět do obtížně přístupných míst pomocí optických vláken s přizpůsobitelným hrotem pro ozařování cílových lézí (Mitton & Ackroyd 2008; Agostinis et al. 2011).

V minulosti byly velmi oblíbené argonové lasery, které jsou specifické především vysokým vstupním výkonem a možností upravování vlnové délky. Tato technologie však byla nákladná, velká a vyžadovala komplexní chladicí a napájecí systémy. V současné době byly proto nahrazeny cenově dostupnějšími a mobilnějšími polovodičovými diodovými lasery. Tyto lasery nepotřebují externí chlazení a vynikají svou spolehlivostí. Diodové lasery mohou být spojeny s optickými vlákny a být tak ideálním zdrojem světla pro endoskopickou PDT. Mohou být také použity k léčbě lézí na kůži, v ústní dutině a v neposlední řadě i u adenomů hypofýzy (Marks et al., 2000). Laserová terapie může být aplikována pomocí optických vláken s difuzními koncovkami k léčbě nádorů v močovém měchýři a trávicím traktu (Agostinis et al. 2011; Mitton a Ackroyd 2008).

Dalším možným zdrojem používaným v PDT jsou lampy vyznačující se také vysokým výkonem. Mezi běžně používané typy lamp patří křemenné halogenidové lampy s wolframovým vláknem a xenonové obloukové lampy. Nejen cena, ale i údržba bývá u lamp levnější oproti laserům. Jednou z klíčových výhod lamp je jejich schopnost vyzařovat širší spektrální rozsah světla oproti laserům, což umožňuje širší aplikaci v PDT. Nicméně pro konkrétní užití lampy je vyžadována kombinace různých filtrů pro dosažení optimálních vlnových délek. Lampy se také vyznačují snadnou manipulací, což z nich činí ideální volbu pro léčbu rozsáhlejších kožních onemocnění jako je nemelanomový karcinom kůže. Naopak výstup lampy nelze snadno spojit s malými optickými vlákny, aniž by se výrazně omezil jejich výkon. Z těchto důvodů není možné, aby byly lampy použity pro endoskopickou PDT (Brancaleon & Moseley, 2002).

Další typ zdroje záření představují fluorescenční lampy, které vyzařují světlo v oblasti 400-450 nm. Tyto lampy umožňují dosáhnout stejné nebo vyšší účinnosti fotodynamického efektu při nižší koncentraci léčiva v tkáni, což může vést ke snížení vedlejších účinků. Nicméně, kvůli omezenému průniku světla v této oblasti spektra, jsou lampy vhodné pouze pro léčbu povrchových kožních

lézí. Jejich výkon je nižší než u jiných zdrojů světla, ale i přesto jsou atraktivní pro klinické prostředí (Bissonnette et al., 2000; Brancalion & Moseley, 2002).

Další alternativou mohou být LED diody, které se vyznačují úzkou šířkou spektrálního pásma. Tyto diody nabízejí širokou škálu vlnových délek od UV po blízkou infračervenou oblast a mají šířku pásma právě pouze 5-10 nm. Další výhodou je jejich relativně nízká cena, která umožňuje uspořádání v soustavách pro ozáření rozsáhlých ploch a snadnou přenosnost díky možnosti napájení bateriemi. LED diody jsou navíc i flexibilní, což umožňuje účinné ozáření i v obtížně přístupných anatomických oblastech (Brancalion & Moseley, 2002).

2.5. Fotosenzitizéry

Fotosenzitizéry (PS) jsou jedním z hlavních komponent fotodynamické terapie. Jsou to molekuly, které jsou schopny absorbovat světlo o určité vlnové délce, a tím vyvolat fotochemickou reakci. Jelikož jsou PS používány jako léčivo, je nutné, aby splňovaly určité vlastnosti, kterými jsou například vysoký stupeň čistoty látky, stabilita při pokojové teplotě a snadná rozpustnost v tělesných tkáních a tekutinách. Dále je důležitá fotochemická reaktivita pouze v přítomnosti specifické vlnové délky světla a minimální cytotoxicita ve tmě. Mezi žádoucí vlastnosti pak patří dobrá rozpustnost ve vodě, snadná aplikace pacientovi a také jednoduchá a levná chemická syntéza. (Agostinis et al., 2011; Kwiatkowski et al., 2018; Macrabert et al., 1989; Nyman & Hynninen, 2004).

Fotosenzitizéry jsou děleny do tří skupin dle doby vzniku a jejich specifických vlastností. Do první generace můžeme zařadit látky odvozené od porfyrinu, jeho deriváty hematoporphyrinu (HpD) (Schwartz et al., 1955) a jeho analogy jako je Photofrin. Tyto látky byly vyvinuty v průběhu 70. let 20. století. Slabinou těchto PS je bohužel nedostatečná specifita pro nádorovou tkáň a chemická čistota, nevhodné absorpční maximum (400-630 nm) a také jejich špatná penetrace do hlubších tkání. PS 1. generace vyvolávají kožní fototoxicitu, která u pacientů přetrvává po dobu několika týdnů v podobě hyperfotosenzitivity kůže, kvůli dlouhému poločasu rozpadu PS. Pro jejich nevhodné vlastnosti, byly již na počátku 80. let 20. století zahájeny výzkumy nových látek.

Mezi druhou generaci fotosenzitizérů se v současné době řadí deriváty hematoporphyrinu a jiné porfyrinům podobné syntetické struktury jako je

5-aminolevulinová kyselina (ALA), dále pak chlorin či ftalocyanin. Druhá generace se vyznačuje vyšší chemickou čistotou, vyšším výtěžkem singletového kyslíku a lepším průnikem do hlouběji uložených tkání díky maximální absorpci ve vlnových délkách 650-800 nm, což je oproti minulé generaci významný benefit. Kromě prokazatelně lepších vlastností je jejich pokrokem zmírnění vedlejších účinků jako je fototoxicita díky rychlejšímu vylučování PS z těla. Bohužel stále přetrvávající limitací PS druhé generace je špatná rozpustnost ve vodě, která je klíčová při intravenózním podání látky pacientovi. (Kwiatkowski et al., 2018; van Straten et al., 2017).

V současné době se výzkumy zabývají navrhováním PS třetí generace. Nezaměřují se však pouze na tvorbu nových látek, ale i na vyvíjení metod, které by umožnily specifické směřování PS do nemocné tkáně se zaměřením na vyšší selektivitu a specifickou PS pro lepší vychytávání PS nádorovými buňkami. Mezi mechanismy cílení patří aktivní a pasivní cílení.

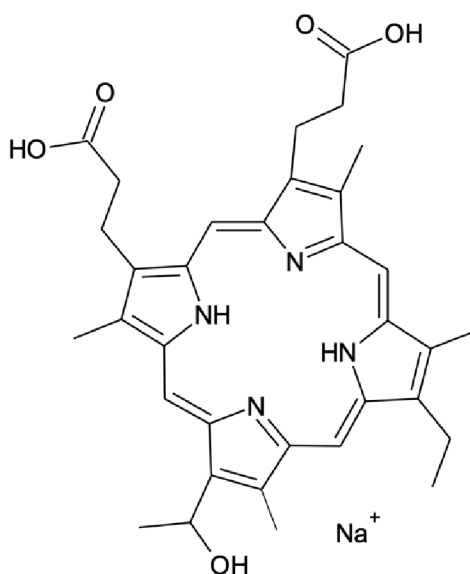
Aktivní cílení vyžaduje interakci cílových molekul s konkrétními receptory na povrchu buněčné membrány nádorových buněk. Některé povrchové receptory bývají exprimovány více nádorovými buňkami než normálními, čehož se právě při aktivním cílení využívá. Tento přístup zahrnuje využití nosiče, jako jsou monoklonální protilátky, peptidy, sacharidy, polymery, lipozomy a nanočástice, a tvorbu konjugátu s látkou. Poté jsou specifické konjugáty navázány na receptory exprimované buňkami v cílovém místě. Toto umožňuje cílení látek přímo na určité typy buněk a zvyšuje účinnost terapie. Příkladem může být konjugace PS s manózou, kde léčba cílí na manózové receptory, které jsou nadměrně exprimovány u rakoviny prsu (Zhang et al., 2017). Dále pak je také zkoumáno využívání monoklonálních protilátek, které se vážou na povrchové antigeny nádorových buněk, využívající například transtuzumab v kombinaci s PS na HER-2 receptory také exprimované u buněk rakoviny prsu (Gunaydin et al., 2021; Shu et al., 2020).

Pasivní cílení je proces, který zahrnuje difúzi lipofilních či amfipatických látek do buněk díky svým fyzikálním vlastnostem rozpouštět se v tucích. Jako potenciální nosiče pasivního cílení se využívají lipozomy a nanočástice tvořící konjugáty s účinnými látkami. Ty jsou konstruovány tak, aby byly schopny proniknout do buněk pasivní difúzí. Cévy v okolí nádorů nejsou zcela správně vyvinuté a mívají netěsné interendotelové spoje a nepravidelné větvení.

Nádorové tkáně bývají také mnohem propustnější než zdravá tkáň, což umožňuje látkám snáze pronikat a akumulovat se v nádorové tkáni. Pasivní absorpce je méně selektivní a efektivní než aktivní cílení, ale i přes to může být stále užitečným mechanismem pro dodání PS do buněk (Josefsen & Boyle 2008; Chen et al. 2004).

2.5.1. Příklady klinicky schválených a používaných fotosenzitizérů

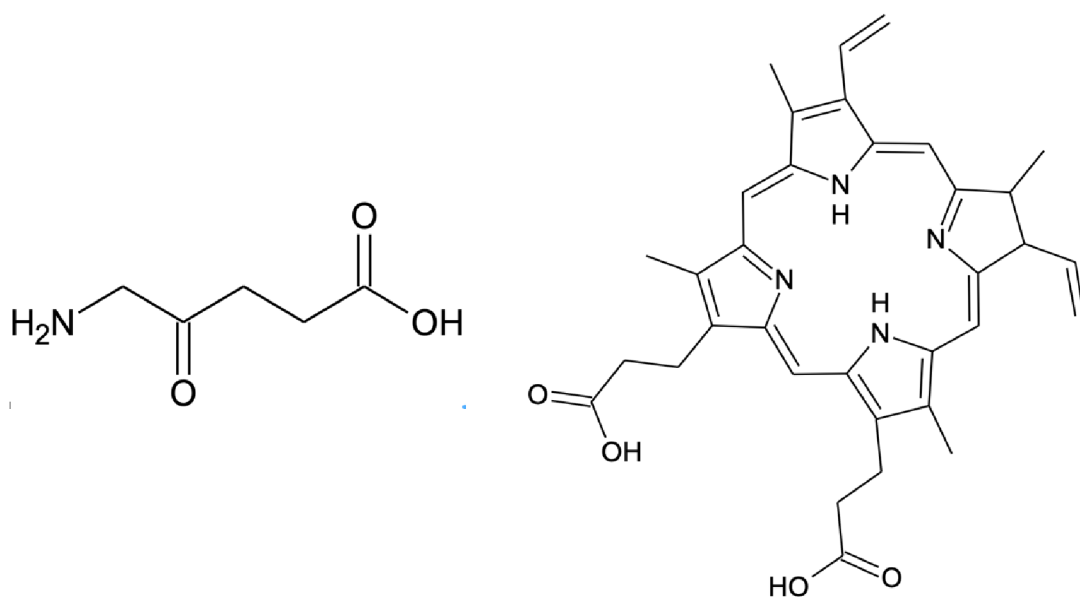
2.5.1.1. Photofrin (Porfimer sodný)



Obrázek 3. Struktura Photofrinu

Porfimer sodný (Obrázek 3), komerčně známý jako Photofrin, byl první fotosenzitivní látka, která byla schválena k léčbě v rámci fotodynamické terapie. Photofrin vznikl purifikací derivátu hematoporfyrinu HpD a v roce 1993 byl schválen k léčbě rakoviny močového měchýře v Kanadě. V současné době je schválen po celém světě a je využíván k léčbě rakoviny plic, jícnu, močového měchýře a dělohy (Chilakamarthi & Giribabu, 2017; Kim & Chang, 2023).. Photofrin má absorpční maximum při 630 nm. Přestože je Photofrin hojně využíván, má mnoho nevýhod a nežádoucích účinků. Slabinou této látky je především nedefinované složení tvořené monomery, dimery a oligomery hematoporfyrinů, což stěžuje opakovanou přípravu látky. Další nevýhodou je slabá absorpce světla v terapeutické oblasti. Dále se jedná o kožní fototoxicitu, která u pacientů přetrvává po dobu několika týdnů, kvůli dlouhému poločasu rozpadu (Kim & Chang, 2023; Kwiatkowski et al., 2018; Przygoda et al., 2023).

