

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Disertační práce

Olomouc 2019

Mgr. Barbora Hošíková

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Lékařská fakulta

Ústav lékařské biofyziky



In vitro studium účinků fotosenzitivních látek
na nádorové buněčné linie

Mgr. Barbora Hošíková

Studijní program: Lékařská biofyzika

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2019

Vedoucí práce: **Mgr. Svatopluk Binder, Ph.D.**

Prohlašuji, že jsem tuto dizertační práci vypracovala samostatně v průběhu postgraduálního studia pod vedením Mgr. Svatopluka Bindera, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne 15. 7. 2019

Děkuji vedoucímu dizertační práce Mgr. Svatoplukovi Binderovi, Ph.D. za věnovaný čas v průběhu studia, za důležité připomínky a odbornou pomoc. Dále děkuji paní prof. RNDr. Haně Kolářové, CSc. za vytvoření výborných podmínek pro studium, za podporu, důvěru a v neposlední řadě také za velice cenné a praktické rady v průběhu studia. Děkuji panu Mgr. René Lenobelovi, Ph.D. za spolupráci v proteomické části dizertační práce. Děkuji i zaměstnancům Ústavu lékařské biofyziky za cenné rady a pomoc při praktické části diplomové práce.

OBSAH

1	CÍLE PRÁCE	14
2	ÚVOD	15
3	TEORETICKÁ ČÁST	17
3.1	Fotodynamická terapie (PDT)	17
3.1.1	Mechanismy fotodynamické reakce	18
3.1.1.1	Fotochemická reakce I. typu	20
3.1.1.2	Fotochemická reakce II. typu	21
3.1.2	Fotosenzitivní látky	23
3.1.2.1	Vlastnosti ideální fotosenzitivní látky	24
3.1.2.2	Klasifikace fotosenzitivních látek	25
3.1.2.2.1	Fotosenzitivní látky I. generace – deriváty hematoporphyrinu	25
3.1.2.2.2	Fotosenzitivní látky II. generace	26
3.1.2.2.2.1	5-aminolevulinová kyselina (ALA)	26
3.1.2.2.2.2	Chloriny a bakteriochloriny	28
3.1.2.2.2.3	Ftalocyaniny	29
3.1.2.2.3	Fotosenzitivní látky III. generace	31
3.1.2.3	Buněčná lokalizace fotosenzitivní látky	31
3.1.2.3.1	Mitochondrie	32
3.1.2.3.2	Lysozomy	33
3.1.2.3.3	Endoplazmatické retikulum	34
3.1.2.3.4	Jádro	34
3.1.3	Světlo, jeho zdroje a způsoby aplikace ve fotodynamické terapii	35
3.1.3.1	Zdroje záření	36
3.1.3.2	Způsoby aplikace světla používané při fotodynamické terapii	37
3.1.3.2.1	Superficiální (povrchová) PDT	37
3.1.3.2.2	Intersticiální PDT	38
3.1.3.2.3	Intraoperativní PDT	40
3.1.3.2.4	Intrakavitární PDT	40
3.1.4	Mechanismy destrukce nádoru	41
3.1.4.1	Přímá cytotoxicita	41
3.1.4.1.1	Typy buněčné smrti	42
3.1.4.2	Poškození cévního systému nádoru	44
3.1.4.3	Imunitní odpověď	46
3.1.5	Fotodynamická reakce v těle	47

3.1.5.1	Reakce na buněčné úrovni.....	48
3.1.5.1.1	Vápník	48
3.1.5.1.2	Lipidový metabolismus	49
3.1.5.1.3	Proteiny	49
3.1.5.1.3.1	Intracelulární proteiny zapojené v reakci buňky na reaktivní kyslíkové radikály.....	51
3.1.5.1.3.1.1	Superoxid dismutáza (SOD).....	51
3.1.5.1.3.1.2	Kataláza (CAT).....	52
3.1.5.1.3.1.3	Gluthation (GSH).....	53
3.1.5.1.3.1.4	Thioredoxin	54
3.1.5.1.3.1.5	Peroxiredoxiny (PRX).....	54
3.1.5.1.3.1.5.1	Peroxyinitritová reduktázová aktivita peroxiredoxinů ...	56
3.1.5.1.3.1.6	Tyrosin kinázy	56
3.1.5.1.3.1.7	Transkripční faktory.....	57
3.1.5.1.3.1.8	Cytokiny	57
3.1.5.1.4	Změny v buněčné adhezi.....	58
3.1.5.1.5	Stresové faktory.....	58
3.1.5.1.6	Hypoxie a angiogeneze	59
3.1.5.1.7	Poškození DNA	59
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	60
4.1	Materiál a metody	60
4.1.1	Materiál	60
4.1.2	Buněčné linie a kultivační podmínky	61
4.1.3	Zdroje záření a ozařovací protokol.....	61
4.1.4	Metody	62
4.1.4.1	MTT test životnosti.....	62
4.1.4.2	Měření produkce reaktivních kyslíkových radikálů.....	63
4.1.4.2.1	Měření reaktivních kyslíkových radikálů, vznikajících fotodynamickou reakcí I. typu	63
4.1.4.2.2	Měření reaktivních kyslíkových radikálů, vznikajících fotodynamickou reakcí II. Typu	64
4.1.4.3	Měření mitochondriálního membránového potenciálu	65
4.1.4.4	Kometová analýza (Comet assay).....	66
4.1.4.5	Mikroskopie atomárních sil (AFM).....	67
4.1.4.6	Sledování změn aktinové struktury pomocí fluorescenční mikroskopie	67
4.1.4.7	Proteomická část	68

4.1.4.7.1	Fotodynamická terapie	68
4.1.4.7.2	Lýze buněk	68
4.1.4.7.3	Stanovení koncentrace proteinů pomocí 2-D QUANT-iT Kitu.....	69
4.1.4.7.4	Precipitace proteinů	70
4.1.4.7.5	Štěpení proteinů	71
4.1.4.7.6	Purifikace na C18 reverzní fázi	71
4.1.4.7.7	Značení peptidů pomocí dimetylace	72
4.1.4.7.8	LC-MS/MS analýza.....	72
4.1.4.8	Statistická analýza	73
4.1.5	Použité roztoky, média a chemikálie.....	74
4.1.6	Použité laboratorní vybavení a programy.....	75
5	VÝSLEDKY.....	77
5.1	Měření životnosti – MTT test.....	77
5.1.1	Nenádorové buněčné linie	77
5.1.2	Nádorové buněčné linie	78
5.2	Měření produkce reaktivních kyslíkových radikálů a dynamika změn hladin vybraných proteinů zapojených v buňce v reakci na oxidační stres	81
5.2.1	Měření produkce kyslíkových radikálů vznikajících I. a II. typem fotodynamické reakce.....	81
5.2.2	Dynamika změn vybraných hladin proteinů zapojených v buňce při odpovědi na oxidační stres	83
5.3	Změny v buňce na cytoskeletární úrovni.....	85
5.3.1	Detekce změn výškového profilu pomocí mikroskopie atomárních sil	85
5.3.2	Vizualizace aktinové struktury HeLa buněk pomocí konfokální mikroskopie	87
5.3.3	Detekce změn hladin vybraných cytoskeletárních proteinů.....	88
5.4	Změny v buňce na mitochondriální úrovni.....	89
5.4.1	Detekce změn mitochondriálního membránového potenciálu	89
5.4.2	Detekce změn vybraných mitochondriálních proteinů	90
5.5	Změny v buňce na úrovni jádra a DNA	92
5.5.1	Detekce míry fragmentace DNA pomocí kometové analýzy.....	92
5.5.2	Dynamika změn hladin vybraných proteinů zapojených v opravě poškození DNA	95
5.6	Buněčná lokalizace a molekulární funkce degradovaných proteinů	97
6	DISKUZE.....	103
7	ZÁVĚR	110

8	SEZNAM ZKRATEK	111
9	POUŽITÉ ZDROJE.....	112
10	PUBLIKAČNÍ ČINNOST AUTORKY	125

SOUHRN

Dizertační práce je zaměřena na studium účinků fotodynamické terapie v podmínkách *in vitro*. Fotodynamická terapie (PDT) je neustále se vyvíjející diagnostická a léčebná metoda, jež je využívána zejména pro léčbu zhoubných i nezhoubných nádorových onemocnění, avšak nachází využití i v terapii některých nenádorových onemocnění (např. v dermatologii při léčbě akné a lupénky). Princip terapie spočívá v podání fotosenzitivní látky, která je aktivována světlem příslušné vlnové délky, což má za následek produkci kyslíkových radikálů, prostřednictvím kterých dochází k následnému poškození a destrukci buňky.

V teoretické části dizertační práce jsou shrnuty poznatky o dostupných fotosenzitivních látkách, mechanismech fotodynamické terapie, vlivech fotodynamické reakce na základní buněčné pochody (např. lipidový metabolismus a buněčná adheze) a také je zde popsána funkce proteinů, které jsou zapojeny v reakci buňky na oxidativní stres, jakožto hlavního činitele při destrukci buněk po fotodynamické terapii.

V experimentální části byla v *in vitro* podmínkách ověřována účinnost PDT s použitím dvou senzitivizérů a to nekovového (2HPc) a zinečnatého (ZnPc) derivátu ftalocyaninu. V rámci dizertační práce byl analyzován vliv fotodynamické terapie (PDT) s využitím těchto fotosezitivizérů na pokles životnosti u 2 nádorových (MCF7 – adenokarcinom prsu, HeLa – karcinom děložního čípku) a 2 nenádorových buněčných linií (BJ – lidské fibroblasty, HaCat – keratinocyty) a byla stanovena hodnota EC50 (koncentrace, při níž dochází ke snížení životnosti o 50 %) pro každou buněčnou linii i fotosenzitivní látku. Z výsledků *in vitro* analýz změn životnosti vyplývá, že obě fotosenzitivní látky způsobovaly úhyn buněk po 5 Jcm⁻² fotodynamické terapii, přičemž fotosenzitivní látka obsahující ve své struktuře atom zinku byla v porovnání s nekovovým derivátem ftalocyaninu mnohem účinnější na všech buněčných liniích. Zinečnatý derivát vykazoval největší účinnost na buněčné linii karcinomu děložního čípku, a to jak v porovnání s nenádorovými buněčnými liniemi HaCat a BJ, tak i s linií nádorovou MCF7, u níž byl naopak účinek nejmenší.

Na základě předchozích analýz byla pro další *in vitro* experimenty vybrána buněčná linie karcinomu děložního čípku, zinečnatý derivát ftalocyaninu (koncentrace EC50 = 30 nM) a plošná hustota světelné energie 5 Jcm⁻² (5 Jcm⁻² ZnPc PDT), jelikož se tato kombinace jevila jako velmi perspektivní. Byla provedena *in vitro* analýza vlivu této terapie na buněčnou linii karcinomu děložního čípku (HeLa) z hlediska jejího účinku na cytoskeletální strukturu, na mitochondriální membránový potenciál, na míru fragmentace DNA a na produkci kyslíkových radikálů, které vznikají I. a II. typem fotodynamické reakce. Pro tyto analýzy byly použity techniky mikroskopie atomárních sil, konfokální mikroskopie, fluorescenční spektrofotometrie (s použitím JC-1, SOSG and CM-H₂DCFDA fluorescenčních sond) a kometové analýzy. Kapilární chromatografií a tandemovou hmotnostní spektrometrií s ESI ionizací byla ve třech různých časových odstupech (0, 4 a 24 hodin) po terapii provedena analýza změn proteinového aparátu, která byla zaměřena na detekci změn mitochondriálních a cytoskeletálních proteinů, proteinů zapojených v buňce v reakci na oxidativní stres a opravy DNA, a dále na změny proteinového aparátu z hlediska buněčné lokalizace a molekulární funkce proteinů.

Při měření produkce kyslíkových radikálů bylo zjištěno, že při *in vitro* 5 Jcm⁻² ZnPc PDT s EC50 30 nM dochází k výraznému nárůstu kyslíkových radikálů, avšak hladiny proteinů zapojených v reakci buňky na oxidativní stres se kromě superoxid dismutázy nezvýšily, což je pravděpodobně jednou z příčin zvýšené citlivosti HeLa buněk na oxidativní stres. Dále bylo zjištěno, že po této terapii dochází k poškození mitochondriální membrány, kdy byla detegována změna membránového potenciálu v porovnání s kontrolními buňkami o 65 % a pokles hladiny mitochondriálního napěťově řízeného kanálového proteinu. Bylo pozorováno i narušení organizovanosti cytoskeletálního aparátu pravděpodobně v důsledku poklesu hladiny proteinu ARPC2 zodpovídajícího za polymerizaci aktinové struktury. Dále zvýšená míra fragmentace DNA v buňce, patrně související se snížením hladiny proteinu DDB1, který zodpovídá za udržování genomové integrity a účastní se spouštění DNA opravných drah a při jehož nedostatku dochází k hromadění fragmentů DNA v buňce. Z výsledků analýzy změn molekulární funkce proteinů po 5 Jcm⁻² ZnPc PDT s EC50 = 30 nM byl pozorován postup účinků *in vitro* terapie na základní

pochody v buňce (změny počtu proteinů zapojených např. v tvorbě ATP, adhezi buněk, transkripci a translaci, elektron transportním řetězcí) ve třech různých časových odstupech (0, 4 a 24 hodin) po terapii.

Na základě těchto zjištění je možno označit zinečnatý derivát ftalocyaninu za potenciálně perspektivní pro analýzu *in vivo* účinků na karcinom děložního čípku na zvířecích modelech, popř. pro jeho zařazení do klinických studií.

SUMMARY

This thesis focuses on the effects of *in vitro* photodynamic therapy. Photodynamic therapy is a constantly evolving diagnostic and therapeutic method that is used mainly for the malignant and non-malignant tumours treatment as well as for treatment of certain non-cancerous diseases (e.g. for the acne and psoriasis treatment in dermatology). The principle of the therapy is to administrate a photosensitive substance activated by light of the appropriate wavelength. This results in production of reactive oxygen species through which a cell is subsequently damaged and destroyed.

The theoretical part of the thesis summarizes knowledge of the available photosensitive substances, mechanisms of photodynamic therapy, effects of a photodynamic reaction on the fundamental cell processes (e.g. lipid metabolism, cell adhesion) and description of the function of the proteins involved in cell response to oxidative stress as a major agent in cell destruction after photodynamic therapy.

In the experimental part, the *in vitro* efficacy of the PDT using two sensitizers, a non-metallic (2HPc) and a zinc (ZnPc) phthalocyanine derivatives, was evaluated. Effects of these therapies on cell viability on two non-tumoural (BJ – human fibroblasts, HaCat – human keratinocytes) and two tumoural (MCF7 – breast adenocarcinoma, HeLa – cervical carcinoma) cell lines were analysed and EC50 values (the concentration causing the cell viability decrease by 50 %) for each photosensitizer and cell line were detected. The results showed that both photosensitizers caused cell death after 5 Jcm⁻² ZnPc PDT, where the zinc photosensitizer was much more effective on all cell lines compared to the non-metallic photosensitizer. The zinc phthalocyanine photosensitizer showed the greatest efficacy on the cervical cell line.

Based on previous analyzes a cervical cancer cell line and zinc phthalocyanine derivative (EC50 = 30 nM) were selected for further *in vitro* experiments at light dose of 5 Jcm⁻² (in short 5 Jcm⁻² ZnPc PDT), since this combination seemed to be very promising. *In vitro* analyses of the effect of this therapy in terms of its impact on cytoskeletal structure, on the mitochondrial

membrane potential, on the degree of DNA fragmentation and on the production of oxygen radicals produced by I. and II. type of photodynamic reaction were performed. For these analyses the atomic force microscopy, confocal microscopy, fluorescence spectrophotometry (using JC-1, SOSG and CM-H₂DCFDA fluorescent probes) and Comet Assay were used. Capillary chromatography and ESI Ion tandem mass spectrometry was used to find the differences in proteome at three incubation time intervals (0, 4 and 24 hours) after therapy. This analysis aimed at detecting changes of mitochondrial and cytoskeletal proteins, proteins involved in the cell response to oxidative stress and DNA repair, as well as proteome changes in terms of cellular localization and molecular function.

The results showed that *in vitro* 5 Jcm⁻² ZnPc PDT at EC50 concentration caused a significant increase of reactive oxygen species, but the levels of proteins involved in cell response to oxidative stress did not increase except for superoxid dismutase. Furthermore, it was found that this therapy also damaged mitochondrial membrane which was proven by voltage-dependent channel protein 1 level decrease and also by 65% change of mitochondrial membrane potential compared to the control cells. Disruption of the cytoskeletal apparatus, probably due to decrease of the ARPC2 protein responsible for actin structure polymerization, was also observed. The increased level of the DNA fragmentation was detected, possibly related to the decreased level of DDB1 protein which is responsible for maintaining genomic integrity and involved in triggering the DNA repair pathways. Proteome analysis in terms of molecular function after therapy showed its *in vitro* effect on the fundamental processes in the cell (changes in amount of protein involved e.g. in cell adhesion, transcription and translation, electron transport chain) in three different time intervals (0, 4 and 24 hours) after the therapy.

Based on the results the zinc phthalocyanine derivative tested can be considered as potentially perspective for *in vivo* analysis on animal models or for its inclusion into clinical trials for cervical cancer treatment.

1 CÍLE PRÁCE

- Shromáždit dostupné literární zdroje a vypracovat literární rešerši na téma dizertační práce.
- Studium účinku dvou fotosenzitivních látek (zinečnatého a nekovového derivátu ftalocyaninu) na pokles životnosti u buněčných linií.
- *In vitro* stanovení optimální kombinace koncentrace a plošné hustoty světelné energie u vybrané buněčné linie a fotosenzitivní látky.
- Analýza účinků *in vitro* fotodynamické terapie na základní buněčné pochody u kombinace vybrané buněčné linie a fotosenzitivní látky.

2 ÚVOD

Fotodynamická terapie (PDT) je minimálně invazivní, velmi účinný způsob léčby nádorových onemocnění. Může být prováděna před nebo po chemoterapii, ozařování ionizujícím zářením či chirurgickém výkonu bez toho, aby danou metodu léčby omezila či byla omezena sama. Míra a délka odezvy na léčbu jsou v případě PDT stejné, ne-li lepší, jako u běžně používaných metod. Navíc je zde menší míra morbidit a vyšší kosmetický i funkční výsledek (Hopper, 2000).

Fotodynamická terapie je založena na podání fotosenzitivní látky, která je lépe zadržována v nádorové tkáni než ve tkáni nenádorové, následované ozářením místa světlem příslušné vlnové délky. Fotosenzitivní látka absorbuje energii ze záření a následně indukuje produkci reaktivních kyslíkových radikálů v okolí cílové oblasti, což vede ke kaskádě dalších událostí vedoucích k destrukci nádorových buněk (Sibata *et al.*, 2001).

Reaktivní kyslíkové radikály jsou molekuly generované v buňkách v průběhu metabolismu kyslíku. Stresové situace mohou vést k dramatickému nárůstu těchto radikálů a mohou způsobovat závažné poškození buněčných struktur. Cílem hydroxylových radikálů jsou všechna aminokyselinová residua proteinů, nicméně nejvíce preferovanými cíli jsou tyrosinová, tryptofanová, histidinová a fenylalaninová residua. Navíc při anaerobních podmínkách radiolyticky generované volné radikály značně podporují tvorbu protein – protein cross-linků a –S–S- a –Tyr–Tyr- vazeb, zatímco v přítomnosti O₂ radiolýza vede ke značné fragmentaci polypeptidového řetězce (Liu *et al.*, 2016).

Ftalocyaniny jsou slibnými fotosenzitivními látkami druhé generace fotosenzitivních látek. Jsou řazeny do skupiny tetrapyrolových makrocyklů příbuzným porfyrinům. V porovnání s porfyrinovým cyklem mají ftalocyaniny Pcs 18 π-elektronovou strukturu se čtyřmi benzenovými jednotkami připojenými v β –pyrolových pozicích a s dusíkovými atomy v mezo – pozicích. Strukturální znaky dávají ftalocyaninům řadu vlastností, jako jsou například silná absorpce a emise v červené oblasti světla, vysoká stabilita a vysoce účinná produkce

kyslíkových radikálů, vhodných pro aplikaci v biologii, medicíně a dalších odvětvích (Liu *et al.*, 2016; Ongarora *et al.*, 2014).

Hlavními problémy spojenými s použitím ftalocyaninových derivátů jsou nízká rozpustnost v biologických médiích a špatná specifita ve vylučování nádorovou tkání.

Tato práce se zabývá *in vitro* analýzou účinku fotodynamické terapie využívající nekovový a zinečnatý derivát ftalocyaninu a dále mírou poškození jednotlivých buněčných organel a proteinů vzniklých působením 5 Jcm⁻² fotodynamické terapie využívající zinečnatý derivát ftalocyaninu v koncentraci EC50.

3 Teoretická část

3.1 Fotodynamická terapie (PDT)

Účinky světla jsou využívány v léčbě různých chorob již od dob antiky. Ve starověké Indii, Číně i Egyptě se světlo v kombinaci s rostlinnými extrakty využívalo pro léčbu například lupenky, vitiliga a kožních nádorů (Kudinova *et* Berezov, 2009). Fotodynamická terapie (PDT) jako taková byla vynalezena před více než sto lety, kdy Hermann von Tappeiner pomocí bílého světla odstranil neoplastickou kožní lézi obsahující předem aplikovaný eozinový roztok. Tento pokus byl založen na pozorování studenta medicíny pracujícího ve stejné laboratoři, který popsal letální účinky světla na bakterie ošetřené akridinem. Ačkoliv toto pozorování otevřelo dveře vedoucí k moderní PDT, tato terapie zůstává dodnes z velké části neprozkoumaná. V roce 1961 Lipson *et al.* publikovali přípravu netoxického hematoporfyrinového derivátu, který měl sklon k akumulaci v neoplastické tkáni (Lipson *et al.* 1961 a, b). Nicméně ke klinickému využití pro odstraňování nádorů došlo až po roce 1970. Od té doby, díky neustále probíhajícím laboratorním vylepšováním přípravy léčiv a světelných zdrojů, začala být fotodynamická terapie považována za perspektivní metodu pro léčbu rakoviny u lidí. V současné době je fotodynamická terapie využívána hlavně při léčbě kožních lézí, prekanceróz (např. Barrettův jícen) a některých forem pokročilých rakovin. U pokročilých stádií rakovin, u nichž nejsou ostatní metody účinné, umožňuje díky malé invazivitě opakovanou léčbu. Navíc nebrání ve využití konvenčních více agresivních metod v době, kdy bude pacient z hlediska svého zdravotního stavu na léčbu připraven (Palumbo, 2007).

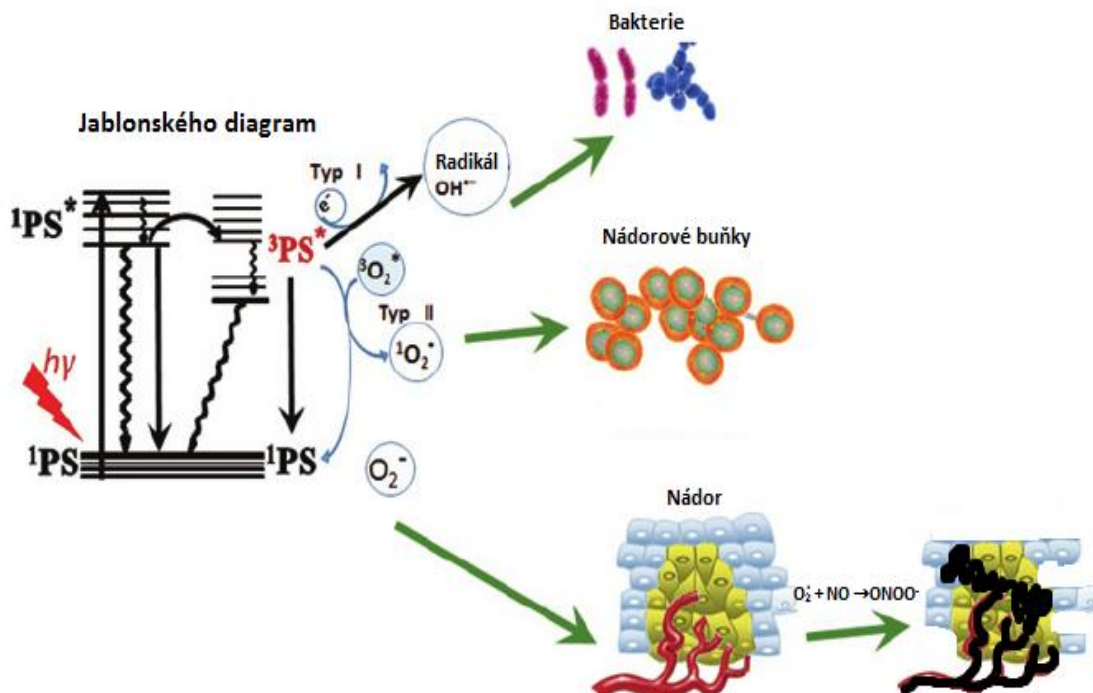
Nedostatečná efektivita v současnosti využívaných terapeutických metod pro léčbu maligních nádorů vedla k extenzivnímu hledání nových účinných metod. Tradiční léčby nádorových onemocnění jako chirurgické odstranění, radioterapie či chemoterapie jsou málo selektivní pro nádorové tkáně, což limituje jejich účinnost v praxi. Z toho důvodu je velmi důležitý vývoj metod, které by byly více selektivní pro cílovou nádorovou oblast. Fotodynamická terapie je minimálně invazivní a slibná léčebná metoda v boji s nádory.

Tato metoda zahrnuje podání netoxického léčiva nebo barviva (fotosenzitizéru) pacientům s lézemi, přičemž toto podání fotosenzitivní látky může být buď systémové, nebo lokální. Po uplynutí příslušné inkubační doby je fotosenzitivní látka ozářena světlem specifické vlnové délky, přičemž v přítomnosti kyslíku způsobí produkci reaktivních kyslíkových radikálů s následnou buněčnou smrtí a poškozením tkáně. Délka inkubační doby a vlnová délka použitého záření závisí na typu fotosenzitivní látky (Robertson, 2009). Klinické studie odhalily, že fotodynamická terapie může prodloužit délku života pacientů trpících neoperovatelnými formami rakoviny a zlepšit kvalitu jejich života. Bohužel i přesto, že fotodynamická terapie byla FDA (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv, USA) schválena před přibližně dvěma dekádami let, je dosud klinicky málo využívaná (Agostinis *et al.*, 2011; Allison *et Sibata*, 2010).

3.1.1 Mechanizmy fotodynamické reakce

Pro zahájení fotodynamické terapie musí barvivo, resp. fotosenzitivní látka, absorbovat záření (*splnění podmínek prvního fotochemického zákona – fotochemickou reakci látky může vyvolat pouze světlo jí absorbované*). Navíc, fotony musí mít dostatečnou energii k produkci elektronické excitace molekul, což je mechanismus přetržení chemické vazby, kdy je energie dopadajícího záření (fotonů, elektronů) použita na excitaci vazebného elektronu do protivazebného orbitalu. Toto vyžaduje energii v ultrafialové (UV), viditelné (VIS) či blízké infračervené (NIR) oblasti spektra, jelikož záření s kratší vlnovou délkou (vyšší energie) je ionizující a delší vlnové délky sice vibrační stavy způsobují, ale energie je nedostatečná pro vznik elektronické vibrace. Pro aplikaci ve tkáních, kde se bere ohled na hloubku penetrace, je UV záření a modré světlo méně účinné než při povrchové aplikaci. Z toho důvodu je vhodnější využít barviva absorbující v červené a blízké infračervené oblasti, ale je třeba zvolit takovou vlnovou délku, kdy budou mít fotony stále dostatečnou energii pro vyvolání elektronické excitace nezbytné pro fotodynamický proces (Redmond, 2008).

Stejně jako většina molekul má fotosenzitivní látka párové elektrony s opačným spinem v nízkoenergetických molekulových orbitalech. Absorpce světla příslušné vlnové délky fotosenzitivní látkou vede k excitaci elektronu z nejvyššího obsazeného molekulového orbitalu (HOMO) do nejnižšího neobsazeného molekulového orbitalu (LUMO), zatímco spin zůstává během tohoto procesu nezměněn. Tento stav, známý jako excitovaný singletní stav (S_1), má relativně krátkou životnost (nanosekundy) a fotosenzitivní látka může ztratit svou energii při návratu do základního stavu pomocí uvolnění energie ve formě záření (fluorescence) či tepla. Jinou variantou je, že excitovaný elektron změní svůj spin (vnitřní přeuspořádání), což je u většiny organických látek relativně dlouhý proces vyžadující relativně dlouhotrvající singletní stav. Tripletový stav má mnohem delší životnost (mikrosekundy), jelikož excitované elektrony mají paralelní spin k jejich párovému, neexcitovanému elektronu. Z tripletového stavu se excitovaný elektron nemůže jednoduše vrátit do svého základního stavu, neboť by došlo k porušení Pauliho vylučovacího principu. Je to právě tento dlouhotrvající tripletový stav, který umožňuje fotosenzitivní látce reagovat s kyslíkem a dává fotodynamické terapii její základní charakteristický rys – oxidativní poškození. Obrázek č. 1 zobrazuje obě tyto reakce dohromady s následnými fotochemickými reakcemi a zmíněnými mechanismy poškození různých buněčných organismů a struktur (Sharma *et al.*, 2012; Benov, 2015).



Obr. č. 1: Jablonského diagram zobrazující fotochemické reakce. Fotochemická reakce I. typu může vést k produkci hydroxylových radikálů. Fotochemická reakce II. typu produkuje singletní kyslík účinný zejména v destrukci nádorových buněk, zatímco peroxynitril (tvořený ze superoxidu a oxidu dusného) může být účinný v poškozování cévního zásobení nádoru (Hamblin *et al.*, 2015).

3.1.1.1 Fotochemická reakce I. typu

Při reakci I. typu jsou reaktivní kyslíkové radikály (ROS) tvořeny pomocí přenosu elektronu. H_2O_2 , jež je sám o sobě relativně stabilní, reaguje s pikogramovou koncentrací např. železitých iontů v reakci odvozené od Fentonovy reakce, což vede k produkci hydroxidového iontu a OH^\bullet pomocí homolytického štěpení $-O-O-$ vazby v molekule peroxidu vodíku ($Fe^{3+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{2+} + HOO^\bullet + H^+$). H_2O_2 je schopen difundovat skrz plazmatickou membránu, což vede k následné devastaci vnitřního prostředí prostřednictvím

generování OH^- v cytoplasmě způsobující destrukci proteinů nezbytných pro udržování homeostázy.

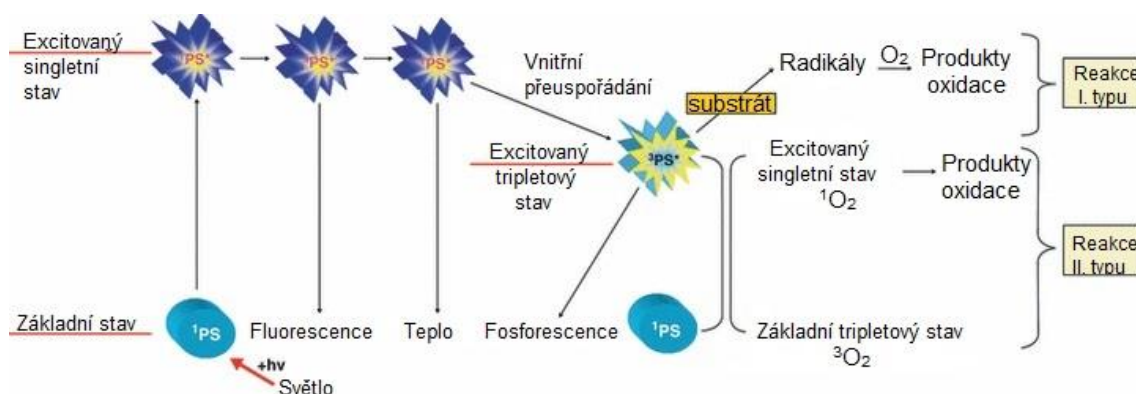
V aerobních podmínkách dochází k přenosu elektronu z PS-radikálu na kyslík za tvorby superoxidového radikálu ($^{\bullet}\text{O}_2^-$). Superoxidový radikál může dále vystupovat jako jednomocný oxidant nebo reduktant. Může oxidovat malé molekuly jako jsou sulfity, tetrahydroflaviny, leukoflaviny, katecholaminy apod., nicméně nereaguje přímo s nukleovými kyselinami, lipidy i karbohydráty. Superoxidový radikál naopak reaguje s dalšími biologicky relevantními radikály uvolňujícími pro buňku potenciálně toxické produkty jako např. hydroperoxydy. Mezi takové radikály patří například oxid dusnatý (NO^{\bullet}) a fenoxylové radikály generované při jednoelektronové oxidaci fenolů. V biosystémech je nejvíce zastoupeným fenolem aminokyselina tyrosin. Tyrosilové radikály reagují se superoxidem s konstantní rychlostí $1,5 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Bylo zjištěno, že vodíkové vazby na aminoskupinu zvyšují elektrofilní vlastnost $^{\bullet}\text{O}_2^-$ a redukční potenciál $\text{O}_2/^{\bullet}\text{O}_2^-$ páru, což vede k výraznému zvýšení $^{\bullet}\text{O}_2^-$ reaktivity. Superoxidový radikál může také reagovat s oxidem dusným za vzniku vysoce reaktivních peroxinitritů OONO^{\bullet} . Navíc superoxidový radikál může být dismutován pomocí superoxid dismutázy (SOD), což vede k tvorbě peroxidu vodíku a O_2 . Superoxidový radikál je, vedle reakce s ostatními volnými radikály, schopen oxidovat proteinové klastry. Tyto proteiny patří často mezi dehydratázy a také enzymy Krebsova cyklu. Destrukce těchto proteinů má pro buňku zhoubné následky. Při inaktivaci enzymů Krebsova cyklu dochází k narušení tohoto cyklu, a tedy k narušení aerobní produkce energie v buňce a také řady biosyntetických drah závislých na těchto enzýmech (Mroz *et al.*, 2009; Fridovich, 1998; Winterbourn *et Kettle*, 2003; d'Allessandro *et al.*, 2000; Nagy *et al.*, 2009).

3.1.1.2 Fotochemická reakce II. typu

Při reakci II. typu předává excitovaná fotosenzitivní látka svou energii přímo na molekulární kyslík, který je sám o sobě v tripletovém základním stavu. Tato energie vede nejen k přenosu jednoho nebo dvou nepárových elektronů $^3\text{O}_2$ (tripletní kyslík) do orbitalu o vyšší energii, ale také ke změně jejich spinu

vedoucí k přeměně základního stavu molekulového kyslíku na stav singletní $^1\text{O}_2$. Přítomnost elektronů s opačnými spiny činí singletní kyslík vysoce reaktivním. Singletní kyslík rychle reaguje s nenasycenými $-\text{C}=\text{C}-$ vazbami a neutrálními nukleofily jako např. sulfidy a aminy za vzniku peroxidů. V biologických systémech je životnost $^1\text{O}_2$ limitována jak fyzikálními, tak chemickými zhášeči. Životnost $^1\text{O}_2$ v čisté vodě je vlivem fyzikálního zhášení asi 4 μs , v buňkách je toto číslo ještě nižší, a to vzhledem k příspěvku chemických zhášečů, díky čemuž je maximální délka dosahu $^1\text{O}_2$ 150 nm. Toto je extrémně krátká vzdálenost a je mnohem menší než průměrná velikost savčí buňky (10–30 μm), a dokonce i většiny buněčných organel. Vzhledem ke krátké životnosti $^1\text{O}_2$ se tedy buněčná lokalizace akumulace fotosenzitivní látky stává klíčovým faktorem pro určení, které orgány budou poškozeny a tudíž pro celkový účinek PDT.