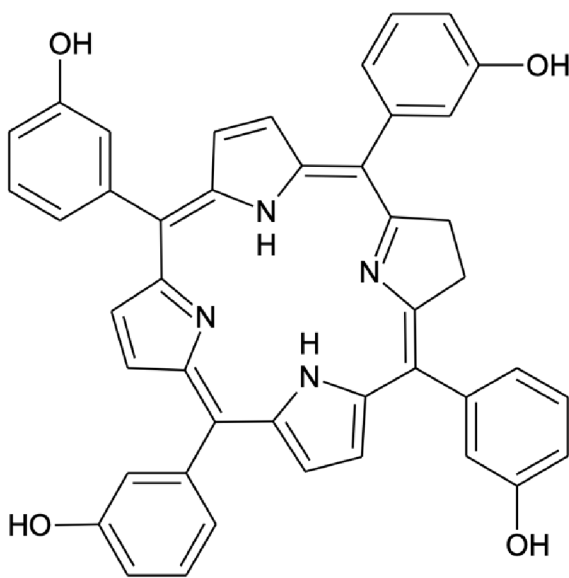
2.5.1.2. 5-aminolevulinová kyselina (5-ALA, Ameluz, AlaCare, Levulan)



Obrázek 4: Struktura 5-aminolevulinové kyseliny (vlevo) a Protoporfyriu IX (vpravo)

Kyselina 5-aminolevulinová (Obrázek 4) a její estery, využívající se pod komerčními jmény jako Ameluz, AlaCare nebo Levulan, se ukázaly jako účinné v léčbě rakoviny kůže, prostaty, močového měchýře a jícnu. Může být podáván intravenózně, perorálně i lokálně v místě léze. Sama o sobě 5-ALA nevykazuje fotosenzibilizující účinek, nicméně bylo prokázáno, že je metabolizována v tkáních na velmi účinný PS Protoporphyrin IX (Obrázek 4) (Kennedy & Pottier, 1992) a další fotosenzitivní porfyriny. K ozáření po použití 5-ALA se používá světlo o vlnové délce 635 nm. Látka 5-ALA vykazuje vyšší a rychlejší akumulaci v nádorové tkáni a zároveň rychlejší vylučování z těla, což vede k nižší fotosenzitivitě kůže obvykle netrvající déle než 24 hodin (Kim & Chang 2023; Przygoda et al. 2023; Ackroyd et al. 2001).

2.5.1.3. Temoporfin (Foscan, mTHPC)



Obrázek 5. Struktura Temoporfinu

Temoporfin (Obrázek 5), známý též jako m-tetrahydroxyfenylchlorin, je velmi účinný PS, který je aktivován při vlnové délce 652 nm. Tato látka vykazuje také vysokou nádorovou selektivitu. V současné době je využíván k léčbě rakoviny hlavy a krku, u nádorů dutiny ústní a kůže. Používá se převážně v Evropě, kde je schválen Evropskou agenturou pro léčivé přípravky (EMA). Dále je Temoporfin součástí klinických studií k léčbě rakoviny prostaty a prsu. Jelikož se jedná o velmi hydrofobní látku, která je prakticky nerozpustitelná ve vodě, k aplikaci se používají nejnovější techniky zahrnující použití lipozomů (Dragicevic-Curic et al., 2008; Kim & Chang, 2023),

2.6. Rakovina prsu a fotodynamická terapie

Jelikož jsem se v rámci experimentální části bakalářské práce zaměřila na buňky odvozené od adenokarcinomu prsu, tak se v teoretické části zaměřím právě na rakovinu prsu.

Rakovina prsu je jedním z významných globálních zdravotních problémů, kterému v roce 2022 podlehl 670 000 pacientů po celém světě. Toto onemocnění postihuje především ženy ve všech zemích a představuje nejčastější formu rakoviny u žen ve 157 ze 185 zemí. Přibližně polovina případů tohoto onemocnění se vyskytuje u žen bez jiných identifikovatelných rizikových faktorů než pohlaví a věk. Začíná v mlékovodech a mléčných lalocích prsu a

může se šířit do okolní tkáně a lymfatických uzlin, což vede k metastázám a fatálním následkům (World Health Organization, 2024).

V dnešní době zahrnuje léčba rakoviny prsu kombinaci chirurgických zákroků, radioterapie a chemoterapie, přičemž strategie jsou přizpůsobeny konkrétním pacientům a typům nádorů mezi které se řadí například invazivní duktální karcinom, invazivní lobulární karcinom, duktální karcinom, lobulární karcinom a další. Cílem léčby je minimalizovat riziko recidivy a zlepšit prognózu. Světová zdravotnická organizace (WHO) usiluje o snížení úmrtnosti na rakovinu prsu o 2,5 % ročně prostřednictvím globální iniciativy zaměřené na podporu zdraví, včasnou diagnostiku a komplexní léčbu. Osvěta hraje klíčovou roli v informování žen o příznacích rakoviny prsu a v podpoře včasného vyhledání lékařské péče, což výrazně zlepšuje výsledky léčby tohoto onemocnění (World Health Organization, 2024).

I přes pokroky v léčbě zůstávají recidiva a metastázy rakoviny prsu hlavními příčinami úmrtí pacientek. Z tohoto důvodu je PDT zkoumána jako potenciální léčba rakoviny prsu, nabízející novou a nadějnou strategii v boji proti nádorům (Kim & Chang, 2023). V současné chvíli neexistují žádné PS, které by byly schválené ke klinickému použití k léčbě rakoviny prsu, ale možnosti použití jsou studovány. Například v letošním roce byla spuštěna klinická studie na ověření bezpečnosti a účinnosti PS REM-001 farmaceutickou společností Kintara, která je určena pro pacientky s metastazujícím karcinomem prsu (Kintara Therapeutics, 2024)

V současné době je zkoumána i možnost cílené terapie na buňky rakoviny prsu. Na povrchu některých typů buněk rakoviny prsu bývá nadměrně exprimován například receptor HER-2 a cílení na něj je klíčovým léčebným přístupem. V případě použití monoklonální protilátky trastuzumab, která se váže na receptor HER-2 na povrchu nádorových buněk, s konjugovaným PS je umožněno selektivní dodání léčiva přímo na nádorové buňky s nadměrnou expresí receptoru HER-2 (Kim et al., 2018). Tím se minimalizuje poškození okolních normálních buněk a zvyšuje účinnost léčby (Gunaydin et al., 2021). V novějších studiích jsou již zkoumány i nanoprottilátky konjugované s PS, které mají již slibné výsledky i v in vivo studiích (Deken et al., 2020).

3. Praktická část

3.1. Materiál

3.1.1. Chemikálie

- 2-merkaptoethanol ($\geq 97\%$, Serva, Německo)
- 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT) (Sigma-Aldrich, Rakousko)
- Akrylamid (AA) (VWR, USA)
- Aprotinin (Merck, Německo)
- N',N',metylenbisakrylamid (Bis) (Sigma-Aldrich, USA)
- Bromfenolová modř (Merck, Německo)
- Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich, Rakousko)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lachema, Česká republika)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Meck, Německo)
- Dithiothreitol (DTT) (Roche, Německo)
- Dodecylsírán sodný (SDS) ($\geq 98\%$, Serva, Německo)
- ECL substrát (luminol:peroxid vodíku 1:1) (Sigma-Aldrich, Rakousko)
- Ethanol 96% (Lach-Ner, Česká republika)
- Fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF) (Merck, Německo)
- Fluorid sodný ($\geq 98\%$, Lach-Ner, Česká republika)
- Fetální bovinní sérum (FS) (Biowest, Francie)
- Glycerol (PENTA, Česká republika)
- L-Glutamin (Merck, Německo)
- Glycin ($\geq 99\%$, Serva, Německo)
- Hovězí sérový albumin BSA (VWR, USA)
- Chlorid sodný (Penta, Česká republika)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová EDTA ($\geq 98,5\%$, Merck, Německo)
- Kyselina ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová EGTA ($\geq 97\%$, Merck, Německo)
- Kyselina chlorovodíková 35% (Lach-Ner, Česká republika)
- Kyselina octová 99% (Lach-Ner, Česká republika)
- Kyselina trihydrogenfosforečná (Lach-Ner, Česká republika)
- Leupeptin, lyofilizovaný (Merck, Německo)
- n-butanol (Lach-Ner, Česká republika)

- N',N',N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED) ($\geq 99\%$, Merck, Německo)
- Nonidet p40 (Fluka, Švýcarsko)
- Peroxodisíran amonný (APS) ($\geq 98\%$, Merck, Německo)
- Penicilin/streptomycin v 0,9% NaCl (Merck, Německo)
- Polyoxyethylensorbitanmonolaurát Tween 20 (Merck, Německo)
- Ponceau S (Serva, Německo)
- Proteinový detekční marker molekulové hmotnosti Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (ThermoFisher, USA)
- Pyocyanin (MedChemExpress, USA)
- Médium Rosewell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) (Biowest, Francie)
- Trypsin/EDTA (Sigma-Aldrich, Rakousko)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) ($\geq 99\%$, Serva, Německo)
- Orthovanadičnan sodný (Merck, Německo)
- Fluorescenční sonda CM-H₂DCFDA (Invitrogen Thermo Fisher Scientific, USA)
- Dimethylformamid (DMF) (Sigma-Aldrich, Rakousko)

3.1.2. Roztoky

- Kultivační médium DMEM, 10% fetální sérum, penicilin (100 U/ml), streptomycin (100 μ g/ml), glutamin (2 mM)
- Bradfordovo činidlo: 0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250; 4,7% (v/v), EtOH; 8,5% (v/v) H₃PO₄; v dH₂O
- Roztok akrylamidu (AA+Bis): 30% (w/v) akrylamid + 0,8% (w/v) bisakrylamid v dH₂O
- Vzorkovací pufr (5x): 0,3 M Tris pH = 6,8; 10% (w/v) SDS; 50% (v/v) glycerol; 0,05% (w/v) bromfenolová modř; 5% (v/v) 2-merkptoethanol
- 1M Tris-HCl pH 6,8: 1 M Tris v dH₂O; konc. HCl upraveno pH na hodnotu 6,8
- 1M Tris-HCl pH 8,8: 1 M Tris v dH₂O; konc. HCl upraveno pH na hodnotu 8,8
- SDS:10% (5 g SDS na 50 ml dH₂O)
- 10% APS (0,1g APS na 1 ml dH₂O)

- Elektroforetický dělicí gel 2x (12,5% AA+Bis): 3,9 ml AA+Bis; 1,94 ml dH₂O; 3,5 ml Tris pH=8,8; 84 µl 10% SDS; 6,25 µl TEMED; 37,5 µl 10% APS
- Elektroforetický zaostřovací gel 2x (5% AA+Bis): 0,84 ml AA+Bis; 3,51 ml dH₂O; 0,63 ml Tris 6,8; 50 µl 10% SDS; 5 µl TEMED; 30 µl 10% APS
- Blotovací pufr: 25 mM Tris; 192 mM glycin; v dH₂O
- Blokovací roztok: 4% BSA v TBS s 0,1% Tween 20
- Roztok Ponceau S: 0,2% (w/v) Ponceau S v 1% (v/v) kyselině octové v dH₂O
- Lyzační pufr RIPA: 200 mM TRIS (pH 7,4); 100 mM NaCl; 5 mM EDTA; 2 mM EGTA; 2 mM NaF; 0,2% nonidet P 40 (pH 7,4);
Před použitím následně přidáno: 1 mM PMSF; 1 mM DTT; 10 µg/ml leupeptin; 10 µg/ml aprotinin; 1 mM vanadičnan sodný v dH₂O
- Fosfátový pufr (PBS): 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH₂PO₄; 6,4 mM Na₂HPO₄.12H₂O; pH = 7,4
- Ponceau S: 0,2% Ponceau S; 1% kyselina octová v dH₂O
- Roztok MTT: MTT 5 g/l rozpuštěno v PBS pH= 7,4
- Tris-pufr (TBS): 20 mM Tris; 137 mM NaCl; v dH₂O; pH upraveno pomocí koncentrované HCl na výslednou hodnotu pH 6,8
- Tris-pufr s Tweenem (TBS-T): k TBS přidavek 0,05% (v/v) Tween 20

3.1.3. Biologický materiál

V experimentální části bakalářské práce byla používána lidská nádorová buněčná linie MCF-7 odvozená od adenokarcinomu prsu získaná z European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) a dále buněčná linie MCF-7 stabilně exprimující protein HSF1 fúzovaný s fluorescenčním proteinem mCherry (MCF-7-HSF1-mCherry) získaná od MUDr. Petra Müllera, Ph.D. z Masarykova onkologického ústavu v Brně.

3.1.4. Protilátky

V Tabulka 1 je uveden seznam primárních protilátek včetně jejich specifikací.

Tabulka 1: Seznam primárních protilátek použitých v experimentální části bakalářské práce při vyhodnocování imunodetekce na membráně

Název cíle	Molekulová hmotnost [kDa]	Protilátka Klon/zdroj	Výrobce	Ředění
PARP-1	116; 89	46D11 / králíčí	Cell Signaling	1000x
GAPDH	36	0411 / myší	Santa Cruz Biotechnology	500x
Cytochrom C	12	136F3 / králíčí	Cell Signaling	1000x
HSF1	82	- / králíčí	Cell Signaling	500x
BAX	20;18	D2E11 / králíčí	Cell Signaling	500x
Bcl-2	26	- / myší	Sigma Aldrich	500x
Mcl-1	40	D35A5 / králíčí	Cell Signaling	500x

V Tabulka 2 je uveden seznam sekundárních protilátek s jejich specifikacemi.

Tabulka 2: Seznam sekundárních protilátek použitých v experimentální části bakalářské práce při vyhodnocování imunodetekce na membráně

Protilátka	Výrobce	ředění
anti-rabbit IgG značená křenovou peroxidázou	Cell Signaling	1000x
anti-mouse IgG značená křenovou peroxidázou	Cell Signaling	1000x

3.1.5. Testované látky

V experimentální části bakalářské práce byly testovány účinky nově syntetizovaných heterocyklických sloučenin s označením **8853** a **8656**, které byly připraveny na Kaunas University of Technology v Litvě Ing. Gabrielé Varvuolyté pod odborným vedením prof. Algirdase Šačkuse. Chemická struktura látek byla potvrzena pomocí fyzikálně-chemických metod (NMR, hmotnostní spektrometrie) a jejich výsledná čistota byla > 95 %. Zásobní roztoky testovaných látek byly připraveny jejich rozpuštěním v dimethylsulfoxidu (DMSO). K jejich dalšímu

vyředění docházelo bezprostředně před prováděním daného experimentu, koncentrace DMSO ve vzorku nepřesáhla 0,1 %.

3.1.6. Přístrojové vybavení a příslušenství

- Analytická váha KERN ABT 120-5DM (KERN, Německo)
- Aparatura pro vertikální elektroforézu Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad, USA)
- aparatura pro Western blot Mini Trans-Blot Module (Bio-Rad, USA)
- Automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- Bürkerova komůrka (Meopta, Česká republika)
- Centrifuga BR4i (Jouan, USA)
- CO₂ inkubátor MCO-17AIC (Sanyo, Japonsko)
- Centrifuga 5702, (EU-IVD) s rotorem A-4-38 (Eppendorf, Německo)
- Gelový a membránový dokumentační systém FUJILAS 4000 (FujiFilm, Japonsko)
- Hlubokomrazící box New Brunswick Innova U535 (New Brunswick Scientific, USA)
- Chladnička s mrazákem Liebherr CN40 (Liebherr, Německo)
- Inverzní mikroskop Nikon CK2 (Olympus, Japonsko)
- Laminární flowbox (Alpina, Polsko)
- Magnetická míchačka Arex-6 (VELP Scientifica, Itálie)
- MicroPlate Reader – Tecan Infinite M200 Pro (Tecan, Švýcarsko)
- Mikrocentrifuga iFuge M08 (Neuation, India)
- Míchačka zkumavek s bezdotykovým spínačem (VELP Scientifica, Itálie)
- Mikroskop Olympus IX51 (Olympus, Japonsko)
- MINI digitální třepačka s kývavým pohybem typ MR-1 (Biosan Ltd., Litva)
- Odsávací pumpa FTA-2i (Biosan, Lotyšsko)
- Pipetor accu-jet-pro (BrandTech Scientific, USA)
- Sonorex super, ultrazvuková lázeň RK31 (Bandelin, Německo)
- Termoblok MBT 250 (Kleinfeld Labortechnik)
- Ultrazvukový homogenizátor Bandelin Sonopuls HD2200 (Bandelin, Německo)
- UV-VIS spektrofotometr UV-1800 (Shimadzu, Japonsko),

- Vortex mixer PV-1 (GRANT-BIO, Velká Británie)
- LED diodový zdroj záření 414 nm (Ústav lékařské biofyziky, Lékářská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci)
- Zdroj pro SDS-PAGE PowerPac Basic (Bio-Rad, USA)

Mezi používané spotřební zboží patřily:

- Jednorázové špičky na automatické pipety,
- Sterilní Petriho misky s průměrem 10 cm,
- Sterilní zkumavky o objemu 15 ml a 50 ml
- Sterilní 96-jamkové mikrodestičky
- Mikrozukmavky (1,5 ml, 2 ml)
- Nitrocelulózová membrána pro western blot (Bio-Rad, USA)

3.2. Metody

3.2.1. Měření absorpčních a fluorescenčních spekter zkoumaných látek

Látky **8656** a **8853** byly naředěny na koncentraci 50 μM do UV transparentní mikrodestičky. Roztoky byly ozářeny světlem o vlnové délce 414 nm a energii 10 J/cm². Do mikrodestičky byly přidány roztoky látek bez ozáření. Na multiparametrovém readeru Tecan Infinite M200 Pro byly proměřeny absorpční a fluorescenční spektra zkoumaných látek.

3.2.2. Kultivace nádorových buněk MCF-7

Veškerá manipulace s buňkami probíhala za sterilních podmínek. Buňky buněčné linie MCF-7 i MCF-7-HSF1-mCherry byly kultivovány v kultivačním médiu DMEM bez fenolové červeně doplněném o 10% fetální sérum, penicilin (100 U/ml), streptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$) a glutamin (2 mM). Buňky byly kultivovány v inkubátoru při 37°C, 100% vlhkosti vzduchu a s 5% obsahem oxidu uhličitého.

3.2.3. MTT test

Buňky byly vysazeny do 96-jamkové destičky v počtu 12 tisíc buněk na jamku v 80 μl média. Další den byly ovlivněny testovanými látkami v koncentracích 0,04 μM , 0,12 μM , 0,37 μM , 1,1 μM , 3,3 μM a 10 μM . Buňky v mikrodestičkách byly po čtyřech hodinách inkubace v inkubátoru ozářeny různými energiemi světla o vlnové délce 414 nm (2,5 J/cm², 5 J/cm² a 10 J/cm²),

jedna byla ponechána jako kontrolní bez osvětlení ve tmě. Buňky byly inkubovány 24 hodin od ovlivnění do dalšího dne, kdy byl do mikrodestiček přidán roztok MTT. Po čtyřech hodinách inkubace v inkubátoru byl vzniklý formazan rozpuštěn přidáním 10% SDS. Druhý den byla na multiparametrickém readeru Tecan Infinite M200 Pro změřena absorbance jednotlivých vzorků při vlnové délce 570 nm.

3.2.4. Detekce reaktivních forem kyslíku

Buňky byly vysazeny do 96-jamkové destičky v počtu 12 tisíc buněk na jamku v 80 μl média. Další den byla fluorescenční sonda CM-H₂DCFDA vyředěna do PBS s 5 mM glukosou na koncentraci 3 μM . Následně bylo z destičky s buňkami pomocí odsávačky odsáto médium, které bylo na 30 minut nahrazeno právě roztokem s fluorescenční sondou. Po ukončení inkubace byla sonda odsáta, a do jamek s nasazenými buňkami bylo přidáno PBS s 5 mM glukosou. Buňky byly ovlivněny látkou **8656** v koncentracích 0,04 μM , 0,12 μM , 0,37 μM , 1,1 μM , 3,3 μM a 10 μM a pyocyaninem, který byl použit jako pozitivní kontrola, v koncentracích 0,37 μM , 1,1 μM , 3,3 μM , 10 μM , 30 μM a 90 μM . Buňky byly v inkubátoru inkubovány po dobu 4 hodin a následně ozářeny modrým světlem (414 nm) s energií 5 J/cm² a 10 J /cm². Jedna mikrodestička byla ponechána bez ozáření. Reaktivní formy kyslíku byly změřeny pomocí mikrodestičkového readeru Tecan Infinite M200 Pro při excitační vlnové délce 492 nm a emisní vlnové délce 530 nm.

3.2.5. Detekce stresových tělísek HSF1 v jádře buněk pomocí

fluorescenční mikroskopie

Buňky MCF-7-HSF1-mCherry byly nasazeny v 96-jamkových destičkách v počtu 12 tisíc buněk v 80 μl média na jamku. Den po nasazení byly ovlivněny látkou **8656**. Po čtyřech hodinách inkubace byly destičky ozářeny světlem o vlnové délce 414 nm a energii 5 J/cm² a 10 J/cm² a byly ihned pozorovány fluorescenčním mikroskopem Olympus IX51 a pozorování zaznamenáno pomocí kamery Olympus DP71 pro následnou analýzu. Procentuální zastoupení buněčných jader se stresovými tělísky bylo vyhodnoceno pomocí programu ImageJ.

3.2.6. Immunoblotting

3.2.6.1. Ovlivnění buněk testovanou látkou, sklizení a lyzace buněk

Buňky byly vysazeny do Petriho misek o průměru 10 cm v počtu 1,7 milionu buněk v 8 ml kultivačního média. Další den byly ovlivněny testovanou látkou **8656** v koncentraci 5 μM a 4 hodiny po ovlivnění byly buňky ozářeny modrým světlem o vlnové délce 414 nm a intenzitě 2,5 J/cm², 5 J/cm², 7,5 J/cm² a 10 J/cm² či byly ponechány ve tmě. Buňky byly následně inkubovány 4 hodiny, sklizeny a buněčné pelety byly před dalším zpracováním uchovány při -80 °C.

Pro přípravu buněčného lyzátu byly buněčné pelety resuspendovány v lyzačním pufru. Vzorky byly po dobu 30 minut na ledu opakovaně homogenizovány, po uplynutí doby inkubace sonikovány a následně zcentrifugovány (30 min, 14000 g, 4 °C). Supernatant byl přenesen do nových mikrozkušavek a pomocí Bradfordovy metody byla spektrofotometricky při vlnové délce 595 nm změřena koncentrace proteinů ve vzorcích. Vzorky byly smíchány s SDS vzorkovacím pufrem, umístěny na 5 minut na termoblok s teplotou 95 °C a následně zamraženy při -20 °C.

3.2.6.2. SDS-PAGE elektroforéza, imunoblotting

Lyzáty byly rozeřháty při 95 °C po dobu 3 minut na termobloku. Separace proteinů probíhala pomocí diskontinuální SDS-PAGE elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (12,5% dělicí gel a 5% zaostřovací gel). Separace probíhala při napětí 80 V a po vstupu vzorků do dělicího gelu bylo napětí zvýšeno na 120 V.

Gel byl přenesen na nitrocelulósovou membránu do blotovací kazety, která byla následně vložena do blotovací komory, která byla naplněna blotovacím pufrem. Přenos proteinů probíhal 3 hodiny při 280 mA za současného chlazení ledem.

Po dokončení blotování byla membrána vyjmuta a nabarvena v roztoku Ponceau S na kývačce po dobu 5 minut. Membrána byla opláchnuta v destilované vodě a usušena na filtračním papíře. Po oschnutí byla membrána nařezána podle molekulových hmotností studovaných proteinů. Nařezané části membrány byly odbarveny v TBS a následně blokovány v 4% roztoku BSA v TBS

s Tween 20 po dobu 1 hodiny pro vyblokování nescifických vazeb proteinu a protilátky. Po blokaci byla nanášena primární protilátka, která byla ředěná rovněž v roztoku 4% BSA v TBS s Tween 20. Inkubace s primární protilátkou probíhala přes noc při 4 °C. Následně byly membrány promyty v TBS a TBS s Tweenem 20, aby byly odstraněny nenasazené primární protilátky. Na membrány byly nanášeny sekundární protilátky značené křenuvou peroxidázou, které byly ředěny v roztoku 4% BSA s Tween 20. Membrány byly se sekundární protilátkou inkubovány 1 hodinu při laboratorní teplotě. Membrány byly promyty v TBS a TBS s Tweenem 20 a položeny na destičku s parafilmem.

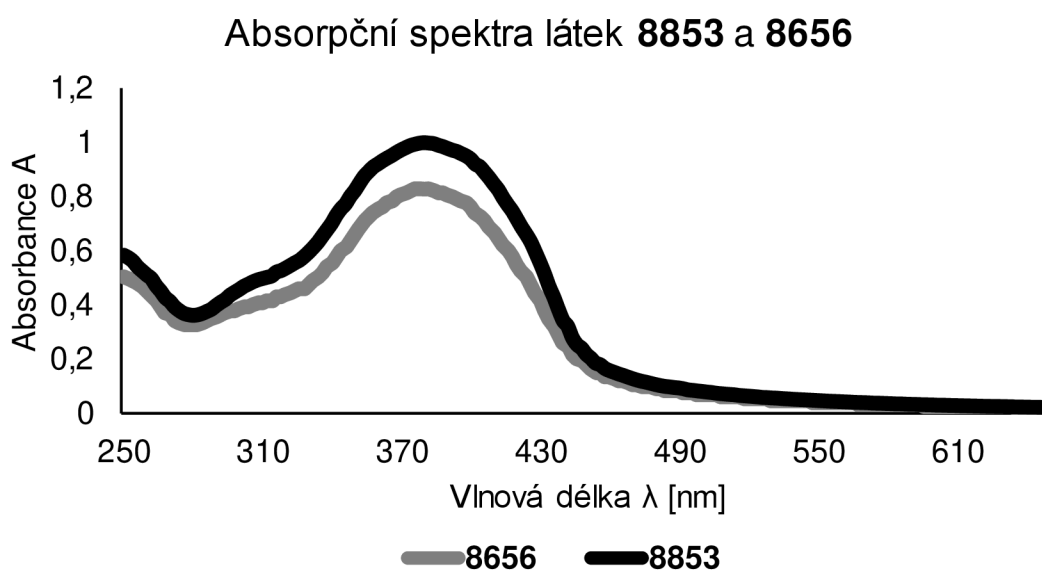
Na membrány byla nanášena chemiluminiscenční detekční směs ECL (luminol:peroxid v poměru 1:1). Membrány byly přeneseny do detekční komory se CCD kamerou a byla provedena detekce chemiluminiscence.