Přenos energie pro získání $^1\text{O}_2$ (Typ II) soupeří s elektronovým přenosem (Typ I) a většina fotosenzitivních látek způsobuje oba typy reakcí (schématické znázornění obou typů reakcí je uvedeno na obrázku č. 2). Jelikož přenos energie na kyslík O_2 probíhá rychleji ($k \approx 1\text{--}3 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) než elektronový transfer (např. v případě tvorby $\text{O}_2 \cdot^-$ je odhadovaná rychlostní konstanta $k \leq 1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) a $^1\text{O}_2$ je více reaktivní než $\text{O}_2 \cdot^-$, je singletní kyslík považován za primární činitel při PDT indukovaném buněčném poškození (Sharma *et al.*, 2012; Benov, 2015; Misiaszek *et al.*, 2004; Huie *et al.*, 1993; Lyman et Hurst, 1995; Medinas *et al.*, 2007; Imlay, 2013).



Obr. č. 2: Schématické znázornění fotodynamické reakce I. a II. typu (Soukos *et Goodson*, 2011).

3.1.2 Fotosenzitivní látky

Fotosenzitivní látky fungují ve fotodynamické terapii jako nosiče, které umožňují přenos a přeměnu světelné energie na užitečnou ve fotochemické reakci II. typu. Reaktivní koncové produkty této dráhy způsobují rapidní cyto- a vaskulární toxicitu. Existuje mnoho syntetických i přírodních barviv, které mohou být použity při PDT. V průběhu testování bylo zjištěno, že fotosenzitizéry vykazují odlišné farmakologické a fotochemické vlastnosti, z nichž nejdůležitějšími parametry jsou doba fotosenzitivity a aktivující vlnová délka (Castano *et al.*, 2005). Obecně lze říci, že hlavní požadovanou vlastností všech PS je schopnost preferenční akumulace v nemocné tkáni s následnou produkcí cytotoxických produktů a indukci požadované biologické odezvy (Zimčík *et Miletín*, 2004).

První fotosenzitivní látkou, která byla studována pro klinické využití při fotodynamické terapii, byl hematoporfyrinový derivát (HpD) a jeho purifikovaná verze Photofrin®. Bohužel nevýhodou těchto látek je, že jsou produkovány jako směs velkého množství monomerů, dimerů a vyšších oligomerů, dále dlouhotrvající kožní senzitivita a fototoxicita u pacientů. Jelikož bylo potřeba eliminovat tyto vedlejší účinky, byl výzkum zaměřen na nové typy fotosenzitivních látek a byla vyvinuta druhá generace fotosenzitivních látek, do níž jsou zahrnovány např. chloriny, bakteriochloriny a ftalocyaniny. Některé z nich, jako např. porfyrinové látky Levulan®, Radachlorin®, Visudin® a Foscan®, jsou schváleny řadou zdravotnických organizací pro léčbu rakoviných a nerakoviných onemocnění. Radachlorin® společnosti Radapharma (Rusko), který absorbuje záření při 662 nm, byl v Rusku studován jako látka pro léčbu různých maligních onemocnění. Visudin® společnosti Novartis Pharmaceuticals, známý také pod názvem Verteporfin™, je velmi efektivně využíván při léčbě s věkem spojené makulární degenerace (AMD). Foscan® je chlorinový fotosenzitizér ($\lambda_{ex} = 652 \text{ nm}$) v Evropě schválen pro léčbu nádorů hlavy, krku a prostaty.

V průběhu vývoje nových fotosenzitivních látek využitelných pro fotodynamickou terapii byly formulovány vlastnosti ideální fotosenzitivní

látky. Do současné doby ovšem nebyla nalezena látka, která by splňovala všechny ideální vlastnosti. Současně vyvíjené látky se ideální látce snaží alespoň co nejvíce přiblížit.

3.1.2.1 Vlastnosti ideální fotosenzitivní látky (Zimčík *et Miletín*, 2004; Ethirajan, 2008; Allison *et al.*, 2004)

- Ideální fotosenzitizér (PS) by měl být schopen účinné produkce singletního kyslíku, jelikož ten a II. typ fotochemické reakce jsou zodpovědné za většinu lézí produkovaných během fotodynamické terapie.
- PS by měl vykazovat silnou absorpci s vysokými extinčními koeficienty při delších vlnových délkách (650–800 nm), jelikož při těchto vlnových délkách je schopnost průniku světla do tkání nejvyšší a energie je stále dostatečná pro vyvolání fotochemické reakce. Látka by však ideálně neměla absorbovat v rozmezí 300 až 600 nm, kde je intenzita slunečního záření maximální, aby se tak redukovalo potenciální nebezpečí kožního poškození slunečními paprsky na minimum.
- PS by neměl být toxický nebo resp. být minimálně toxický ve tmě. Dále by se v průběhu metabolismu PS neměly vytvářet nové toxické vedlejší produkty.
- PS by měl být z těla po terapii rychle eliminován pro co nejrychlejší odstranění vedlejších účinků (např. fotosenzitivita). Vyloučení z těla by mělo trvat řádově hodiny či dny, ne týdny a měsíce. Rychlé odplavení látky z těla umožňuje opakovanou aplikaci terapie.
- PS by se měl selektivně akumulovat v cílové tkáni.
- PS by měl být chemicky čistá látka definované struktury.
- Distribuce fotosenzitizéru je pro PDT velmi důležitá a je ovlivněna chemickou strukturou fotosenzitizéru. Velkou výhodou je, pokud je molekula PS amfifilní, což usnadňuje průchod skrz membránu.
- Ideální PS by měl být využitelný ve spojení s dalšími typy léčby jako je chirurgické odstranění, radioterapie a chemoterapie.
- Fotosenzitizér by měl být finančně dostupný a snadno chemicky modifikovatelný ve farmakokinetických parametrech.

3.1.2.2 Klasifikace fotosenzitivních látek

Fotosenzitizéry mohou být klasifikovány několika různými způsoby (dle čistoty, buněčného zacílení, chemické struktury a generace), avšak všechny mají svá určitá omezení. Obecně je nejpoužívanější klasifikace dle generací fotosenzitivních látek.

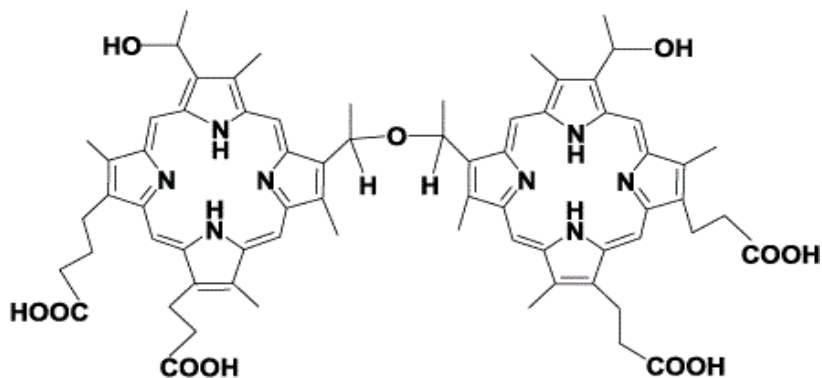
3.1.2.2.1 Fotosenzitivní látky I. generace – deriváty hematoporphyrinu

Hematoporphyrinový derivát (HpD) je směs produktů, které vznikly z hematoporphyrinu izolovaného z hemu. První generace fotosenzitizérů byla vyvinuta v 70. a na začátku 80. let 20. století. Zahrnuje hematoporphyrinový derivát (HpD) a jeho analogy. Tyto sloučeniny byly podrobeny mnoha rozsáhlým studiím a využity k experimentálním klinickým pracím. Jejich nevýhodou je poměrně nízká selektivita nádorové tkáně, jelikož pouze necelá 3 % množství injektovaného fotosenzitizéru selektivně napadají nádorovou tkáň (Dumoulin, 2012).

Purifikací a manipulací s hematoporphyrinovým derivátem vznikly komerční produkty s různými názvy např. Photosan, Protocan a Photofrin® (obr. č. 3 – chemická struktura photofrinu). Tyto látky se skládají z různých frakcí porfyrinových monomerů, dimerů a oligomerů, které jsou potřebné pro úspěšnou terapii (Allison *et* Sibata, 2010).

Photofrin® společnosti Axcan Pharma, Inc. je nejdéle využívanou fotosenzitivní látkou v PDT (v Kanadě schválen v roce 1993, FDA schválen v roce 1995). Tato látka je kombinací monomerů, dimerů a oligomerů získaných chemickými úpravami hematoporphyrinu. V různých obměnách je znám pod jinými názvy po celém světě. V USA je Photofrin® schválen FDA pro léčbu časného a pozdního stádia endobronchiálních lézí, Barrettova jícnu a ezofageálních obstrukčních lézí. V různých částech světa je schválen pro léčbu mnoha dalších onemocnění jako např. karcinom močového měchýře, kožní léze. Photofrin® lze aktivovat světlem o vlnové délce 630 nm (tato vlnová délka

proniká ve tkáni asi do hloubky 5 mm) (Agostinis *et al.*, 2011; Castano *et al.*, 2004; Yano *et al.*, 2011, Zimčík *et Miletín* 2004).



Obr. č. 3: Chemická struktura Photofrinu® (Simplicio *et al.*, 2002).

3.1.2.2.2 Fotosenzitivní látky II. generace

Fotosenzitivní látky druhé generace byly vyvinuty na základě nedostatků předchozí generace. Tyto látky se vyznačují tím, že jsou již chemicky jednotné a lehce charakterizovatelné. Jejich výhodou je, že se rychleji eliminují z oběhu, resp. z kůže, a z tohoto důvodu není nutné, aby byl pacient dlouhodobě (několik týdnů) chráněn před slunečními paprsky.

Druhá generace zahrnuje některé látky ze skupiny porfyrinů a od nich odvozených ftalocyaninů, dále chloriny, bakteriochloriny, barviva a další. Jejich výhodou je schopnost účinné produkce $^1\text{O}_2$ a nízká toxicita v nepřítomnosti světla (Nyman *et Hynninen*, 2004; Kessel, 2004).

3.1.2.2.2.1 5 - aminolevulinová kyselina (ALA)

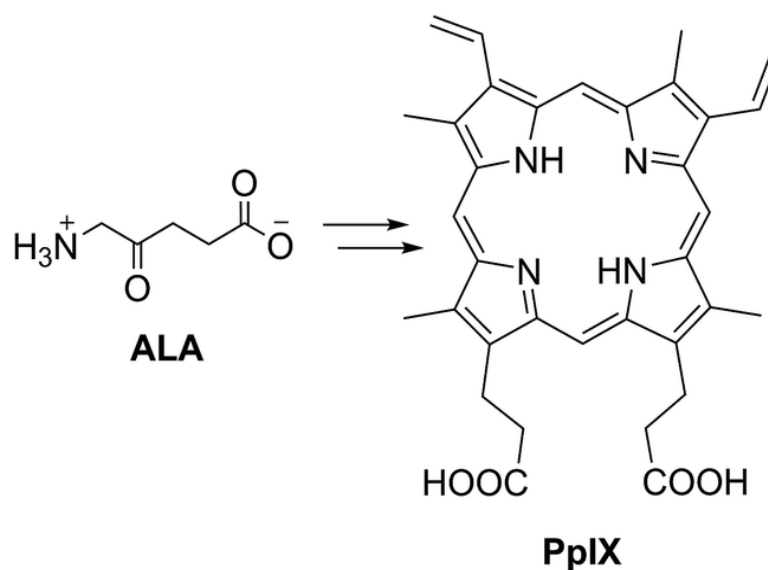
Tato fotosenzitivní látka se na trhu objevuje pod různými názvy např. Levulan®, Hexvix®, Benzvix® a Metvix®. ALA je endogenní látka, která se v živých organismech enzymaticky přeměňuje na protoporphyrin IX (PpIX), který

je účinným fotosenzitizérem (Tvorba PpIX z ALA je zobrazena na obr. č. 4). PpIX je prekurzorem hemu a následně se na něj přeměňuje. Míra tvorby PpIX závisí na míře syntézy ALA z glycinu a sukcylnylCoA, jež je závislá na koncentraci volného hemu. Toho se využívá při PDT, jelikož po využití všech volných molekul hemu se PpIX začne hromadit v organizmu. Selektivní akumulace v nádorové tkáni je dána řadou faktorů, které zahrnují například zvýšenou permeabilitu abnormálního keratinu, sníženou koncentraci železa, sníženou aktivitu ferrochelatázy, která katalyzuje přeměnu PpIX na neaktivní hem apod. Tyto faktory poté vedou ke hromadění PpIX v cílové tkáni. Levulan® je fotosenzitivní látka od firmy DUSA Pharmaceuticals, která byla v roce 1999 Americkým úřadem pro kontrolu potravin a léčiv schválena pro léčbu aktinózní keratózy. Pacientovi je při léčbě podán 20% roztok ALA s 1–4 hodiny dlouhou inkubační dobou (v závislosti na lokalizaci v těle) a následně je místo ozařováno světlem o vlnové délce 415 nm po dobu 15 minut. Pacienti by se následně měli 48 hodin vyhýbat slunečním paprskům. Levulan® se dále využívá pro léčbu Barrettova jícnu, která byla FDA schválena v roce 2007 (O'Connor *et al.*, 2009; www.drugs.com; www.dusapharma.com).

Vzhledem k nízké lipofilitě kyseliny 5 - aminolevulinové se do terapie dostávají také její estery, které lépe pronikají do tkání (zejména při aplikaci na kůži) a po hydrolyze uvolňují volnou ALA. Metvix® je metyl ester kyseliny 5 - aminolevulinové, který je od roku 2001 povolen pro léčbu aktinózní keratózy a později také pro léčbu karcinomu bazálních buněk kůže. Hexylaminolevulinová kyselina (HALA) je využívána pro fotodetekci karcinomu močového měchýře, kdy po nahromadění k nádorové tkáni svou fluorescencí upřesňuje místo možné resekce. HALA byla v roce 2010 schválena americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv k léčbě rakoviny močového měchýře. V případě Benzvixu® se jedná o benzyl ester kyseliny 5 - aminolevulinové a využívá se pro léčbu gastrointestinálního traktu (Robinson *et al.*, 2015; Ormond *et Freeman*, 2013; Castano *et Hamblin*, 2008).

Vedle onkologických malignit je ALA také hojně využívána v dermatologii. Bylo prokázáno, že po ošetření kůže pomocí ALA – PDT je pokožka méně vrásčitá. ALA se k omlazení kůže využívá celosvětově a zdá se

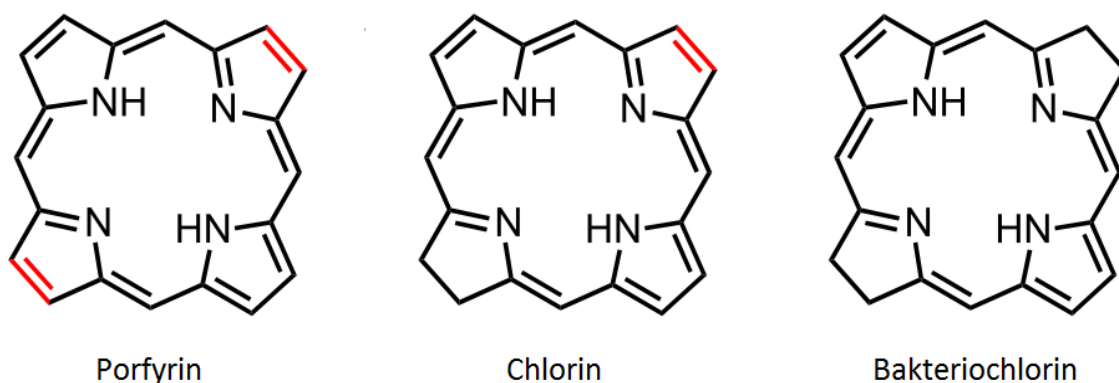
být perspektivní látkou pro budoucí neonkologické použití (Allison *et Sibata*, 2010).



Obr. č. 4: Tvorba PpIX z ALA (Gola *et al.*, 2016).

3.1.2.2.2 Chloriny a bakteriochloriny

Porfyrinové jádro absorbuje světlo kratších vlnových délek ($\lambda_{\max} = 405$ nm), které neumožňují hlubší penetraci do tkáně. Redukcí pyrolové dvojně vazby na periferii porfyrinu vzniká chlorinové jádro a další redukcí druhé dvojně vazby na periferii chlorinu vzniká bakteriochlorin (obr. č. 5 – chemická struktura porfyrinů, chlorinů a bakteriochlorinů). Obě tyto skupiny molekul mají pásmo absorpčního maxima v delších vlnových délkách ($\lambda_{\max} = 650\text{--}670$ nm pro chloriny a $\lambda_{\max} = 730\text{--}800$ nm pro bakteriochloriny) než porfyriny, přičemž stále zůstávají dostatečně efektivní v tvorbě $^1\text{O}_2$. Klinicky využívanými léčivy, která patří do těchto dvou skupin, jsou Verpeporfin, Visudyne®, Foscan®, Purlytin™, Talaporfin, apod. (Ormond *et Freeman*, 2013; Detty *et al.*, 2004; www.visudyne.com; www.bioletcpharma.com).