4. Výsledky a diskuse

V experimentální části bakalářské práce byly testovány fotodynamické účinky dvou nových heterocyklických sloučenin s označením **8853** a **8656**, které byly připraveny na Kaunas University of Technology v Litvě Ing. Gabrielė Varvuolytė pod odborným vedením prof. Algirdase Šačkuse a které byly vybrány na základě předchozích výsledků získaných na Katedře experimentální biologie. Biologické účinky látek byly testovány na buňkách buněčné linie MCF-7 odvozené od lidského adenokarcinomu prsu.

4.1. Absorpční a fluorescenční spektra testovaných látek

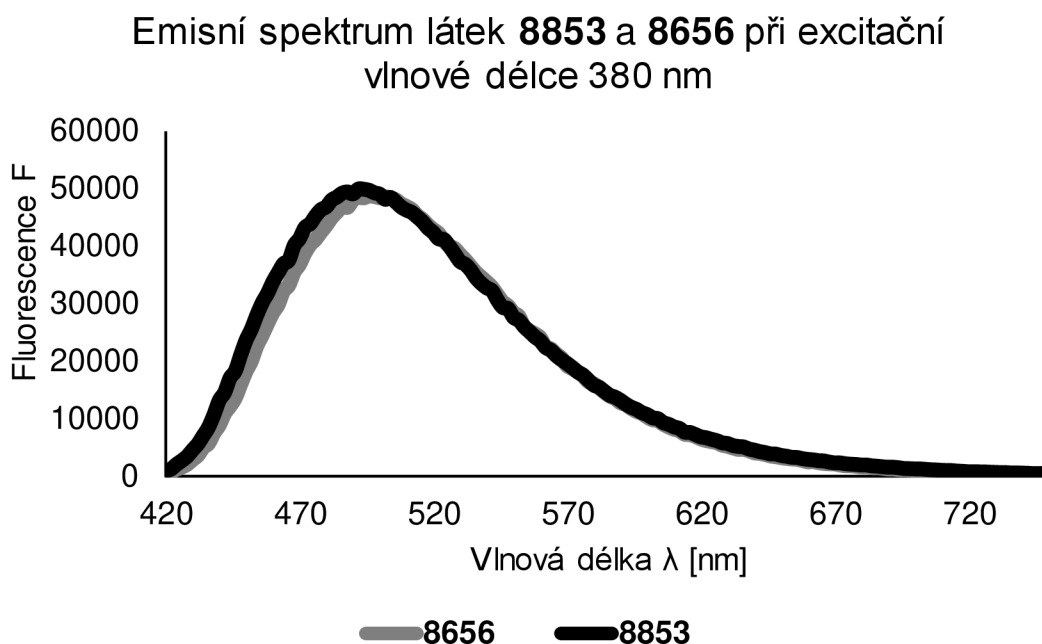
Každá fotosenzitivní látka má optimální absorpční maximum, které je ve fotodynamické terapii využíváno k aktivaci fotochemické reakce. V rámci experimentální práce bylo tedy změřeno absorpční spektrum látek **8853** a **8656**. Absorpční maximum se u látky **8853** i **8656** nacházelo při 380 nm (Graf 1).



Graf 1: Absorpční spektra látek **8653** a **8656** měřené na destičkovém multidetekčním readeru Tecan Infinite M200 Pro.

Řada známých fotosenzitivních látek vykazuje fluorescenci, využívající se například v diagnostice (Hosmann et al., 2021). K proměření emisního fluorescenčního spektra byla využita vlnová délka absorpčního maxima (380 nm)

jako excitační vlnová délka. Emisní maximum bylo stanoveno na 486 nm u látky **8656** a na 488 nm u látky **8853** (Graf 2).



*Graf 2: Emisní spektra látek **8853** a **8656** měřené na destičkovém multidetekčním readeru Tecan Infinite M200 Pro.*

Ačkoli je absorpční maximum obou látek při 380 nm, obě absorbují v širším rozsahu vlnových látek. Proto byl pro následné biologické experimenty využit dostupný zdroj modrého světla o vlnové délce 414 nm, který je svými vlastnostmi pro studium fotodynamických účinků látek na buňky vhodnější než světlo v ultrafialové oblasti. Ultrafialové záření je elektromagnetické záření o vlnové délce mezi 100 až 400 nm a je známé hlavně pro své negativní účinky na organismus. Podle vlnové délky rozlišujeme ultrafialové záření na UVA (400 až 315 nm), UVB (315-280 nm), UVC (280-100 nm). Absorpční maximum látek s vlnovou délkou 380 nm spadá do oblasti dlouhovlnného UVA záření. Negativní působení UVA spočívá ve zrychlené tvorbě kyslíkových radikálů vedoucí k poškození DNA a karcinogenezi (Lajčíková & Pekárek, 2009). Z tohoto důvodu není vhodné toto záření k použití při zkoumání fotodynamických účinků.

4.2. Analýza cytotoxicity látek pomocí MTT testu

Vliv intenzity modrého světla na cytotoxicitu testovaných látek byl testován na buněčné linii MCF-7 pomocí MTT testu. Buňky MCF-7 byly inkubovány po dobu 4 hodin s látkami **8853** a **8656** o koncentracích 0,04 μM , 0,12 μM , 0,37 μM , 1,1 μM , 3,3 μM a 10 μM , následně ozářeny modrým světlem o intenzitě 2,5 J/cm², 5 J/cm² a 10 J/cm² a inkubovány dalších 20 hodin. Byly vytvořeny křivky závislosti viability buněk na koncentraci látek a stanoveny hodnoty IC₅₀, které jsou definovány jako koncentrace testované látky, která sníží viabilitu buněčné populace na 50 %. Výsledky shrnuje Tabulka 3, ze které vyplývá, že látky bez ozáření modrým světlem pro buňky buněčné linie MCF-7 nevykazovaly žádné výrazné známky cytotoxicity až do koncentrace 10 μM . Se zvyšující se intenzitou záření se zvyšuje i účinnost obou testovaných látek, tedy klesají jejich hodnoty IC₅₀.

Experiment dokázal, že vybrané látky **8853** a **8656** v kombinaci s ozářením modrým světlem mají cytotoxické účinky na buňky MCF-7. Jejich účinnost se v závislosti na intenzitě záření pohybuje v (sub)mikromolárních koncentracích. Zatímco hodnota IC₅₀ se po ozáření světlem o intenzitě 2,5 J/cm² u obou látek pohybuje okolo 3 μM , zvýšení intenzity světla na 10 J/cm² sníží výslednou hodnotu IC₅₀ zhruba 4x na 0,8 μM pro látku **8853** a 0,7 μM pro látku **8656** (Tabulka 3). Tato účinnost je srovnatelná s již dříve publikovanými strukturálně podobnými látkami, jejichž účinnost byla ověřována na buňkách melanomu G361, které byly rovněž ozařovány modrým světlem o vlnové délce 414 nm (Varvuolyte et al. 2020).

V experimentálních modelech karcinomu prsu se často studuje fotodynamická účinnost strukturálně odlišných sloučenin, často různých photofrinových derivátů. Vzhledem k jejich odlišným vlastnostem je srovnání jejich účinnosti s našimi látkami obtížné. Mezi příklady testovaných látek patří například derivát photofrinu Sinoporfyrin sodný (DVDMS) na myší linii karcinomu prsu 4T1 při koncentraci 4 μM a intenzitě ozáření laserem mezi 1,43 a 7,15 J/cm² (Wang et al., 2015). Dále pak také látka TONS 501-Na, která byla testována při koncentracích 0-100 $\mu\text{g/ml}$ a intenzitě ozáření diodového laseru mezi 0-13 J/cm² na buňkách odvozených od myšího karcinomu prsu EMT6 (Osaki et al., 2017).

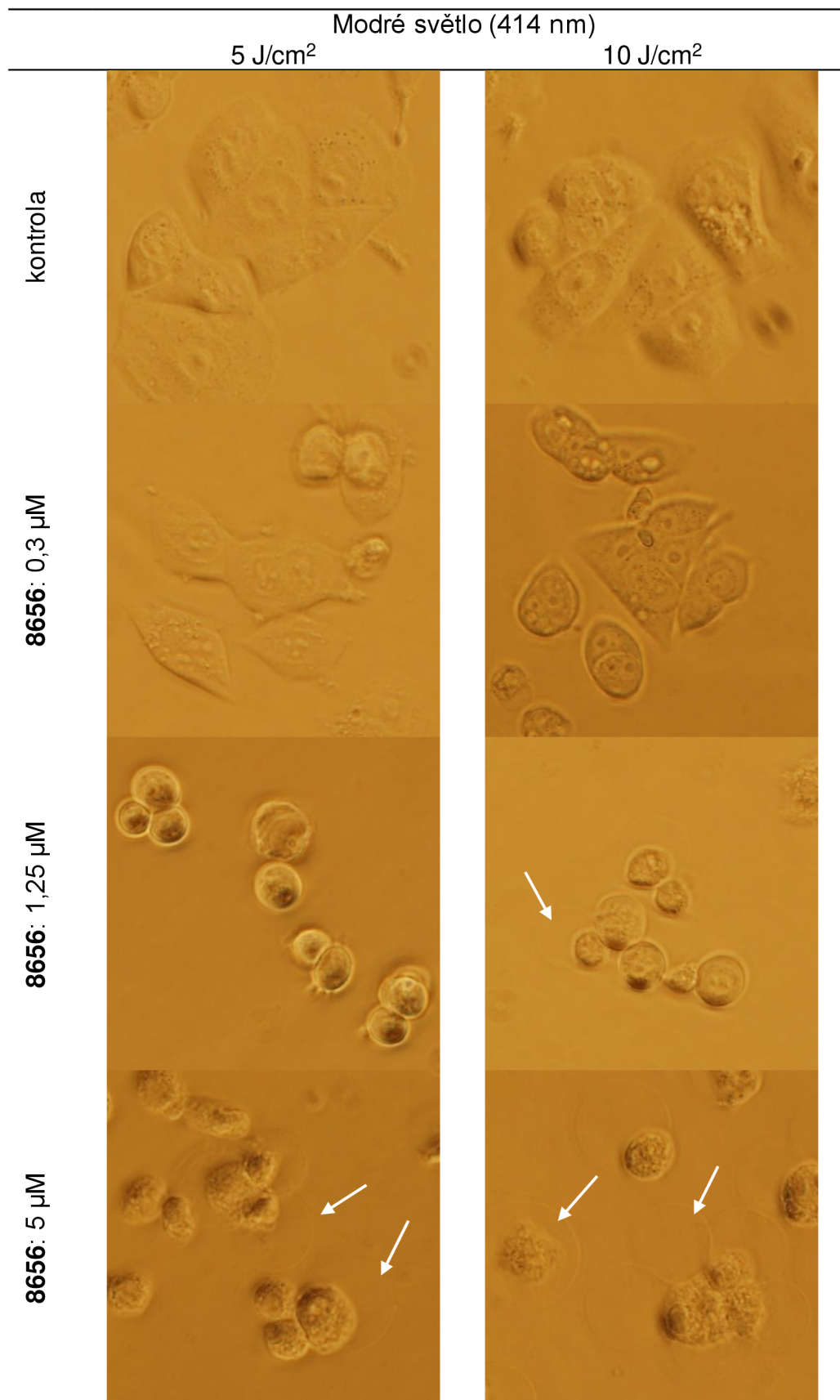
Tabulka 3: Cytotoxicita testovaných látek **8853** a **8656** ($IC_{50} \pm SD$) u buněk buněčné linie MCF-7. Hodnoty IC_{50} jsou průměrem tří nezávislých experimentů se směrodatnou odchylkou.

látka	$IC_{50} \pm SD$ (μM)			
	Tma	Světlo (414 nm)		
		2,5 J/cm ²	5 J/cm ²	10 J/cm ²
8853	>10	2,939 \pm 0,169	1,349 \pm 0,238	0,815 \pm 0,230
8656	>10	3,034 \pm 0,841	1,193 \pm 0,144	0,663 \pm 0,116

Ze získaných dat vyplývá, že vyšší účinnosti dosahuje látka **8656**, a proto byly další experimenty prováděny již jen s látkou **8656**.

4.3. Morfologie buněk

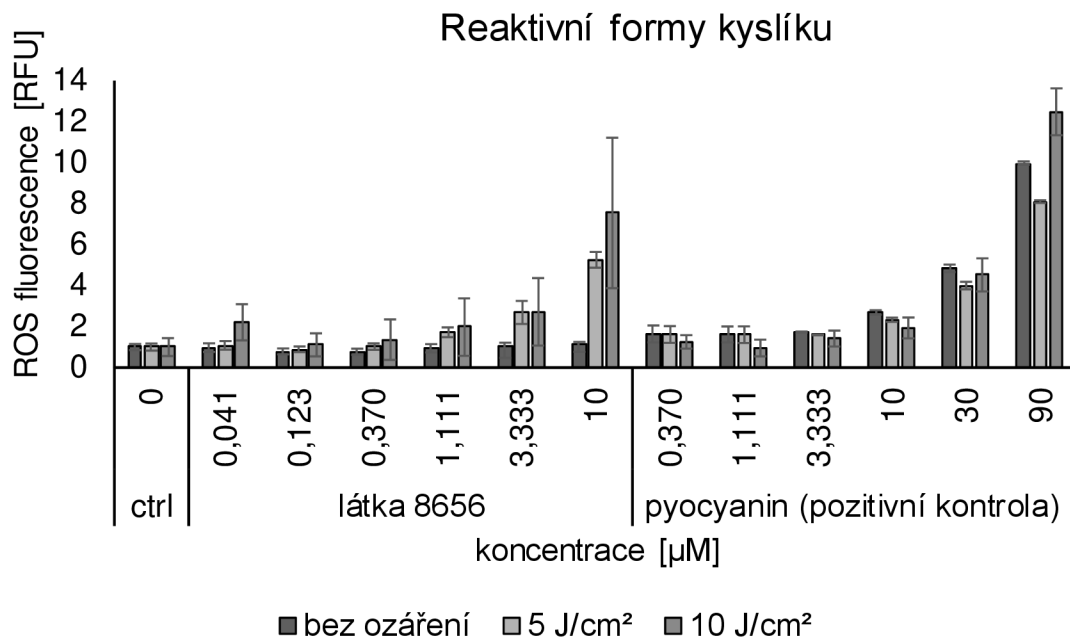
Aplikace fotochemické reakce může vést k různým typům buněčné smrti. Pod mikroskopem byla pozorována morfologie buněk linie MCF-7 po ovlivnění testovanou látkou **8656** a po ozáření 10 J/cm² a 5 J/cm². U kontrolních buněk, které nebyly ovlivněny látkou **8656**, ale byly ozářené jak 5 J/cm², tak 10 J/cm² je možné pozorovat typický tvar buněk MCF-7 (Obrázek 6). Buňky rostou přisedle a nevykazují žádné znaky buněčné smrti. Při nižších koncentracích testované látky docházelo k postupnému zakulacování buněk a jejich odlepování od povrchu kultivační desky. Tyto morfologické změny bylo možné pozorovat při koncentraci látky 0,3 μM i 1,25 μM jak při ozáření modrým světlem o intenzitě 5 J/cm² tak 10 J/cm². Zakulacení buněk a jejich odlepování od povrchu může být znakem apoptózy. Zároveň u buněk ovlivněných 1,25 μM koncentrací **8656** s ozářením 10 J/cm² bylo již pozorováno bobtnání cytoplazmatické membrány a zároveň kondenzace obsahu buňky. Toto bylo pozorováno také u koncentrace 5 μM při obou intenzitách ozáření. Tyto výsledky naznačují, že s rostoucí koncentrací **8656** a zvyšující se intenzitou záření dochází k přesunu mechanismu buněčné smrti od apoptózy k nekróze (Obrázek 6). Podobné morfologické změny buněk v důsledku indukce apoptotické a nekrotické smrti byly pozorovány i ve dřívějších publikacích na buňkách glioblastomu T98G po ovlivnění látkou talaporfinem sodným (NPe6) ozářených laserem o vlnové délce 664 nm (Miki et al., 2013)



Obrázek 6: Morfologie buněk buněčné linie MCF-7, které byly ovlivněny zvyšujícími se koncentracemi testované látky **8656** po dobu 4 hodin a následně 20 hodin po ozáření světlem o vlnové délce 414 nm o intenzitě 5 J/cm² či 10 J/cm² fotografovány při zvětšení 400x. Šípkami označené morfologické změny buněk spojené s nekrózou.

4.4. Produkce ROS

V průběhu PDT produkují PS reaktivní formy kyslíku, které pomáhají ničit rakovinné buňky. V průběhu výzkumu byla zjišťována produkce ROS u testované látky **8656** pomocí fluorescenční sondy CM-H₂DCFDA. Tento derivát fluoresceinu, který není fluorescenční, vstupuje do buněk. V přítomnosti ROS dochází k jeho rozštěpení, což vede ke zvýšení jeho fluorescence, kterou je následně možné detekovat. Produkce ROS nebyla indukovaná u ovlivněných buněk MCF-7, které nebyly ozářeny, což jen potvrzuje, že látka bez ozáření nebyla aktivována. V závislosti na zvyšující se koncentraci látky **8656** a na intenzitě ozáření byla pozorována zvyšující se hladina ROS u buněčné kultury MCF-7. Nejvyšší produkce ROS byla detekovaná při použití koncentrace 10 μM s ozářením 10 J/cm². Jako pozitivní kontrola pro tuto metodu byla použita látka pyocyanin, jejíž mechanismus působení je odlišný od látky **8656**. Působení pyocyaninu není ovlivněno modrým světlem a ve všech experimentálních podmínkách je míra působení pyocyaninu srovnatelná. Látka **8656** je v porovnání s pyocyaninem účinnější. Pro dosažení srovnatelné účinnosti je totiž potřeba vyšší koncentrace pyocyaninu než **8656** (Graf 3). Jak již bylo zmíněné v teoretické části bakalářské práce, produkce ROS je typická pro PDT a byla popsána dříve například i v modelech karcinomu prsu (Wang et al., 2015), kde autoři ověřili účinnost sinoporfirinu sodného DVDMS po ozáření laserem na buňkách 4T1 odvozených od myších buněk karcinomu prsu a prokázali spojitost cytotoxicity této látky právě s aktivací ROS. Stejně tak při ověření tvorby ROS u DTP (meso-5-[p-diethylen triamin pentaoctová kyselina-aminofenyl]-10,15,20-trifenyl-porfyrin) byla zaznamenána závislost aktivace tvorby ROS na dávce použité látky stejně jako v pokusu s látkou **8656** (Chen et al., 2024).



*Graf 3: Relativní hodnota fluorescence reprezentující produkci ROS buňkami MCF-7 ovlivněnými testovanou látkou **8656** a ozářenými modrým světlem. Měření probíhalo bezprostředně po ozáření buněk. Kontrolu představují buňky bez ovlivnění **8656** a pozitivní kontrolu představují buňky ovlivněné Pyocyaninem. Data jsou normalizována na neovlivněnou kontrolu a jsou průměrem hodnot dvou měření se směrodatnou odchylkou.*

4.1. Analýza exprese proteinů pomocí imunoblottingu

Pro potvrzení rozdílů mezi apoptotickou a neapoptotickou buněčnou smrtí způsobenou **8656** v kombinaci s modrým světlem byla provedena analýza vybraných proteinů souvisejících s buněčnou smrtí.

Byl analyzovaný 116 kDa protein PARP-1. Hlavní funkcí proteinu PARP-1 je detekce a oprava poškozené DNA, nicméně při neopravitelných chybách v DNA dojde k aktivaci kaspáz a následné indukci apoptózy. Protein PARP-1 vytváří po aktivaci kaspás 89 kDa štěpný fragment, který se všeobecně používá jako marker apoptózy (Boulares et al., 1999). Protein PARP-1 nebyl štěpen u vzorků ovlivněných pouze testovanou látkou **8656** a u pouze ozářených vzorků bez ovlivnění látkou. U vzorků ovlivněných **8656** a zároveň ozářených modrým světlem o intenzitě 2,5 a 5 J/cm² došlo k tvorbě štěpného fragmentu proteinu PARP 1, což indikuje iniciaci apoptózy. U vyšších intenzit ozáření docházelo k celkovému vymizení celého proteinu PARP-1 včetně štěpného fragmentu, což ukazuje, že v tomto případě apoptóza neprobíhá (Obrázek 7).

Protein BAX patří mezi proapoptotické proteiny z rodiny Bcl-2 a hraje důležitou roli v mitochondriální apoptóze. Za normálních podmínek je většina proteinu BAX umístěna v cytosolu a má minimální vazbu na membránu mitochondrií. Za stresových podmínek dochází k aktivaci a fragmentaci proteinu BAX, což způsobuje jeho přesunutí na mitochondriální membrány, její depolarizaci a uvolnění cytochromu c (Gao & Dou, 2000). Výsledky detekce proteinu BAX korelují s výsledky získanými pro protein PARP-1. Protein BAX nebyl štěpen u vzorků ovlivněných pouze látkou **8656** a u vzorků pouze ozářených modrým světlem. U vzorků ovlivněných **8656** a ozářených 2,5, 5 a 7,5 J/cm² došlo jak k mírnému nárůstu celkové hladiny proteinu BAX, tak k tvorbě 18-kDa štěpného fragmentu proteinu BAX, což indikuje iniciaci apoptózy. Se zvyšující se koncentrací opět docházelo k celkovému vymizení proteinu i štěpného fragmentu BAX (Obrázek 7).

Proteiny Mcl-1 a Bcl-2 jsou antiapoptotické proteiny rodiny Bcl-2, které regulují buněčnou smrt. Jejich úkolem je chránit buňku inhibicí uvolnění cytochromu C, dále opravovat DNA a regulovat buněčný cyklus (Craig, 2002). Analýza exprese proteinů Bcl-2 a Mcl-1 prokázala, že v závislosti na intenzitě ozáření dochází k postupnému poklesu hladiny obou proteinů (Obrázek 7).

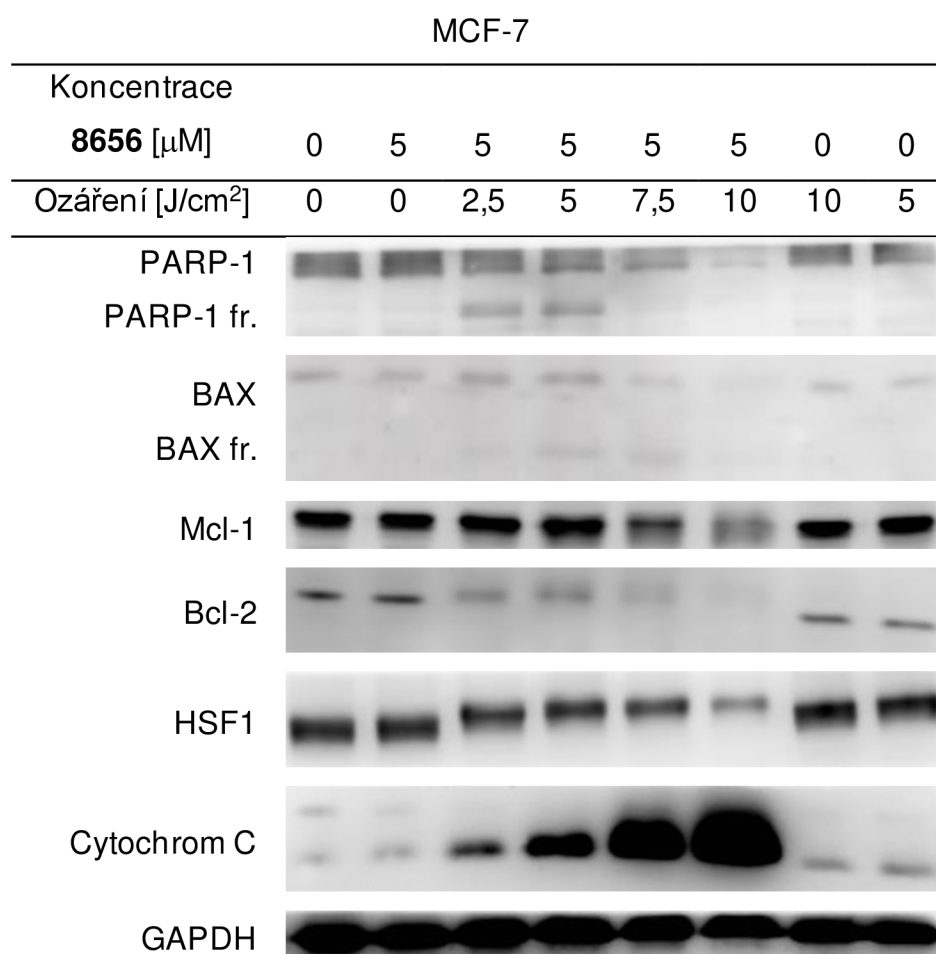
Dalším detekovaným proteinem byl cytochrom C, protein vyskytující se za fyziologických podmínek v mezimembránovém prostoru mitochondrií. Jeho hlavní úlohou je transport elektronů v dýchacím řetězci buňky. Při poškození membrán mitochondrií dochází k uvolnění cytochromu C do cytosolu, což patří ke klíčovým dějům při apoptóze (Ow et al., 2008). Na Obrázek 7 je možné pozorovat extrémní nárůst cytochromu C ve vzorcích ovlivněných 5 μM koncentrací **8656** vlivem zvyšující se intenzity použitého světla. Výsledky naznačují, že vlivem látky **8656** došlo k poškození mitochondriálních membrán a vylití cytochromu C do cytosolu. Díky tomu došlo k lepší extrakci proteinu při zpracování vzorků (Obrázek 7). Bylo prokázáno, že poškození mitochondriální membrány pomocí PDT vede k vylití cytochromu C a také k indukci apoptózy (Huang et al., 2005; Kessel & Luo, 1998). Cílení PS na mitochondrie je dokonce jednou ze strategií zvýšení účinku PS, zahrnující například studii IR-TPP na buňkách karcinomu děložního čípku HeLa s ozářením laserem o vlnové délce s 808 nm (Batakrishna et al. 2020).