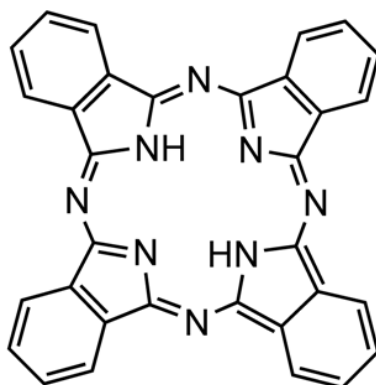


Obr. č. 5: Chemická struktura porfyrinů, chlorinů a bakteriochlorinů (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Porphyrin,_chlorin,_bakteriochlorins.png).

3.1.2.2.3 Ftalocyaniny

Ftalocyaniny jsou fotosenzitivní látky, které jsou strukturálně podobné porfyrinům. Na každou pyrolovou jednotku je připojen benzenový kruh. Dalším rozdílem je to, že porfyrinové jednotky nejsou spojeny methylovými můstky, ale atomy dusíku (obr. č. 6 - chemická struktura ftalocyaninů). Důležitá pro vlastní účinek PDT je přítomnost chelatovaných centrálních kovů a polokovů, z nichž některé (např. Zn, Al, Si) prodlužují trvání tripletového stavu a tím zvyšují účinnost PDT. Maximální absorpční vlnová délka je u těchto látek posunuta k červené části spektra (nejčastěji 670–700 nm) a díky zesílené absorpci při této vlnové délce (ϵ_{\max} až 200 000 M⁻¹cm⁻¹) představují potenciálně perspektivní látky pro využití při fotodynamické terapii. V porovnání s HpD se podávají ve výrazně nižších koncentracích, což umožňuje minimalizovat kožní senzitivitu. Nevýhodou některých ftalocyaninů je jejich velice špatná rozpustnost nejen ve vodě, ale také v organických rozpouštědlech, což způsobuje problematickou aplikaci. Tuto negativní vlastnost lze odstranit pomocí jejich modifikace na periferii, popř. inkorporací do lipidových vezikul. Přidání dalšího benzenového jádra na periferii ftalocyaninů vede k vytvoření látek typu naftalocyaninů. Naftalocyaniny absorbují při velmi dlouhých vlnových délkách

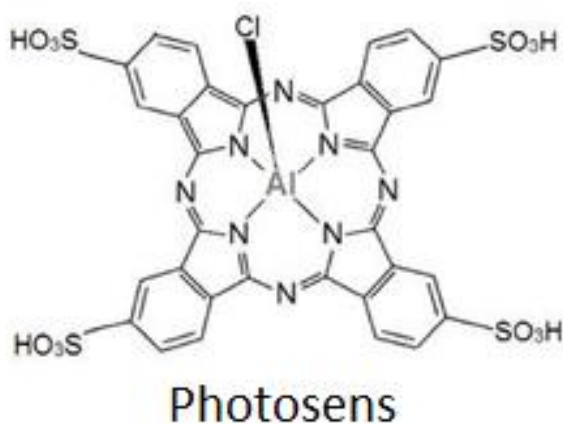
(okolo 770 nm), což umožňuje zvýšení hloubky penetrace do cílové tkáně, díky čemuž jsou využitelné pro léčbu i velmi pigmentovaných nádorů (např. melanom) (Zimčík *et* Miletín, 2004; Nyman *et* Hynninen, 2004; Allison *et* Sibata, 2010; Josefsen *et* Boyle, 2008).



Obr. č. 6: Chemická struktura ftalocyaninů – skelet.

(https://www.iic.cas.cz/cz/vyzkum_fotofyzika_fotochemie_molekularni_skladacky).

Mezi významné ftalocyaniny patří AlPcS₄, který má λ_{\max} = 676 nm. Tato látka je celosvětově známá pod názvem Photosens® (obr. č. 7 – chemická struktura Photosensu®) a je např. v Rusku využívána pro léčbu rakoviny žaludku, kůže, rtu a prsu. Nevýhodou Photosensu® je dlouhotrvající kožní fotosenzitivita, která trvá několik týdnů (Ormond *et* Freeman, 2013).



Obr. č. 7: Chemická struktura Photosensu® (Ormond *et* Freeman, 2013).

Výše zmíněné fotosenzitivní látky patří mezi nejvýznamnější zástupce skupin fotosenzitivních látek využívaných pro fotodynamickou terapii. Vedle těchto látek je laboratorně testována řada dalších látek jako např. methylenová modř ($\lambda_{\max} = 668 \text{ nm}$), jež se využívá pro dekontaminaci čerstvě zmražené plazmy, účinně inaktivuje extracelulárně přítomné viry a vykazuje pro člověka prakticky nulovou toxicitu. Bohužel vzhledem k enzymatické redukci methylové modři na fotodynamicky neaktivní leukoformu v živých buňkách je její použití *in vivo* limitováno a je potřeba vyvinout mechanismy, které by tuto látku před enzymy uchránily. Dále jsou to například hypericin ($\lambda_{\max} = 590 \text{ nm}$), safyryny ($\lambda_{\max} \approx 650 \text{ nm}$) a porfyceny ($\lambda_{\max} = 600\text{-}650 \text{ nm}$), které patří mezi nejrychleji vychytávané fotosenzitivní látky vůbec (při *in vitro* podmínkách). Porfyceny se aplikují pouze povrchově a používají se např. pro léčbu lupenky a nemelanotického karcinomu kůže (Zimčík *et Miletín*, 2004).

3.1.2.2.3 Fotosenzitivní látky III. generace

Skupina fotosenzitivních látek třetí generace se skládá z látek, které patří do skupiny fotosenzitizérů II. generace, jež jsou určitým způsobem modifikovány za účelem zvýšení jejich specifického vychytávání konkrétní tkáni (např. prostřednictvím navázání specifických protilátek), popř. jsou uzavřeny v nosičích, kterými mohou být například lipozomy, micely a nanočástice (Lamch *et al.*, 2014; Bazylińska *et al.*, 2017; Kataoka *et al.*, 2017).

3.1.2.3 Buněčná lokalizace fotosenzitivní látky

Vychytávání fotosenzitivní látky nádorovými a ostatními buňkami je klíčové pro úspěšnou fotodynamickou terapii. ROS mají krátkou životnost a reagují pouze v blízkosti místa jejich vzniku. Porozumění principům lokalizace fotosenzitivní látky je tedy velmi důležité při výběru nejefektivnější fotosenzitivní látky pro každý konkrétní případ. V současné době se žádný dosud schválený nebo testovaný fotosenzitizér neakumuluje pouze v jednom místě. Důležitými

vlastnostmi, které ovlivňují místo akumulace jsou (1) celkový náboj, který se může pohybovat v rozmezí od -4 do +4, (2) stupeň hydrofobicity vyjádřený jako logaritmus rozdělovacího koeficientu oktanol/voda, a (3) stupeň asymetrie v molekule. PS, které jsou hydrofobní a mají dva a méně záporných nábojů, mohou difundovat skrz plazmatickou membránu a poté se přemístit do dalších struktur. Tyto PS mají tendenci být nejvíce buňkou *in vitro* vychytávány, zejména pokud jsou v médiu přítomny v malých koncentracích (<1 μ M). Fotosenzitizéry, které jsou méně hydrofobní a mají více než 2 negativní náboje, jsou příliš polární pro difuzi skrz plazmatickou membránu, a proto bývají vychytávány endocytózou. Některé fotosenzitivní látky jsou distribuovány v širokém spektru buněčných struktur. Například pyroferoforbid, metyl ester, který byl u NCI-h446 buněk objeven v endoplazmatickém retikulu, Golgiho aparátu, lysozomech i mitochondriích (Castano *et al.*, 2004; Sun *et Leung*, 2002; Oleinick *et al.*, 2008).

3.1.2.3.1 Mitochondrie

Obecně platí, že léčiva, která narušují funkci mitochondrií, mají větší účinnost v destrukci nádorových buněk než ta, které mitochondrie nezasahují. Obdobně je tomu i u fotodynamické terapie. Poškození mitochondrií vede k tvorbě ROS, změně mitochondriálního membránového potenciálu a uvolnění proapoptotických faktorů jako např. Smac/Diablo, AIF a cytochromu c do cytozolu. Následná aktivace kaspáz v přítomnosti ATP vede k apoptotickému typu buněčné smrti. Příkladem může být na mitochondrii cílící fotosenzitizér Pc4. Pomocí konfokální mikroskopie bylo zjištěno, že se Pc4 kumuluje převážně v membránách, zejména v mitochondriích. Tvorba mitochondriálních ROS nastává řádově v minutách po aplikaci světla na buňky. Následkem je permeabilizace vnitřní membrány, mitochondriální depolarizace a otok, uvolnění cytochromu c a apoptóza (Oleinick *et al.*, 2008).

Mitochondriální disfunkce může po PDT nastat několika mechanismy. Jeden z modelů (MPT – mitochondrial pore transition model) např. naznačuje, že za uvolnění mitochondriálních proteinů, které se nachází v mezimembránovém

mitochondriálním prostoru, je zodpovědné otevření mitochondriálních permeabilních pórů (PT). U jiného modelu se předpokládá, že je tvorba PT pórů poškozena, rozložené membránové proteiny poté agregují na hydrofilním povrchu za tvorby vodních transmembránových kanálů. CypD (cyklofilin D) a další molekulární chaperony v blízkosti PT pórů chrání mitochondrii před depolarizací a otokem. CypD udává citlivost k Ca^{2+} , přičemž zvýšení koncentrace Ca^{2+} v matrix vede k otevření pórů – antagonisticky působí CsA. Pokud jsou nově vznikající PT póry tvořeny z rozložených proteinových agregátů a je překonána chaperonová regulace, nastává neregulované otevírání PT pórů, které jsou necitlivé k CsA inhibici a nepotřebují Ca^{2+} pro otevření (Oleinick *et al.*, 2008).

3.1.2.3.2 Lysozomy

Lysozomy jsou významnou organelou v intracelulární lokalizaci PS. Nicméně studie ukázaly, že ačkoliv PS akumulující se v lysozomech způsobovaly po ozáření smrt buněk, jejich relativní účinek byl v porovnání s PS akumulujícími se v mitochondriích nebo jiných organelách nižší. Může to být způsobeno tendencí fotosenzitizérů s vyšším stupněm agregace akumulovat se v lysozomech. Působení i jen malého množství světla může způsobit změnu lokalizace u fotosenzitizérů primárně akumulovaných v lysozomech. Bylo zjištěno, že vystavení buněk s inkubovaným aniontovým porfyrinem světlu vedlo k relokaci fotosenzitizéru z lysozomů do cytoplazmy, resp. do jádra. Toto chování je připisováno fotodynamické permeabilizaci lysozomální membrány umožňující malým molekulám včetně PS uniknout do cytoplazmy (Castano *et al.*, 2004).

Lysozomy jsou také klíčovými mediátory finálních stádií autofagie. Autofagozomy, které uzavírají organely a jejich cytoplazmatické složky, neobsahují nezbytné hydrolytické enzymy pro štěpení jejich obsahu, místo toho fúzí s lysozomy. Lysozomální enzymy jsou pak zodpovědné za likvidaci autofagozomálního obsahu – buď recyklací, nebo vyloučením. Většina studií zabývajících se PDT – indukovanou autofagií se zaměřuje na počáteční stadia

autofagie – na proces tvorby autofagozomu. Zjištění, že se autofagozomální komponent LC3-II v buňkách akumuluje jako odpověď na PDT může naznačovat, že další formování autofagozomu je inhibováno PDT – indukovaným poškozením lysozomů nebo faktorů potřebných pro lysozomální stadia autofagie. Další studie by měly být zaměřeny i na tuto problematiku (Oleinick *et al.*, 2008).

3.1.2.3.3 Endoplazmatické retikulum

Fotosenzitivní látky mají tendence se akumulovat, vedle mitochondriální membrány, také v membránách endoplazmatického retikula (ER). Oxidace proteinů ER po PDT může způsobit dvě hlavní změny v ER funkci: (1) změny v ER Ca^{2+} homeostáze a (2) agregaci nesložených a špatně složených proteinů. ER je hlavním intracelulárním zdrojem Ca^{2+} . Intracelulární uvolňování inozitol trifosfátu (IP3) z plazmatické membrány způsobuje IP3-indukované uvolnění Ca^{2+} z ER do cytozolu. Ca^{2+} jsou vráceny do lumen ER pomocí sarko/endoplazmatických Ca^{2+} pump (SERCA). Koordinovaná regulace mechanismů uvolnění a vychytávání Ca^{2+} udržuje za fyziologických podmínek hladinu volných Ca^{2+} na hodnotě $\sim 500 \mu\text{M}$. Jakékoliv poruchy v uvolňování nebo vychytávání Ca^{2+} nakonec vedou k ovlivnění koncentrací Ca^{2+} v cytozolu. Vedle funkce udržování hladiny Ca^{2+} je ER zodpovědné také za skládání, úpravu a třídění nově syntetizovaných proteinů. Jakékoliv poškození těchto vitálních buněčných funkcí vede k ER stresu, které může nakonec vést k buněčné smrti (Oleinick *et al.*, 2008).

3.1.2.3.4 Jádro

Díky tendenci hydrofobních fotosenzitizérů akumulovat se v cytoplazmatických membránách a membránových organelách a sklonu vylučovat se z jádra je v porovnání s ostatními organelami relativně málo studií zaměřujících se na poškození DNA po PDT. Navíc prvotní studie zaměřující se

na opravené defekty DNA v buňkách poskytly důkaz, že většina poškození DNA po PDT byla pro úhyn buněk v porovnání s poškozením membrán méně důležitá. Kultivované savčí buňky vystavené PDT s porfyrinem a porfyrinovými deriváty vytvářely DNA jednořetězcové zlomy a alkalická labilní místa, neopravitelné DNA-protein cross-linky a mutace. V jiných případech však k mutaci nebo produkci chromozomálních aberací a mikrojader nedošlo. Z toho vyplývá, že mutagenní potenciál se liší v závislosti na typu buněk a odráží rozdíly ve schopnostech oprav mezi nimi. PDT tedy může způsobit DNA báze oxidativní poškození, cross-linky a zlomy řetězců, nicméně většina zlomů DNA řetězců způsobených nízkodávkovou PDT je obvykle opravena (Castano *et al.*, 2005; Oleinick *et al.*, 2008).

3.1.3 Světlo, jeho zdroje a způsoby aplikace ve fotodynamické terapii

Pro úspěšné provedení fotodynamické terapie je nezbytné zajistit dostatečné osvětlení postižených oblastí. Toto vyžaduje porozumění tomu, jakým způsobem světlo prochází různými tkáněmi a relativní účinky absorpce a rozptylu. Pro fotodynamickou terapii je nezbytností schopnost předpovědět prostorové rozložení světla v cílové tkáni. Po vstupu do tkáně je světlo buď rozptýleno, nebo absorbováno, přičemž rozsah obou procesů závisí na typu tkáně a vlnové délce použitého světla (Robertson *et al.*, 2009).

Tkáňová optika zahrnuje měření prostorové/ časové distribuce, rozdělení tkáňových struktur dle velikosti a jejich absorpční a rozptylové vlastnosti. Toto se provádí zejména v případech, kdy je biologická tkáň nehomogenní a jsou v ní přítomny mikroskopické nehomogenity (např. makromolekuly, buněčné organely, organizovaná buněčná struktura, intersticiální vrstvy), které ji činí zakalenou. Mnohočetný rozptyl uvnitř zakalené oblasti vede k šíření světelného paprsku a ztrátě směrovosti. Absorpce je z velké části způsobena endogenními tkáňovými chromofory, jako je hemoglobin, myoglobin a cytochromy (Juzeniene *et Moan*, 2007).

3.1.3.1 Zdroje záření

Výběr optimálního zdroje světla by měl být založen na vlastnostech fotosenzitivní látky, charakteru léčené tkáně (velikost, lokalizace a přístupnost postižené oblasti), na hloubce průniku do tkáně a v neposlední řadě na finanční nákladnosti.

V minulosti byla aktivace fotosenzitivní látky prováděna prostřednictvím různých světelných zdrojů jako například barvivo/ argonové lasery, lasery využívající páry kovů (Au, Cu, Hg) apod. Jedním z nejrozšířenějších laserů je laser argonový poskytující kontinuální záření s $\lambda = 630 \text{ nm}$ v rozmezí 1–7 W. Od tohoto laseru se v současné době ustupuje. Laser využívající páry kovů (nejčastěji Au a Cu) je oproti kontinuálnímu argonovému laseru pulzní s dobou trvání pulzu 10–50 ns a pulzní frekvencí 1 kHz. Lasery využívající páry kovů jsou využívány zejména při terapii nádorů hlavy, jícnu, plic, krku a močového měchýře. Tyto lasery se často využívají i pro terapii velkých nádorů na kůži (Brancaleon *et* Moseley, 2002).

Mezi zdroje záření, které jsou velmi atraktivní pro klinickou praxi, patří díky jednoduché ovladatelnosti a přenositelnosti diodové lasery. Tyto lasery jsou obvykle spojeny s optickými vlákny a představují ideální zdroje záření pro využití při endoskopické PDT. Lasery tvořené polovodiči jsou extrémně kompaktní, a přitom si zachovávají vysoký výkon. Jsou velmi univerzální díky tomu, že mohou být použity jak v kontinuálním, tak i v pulzním módu. Nevýhodou těchto laserů je, že mají obvykle výstup pouze v jedné vlnové délce, avšak jsou vyvíjeny i systémy se zaměnitelnými laserovými moduly pro více vlnových délek. Diodové lasery jsou obvykle v klinické praxi využívány při léčbě s věkem spojené makulární degenerace, karcinomů hypofýzy, lézí na kůži a v dutině ústní (Brancaleon *et* Moseley, 2002).