Výsledky exprese studovaných proteinů naznačují, že zatímco vlivem nižších intenzit záření (2,5 a 5 J/cm²) dochází k aktivaci proapoptotických účinků látky **8656**, vyšší intenzity záření (7,5 a 10 J/cm²) v kombinaci s látkou **8656** navozují v buňkách MCF-7 nekrózu. Tyto výsledky jsou tak v souladu s morfologickými změnami pozorovanými u buněk MCF-7 po ovlivnění **8656** a ozaření modrým světlem (Obrázek 6).

Již ve dřívějších výzkumech bylo pozorováno, že nízké dávky PS iniciují apoptózu, zatímco vysoké dávky směřují buněčnou smrt k nekróze. Mezi příklady studií patří studie Photofrinu na buňkách buněčné linie opičích ledvin CV-1 (Dellinger 1996) nebo studie chlorohliníkového ftalocyaninu na buňkách myší leukémie P388 a L1210 (Luo & Kessel, 1997). Tento fakt je potvrzen vymizením jak štěpných fragmentů, tak i celkových proteinů PARP-1, BAX, Mcl-1 a Bcl-2 (Obrázek 7).

V experimentálních modelech karcinomu prsu buněčné linie MCF-7 byla testována indocyaninová zeleň v koncentracích 15 a 25 μM ozářená diodovým laserem o vlnové délce 805 nm. Intenzita záření odpovídala 15 a 25 J/cm². V porovnání s látkou **8656**, vykazuje indocyaninová zeleň menší účinnost na buňky buněčné linie MCF-7. Ve studii byla použita jak vyšší koncentrace látky, tak vyšší intenzita ozáření laserem, a i přesto detekovaný protein PARP-1 tvořil štěpný fragment pouze při nejvyšší koncentraci a intenzitě ozáření (Crescenzi et al., 2004). Byla zde tedy indukována pouze apoptóza.

Dále byla také na buněčné linii MCF-7 testována látka meso-5-[p-diethylen triamin pentaoctová kyselina-aminofenyl]-10,15,20-trifenyl-porfyrin (DTP) o koncentraci 0 – 1,4 μM a ozářená světlem s vlnovou délkou 650 nm o intenzitě 16 J/cm² po dobu 17 minut. Podobně jako ve studii Crescenzi a kol. byla látka méně účinná než **8656** a vykazovala pouze apoptotické účinky potvrzené snižující se expresí proteinu Bcl-2 a zvyšující se expresí proteinu BAX (Chen et al., 2024).

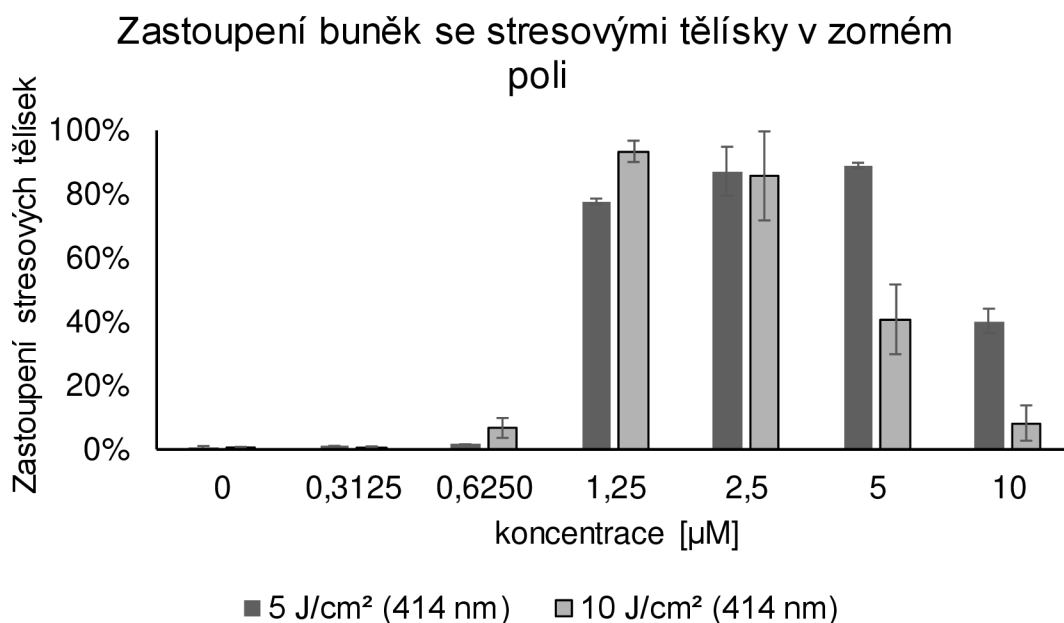


Obrázek 7: Imunodetekce proteinů buněk buněčné linie MCF-7 vystavených koncentraci $5 \mu\text{M}$ látky **8656** a po 4 h od ovlivnění ozářených modrým světlem [J/cm^2] v různých intenzitách v rozmezí od 0 do $10 \text{ J}/\text{cm}^2$ s následnou inkubací po dobu 4 hodin. Zkratka fr. představuje štěpný fragment daného proteinu. Protein GAPDH slouží jako kontrola rovnoměrného nanesení vzorků.

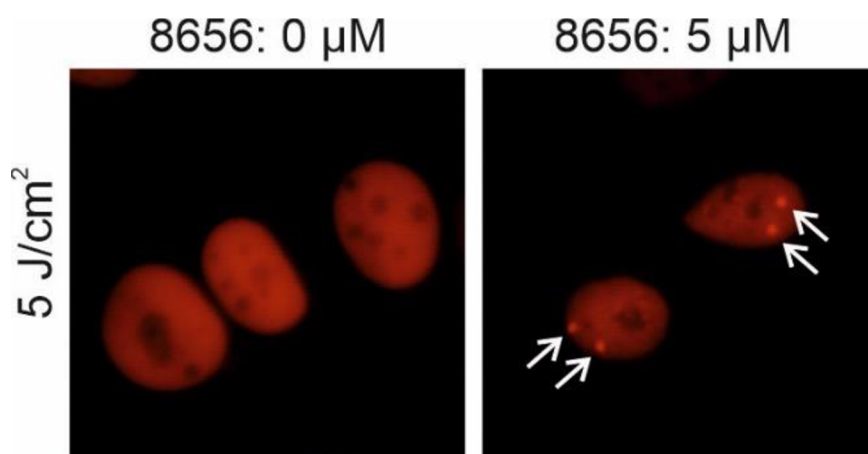
4.2. Jaderná stresová tělíska

Jaderná stresová tělíska HSF1 jsou formována v jádrech buněk působením různých stresových podmínek. Protein HSF1 funguje jako hlavní mediátor transkripčních odpovědí na indukovaný stres jako je tepelný šok či oxidativní stres. V nestresových podmínkách se vyskytuje jako neaktivní monomer v cytoplazmě i jádře a jeho aktivita je potlačena molekulárními chaperony jako jsou Hsp70 a Hsp90. Při buněčném stresu, zahrnujícím například teplotní šok, přítomnost těžkých kovů či analogů aminokyselin (Cotto et al., 1997), dochází k posttranslačním modifikacím HSF1, kde je monomer formován do aktivního trimeru. Trimer se následně hromadí v jádře a váže se na elementy tepelného šoku (HSE) na DNA do regulačních oblastí genu heat shock proteinů.

Spojení HSF1 s DNA sekvencemi vede ke transkripci nekódujících jednořetězcových molekul RNA a tvorbě jaderných stresových tělísek (Naidu & Dinkova-Kostova 2017). V souvislosti s PDT stresová tělíska ještě zkoumána nebyla. Pro potvrzení výskytu HSF1 stresových tělísek byly použity buňky stabilně exprimující protein HSF1 fúzovaný s fluorescenčním proteinem mCherry (MCF-7-HSF1-mCherry), které byly ovlivněny vzestupnými koncentracemi **8656** a ozářeny modrým světlem v intenzitách 5 a 10 J/cm². Zatímco u nízkých použitých koncentrací **8656** nebyla stresová tělíska pozorována, u koncentrací 1,25 μM a 2,5 μM byly po ozáření světlem o intenzitě 5 i 10 J/cm² pozorovány tělíska u skoro 80 % buněk. U vyšších koncentrací látky docházelo k vymizení stresových tělísek (Graf 4, Obrázek 8). Tento výsledek koreloval s analýzou HSF1 pomocí imunoblottingu, která prokázala, že se zvyšující se intenzitou záření docházelo u buněk ovlivněných **8656** ke snížení hladiny proteinu HSF1 (Obrázek 7).



*Graf 4: Zastoupení jaderných stresových tělísek u buněčné linie MCF-7-HSF1-mCherry v závislosti na koncentraci zájmové látky **8656**. Fotografie byly pořízeny bezprostředně po ozáření buněk o intenzitě 5 J/cm² a 10 J/cm² při zvětšení 400x. Na fotografiích jsou vizuálně znázorněny buňky bez i se stresovými tělísky označené šipkami. Data jsou průměrem hodnot 2 zorných polí a chyba jako SD.*



Obrázek 8: Reprezentativní fotografie detekce fluorescenčního signálu HSF1. Porovnání vlivu látky **8656** na vznik stresových tělísek v jádře buněk ozářených světlem o intenzitě $5 \text{ J}/\text{cm}^2$ o vlnové délce 414 nm . Vlevo jádra buněk neovlivněných bez stresových tělísek. Vpravo buňky ovlivněné $5 \mu\text{M}$ **8656** se stresovými tělísky označené šipkou.

5. Závěr

V rámci bakalářské práce byly zkoumány fotodynamické vlastnosti nově syntetizované fotosenzitivní látky **8656** na buněčné linii MCF-7 odvozené od adenokarcinomu prsu pomocí vybraných biologických a biochemických metod.

Měření absorpčního spektra bylo zjištěno absorpční maximum látky **8656** s vlnovou délkou 380 nm. Tato vlnová délka spadá do oblasti UV záření, které není ideální pro použití v klinických aplikacích kvůli svým negativním účinkům na organismus. V rámci experimentů bylo tedy zvoleno světlo o vlnové délce 414 nm, protože se stále nachází v oblasti absorpčního spektra látky **8656**, což je klíčové pro efektivní aktivaci fotochemické reakce. Navíc je vhodnější pro studium fotodynamických účinků látek na buňky než UV záření.

Byl potvrzen cytotoxický účinek látky **8656** na buněčnou linii MCF-7 v závislosti na intenzitě ozáření. Zatímco bez ozáření nevykazovala **8656** žádné výrazné cytotoxické účinky až do koncentrace 10 μM , což je velmi důležitá vlastnost fotosenzitivních látek, se zvyšující se intenzitou záření docházelo k postupnému zvyšování cytotoxicity až na hodnotu 0,7 μM při ozáření 10 J/cm^2 .

Protože je produkce reaktivních forem kyslíku typická pro fotodynamickou terapii, byla sledována jejich produkce i v našem experimentálním modelu. Reaktivní formy kyslíku byly detekovány pouze při kombinaci **8656** s ozářením modrým světlem a pravděpodobně stojí za cytotoxickým účinkem **8656**.

Následná analýza morfologie buněk naznačila, že v závislosti na různých koncentracích látky a intenzitě světla dochází k různým typům buněčné smrti. Zatímco nižší koncentrace **8656** po aktivaci světlem působí spíše proapoptoticky, vyšší dávky vedou spíše k nekróze. Tento poznatek byl také podpořen analýzou exprese apoptotických markerů imunoblottingem.

V neposlední řadě byla potvrzena tvorba HSF1 stresových tělísek v jádrech buněk MCF-7 po ovlivnění látkou **8656** a ozáření modrým světlem. Tato pozorování naznačují aktivaci buněčných mechanismů odpovídajících na indukovaný stres.

Celkově lze konstatovat, že studie poskytuje důležité informace o potenciálu látky **8656** pro fotodynamickou terapii rakoviny prsu a ukazuje na její schopnost indukovat buněčnou smrt v nádorové buněčné linii MCF-7. Tato zjištění přispívají k dalšímu porozumění mechanismům působení fotodynamické

terapie a mohou posloužit jako základ pro další vývoj léčiv pro terapii rakoviny prsu.

Zkratky

- 5-ALA - 5-aminolevulinic acid
- AA – Acrylamide
- APS – Amonium persulfate
- ATP – Adenosine triphosphate
- Bax – Bcl-2-associated protein X
- Bcl-2 – B-cell lymphoma 2
- Bcl-XL – B-cell lymphoma – extra large
- Bid – BH3 interacting-domain death agonist
- Bidt – BH3 interacting-domain death agonist fragment
- Bis – N',N',methylenbisacrylamidce
- BSA – Bovine serum albumin
- CM-H₂DCFDA - chloromethyl derivative fluorescein
- CPO – Porfycen
- Ctrl – Control
- DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DMF – Dimethylformamide
- DMSO – Dimethyl sulfoxide
- DTP – Meso-5-[p-diethylene triamine pentaacetic acid-aminophenyl]-10,15,20-triphenyl-porphyrin
- DTT – Dithiothreitol
- DVDMS – Sinoporphyrin sodium
- ECL - Enhanced chemiluminescence
- EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid
- EGTA – Ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid)
- EMA – European Medicines Agency
- FS – Fetal Bovine Serum
- GAPDH – Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
- HpD – Hematoporphyrin derivate
- HSE – Heat shock element
- HSF1 – Heat shock factor 1
- HSP70 – Heat shock protein 70
- HSP90 – Heat shock protein 90

- IC₅₀ – Half-maximal inhibitory concentration
- Mcl-1 – Myeloid cell leukemia-1
- mTHPC – m-tetrahydroxyphenylchlorin, Temoporfin
- MTT - 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid
- PARP-1 – Poly [ADP-ribose] polymerase 1
- PDT – Photodynamic therapy
- PMSF – phenylmethylsulfonyl fluoride
- PpIX – Protoporphyrin IX
- PS – Photosensitizer
- RIP1 – Receptor-interacting protein 1
- RIPA – Radioimmunoprecipitation assay buffer
- ROS – Reactive oxygen species
- RPMI 1640 – Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
- SDS-PAGE – SDS-polyacrylamide electrophoresis
- SDS – Dodecylsulfate sodium
- SnET2 - Tin etiopurpurin dichloride
- TBS – Tris buffer saline
- TEMED – N',N',N',N'-tetramethylethylendiamin
- TNF – Tumor necrosis factor
- TRIS – Tris(hydroxymethyl)aminomethan
- WHO – World Health Organization

Reference

- Ackroyd, R., Kelty, C., Brown, N., & Reed, M. (2001). The History of Photodetection and Photodynamic Therapy ¶. *Photochemistry and Photobiology*, **74**(5), 656–669.
[https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2001\)074<0656:thopap>2.0.co;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2001)074<0656:thopap>2.0.co;2).
- Agarwal, M. L., Clay, M. E., Harvey, E. J., Evans, H. H., Antunez, A. R., & Oleinick, N. L. (1991). Photodynamic Therapy Induces Rapid Cell Death by Apoptosis in LS178Y Mouse Lymphoma Cells1. *Cancer Research*, **51**(21), 5993–5996.
<http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/51/21/5993/2445338/cr0510215993.pdf>
- Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., Hahn, S. M., Hamblin, M. R., Juzeniene, A., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J., Mroz, P., Nowis, D., Piette, J., Wilson, B. C., & Golab, J. (2011). Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *A Cancer Journal for Clinicians*, **61**(4), 250–281. <https://doi.org/10.3322/caac.20114>
- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M. C., Roberts, K., & Walter, P. (2006). Regulace počtu buněk u mnoho buněčných organismů. Přeložil A. Kotyk, B. Bouzek, & P. Horák, *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky* (2. vyd., s. 584–587). Espero. ISBN: 80-902906-2-0
- Batakrishna, J., Ajesh, T. P., Sangpil, K., In, L. S., Huyeon, C., Seongeon, J., Soo, P. A., Seung, K. M., Chaekyu, K., & Ja-Hyoung, R. (2020). Self-Assembly of Mitochondria-Targeted Photosensitizer to Increase Photostability and Photodynamic Therapeutic Efficacy in Hypoxia. *Chemistry - A European Journal*, **26**(47), 10695–10701.
<https://doi.org/10.1002/CHEM.202001366>
- Berghe, T. Vanden, Kalai, M., van Loo, G., Declercq, W., & Vandenabeele, P. (2003). Disruption of HSP90 Function Reverts Tumor Necrosis Factor-Induced Necrosis to Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, **278**(8), 5622–5629. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208925200>
- Berra, C. M., Menck, C. F. M., Martinez, G. R., De Oliveira, C. S., Da Silva Baptista, M., & Di Mascio, P. (2010). Plasmid DNA Damage Induced by

Singlet Molecular Oxygen Released from the nNphthalene Endoperoxide DHPNO₂ and Photoactivated Methylene Blue. *Quimica Nova*, **33**(2), 279–283.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000200009>

Bissonnette, R., Shapiro, J., Zeng, H., Mclean, D. I., & Lui, H. (2000). Topical photodynamic therapy with 5-Aminolaevulinic Acid Does Not Induce Hair Regrowth in Patients with Extensive Alopecia Areata. *British Journal of Dermatology*, **143**, 1032–1035.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2000.03783.x>

Boulares, A. H., Yakovlev, A. G., Ivanova, V., Stoica, B. A., Wang, G., Iyer, S., & Smulson, M. (1999). Role of Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) Cleavage in Apoptosis Caspase 3-resistant PARP Mutant Increases Rates of Apoptosis in Transfected Cells*. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**(33), 22932–22940.

<https://doi.org/10.1074/jbc.274.33.22932>

Brancalion, L., & Moseley, H. (2002). Laser and Non-laser Light Sources for Photodynamic Therapy. *Journal of Lasers in Medical Science*, **17**, 173–186. <https://doi.org/10.1111/php.13219>

Buytaert, E., Callewaert, G., Hendrickx, N., Scorrano, L., Hartmann, D., Missiaen, L., Vandenheede, J. R., Heirman, I., Grooten, J., & Agostinis, P. (2006). Role of Endoplasmic Reticulum Depletion and Multidomain Proapoptotic BAX and BAK Proteins in Shaping Cell Death After Hypericin-Mediated Photodynamic Therapy. *The FASEB Journal*, **20**(6), 756–758. <https://doi.org/10.1096/fj.05-4305fje>

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

Castano, A. P., Mroz, P., & Hamblin, M. R. (2006). Photodynamic Therapy and Anti-tumour Immunity. *Nature Reviews Cancer*, **6**(7), 535–545. <https://doi.org/10.1038/nrc1894>

Cotto, J. J., Fox, S. G., & Morimoto, R. I. (1997). HSF1 granules: A novel Stress-induced Nuclear Compartment of Human Cells. *Journal of Cell Science*, **110**(23), 2925–2934. <https://doi.org/10.1242/jcs.110.23.2925>

- Craig, R. W. (2002). MCL1 Provides a Window on the Role of the BCL2 Family in Cell Proliferation, Differentiation and Tumorigenesis. *Leukemia*, **16**, 444–454. <https://doi.org/10.1038/sj/leu/2402416>
- Crescenzi, E., Varriale, L., Iovino, M., Chiaviello, A., Veneziani, B. M., & Palumbo, G. (2004). Photodynamic therapy with Indocyanine Green Complements and Enhances Low-dose Cisplatin Cytotoxicity in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, **3**(5), 537–544. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.537.3.5>
- Deken, M. M., Kijanka, M. M., Hernández, B. I., Slooter, M. D., de Bruijn, H. S., van Diest, P. J., van Bergen en Henegouwen, P. M. P., Lowik, C. W. G. M., Robinson, D. J., Vahrmeijer, A. L., & Oliveira, S. (2020). Nanobody-targeted Photodynamic Therapy Induces Significant Tumor Regression of Trastuzumab-resistant HER2-positive Breast Cancer, After a Single Treatment Session. *Journal of Controlled Release*, **323**, 269–281. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2020.04.030>
- Dellinger, M. (1996). Apoptosis or Necrosis Following Photofrin® Photosensitization: Influence of the Incubation Protocol. *Photochemistry and Photobiology*, **64**(1), 182–187. <https://doi.org/10.1111/J.1751-1097.1996.TB02440.X>
- Ding, H., Yu, H., Dong, Y., Tian, R., Huang, G., Boothman, D. A., Sumer, B. D., & Gao, J. (2011). Photoactivation Switch from Type II to Type I reactions by Electron-rich Micelles for Improved Photodynamic Therapy of Cancer Cells under Hypoxia. *Journal of Controlled Release*, **156**(3), 276–280. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.08.019>
- Dolmans, D. E. J. G. J., Fukumura, D., & Jain, R. K. (2003). Photodynamic Therapy for Cancer. *Nature Reviews Cancer*, **3**(5), 375–380. <https://doi.org/10.1038/nrc1070>
- Dougherty, T. J., Kaufman, J. E., Goldfarb, A., Weishaupt, K. R., Boyle, D., & Mittleman, A. (1978). Photoradiation Therapy for the Treatment of Malignant Tumors1. *Cancer Research*, **38**, 2628–2635. <http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/38/8/2628/2402348/cr0380082628.pdf>
- Dragicevic-Curic, N., Scheglmann, D., Albrecht, V., & Fahr, A. (2008). Temoporphin-loaded Invasomes: Development, Characterization and In

- Vitro Skin Penetration Studies. *Journal of Controlled Release*, **127**(1), 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.12.013>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer Statistics for the Year 2020: An Overview. *International Journal of Cancer*, **149**(4), 778–789. <https://doi.org/10.1002/IJC.33588>
- Foote, C. S. (1991). Definition of Type I and Type II Photosensitized Oxidation. *Photochemistry and Photobiology*, **54**(5), 659–659. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1991.tb02071.x>
- François, A., Marchal, S., Guillemin, F., & Bezdetnaya, L. (2011). mTHPC-based Photodynamic Therapy Induction of Autophagy and Apoptosis in Cultured Cells in Relation to Mitochondria and Endoplasmic Reticulum Stress. *International Journal of Oncology*, **39**, 1537–1543. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1174>
- Gao, G., & Dou, P. Q. (2000). N-Terminal Cleavage of Bax by Calpain Generates a Potent Proapoptotic 18-kDa Fragment that Promotes Bcl-2-Independent Cytochrome C Release and Apoptotic Cell Death. *Journal of Cellular Biochemistry*, **80**, 53–72. [https://doi.org/10.1002/1097-4644\(20010101\)80:1<53::AID-JCB60>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/1097-4644(20010101)80:1<53::AID-JCB60>3.0.CO;2-E)
- Gunaydin, G., Gedik, M. E., & Ayan, S. (2021). Photodynamic Therapy for the Treatment and Diagnosis of Cancer—A Review of the Current Clinical Status. *Frontiers in Chemistry*, **9**(686303), 1–26. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.686303>
- Hopper, C. (2000). Photodynamic Therapy: A Clinical Reality in the Treatment of Cancer. *The Lancet Oncology*, **1**, 212–231. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(00\)00166-2](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(00)00166-2)
- Hosmann, A., Millesi, M., Wadiura, L. I., Kiesel, B., Mercea, P. A., Mischkulnig, M., Borkovec, M., Furtner, J., Roetzer, T., Wolfsberger, S., Phillips, J. J., Berghoff, A. S., Hervey-Jumper, S., Berger, M. S., & Widhalm, G. (2021). 5-ALA Fluorescence Is a Powerful Prognostic Marker during Surgery of Low-Grade Gliomas (WHO Grade II)-Experience at Two Specialized Centers. *Cancers*, **13**, 1–15. <https://doi.org/10.3390/cancers13112540>

- Huang, H.-F., Chen, Y.-Z., & Wu, Y. (2005). Mitochondria-dependent Apoptosis Induced by a Novel Amphipathic Photochemotherapeutic Agent ZnPcS₂P₂ in HL60 Cells 1. *Acta Pharmacologica Sinica*, **26**(9), 1138–1144. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2005.00160.x>
- Chen, J., Wang, D., Wang, Z., Han, M., Yin, H., Zhou, W., Yan, R., & Pan, Y. P. (2024). Antitumor effects of a Novel Photosensitizer-mediated Photodynamic Therapy and its Influence on the Cell Transcriptome. *Oncology Research*, **32**(5), 911–923. <https://doi.org/10.32604/or.2023.042384>
- Chen, X., Hui, L., Foster, D. A., & Drain, C. M. (2004). Efficient Synthesis and Photodynamic Activity of Porphyrin-saccharide Conjugates: Targeting and Incapacitating Cancer Cells. *Biochemistry*, **43**(34), 10918–10929. <https://doi.org/10.1021/bi049272v>
- Chilakamarthi, U., & Giribabu, L. (2017). Photodynamic Therapy: Past, Present and Future. *The Chemical Record*, **17**(8), 775–802. <https://doi.org/10.1002/tcr.201600121>
- Chiu, S., Xue, L., Lam, M., Rodriguez, M. E., Zhang, P., Kenney, M. E., Nieminen, A.-L., & Oleinick, N. L. (2010). A Requirement for Bid for Induction of Apoptosis by Photodynamic Therapy with a Lysosome-but Not a Mitochondrion-targeted Photosensitizer. *Photochemistry and Photobiology*, **86**(5), 1161–1173. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2010.00766.x>
- Iani, V., Moan, J., & Ma, L. (1996). Measurements of Light Penetration into Human Tissues In Vivo. *SPIE*, **2625**, 378–383. <https://doi.org/10.1117/12.230985>
- Josefsen, L. B., & Boyle, R. W. (2008). Photodynamic Therapy and the Development of Metal-based Photosensitisers. *Metal-Based Drugs*, **2008**, 1–24. <https://doi.org/10.1155/2008/276109>
- Kelly, J. F., Snell, M. E., & Berenbaum, M. C. (1975). Photodynamic Destruction of Human Bladder Carcinoma. *British Journal of Cancer*, **31**, 237–244. <https://doi.org/10.1038/bjc.1975.30>
- Kennedy, J. C., & Pottier, R. H. (1992). New Trends in Photobiology (Invited Review) Endogenous Protoporphyrin IX, a Clinically Useful