Dalšími zdroji záření jsou lampy, které řadíme mezi nelaserové zdroje. V porovnání s lasery emitují záření v širším spektrálním rozmezí a musí být tedy kombinovány s filtry pro co největší eliminaci infračerveného záření. Toto záření způsobuje zvýšení teploty v léčené oblasti a tím způsobené bolesti. Nevýhodou lamp je nemožnost spojení s optickými vlákny – toto propojení by

vedlo k velkým ztrátám výkonu. Z tohoto důvodu se lampy nepoužívají v endoskopii ale spíše při léčbě kožních nádorů. Fluorescenční lampa, která se pro PDT současné době využívá, je Blu-U® (Dusa), jejíž emisní pík je v oblasti Soretova píku (417 ± 5 nm), což je vhodné pro kombinaci s porfyrinovými fotosenzitizéry (Brancaleon *et Moseley*, 2002).

V současné době jsou jedním z nejvyužívanějších zdrojů záření LED diody, u nichž je světlo produkováno při procesu zvaném elektroluminiscence s emisní vlnovou délkou v rozmezí 350–1100 nm (UVA – IR). Maximální emitovaná energie je u tohoto zdroje záření vysílána ve směru kolmém na ozařovanou plochu a LED diody jsou schopny dosáhnout hustoty výkonu až 150 mWcm^{-2} . Mezi hlavní benefity LED diod patří nízká cena, všestrannost, díky napájení bateriemi přenosnost a uspořádatelnost do různých geometrických kombinací umožňujících kompenzaci obtížné anatomické oblasti (např. oblast obličeje) (Erkiert-Polguj *et al.*, 2016; Hempstead *et al.*, 2015; Mang, 2004).

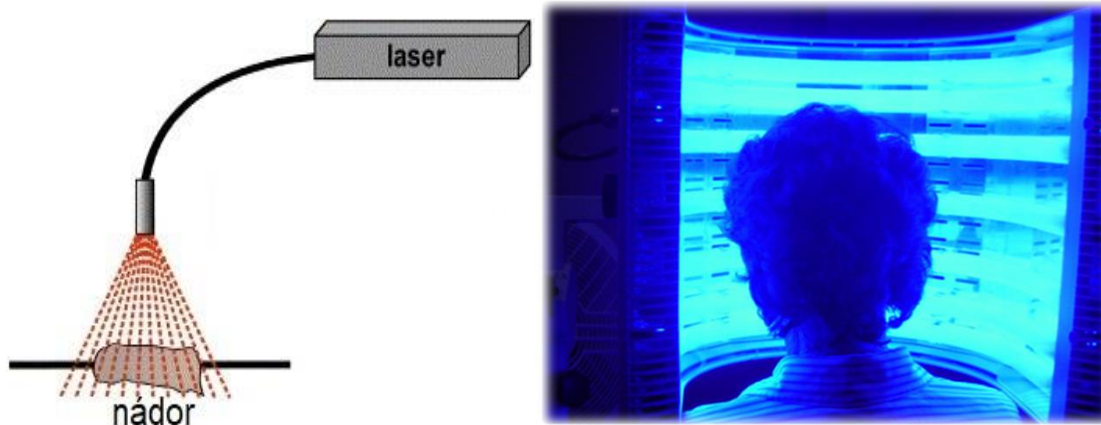
3.1.3.2 Způsoby aplikace světla používané při fotodynamické terapii

V současné době se v klinické praxi využívá k ozáření nádoru, respektive k aktivaci fotosenzitizéru, několik odlišných technik a volba vhodné techniky záleží zejména na velikosti nádoru a jeho lokalizaci.

3.1.3.2.1 Superficiální (povrchová) PDT

Superficiální PDT lze využít u nádorů, které jsou snadno dostupné a nachází se na povrchu kůže nebo orální mukózní vrstvy, jejichž tloušťka není větší než hloubka penetrace světla (závisí na použité vlnové délce). Světlo potřebné pro ozáření nádoru a přilehlého okolí je dodáváno prostřednictvím vláknů s mikročočkami na konci. Při běžném chirurgickém zákroku je pokládáno za bezpečnou rezervu odstranění přibližně 0,5 až 1 cm zdravé tkáně obklopující

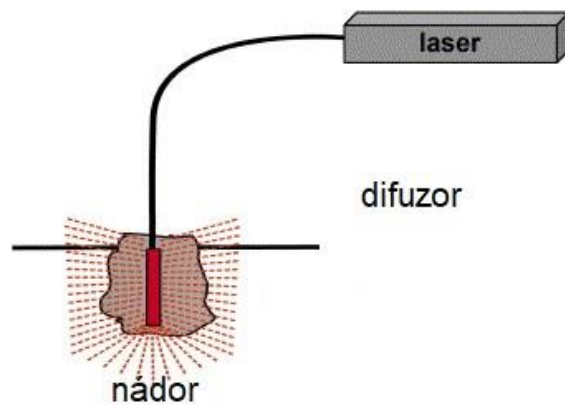
tkáň nádorovou (Kübler, 2005). Princip aplikace světla při superficiální PDT je zobrazen na obr. č. 8.



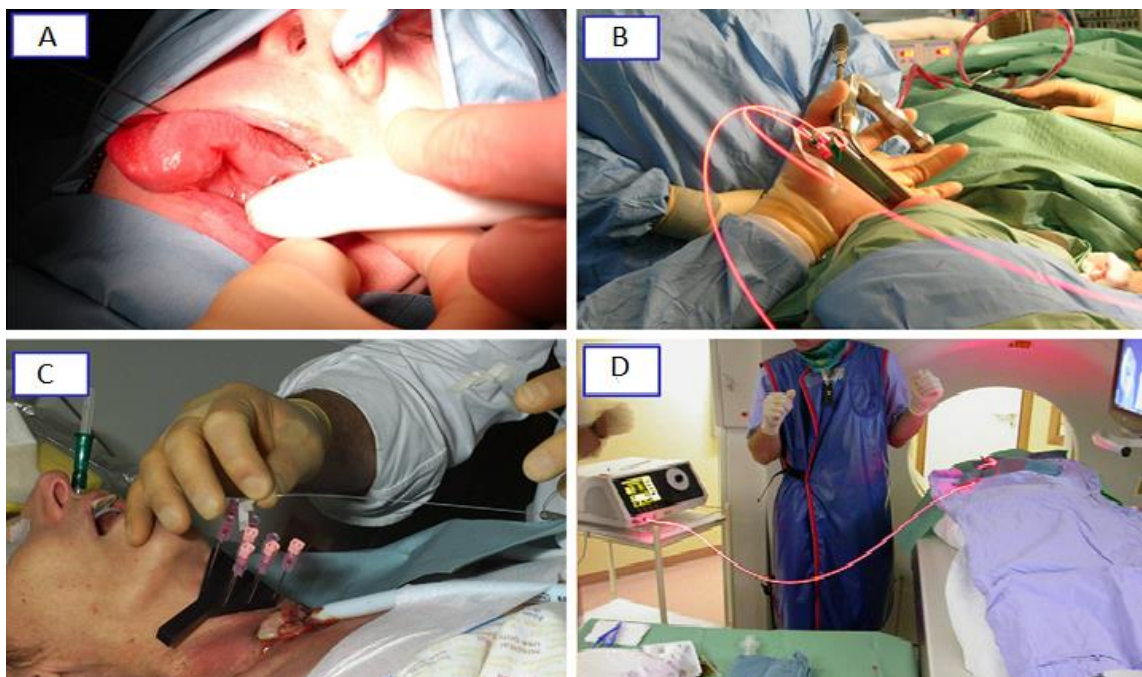
Obr. č. 8: Princip aplikace světla při superficiální PDT (Kübler, 2005; Cole *et al.*, 2016).

3.1.3.2.2 Intersticiální PDT

V případě, že je tloušťka nádoru větší než 1 cm, což představuje limitní penetrační hloubku světla do lidské tkáně, je využívána intersticiální fotodynamická terapie (obr. č. 9: Princip aplikace světla při intersticiální PDT). Při této technice je optické vlákno opatřeno difuzorem na jeho konci a implantováno do nádorové tkáně. Laserová vlákna mají podobu průchozí jehly, jejíž vložení do nádoru může být řízeno pomocí zobrazovacích technik jako např. CT, MR či UZV (obr. č. 10). V případě velkých nádorů je možno vytvořit mřížku, ve které jsou tato vlákna uložena ve vzdálenosti 1–2 cm od sebe, a ozářit celý objem nádoru. Intersticiální technika ozáření tkáně umožňuje využít PDT při léčbě rozsáhlých a hluboko umístěných nádorů. Dále je intersticiální PDT velmi významná při léčbě nádorů, u nichž by chirurgické odstranění mohlo způsobit rozsáhlé resekce, či pro nádory neoperovatelné. Kvůli obtížné a nepřesné dozimetrii v nádorové tkáni je tato technika využívána zejména při léčbě paliativní.



Obr. č. 9: Princip aplikace světla při intersticiální PDT (Kübler, 2005).

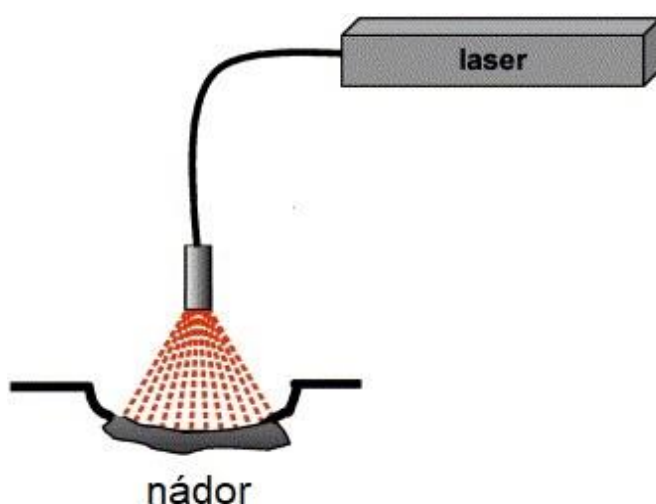


Obr. č. 10: Příklady aplikace optických vláken do nádoru (Juries *et al.*, 2010).

(A) Aplikace řízená ultrazvukem, (B) aplikace řízená laryngoskopem, (C) mřížka s optickými vlákny, (D) aplikace řízená magnetickou rezonancí

3.1.3.2.3 Intraoperativní PDT

Fotodynamické terapie lze být využita také intraoperativně (obr. č. 11 - Princip aplikace světla při intraoperativní PDT). Při této metodě je fotosenzitivní látka pacientovi podána několik dní před operací v závislosti na typu fotosenzitivní látky, respektive rychlosti její akumulace v cílové tkáni. Po uplynutí příslušné doby je tumor chirurgicky odstraněn a následuje intraoperativní PDT. Cílem této terapie je odstranění těžko chirurgicky odstranitelných zbytků nádorové tkáně, díky čemuž může být odstraněn celý nádor, a to i v anatomicky složitých oblastech. Nežádoucí aplikaci světla na fotosenzitivní látky světly nad operačním stolem lze eliminovat filtry, které odfiltrují vlnové délky světla aktivující fotosenzitivní látku. V současnosti je tato metoda využívána v experimentálních klinických podmínkách pro léčbu nádorů hlavy a krku (Kübler, 2005; Lyons *et al.*, 2012).

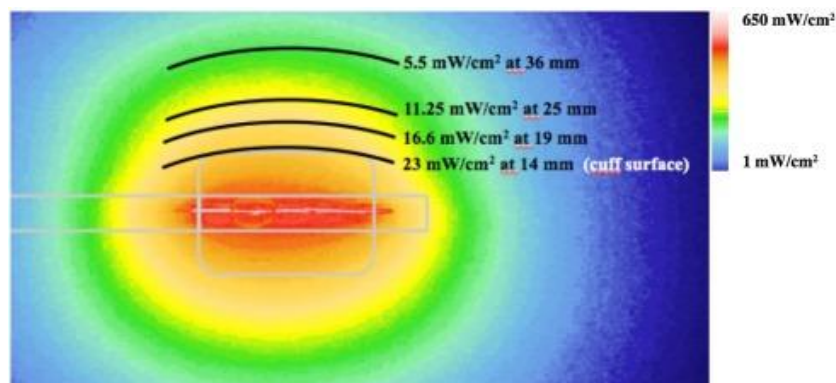


Obr. č. 11: Princip aplikace světla při intraoperativní PDT (Kübler, 2005).

3.1.3.2.4 Intrakavitární PDT

Tato metoda využívá speciálních intrakavitárních světelných difuzorů, kdy se kombinuje prostorový vyhledávač sloužící pro určení polohy světelného aplikátoru a 3D zobrazení pro znázornění dávky světla (obr. č. 12 – osvětlovací profil aplikátoru po připojení na laser). Metoda byla vyvinuta pro léčbu nádorů,

které se nachází uvnitř dutých orgánů, jako jsou např. průdušky, děloha či jícn (Lyons *et al.*, 2012).



Obr. č. 12: Osvětlovací profil aplikátoru po připojení na laser (3 W) (Betrouni *et al.*, 2017).

3.1.4 Mechanismy destrukce nádoru

Jsou známy 3 hlavní mechanismy, prostřednictvím kterých je v průběhu PDT řízena destrukce nádoru: (1) přímý cytotoxický efekt volných radikálů a produktů oxidace na nádorové buňky, (2) poškození cévního systému nádoru a (3) aktivace imunitní odpovědi organismu proti nádorovým buňkám.

3.1.4.1 Přímá cytotoxicita

Rozsah fotopoškození a cytotoxicita závisí na typu fotosenzitivní látky, její intra- a extracelulární lokalizaci, podávané dávce, celkové dávce záření, dostupností kyslíku a časovým intervalem mezi podáním léčiva a ozářením. PDT indukované cytotoxické radikály mají krátkou životnost a jsou schopny účinku pouze na krátkou vzdálenost. V případě singletního kyslíku je poločas životnosti méně než 40 ns, díky čemuž je jeho dosah přibližně 20 nm. Toto tedy poukazuje na skutečnost, že pro cytotoxický efekt fotodynamické terapie je

lokalizace fotosenzitivní látky klíčová, například fotoperoxidace membránového cholesterolu a nenasycených fosfolipidů vede ke změnám v propustnosti membrány, ztrátě pružnosti, cross-linku aminolipidů a polypeptidů a inaktivaci enzymů a receptorů asociovaných s membránou. Inaktivace membránového transportního systému, depolarizace plazmatické membrány a inhibice enzymů zajišťujících opravu DNA, může předcházet inaktivaci mitochondriálních enzymů, což bývá klíčovým dějem vedoucím k buněčné smrti. Dále například lipofilní fotosenzitivní látky mohou penetrovat do jádra a způsobovat poškození DNA a membrány jádra. Toto je spojeno s uvolněním laktát dehydrogenázy a imunitních mediátorů. Všechny imunitní modulátory mají rychlý nástup účinku a vedou k rozvoji PDT – indukovaného cévního poškození, které je popsáno níže (Kudinova *et Berezov*, 2009; Huang *et al.*, 2008; Bisland *et al.*, 2004).

3.1.4.1.1 Typy buněčné smrti

Ačkoliv může fotodynamická terapie indukovat mnoho buněčných a signalizačních pochodů v buňce, jejím hlavním cílem je indukovat buněčnou smrt. Morfologicky můžeme rozlišit 3 formy programované buněčné smrti: apoptózu, nekrózu a autofagii. Hlavními faktory, které určují, jaký typ smrti nastane, jsou typ buňky, buněčná lokalizace fotosenzitivní látky a plošná hustota světelné energie. Předpokládá se, že při nižších dávkách PDT dochází s větší pravděpodobností k apoptóze, při vyšších k nekróze. Obecně platí, že fotosenzitivní látky, které se přednostně akumulují v mitochondriích (např. porfyrinové PS) či v membránách buněčných organel (např. hypericin) vedou při určité míře oxidačního stresu k apoptóze. Látky, které se akumulují v plazmatické membráně, mohou způsobit rychlý zvrát ve prospěch nekrózy pravděpodobně díky ztrátě integrity plazmatické membrány a rapidnímu vyčerpání intracelulárního ATP. Některé kationické porfyriny se během ozařování přesunují z plazmatické membrány do cytozolu, což vede ke specifické fotoinaktivaci prokaspázy 9 a 3 a inhibici apoptózy ve prospěch nekrózy, avšak tento mechanismus je stále nejasný (Buytaert *et al.*, 2007; Robertson *et al.*, 2009; Agostinis *et al.*, 2004).

Nekróza je, na rozdíl od apoptózy, vždy patologický proces, při němž dochází k násilné a rychlé destrukci, která se rychle v buněčné populaci šíří. Je charakterizována procesy, mezi které patří bobtnání cytoplazmy, devastace organel a narušení plazmatické membrány vedoucí k uvolnění intracelulárního obsahu do okolního prostředí a v *in vivo* podmínkách k zánětu. Nekróza může být způsobena různými vlivy jako např. pokles hladiny ATP, zvýšení koncentrace ROS a vápníku v cytoplazmě, enzymatické a mechanické poškození buněk (Nečas *et al.*, 2009; McCall, 2010).

Apoptóza neboli aktivní buněčná smrt může být popsána jako regulovaná buněčná sebevražda, která je spouštěna extra- i intracelulárními faktory. Apoptóza vede k řadě charakteristických morfologických, biochemických a energetických změn, jejichž výsledkem je systematická a kontrolovaná buněčná destrukce a tvorba apoptotických tělísek s buněčnými organelami uvnitř, které jsou následně fagocytovány. Díky tomu je, na rozdíl od nekrózy, zabráněno nekontrolovanému úniku intracelulárního materiálu do okolí, a tudíž nedochází k masivnímu poškození okolních buněk a zánětu. Při apoptóze tedy dochází k smrštění buňky a dalším výrazným změnám, jako jsou kondenzace chromatinu v jádře, fragmentace jádra a následná segregace buňky do jednotlivých apoptotických tělísek (Plaetzer *et al.*, 2003; Bytaert *et al.*, 2007; Robertson *et al.*, 2009).

Při apoptóze dochází k aktivaci cysteinových proteáz zvaných kaspázy, které koordinují proces buněčné destrukce a buněčnou smrt. Tyto kaspázy mohou být aktivovány dvěma různými mechanismy, vnější a vnitřní apoptotickou dráhou. Vnější apoptotická dráha je iniciována vazbou faktorů smrti (např. FasL, TNF- α , TRAIL) na příslušný receptor smrti (DR – death receptor) na povrchu buňky. Tento proces indukuje klastrování DR a intracelulární tvorbu komplexu DISC („death – inducing signaling complex“), který aktivuje enzymy kaspázu 8 a 10. Tyto enzymy dále štěpí a aktivují efektorové prokaspázy 3 a 7. Vnitřní apoptotická dráha je spouštěna různými extracelulárními a intracelulárními stresovými faktory a vývojovými podněty a vyžaduje permeabilizaci vnější mitochondriální membrány vedoucí k uvolnění apoptotických molekul jako např. cytochrom c do cytoplazmy. Cytozolární cytochrom c se váže na Apaf-1, který v přítomnosti ATP vede k aktivaci

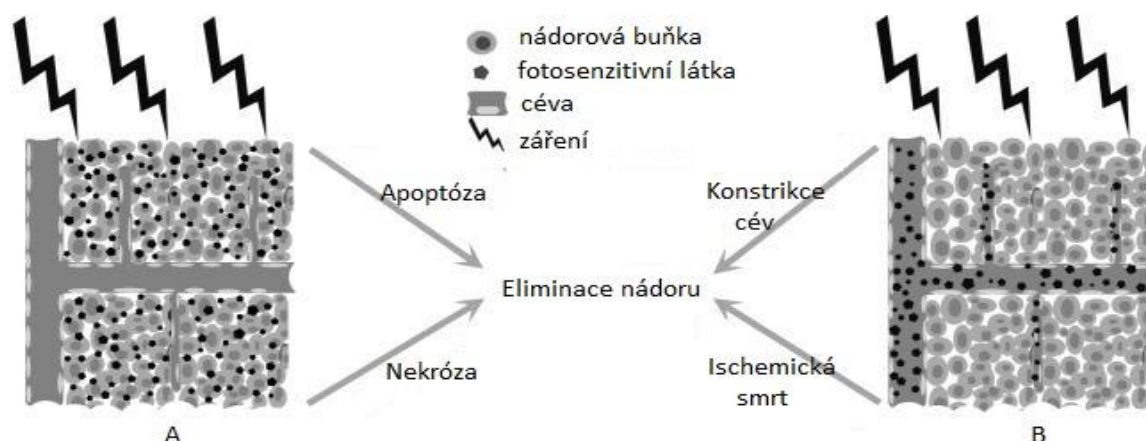
prokaspázy 9 a spolu tvoří oligomerní komplex zvaný apoptozom, který mění prokaspázu 9 na kaspázu 3, která funguje jako efektorová proteáza, která následně štěpí další proteiny metabolické dráhy, což vede k buněčné smrti (Agostinis *et al.*, 2004).

Autofagie je buněčný program pro recyklaci buněčných komponent během hladovění nebo pro odstranění poškozených organel a podporu přežití buňky. V případě, že je poškození rozsáhlé, představuje autofagie další typ buněčné smrti. Autofagie je katabolický mechanismus, který buňce umožňuje udržovat rovnováhu mezi syntézou, degradací a recyklací buněčných produktů. Existuje mnoho autofagiálních procesů a všechny zahrnují lysozomální degradaci buněčných organel a proteinů. Většina známých mechanismů postupuje následujícím způsobem: dvoumembránová struktura zvaná autofagozom obklopí cílovou oblast a vytvoří váček, který oddělí obsah od zbytku cytoplazmy. Tento váček je následně transportován k lysozomu a fúzuje s ním, což vede k vytvoření struktury zvané autofagolysosom, jehož obsah je následně degradován lysozomálními hydrolázami. Vedle usnadnění likvidace nežádoucích proteinů, organel a mikroorganismů umožňuje autofagie buňce přeskupit živiny z vedlejších do pro život nezbytných procesů během hladovění. Stále není jasné, jakým způsobem autofagie ovlivňuje výsledek PDT. Obecně savčí buňky využívají autofagii jako obranu proti ROS – řízenému poškození pomocí odstranění poškozených organel. V závislosti na typu ROS a stupni oxidativního poškození může PDT stimulovat autofagii, která buď reaguje cytoprotektivně nebo indukuje buněčnou smrt. Autofagie může hrát roli i v PDT-indukované apoptóze, tyto dva procesy však mohou nastávat nezávisle jeden na druhém (Mroz *et al.*, 2011; Kessel *et al.*, 2006; Reiners *et al.*, 2010; Scherz-Shouval *et al.*, 2007; Sasnauskienė *et al.*, 2009; Kessel *et al.*, 2009).

3.1.4.2 Poškození cévního systému nádoru

Rozvoj cévního poškození byl v minulosti podrobně popsán u řady fotosenzitivních látek včetně Photofrinu 2, purpurinů, ftalocyaninů a NPe6. Časový interval mezi iniciací poškození a vaskulární okluzí se liší nádor

od nádoru a také mezi fotosenzitizéry. Ozáření fotosenzitivní látky, která buď cirkuluje v krevním řečišti akumulovaná v endoteliálních buňkách nebo je navázána na stěny cév, vede ke kolaterálnímu poškození endoteliálních buněk, které je charakterizováno ztrátou těsných spojů mezi buňkami a obnažení vaskulárních bazálních membrán. Toto primární poškození uvnitř lumenu cév vede k tvorbě trombogenních míst a iniciaci kaskády fyziologických reakcí např. agregaci trombocytů, uvolnění vazoaktivních molekul, adhezi leukocytů, zvýšení vaskulární permeability a konstrikci cév. Mikrovaskulární kolaps, omezení průtoku krve a hemoragie mohou vést k trvalé post-PDT nádorové hypoxii a pozitivnímu efektu na léčbu nádoru. Fotosenzitivní látky navázané na nosič (albumin, LDL, HDL) mají vyšší afinitu k endoteliálním buňkám a nádorovému mikrovaskulárnímu endotelu díky přítomnosti velkého množství specifických receptorů v nich. Tato skutečnost může být aditivním faktorem ve vychytávání fotosenzitivní látky a retenci v nádorové tkáni. Ačkoliv by se dalo očekávat, že přítomnost fotosenzitivní látky v cévním systému i cílovém buněčném kompartmentu povede ke zvýšenému kombinovanému efektu, bylo zjištěno, že odpověď na kombinovanou cévní – buněčnou PDT nekoreluje s koncentrací fotosenzitivní látky v buňkách nádoru. Z tohoto důvodu by při této PDT muselo být světlo aplikováno během podávání fotosenzitizéru a pokračovat i po dokončení podávání fotosenzitizéru, díky čemuž by bylo pravděpodobně dosaženo maximálního účinku PDT (Huang *et al.*, 2008; Henderson *et al.*, 1987; Fingar, 1996; Abels, 2004; Huang *et al.*, 2005). Schematické znázornění PDT při akumulaci fotosenzitivní látky v buňce a v cévách je zobrazeno na obrázku č. 13.



Obr. č. 13: Buněčná vs. Vaskulární PDT (Huang *et al.*, 2008).

A – dlouhý interval mezi podáním léčiva a ozářením (DLI, >24 h) umožňuje fotosenzitivní látce akumulaci v cílové oblasti a díky tomu způsobovat intracelulární poškození.

B – Při krátkém DLI (< 30 min) fotosenzitivní látka při ozáření stále cirkuluje v krevním řečišti a způsobuje zejména cévní poškození.

3.1.4.3 Imunitní odpověď

PDT – indukovaná imunitní odpověď a částečná protinádorová specifická imunita byla studována na různých zvířecích modelech. Za určitých experimentálních podmínek PDT způsobuje výrazné, avšak krátce trvající a reverzibilní potlačení imunitního systému. Nicméně na rozdíl od chemoterapie a radiační terapie PDT nezpůsobuje závažné negativní účinky na hostitelském imunitním systému. Výzkumy ukázaly, že protinádorově-specifický imunitní proces a posílení hostitelského imunitního systému může hrát důležitou roli v sekundární cytotoxicitě, v získání dlouhotrvající kontroly nad nádorem nebo kompletní nádorové reakci na PDT, a to i přestože tyto procesy nejsou pro všechny buňky nezbytně letální, popř. relevantní pro zahájení eliminace nádoru. Studie na zvířatech ukazují, že v buněčných membránách vznikají zánětlivá poškození a stěny cév léčených oblastí začínají po PDT shromažďovat neutrofile, žírné buňky a monocyty. Tyto buňky mohou také uvolňovat další zánětlivé mediátory umožňující masivní shromažďování buněk

imunitního systému v oblasti nádoru. Tyto imunitní buňky a nespecifické imunitní efekторы mají velký dopad na destrukci nádorů. PDT může také aktivovat expresi a produkci několika cytokinů jako např. IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10 a TNF- α . Ty mohou hrát důležitou roli v regulaci hostitelské imunitní odpovědi zahrnující jak lymfoidní, tak nelymfoidní buňky. Současné klinické studie naznačují, že PDT může zvýšit vychytávání nádorových antigenů prostřednictvím s nádorem asociovaných antigen prezentujících buněk (APC) a zajistit zapojení lymfocytů. Studie také naznačují, že buněčné lyzáty PDT – léčených buněk mohou sloužit jako účinné vakcíny, nicméně mechanismus zesílení hostitelské protinádorové imunitní odpovědi na PDT – vakcínu je stále nejasný. Tyto pokroky při porozumění PDT – řízené imunitní odpovědi mohou vést k pokusům o optimalizaci PDT – řízených protinádorových metod prostřednictvím modulace důležitých zánětlivých/ imunitních mediátorů (Korbelik, 1996; Canti *et al.*, 2002; van Duijnhoven *et al.*, 2003; Nowis *et al.*, 2005; Yamamoto *et al.*, 1991; Krosli *et al.*, 1995; Gollnick *et al.*, 2003; Castano *et al.*, 2006; Abdel-Hady *et al.*, 2001; Korbelik *et al.*, 2004).

3.1.5 Fotodynamická reakce v těle

Během fotodynamické terapie se fotosenzitivní látka, jejíž způsob podání závisí na lokalizaci nádoru, selektivně akumuluje v nádorové tkáni, a to díky fyziologickým rozdílům mezi nádorovou a zdravou tkání. Akumulace v nádorové tkáni a dosažení maximálního poměru koncentrací nádorová/ zdravá tkáň může trvat od 3 do 96 hodin v závislosti na použité fotosenzitivní látce a druhu nádoru. Fluorescence při fotodynamické terapii může být následně využita pro lokalizaci a diagnostiku nádorové tkáně. Buněčná destrukce může nastat několika různými drahami, přičemž jedna z nich způsobuje poškození cévního zásobení pomocí edému a další z nich vede k přímé buněčné smrti pomocí nekrózy. Uvnitř těla reaguje fotosenzitivní látka s nádorovými buňkami pravděpodobně prostřednictvím LDL (low-density lipoprotein) receptorů. Nádorové buňky mají vyšší hladiny LDL receptorů, a tak je LDL-fotosenzitizér komplex maligními buňkami preferenčně endocytován. Dále je selektivní

akumulace fotosenzitivní látky nádorovou tkání způsobena pravděpodobně díky jinému intracelulárnímu pH (u nádorových buněk nižší), defektnímu mikrovaskulárnímu komplexu, špatnému systému pro odvod lymfy u nádorových buněk, relativně velkému množství nově syntetizovaného kolagenu a většímu intersticiálnímu objemu (Ormond *et Freeman*, 2013; Chowdhary *et al.*, 2003; Moan *et Peng*, 2003).

3.1.5.1 Reakce na buněčné úrovni

Jednou z nejdůležitějších oblastí výzkumu zaměřujícího se na změny po PDT je propojení znalostí buněčné biologie a drah přenosu signálů s transkripčními faktory, regulací buněčného cyklu, zánětlivými reakcemi a buněčnou smrtí, jelikož některé dráhy přenosu signálu jsou aktivovány PDT. Zkoumání a porozumění efektům PDT na dráhy přenosu signálu a odpovědi buňky na stres (hypoxie a angiogeneze) mohou umožnit optimalizaci PDT a tím zefektivnit léčbu rakoviny a dalších onemocnění. Mezi nejdůležitější oblasti studia patří analýza vlivu PDT na změny hladin vápníku, její efekt na lipidový metabolismus a proteiny v buňce (exprese tyrozinkináz, transkripčních faktorů apod.), či změny v adhezi buňky a cytokinů (Robertson *et al.*, 2009).

3.1.5.1.1 Vápník

Při *in vitro* PDT se zjistilo, že v buňkách dochází k nárůstu hladiny celkového intracelulárního vápníku, což je spojeno buď s buněčnou smrtí či za určitých podmínek s buněčným přežitím. Nárůst intracelulárních koncentrací Ca^{2+} se zřejmě děje prostřednictvím přílivu Ca^{2+} skrz iontové kanály uvolněním Ca^{2+} uloženého v endoplazmatickém retikulu a mitochondrii a aktivaci mechanismu výměny iontů. Vzhledem k tomu, že Ca^{2+} představuje důležité propojení mezi mnoha drahami aktivovanými při PDT a má tedy zásadní vliv na její efekt, je Ca^{2+} jedním z důležitých cílů výzkumů (Nowis *et al.*, 2005; Haqq *et al.*, 2005).

3.1.5.1.2 Lipidový metabolismus

V buňce existuje mnoho vzájemně propojených drah mezi Ca^{2+} a lipidovým metabolismem. Rychlé uvolnění metabolitů kyseliny arachidonové bylo pozorováno v mnoha případech po PDT, které může být způsobeno aktivací fosfolipázy A2 (PLA2), což je membránový enzym aktivovaný Ca^{2+} , a může vést k apoptóze. Ceramid je stresem indukovaný sekundární messenger (druhý posel), který se tvoří ze sfingofosfolipidů (jsou součástí buněčné membrány) sfingomyelinázami. Tyto enzymy štěpí sfingofosfolipidy jako je sfingomyelin na fosforylcholin a ceramid. Navíc může být ceramid tvořen *de novo* syntézou působením enzymu ceramid syntázy. Bylo zjištěno, že sfingolipid ceramid funguje jako účinná sekundární efektorová molekula, která reguluje různé buněčné procesy včetně apoptózy, senescence, buněčného cyklu a buněčné diferenciaci. Ceramid také aktivuje řadu enzymů zapojených v odpovědi buňky na stres, a to včetně protein kináz a protein fosfatáz. Ve většině buněk se obecně hladiny ceramidu v buňkách po PDT zvyšují, což vede k buněčné smrti (Nowis *et al.*, 2005; Haqq *et al.*, 2005; Castano *et al.*, 2005).

3.1.5.1.3 Proteiny

Díky jejich hojnosti a relativně vysokým konstantám rychlosti pro reakce s $^1\text{O}_2$ a dalšími reaktivními kyslíkovými radikály (ROS) jsou proteiny považovány za hlavní cíl fotodynamické reakce. Jednotlivá aminokyselinová rezidua se v rychlosti reakce s $^1\text{O}_2$ dramaticky liší, což vede k selektivnímu poškození konkrétních bočních aminokyselinových řetězců. Při fyziologických podmínkách reagují cystein, methionin, tyrozin, histidin a tryptofan s $^1\text{O}_2$ rychlostí $>10^7\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Tato aminokyselinová rezidua jsou primárním místem oxidativních modifikací proteinů. Cystein a methionin jsou oxidovány zejména na sulfoxidy, histidin poskytuje tepelně nestabilní endoperoxid, tryptofan produkuje N-formylkynurenin a tyrosin podstupuje fenolické oxidativní párování. V rozmezí pH 7,0–8,5 jsou nejvíce citlivé na fotooxidaci bílkovinné sulfurydrylové skupiny

následované histidinem, tryptofanem a tyrozinem. Odstranění vodíkových atomů z cysteinových reziduí vede k produkci thiolových radikálů, které podstupují cross-link s druhým thiolovým radikálem a vytváří disulfidové můstky.

V kontrastu s výše uvedeným hydroxylový radikál reaguje s většinou aminokyselin rychlostí odpovídající rychlosti difúze. Z tohoto důvodu závisí poškození proteinů prostřednictvím HO• na koncentraci cílových sloučenin a reaktivitě primárně tvořených produktů. Například oxidace tyrozinu hydroxylovým radikálem vede k vytvoření tyrosylového radikálu. Tento typ reakce vede buď k regeneraci tyrozinu nebo přidavkem $O_2^{\cdot-}$ k vytvoření tyrozin hydroperoxidu. V proteinech je tvorba tyrozin hydroperoxidu upřednostňována v případě, že se tyrozin nachází na N-konci. Vodíkové vazby $O_2^{\cdot-}$ s aminoskupinami podporují adiční reakce, a tudíž i tvorbu tyrozin hydroperoxidu. A tak i bez přímé reakce s aminokyselinovými residui $O_2^{\cdot-}$ přispívá k poškození proteinů prostřednictvím uvolňování Fe z [4Fe-4S] klastrů účastnících se reakcí s meziprodukty reakcí volných radikálů a tvořících peroxyinitrit ($ONOO^-$). Peroxyinitrit reaguje přímo se síru-obsahujícími aminokyselinami a je zdrojem vysoce oxidativních uhličitánových radikálů (Davies, 2005; Garrison, 1987; Winterbourn *et al.*, 2004; Das *et al.*, 2010; d'Alessandro *et al.*, 2000; Nagy *et al.*, 2009).