- Photosensitizer for Photodynamic Therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **14**(4), 275–292.
[https://doi.org/10.1016/1011-1344\(92\)85108-7](https://doi.org/10.1016/1011-1344(92)85108-7)
- Kessel, D. (2006). Death Pathways Associated with Photodynamic Therapy. *Medical Laser Application*, **21**(4), 219–224.
<https://doi.org/10.1016/j.mla.2006.05.006>
- Kessel, D., & Castelli, M. (2001). Evidence that bcl-2 is the Target of Three Photosensitizers that Induce a Rapid Apoptotic Response ¶. *Photochemistry and Photobiology*, **74**(2), 318–322.
[https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2001\)0740318ETBITT2.0.CO2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2001)0740318ETBITT2.0.CO2)
- Kessel, D., & Luo, Y. (1998). Mitochondrial Photodamage and PDT-Induced Apoptosis. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **42**(2), 89–95. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(97\)00127-9](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(97)00127-9)
- Kessel, D., & Oleinick, N. L. (2018). Cell Death Pathways Associated with Photodynamic Therapy: An Update. *Photochemistry and Photobiology*, **94**(2), 213–218. <https://doi.org/10.1111/php.12857>
- Kessel, D., & Poretz, R. D. (2000). Sites of Photodamage Induced by Photodynamic Therapy with a Chlorin e6 Triacetoxymethyl Ester (CAME). *Photochemistry and Photobiology*, **71**(1), 94–96.
[https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2000\)0710094sopibp2.0.co2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2000)0710094sopibp2.0.co2)
- Kim, H.-R. C., Luo, Y., Li, G., & Kessel, D. (1999). Enhanced Apoptotic Response to Photodynamic Therapy after bcl-2 Transfection 1. *Cancer Research*, **59**(14), 3429–3432.
- Kim, K. S., Kim, J., Kim, D. H., Hwang, H. S., & Na, K. (2018). Multifunctional Trastuzumab-Chlorin e6 Conjugate for the Treatment of HER2-positive Human Breast Cancer. *Biomaterials Science*, **6**, 1217-1226.
<https://doi.org/10.1039/c7bm01084b>
- Kim, T. E., & Chang, J.-E. (2023). Recent Studies in Photodynamic Therapy for Cancer Treatment: From Basic Research to Clinical Trials. *Pharmaceutics*, **15**(2257), 1–25.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15092257>
- Kintara Therapeutics, Inc. (2024, únor 13). *Efficacy and Safety Study of REM-001 Photodynamic Therapy for Treatment of Cutaneous Metastatic Breast Cancer (CMBC)*, ID: NCT05374915.

- ClinicalTrials.gov.
<https://clinicaltrials.gov/study/NCT05374915?intr=rem-001&rank=1>
- Kroemer, G., & Jäätelä, M. (2005). Lysosomes and Autophagy in Cell Death Control. *Nature Reviews Cancer*, **5**(11), 886–897.
<https://doi.org/10.1038/nrc1738>
- Kwiatkowski, S., Knap, B., Przystupski, D., Saczko, J., Kędzińska, E., Knap-Czop, K., Kotlińska, J., Michel, O., Kotowski, K., & Kulbacka, J. (2018). Photodynamic Therapy – Mechanisms, Photosensitizers and Combinations. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, **106**, 1098–1107.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.049>
- Lajčiková, A., & Pekárek, L. (2009). UV záření a jeho vliv na zdraví. *Hygiena*, **54**(2), 57–61. <https://hygiena.szu.cz/pdfs/hyg/2009/02/07.pdf>
- Lukšienė, Ž. (2003). Photodynamic Therapy: Mechanism of Action and Ways to Improve the Efficiency of Treatment. *MEDICINA (Kaunas)*, **39**(12), 1137–1150. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14704501/>
- Luo, Y., & Kessel, D. (1997). Initiation of Apoptosis versus Necrosis by Photodynamic Therapy with Chloroaluminum Phthalocyanine. *Photochemistry and Photobiology*, **66**(4), 479–483.
<https://doi.org/10.1111/J.1751-1097.1997.TB03176.X>
- Macrabort, A. J., Bown, S. G., & Phillips, D. (1989). What Are the Ideal Photoproperties for a Sensitizer? *Novartis Foundation Symposium*, 4–16. <https://doi.org/doi:10.1002/9780470513842.ch2>
- Maiuri, M. C., Criollo, A., & Kroemer, G. (2010). Crosstalk between Apoptosis and Autophagy within the Beclin 1 Interactome. *The EMBO Journal*, **29**, 515–516. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.377>
- Marks, P. V., Belchetz, P. E., Saxena, A., Igbaseimokumo, U., Thomson, S., Nelson, M., Stringer, M. R., Holroyd, J. A., & Brown, S. B. (2000). Effect of Photodynamic Therapy on Recurrent Pituitary Adenomas: Clinical Phase I/II trial - an Early Report. *British Journal of Neurosurgery*, **14**(4), 317–325. <https://doi.org/10.1080/026886900417298>
- Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V., & White, E. (2007). Role of Autophagy in Cancer. *Nature Reviews Cancer*, **7**(12), 961–867.
<https://doi.org/10.1038/nrc2254>

- Miki, Y., Akimoto, J., Yokoyama, S., Homma, T., Tsutsumi, M., Haraoka, J., Hirano, K., & Beppu, M. (2013). Photodynamic Therapy in Combination with Talaporfin Sodium Induces Mitochondrial Apoptotic Cell Death Accompanied with Necrosis in Glioma Cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **36**(2), 215–221.
<https://doi.org/10.1248/bpb.b12-00567>
- Mishchenko, T., Balalaeva, I., Gorokhova, A., Vedunova, M., & Krysko, D. V. (2022). Which Cell Death Modality Wins the Contest for Photodynamic Therapy of Cancer? *Cell Death & Disease*, **13**(455), 1–16.
<https://doi.org/10.1038/s41419-022-04851-4>
- Mitton, D., & Ackroyd, R. (2008). A Brief Overview of Photodynamic Therapy in Europe. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **5**(2), 103–111.
<https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2008.04.004>
- Mroz, P., Yaroslavsky, A., Kharkwal, G. B., & Hamblin, M. R. (2011). Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer. *Cancers*, **3**(2), 2516–2539. <https://doi.org/10.3390/cancers3022516>
- Naidu, S. D., & Dinkova-Kostova, A. T. (2017). Regulation of the Mammalian Heat Shock Factor 1. *The FEBS Journal*, **284**(11), 1606–1627.
<https://doi.org/10.1111/FEBS.13999>
- Nyman, E. S., & Hynninen, P. H. (2004). Research Advances in the Use of Tetrapyrrolic Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **73**, 1–28.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2003.10.002>
- Osaki, T., Sakata, I., Uto, Y., Azuma, K., Murahata, Y., Tsuka, T., Itoh, N., Imagawa, T., & Okamoto, Y. (2017). Photodynamic Therapy Mediated by a Novel Chlorin Derivative, TONS 501-Na, in EMT6 cells. *Anticancer Research*, **37**, 1723–1728. <https://doi.org/10.21873/anticancerres.11504>
- Ow, Y.-L. P., Green, D. R., Hao, Z., & Mak, T. W. (2008). Cytochrome c: Functions Beyond Respiration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **9**(7), 532–542. <https://doi.org/10.1038/nrm2434>
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Xiao, H. L., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M. D., & Levine, B. (2005). Bcl-2 Antiapoptotic Proteins Inhibit Beclin 1-Dependent Autophagy. *Cell*, **122**(6), 927–939.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.07.002>

- Piette, J., Volanti, C., Vantieghem, A., Matroule, J.-Y., Habraken, Y., & Agostinis, P. (2003). Cell Death and Growth Arrest in Response to Photodynamic Therapy with Membrane-bound Photosensitizers. *Biochemical Pharmacology*, **66**, 1651–1659.
[https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(03\)00539-2](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(03)00539-2)
- Przygoda, M., Bartusik-Aebisher, D., Dynarowicz, K., Cieślak, G., Kawczyk-Krupka, A., & Aebisher, D. (2023). Cellular Mechanisms of Singlet Oxygen in Photodynamic Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**(23), 1–23. <https://doi.org/10.3390/ijms242316890>
- Reiners, J. J. Jr., Caruso, J. A., Mathieu, P., Chelladurai, B., Yin, X.-M., & Kessel, D. (2002). Release of Cytochrome C and Activation of Pro-caspase-9 Following Lysosomal Photodamage Involves Bid Cleavage. *Cell Death and Differentiation*, **9**(9), 934–944.
<https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401048>
- 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.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2009.04.001>
- Sasnauskiene, A., Kadziauskas, J., Vezelyte, N., Jonusiene, V., & Kirveliene, V. (2009). Damage Targeted to the Mitochondrial Interior Induces Autophagy, Cell Cycle Arrest and, Only at High Doses, Apoptosis. *Autophagy*, **5**(5), 743–744.
<https://doi.org/10.4161/auto.5.5.8701>
- Shu, M., Yan, H., Xu, C., Wu, Y., Chi, Z., Nian, W., He, Z., Xiao, J., Wei, H., Zhou, Q., & Zhou, J. X. (2020). A novel anti-HER2 Antibody GB235 Reverses Trastuzumab Resistance in HER2-expressing Tumor Cells In Vitro and In Vivo. *Scientific Reports*, **10**(1).
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-59818-2>
- Scherz-Shouval, R., & Elazar, Z. (2007). ROS, Mitochondria and the Regulation of Autophagy. *Trends in Cell Biology*, **17**(9), 422–427.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.07.009>
- Schwartz, S., Absolon, K., & Vermund, H. (1955). Some Relationships of Porphyrins, X-rays and Tumors. *The Medical Bulletin*, **27**, 7–13.

<https://conservancy.umn.edu/bitstream/handle/11299/167339/Bulletin19551015.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Star, W. M., Marijnissen, H. P. A., Van Den Berg-Blok, A. E., Versteeg, J. A. C., Franken, K. A. P., & Reinhold, H. S. (1986). Destruction of Rat Mammary Tumor and Normal Tissue Microcirculation by Hematoporphyrin Derivative Photoradiation Observed In Vivo in Sandwich Observation Chambers. *Cancer Research*, **46**(5), 2532–2540.
- van Straten, D., Mashayekhi, V., de Bruijn, H. S., Oliveira, S., & Robinson, D. J. (2017). Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions. *Cancers*, **9**(19), 1–54. <https://doi.org/10.3390/cancers9020019>
- Varvuolytė, G., Malina, L., Bieliauskas, A., Hošíková, B., Simerská, H., Kolářová, H., Kleizienė, N., Kryštof, V., Šačkus, A., & Žukauskaitė, A. (2020). Synthesis and Photodynamic Properties of Pyrazole-indole Hybrids in the Human Skin Melanoma Cell Line G361. *Dyes and Pigments*, **183**, 108666. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108666>
- Wang, X., Hu, J., Wang, P., Zhang, S., Liu, Y., Xiong, W., & Liu, Q. (2015). Analysis of the In Vivo and In Vitro Effects of Photodynamic Therapy on Breast Cancer by Using a Sensitizer, Sinoporphyrin Sodium. *Theranostics*, **5**(7), 772–786. <https://doi.org/10.7150/thno.10853>
- World Health Organization. (2024, březen 13). *Breast Cancer*. WHO. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
- Yanovsky, R. L., Bartenstein, D. W., Rogers, G. S., Isakoff, S. J., & Chen, S. T. (2019). Photodynamic Therapy for Solid Tumors: A Review of the Literature. *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine*, **35**(5), 295–303. <https://doi.org/10.1111/phpp.12489>
- Zhang, Q., Cai, Y., Li, Q.-Y., Hao, L.-N., Ma, Z., Wang, X.-J., & Yin, J. (2017). Targeted Delivery of a Mannose-Conjugated BODIPY Photosensitizer by Nanomicelles for Photodynamic Breast Cancer Therapy. *Chemistry - A European Journal*, **23**(57), 14307–14315. <https://doi.org/10.1002/CHEM.201702935>