Vedle fotooxidace aminokyselinových reakcí mohou probíhat i další reakce. Ty zahrnují vazbu fotosenzitizér – protein a proteinový cross-link prostřednictvím párování 2 tyrozinových jednotek. Kovalentní cross – link, který je považován za sekundární reakci mezi produkty fotooxidace aminokyselinových reziduí s dalšími skupinami v proteinu, vede k tvorbě molekulových agregátů. Například PDT s mitochondriálními fotosenzitivními látkami vede k efektivnímu cross-linku STAT3 proteinu (z ang. "Signal Transducer and Activator of Transcription") a menšímu množství STAT1 a STAT4 proteinů. Zajímavé je, že tyto proteiny byly nalezeny v cytosolárních a jaderných buněčných frakcích, tudíž v signifikantní vzdálenosti od mitochondriální produkce $O_2^{\cdot-}$ během PDT. Z tohoto důvodu se zdá, že se této reakce účastní i další ROS či 1O_2 generované radikály. Vedle toho je známo mnoho dalších proteinových cross-linků: multimerizace proton – translokující ATPázy na vnitřní straně mitochondriální membrány, cross-link membránových

proteinů v lidských erythrocytech, tvorba multimerních komplexů hem-vazebných proteinů. Kvůli množství potenciálních mechanismů je mechanismus proteinových cross-linků následující po fotodynamické terapii obtížnější přesně určit. Například karbonylové skupiny oxidovaných proteinů mohou reagovat s N^ε- amino skupinami lyzinových derivátů v okolí proteinu, oxidace dvou cysteinů může vést k intramolekulárním disulfidovým derivátům, apod. (Benov *et al.*, 2012; Afonso *et al.*, 1999; Benov, 2015).

Modifikace jednotlivých proteinů nezávisí pouze na obsahu citlivých aminokyselinových zbytků, ale také na jejich pozici ve složeném proteinu. Z tohoto důvodu se proteiny podstatně liší v citlivosti na poškození prostřednictvím fotodynamické terapie. Dalším faktorem, který ovlivňuje poškození po PDT je blízkost fotosenzitivní látky k náchylným místům, což souvisí s lokalizací fotosenzitivní látky. Například PDT s rodaminovými deriváty vede k oxidaci NAD(P)H, avšak tento jev není pozorován v případě PDT využívající Photofrin, Verteporfin, AIPcS₄, TPPS₄ a to i přesto, že byly tyto látky nalezeny v mitochondriích také. Tato pozorování naznačují, že i přesto, že cílí na stejnou organelu, jsou různé fotosenzitizéry lokalizovány v blízkosti jiných biologických cílů a podporují koncept místně specifického efektu vyvolaného pomocí ¹O₂ řízené oxidace (Nowis *et Golab*, 2008).

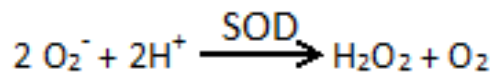
Jako důsledek foto – indukovaných modifikací ztrácí protein svou katalytickou, signalizační nebo jinou esenciální funkci. Jelikož je většinou oxidativní poškození proteinů neopravitelné, vede k buněčné smrti (Pattison *et al.*, 2012; Benov *et al.*, 2012; Al-Mutairi *et al.*, 2007).

3.1.5.1.3.1 Intracelulární proteiny zapojené v reakci buňky na reaktivní kyslíkové radikály

3.1.5.1.3.1.1 Superoxid dismutáza (SOD) (Nowis *et Golab*, 2008)

Produkce superoxidu v eukaryotních buňkách představuje potenciálně velkou hrozbu. Podle odhadů se denní produkce superoxidu pohybuje okolo 1.10⁹ radikálů za den, což pro 75 kg vážícího člověka představuje 2 kg

superoxidu za rok. Z tohoto důvodu si buňky vyvinuly efektivní mechanismus, který jim umožňuje se s tím vyrovnat. Superoxid dismutáza katalyzuje dismutaci superoxidových radikálů na peroxid vodíku a molekulární kyslík:



V přírodě nacházíme 3 rozdílné izoformy superoxid dismutázy: (1) mangan obsahující (Mn), která se nachází v mitochondriální matrix a je známá pod názvem SOD2, dále (2) měď – zinek obsahující (Cu, Zn), která je exprimována v cytozolu s názvem SOD 1, a (3) extracelulární izoforma enzymu (EC-SOD). V buňkách je nejvíce zastoupená izoforma SOD1 v relativně konstantní hladině, naproti tomu je exprese SOD2 indukována různými okolními stresovými podněty. EC-SOD je exprimována zejména v extracelulárních tekutinách jako je např. lymfa, synoviální tekutina a plazma.

3.1.5.1.3.1.2 Kataláza (CAT) (Nowis *et* Golab, 2008)

Kataláza se účastní reakce přeměny peroxidu vodíku na vodu a molekulární kyslík a společně s glutathion peroxidázou hraje klíčovou roli v odstraňování peroxidu vodíku:

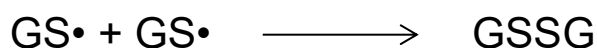
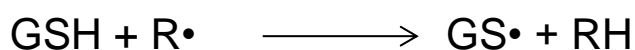


Kataláza je hlavním enzymem odstraňujícím peroxid vodíku při jeho vysoké intracelulární koncentraci. Její tzv. scavengerová aktivita je jednou z nejvyšších u dosud známých enzymů – každou minutou degraduje více než $6 \cdot 10^6$ H_2O_2 molekul. Savčí kataláza má také omezenou peroxidázovou aktivitu, avšak rychlost této reakce je relativně malá. Zdá se, že při nízkých koncentracích H_2O_2 převládá peroxidázová aktivita, zatímco při vyšších koncentracích H_2O_2 převládá katalytická aktivita. Kataláza se vyskytuje v různých organelách (např. v mitochondriích, endoplazmatickém retikulu),

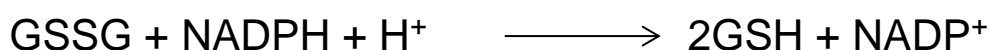
příčemž většina je exprimována v peroxizomech. Kataláza může také hrát cytoprotektivní roli v PDT – ovlivněných buňkách.

3.1.5.1.3.1.3 Glutathion (GSH) (Nowis *et* Golab, 2008)

Glutathion je tripeptid (γ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycin), který se v buňkách vyskytuje v milimolárních koncentracích (~1–10 mM). Obsahuje neobvyklé peptidové spojení mezi aminoskupinou cysteinu a karboxylovou skupinou glutamátového postranního řetězce. Glutathion se vyskytuje v cytozolu, mitochondriích a jádře. Obecně závisí antioxidační charakter thiolových skupin na iontu síry, který se může jednoduše vyrovnat se ztrátou jednoho elektronu. Redukovaný glutathion reaguje s radikálem ($R\cdot$) za tvorby thiolového radikálu ($GS\cdot$), který dále dimerizuje a vede k tvorbě neradikálového produktu – glutathion disulfidu:



Následně je GSSG redukován zpět na GSH v reakci katalyzované glutathion reduktázou v přítomnosti NADPH:



Dráha, která převládá při znovuobnovení GSH, je *de novo* syntéza. Poměr GSH ku glutathion disulfidu (GSSG) je kritický pro udržování buněčné redoxní rovnováhy. Za fyziologických podmínek má intracelulární prostředí redukční potenciál a GSH/GSSG poměr dosahuje hodnot 100 a více. Z tohoto důvodu představuje GSH/GSSG systém hlavní cytosolový redoxní pufr. Zvyšující se množství GSSG je obvykle přechodné, jelikož je GSSG glutathion reduktázou rychle redukován na GSH.

Glutathionový metabolismus je jedním z nejdůležitějších antioxidačních mechanismů uvnitř buňky. Jeho cytoprotektivní role je závislá na několika unikátních znacích této molekuly. Glutathion funguje jako kofaktor několika antioxidačních enzymů (např. glutathion peroxidázy, glutathion –S– transferázy

apod.). Navíc glutathion se sám o sobě zapojuje do přímého odstranění hydroxylového radikálu a singletního kyslíku a prostřednictvím reakce s glutathion peroxidázou pomáhá v eliminaci vodíku a lipidových peroxidů. Glutathion je také schopen regenerace vitamínu C a E zpět na jejich aktivované formy.

3.1.5.1.3.1.4 Thioredoxin (Nowis *et Golab*, 2008)

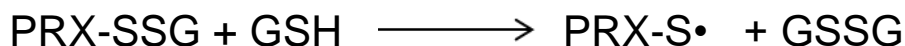
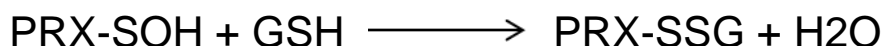
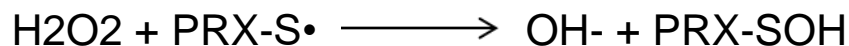
Thioredoxin (TX) je malý (10–12 kDa) multifunkční disulfid obsahující redoxní protein, který obsahuje 2 redoxně aktivní cysteiny na své konzervativní aktivní straně. Thioredoxin, obdobně jako glutathion, podstupuje reverzní oxidačně/ redukční cykly obou cysteinových skupin. Redukovaný thioredoxin [TX-(SH)₂] redukuje oxidované proteiny a přechází na oxidovanou formu [TX-(S-S)]. Oxidovaný thioredoxin se vrací zpátky na redukovanou formu v NADPH – dependentní reakci katalyzované thioredoxin reduktázou (TRX). Hladiny thioredoxinu jsou stokrát až tisíckrát nižší než v případě glutathionu. Thioredoxin slouží jako antioxidant zejména tak, že je donorem elektronů pro peroxiredoxin (viz níže). Redukce thioredoxin peroxidázy obnovuje monomerní a aktivní formu tohoto enzymu. Navíc thioredoxin indukuje expresi thioredoxin peroxidázy.

Thioredoxin reduktázy (TRXs) jsou selenoproteiny, které obnovují redukované formy thioredoxinu s využitím NADPH produkovaného zejména v pentóza fosfátovém cyklu. TRXs podstupují reverzibilní oxidačně/ redukční cykly. Thioredoxin reduktázy využívají thioredoxin jako kofaktor pro redukci dalších proteinů jako inzulin nebo další malé molekuly jako například oxidovaný askorbát nebo peroxid vodíku.

3.1.5.1.3.1.5 Peroxiredoxiny (PRX) (Nowis *et Golab*, 2008)

Peroxiredoxiny patří do skupiny proteinů, které katalyzují redukci peroxidu vodíku pomocí thiolových sloučenin. Někdy bývají zmiňovány také

pod názvem thioredoxin peroxidázy. V jejich enzymaticky aktivním místě mívají obvykle cystein, popř. selen. Posloupnost PRX katalyzovaných reakcí je následující:



V savčích buňkách je exprimováno 6 různých izoform peroxiredoxinů, které se dále rozdělují do 3 podskupiny (2-Cys, atypické 2-Cys a 1-Cys) na základě počtu a pozice cysteinových reziduí, které se účastní katalýzy. Do skupiny 2-Cys patří peroxiredoxiny I–IV. Tyto proteiny obsahují N- i C- koncová konzervativní cysteinová rezidua a pro katalytickou funkci vyžadují zapojení obou. Atypické 2-Cys proteiny (peroxiredoxiny V) obsahují pouze N-koncový cystein, avšak požadují zapojení dalšího nekonzervativního cysteinového rezidua. 1-Cys proteiny (peroxiredoxiny VI) obsahují pouze N-koncový cystein, který stačí pro jejich katalytickou funkci.

PRX izoformy se nachází v buňce na různých místech. PRX I a II se nachází v cytozolu, PRX III v mitochondriích, PRX IV v extracelulárním prostoru, PRX V v mitochondriích a peroxizomech a PRX VI v cytozolu.

Relativní množství peroxiredoxinových enzymů v savčích buňkách zřejmě chrání buněčné složky pomocí redukce nízkých hladin hydroperoxidů a peroxinitritů, které jsou produkovány v průběhu normálního buněčného metabolismu. Buňky samy produkují H_2O_2 pro účely buněčné signalizace. Tato tzv. messengerová funkce vyžaduje, aby jeho koncentrace rapidně narostla nad základní hladinu a vyžaduje také určité obranné mechanismy před destrukcí cytozolárními peroxiredoxiny. V buňce jsou pravděpodobně 2 rozdílné mechanismy, které mohou být zodpovědné za dočasnou inaktivaci peroxiredoxinů I a II:

- 1) Fosforylace pomocí Cdk2, která je aktivována během přechodu z G_2 – M fáze buněčného cyklu.

- 2) Hyperoxidace aktivního místa cysteinu na cystein sulfinovou kyselinu reverzní reakcí katalyzovanou sulfiredoxinem. Hyperoxidace byla pozorována také u buněk, které byly vystaveny velkému oxidačnímu stresu.

3.1.5.1.3.1.5.1 Peroxynitritová reduktázová aktivita peroxiredoxinů

Radikál oxidu dusného ($\text{NO}\cdot$) a superoxidový radikál ($\text{O}_2^{\cdot-}$), které jsou v buňkách často produkovány souběžně, rychle reagují za tvorby peroxynitritu (ONOO^-). Peroxynitrit je pro buňku extrémně toxický, jelikož se snadno přeměňuje na dva radikály $\text{HO}\cdot$ a $\text{NO}_2\cdot$ prostřednictvím hemolytického rozkladu nebo na $\text{CO}_3^{\cdot-}$ při rychlé reakci s CO_2 . Bohužel obranný mechanismus proti těmto dusíkovým oxidantům není prozatím znám. Obdobně jako v případě peroxidu vodíku, peroxynitrit oxiduje thioly ve dvouelektronovém procesu, což vede ke tvorbě kyseliny dusité a kyseliny sulfitové, které v přítomnosti dostupných thiolových skupin vytváří disulfid (Radi *et al.*, 1991; Bryk *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2002; Dubuisson *et al.*, 2004; Peshenko *et Shichi*, 2001; Comtois *et al.*, 2003).

3.1.5.1.3.1.6 Tyrozin kinázy

Systém přenosu signálu umožňuje buňkám obdržet externí podnět a odpovědět na něj odpovídajícím způsobem. Mitogenem aktivované protein kinázové (MAPK) signální dráhy hrají důležitou roli v přenosu signálu u eukaryotních buněk, kde regulují mnoho buněčných procesů a molekul včetně extracelulárních signálem regulovaných kináz jako např. ERK-1/2. Byla studována role těchto kináz v buněčném přežití po PDT, přičemž bylo zjištěno, že exprese ERK-1/2 byla u buněk po PDT signifikantně nižší se zvyšující se mírou buněčné smrti, díky čemuž se předpokládá, že jsou tyto dva procesy propojeny (Santonocito *et al.*, 2005).

Receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR) je tyrozin kináza zapojená v iniciaci a rozvoji různých druhů rakoviny. Bylo zjištěno, že PDT

může indukovat kompletní ztrátu EGFR z buněčné membrány a tím indukovat anti-proliferativní buněčnou odpověď. Bylo také zjištěno, že je zde nárůst down-regulace exprese a fosforylace EGFR, což vede k apoptóze a ústupu nádorových metastáz (Santonocito *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2008).

3.1.5.1.3.1.7 Transkripční faktory

Transkripční faktory jsou proteiny, které se váží do tzv. enhancerových oblastí genů a interagují tak, že transkripce nastává pouze z malé skupiny promotorů. Transkripční faktory působí jako intracelulární poslové, kteří propojují signály generované receptory s aktivací asociované změny genové exprese, často formující velké transkripční komplexy s řadou dalších transkripčních faktorů a pomocných proteinů, které jim umožňují modulaci transkripce genu. PDT studie ukázaly, že promotorové oblasti mnoha genů, které jsou zapojeny do regulace buněčné proliferace, jsou aktivovány řadou fyzikálních a chemických stresových faktorů a jsou tedy spojeny jak s indukcí, tak prevencí apoptózy. Z tohoto důvodu může být PDT využita pro léčbu nádorů, neboť má schopnost buď deaktivovat nebo spouštět různé signální dráhy, zpomalovat pochody vedoucí k přežití buňky a vyvolávat tak apoptotický stav (Castano *et al.*, 2005; Pazos *et Nader*, 2007; Davids *et al.*, 2008).

3.1.5.1.3.1.8 Cytokiny

Cytokiny jsou proteiny, které zprostředkovávají a regulují imunitu, zánětlivé reakce a hematopoézu. Tyto proteiny jsou syntetizovány *de novo* v reakci na podnět. Působí prostřednictvím vazby na specifické membránové receptory, které poté buňce prostřednictvím sekundárních přenašečů (často tyrozin kináz) určují, že má být změněno chování, resp. genová exprese. Odpovědi na cytokiny zahrnují zvýšení nebo snížení exprese membránových proteinů (včetně cytokinových receptorů), proliferace a sekrece efektorových molekul. Ve většině případů může PDT indukovat over- nebo under-expresi

cytokinů, která je často spojena s regresí nádoru a jeho možným vymýcením (Castano *et al.*, 2005; Buytaert *et al.*, 2005; Santonocito *et al.*, 2005; Roland *et al.*, 2007).

3.1.5.1.4 Změny v buněčné adhezi

Savčí buňky adherují k extracelulární matrix a ostatním buňkám prostřednictvím specifických membránových receptorů. Tyto receptory patří do několika skupin: integriny, imunoglobulin G skupiny, selektiny a kadheriny. Mezi zástupce kadherinové skupiny lze zařadit například intracelulární buněčná adhezní molekulu 1 (ICAM-1) a vaskulární adhezní molekulu 1 (VCAM-1). Tyto specifické membránové proteiny fungují jako signální transdukční receptory spouštějící řadu intracelulárních signálních drah, které například regulují chování buňky, vývoj, zánětlivé reakce ve tkáni atd. Změny adheze rakovinových buněk patří mezi nejvýznamnější důsledky PDT. Tyto změny jsou z velké části způsobeny poškozením adhezních molekul lokalizovaných v buněčné membráně a bylo zjištěno, že pokles adheze buněk přímo koreluje s poklesem metastatického potenciálu nádorových buněk (Roland *et al.*, 2007).

3.1.5.1.5 Stresové faktory

Jako odpověď na mnoho stresových faktorů včetně tepla, oxidačních podmínek a toxické látky produkuje buňka řadu tzv. heat shock proteinů (Hsp) a glukózou regulovaných proteinů (Grp). Většina Hsp jsou molekulární chaperony, které váží, stabilizují a chrání proteiny ve fázích mezi skládáním, translokací přes membrány a degradací. Transkripce genů patřících do Hsp skupiny je při stresových podmínkách regulována mechanismem zahrnujícím vazbu heat shockových faktorů (HSF) ke specifickým heat shockovým elementům (HSE). Fotodynamická terapie může být světlem aktivovaný cílený induktor specifické genové exprese (například sebevražedné geny), pokud by příslušný gen byl spojen s Hsp nebo Grp promotory, a tudíž by mohl způsobovat buněčnou smrt nebo naopak rezistenci na PDT řízenou laserovou terapií (Robertson *et al.*, 2009).

3.1.5.1.6 Hypoxie a angiogeneze

Hypoxie nádorů je spojena s maligním vývojem, rezistencí na chemoterapii, PDT a radioterapii, společně se zvyšujícím se metastazováním a špatnou prognózou. Mnoho z těchto účinků hypoxických nádorových buněk je řízeno kyslíkem regulovanou transkripční aktivací specifického setu genů, jejichž vztah k rezistenci na terapii je zatím málo pochopený. Hypoxií indukovaný faktor HIF-1 je hlavní transkripční aktivátor kyslíkem regulovaných genů, které jsou zapojeny v anaerobním energetickém mechanismu, angiogenezi, buněčném přežití, buněčné invazi a rezistenci na léčiva. Vzhledem k tomu, že je PDT schopna rapidní spotřeby tkáňového kyslíku a také uzavírání přívodu krve přenášející kyslík do nádorové oblasti, může samotná léčba vyvolat silnou hypoxii. Z tohoto důvodu je vysoká úroveň HIF-1 exprese asociována s nízkou celkovou buněčnou odpovědí na PDT (Robertson *et al.*, 2009).

3.1.5.1.7 Poškození DNA

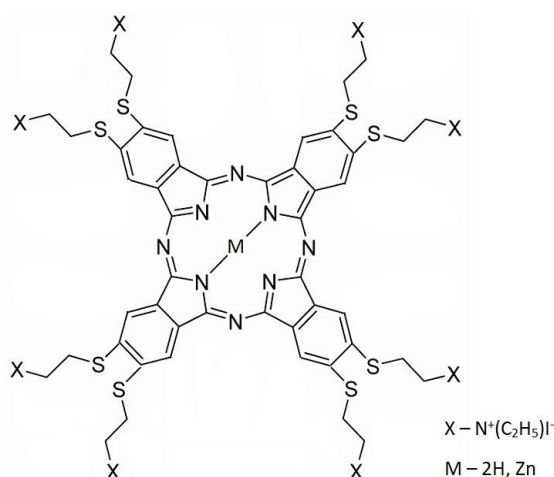
Při fotodynamické terapii dochází také k poškození molekul DNA, nicméně toto poškození nemá většinou letální charakter. Po PDT většinou dochází k oxidativnímu poškození DNA bazí, zlomům řetězců a cross-linkům. Mutagenní potenciál se mezi jednotlivými druhy buněk liší, což může odrážet rozdíly v reparačních mechanismech. Můžeme tedy říci, že DNA poškozující efekt PDT je závislý nejen na typu PDT, ale také na buněčných mechanismech opravy DNA a přežití. Při fotodynamické terapii je poškození DNA v porovnání s jinými metodami léčby nádorů menší. Ačkoliv je syntéza DNA, RNA a proteinů po PDT ovlivněna, dochází k postupné obnově, což naznačuje, že poškození DNA nemusí být pro buňku nutně smrtelné (Robertson *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2007; Kolarova *et al.*, 2000; Ketabchi *et al.*, 1998; Buggiani *et al.*, 2008).

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 MATERIÁL A METODY

4.1.1 Materiál

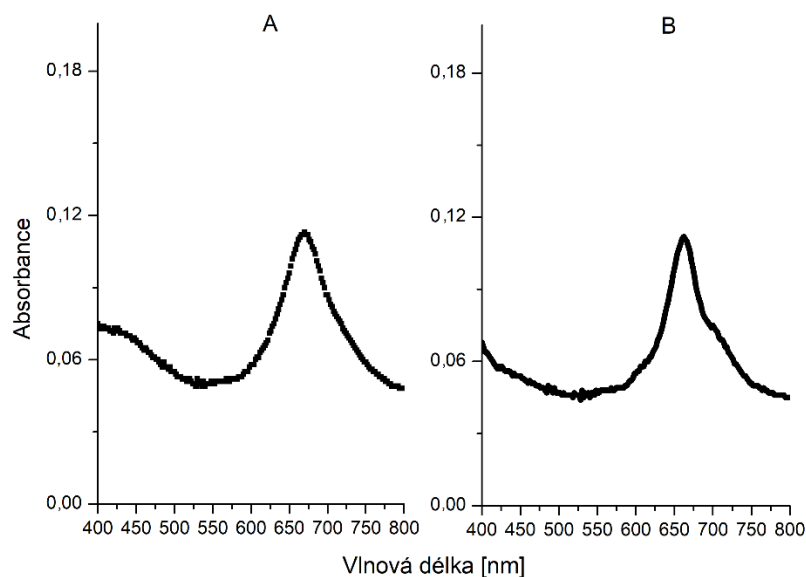
V této práci byl sledován účinek nekovového a zinečnatého derivátu ftalocyaninu (obr. č. 14 – chemická struktura použitých fotosenzitizérů, graf č. 1 – absorpční spektra použitých fotosenzitizérů), jenž byly nově syntetizovány A. Cidlinou (2011). Tato fotosenzitivní látka neagreguje ve vodě díky přítomnosti osmi substituentů v non-periferních pozicích. Před použitím byly fotosenzitizéry rozpuštěny v 1× fosfátovém pufru (PBS).



Obr. č. 14: Chemická struktura použitých fotosenzitivních látek (ZnPc, 2HPc).

ZnPc - jodid 2,3,9,10,16,17,23,24 oktakis [2(triethylamonio)ethylsulfanyl]ftalocyaninato zinečnatého komplexu

2HPc – jodid 2,3,9,10,16,17,23,24 oktakis [2-(triethylamonio)ethylsulfanyl]ftalocyanin



Graf č. 1: Absorpční spektra použitých fotosenzitivních látek v koncentraci 0,05 μM : A – nekovový derivát ftalocyaninu (2HPc); B – zinečnatý derivát ftalocyaninu (ZnPc).

4.1.2 Buněčné linie a kultivační podmínky

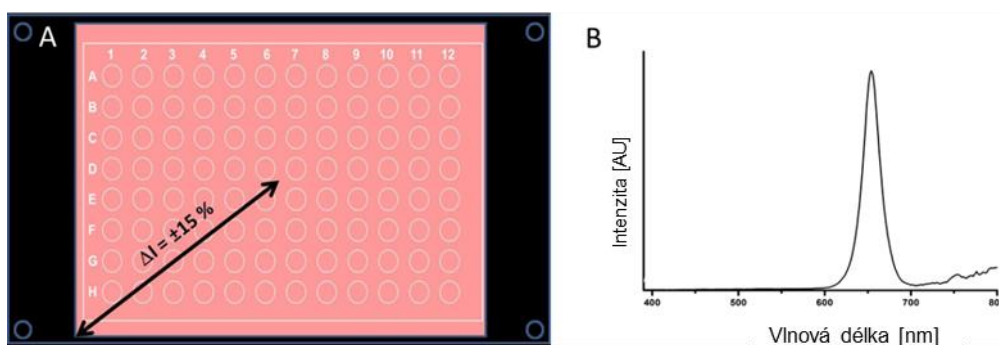
V této práci byl pozorován vliv zinečnatého a nekovového derivátu ftalocyaninu na nádorovou linii karcinomu děložního čípku HeLa a dále na nádorovou buněčnou linii MCF7 (adenokarcinom prsu) a dvou nenádorových liniích BJ (lidské fibroblasty) a HaCat (lidské kožní keratinocyty). Tyto buněčné linie pocházejí z Evropské sbírky buněčných kultur ECACC a Americké sbírky buněčných kultur ATCC (buněčná linie BJ). Buňky byly v počtu $1 \cdot 10^4$ inkubovány s fotosenzitivní látkou po dobu 24 hodin ve tmě v kultivačním médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) při 37 °C a 5% CO_2 .

4.1.3 Zdroje záření a ozařovací protokol

Pro aplikaci světelného záření byl použit zdroj záření složený z LED diod, který byl sestaven za účelem ozáření experimentálních mikrodestiček. Tento

zdroj záření je patentován pod číslem CZ302829B6 (obr. č. 15 – specifikace použitého ozařovacího zařízení).

Buňky byly ozářeny světlem o vlnové délce 660 nm po dobu 5 min a 33 s (odpovídající plošné hustotě světelné energie 5 Jcm^{-2}) a po dobu 66,7 s (odpovídající 1 Jcm^{-2}). Hustota výkonu zářiče byla 15 mWcm^{-2} .

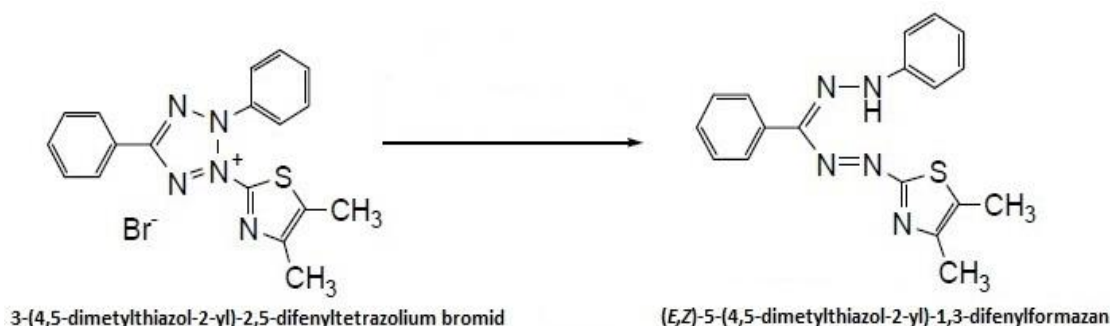


Obr. č. 15: Specifikace použitého ozařovacího zařízení: A) homogenita světelného pole; B) emisní spektrum zářiče (FWHM – 20 nm).

4.1.4 Metody

4.1.4.1 MTT test životnosti

MTT test se řadí mezi kolorimetrické metody pro hodnocení metabolické aktivity. NAD(P)H-dependentní oxidoreduktáza může za určitých podmínek odrážet množství přítomných živých buněk. Tyto enzymy jsou schopné redukovat tetrazolové barvivo MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylnitrazolium bromid) na fialový nerozpustný formazan (obr. č. 16 – znázornění reakce změny MTT na formazan). Redukce MTT, které má žlutou barvu, na fialový formazan probíhá pouze v živých buňkách. Tato redukce probíhá pomocí rozpouštědla (např. dimethylsuloxid – DMSO). Po přidání rozpouštědla dochází ke změně barevnosti roztoku v závislosti na množství tvořeného nerozpustného formazanu. Výsledná absorbance je následně měřena pomocí spektroskopie při vlnových délkách 570 a 690 nm.



Obr. č. 16: MTT reakce (<http://www.dojindo.com/store/p/302-MTT.html>).

Buňky byly inkubovány s fotosenzitivní látkou v příslušné koncentraci po dobu 24 hodin. Následně bylo kultivační médium DMEM nahrazeno fosfátovým pufrům 1× PBS a buňky byly ozářeny. Bezprostředně po ozáření bylo PBS nahrazeno kultivačním médiem DMEM s následnou inkubací po dobu 24 hodin. Po 24 hodinách byly jamky dvakrát propláchnuty pomocí 1× PBS a inkubovány s 50 μl roztoku MTT rozpuštěného ve fosfátovém pufru 1× PBS v koncentraci $0,5 \text{ mgml}^{-1}$ po dobu 4 hodin. Po inkubaci byl roztok MTT nahrazen 100 μl dimetylsulfoxidu (DMSO) pro rozpuštění krystalů MTT. Výsledná absorbance byla měřena pomocí Tecan Infinite 200Pro readeru.

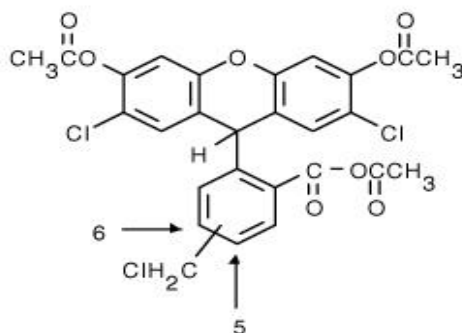
4.1.4.2 Měření produkce reaktivních kyslíkových radikálů

Produkce kyslíkových radikálů vznikajících reakcí I. i II. typu byla měřena pomocí dvou fluorescenčních sond a to CM-H₂DCFDA a SOSG sond.

4.1.4.2.1 Měření reaktivních kyslíkových radikálů, vznikajících fotodynamickou reakcí I. typu

5-(and-6)-chlorometyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát (CM-H₂DCFDA, Life Technologies, obr. č. 17 – chemická struktura) je chlormetylový derivát H₂DCFDA, který slouží jako indikátor množství reaktivních kyslíkových radikálů a to zejména peroxidu vodíku a jeho downstreamových produktů. Tato sonda pasivně difunduje do buněk, kde dochází k deacetylaci, kdy jsou její acetátové skupiny štěpeny intracelulárními esterázami za vzniku

nefluorescentního produktu CM-H₂DCF, který reaguje s kyslíkovými radikály uvnitř buňky za vzniku vysoce fluorescentního barviva CM-DCF.



Obr. č. 17: Chemická struktura 5-(6)-chlorometyl2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetátu (www.thermofisher.com).

Buňky byly inkubovány s fotosenzitivní látkou po dobu 24 hodin. Následně bylo médium nahrazeno 1× PBS puforem s fluorescenční sondou CM-H₂DCFDA o výsledné koncentraci sondy 10 μM a buňky byly inkubovány po dobu 20 minut ve tmě. Po této době byly buňky ozářeny po dobu 5 min a 33 s (5 Jcm⁻²). Ihned po ozáření byl měřen nárůst fluorescence pomocí fluorescenčního readeru Tecan Infinite 200pro (Tecan Group, Švýcarsko). Excitační vlnová délka CM-H₂DCFDA sondy je 495 nm a emisní vlnová délka 520 nm.

4.1.4.2.2 Měření reaktivních kyslíkových radikálů, vznikajících fotodynamickou reakcí II. Typu

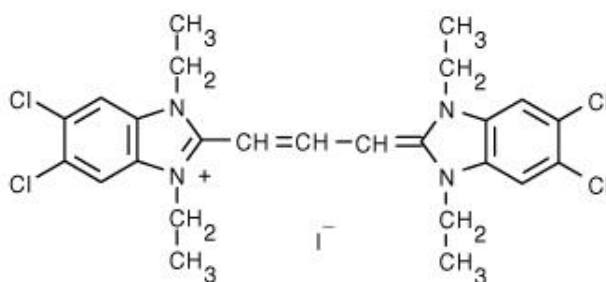
Singlet oxygen sensor green reagent (SOSG, Life Technologies) je fluorescenční sonda, která je vysoce selektivní pro singletní kyslík, avšak nevykazuje prakticky žádnou citlivost pro hydroxylové a superoxidové radikály. V přítomnosti singletního kyslíku emituje silnou fluorescenci v zelené oblasti světla.

Buňky byly inkubovány s fotosenzitivní látkou po dobu 24 hodin. Následně bylo médium nahrazeno roztokem 1× PBS pufru s fluorescenční sondou SOSG o výsledné koncentraci sondy 2 μM a buňky byly inkubovány po

dobu 20 minut ve tmě a následně ozářeny. Ihned po ozáření byl měřen nárůst fluorescence pomocí fluorescenčního readeru Tecan Infinite 2000pro (Tecan Group, Švýcarsko). Excitační vlnová délka SOSG je 500 nm a emisní vlnová délka 525 nm.

4.1.4.3 Měření mitochondriálního membránového potenciálu

5,5',6,6'tetrachloro-1,1',3,3' tetraethylbenzimidazolylkarbocyanine chlorid (JC-1, Biotium, obr. č. 18 – chemická struktura) je karbocyaninové barvivo, které vykazuje akumulaci v mitochondriích závislou na potenciálu, která je indikována pomocí emisního posunu ze zelené fluorescence (~525 nm) do červené oblasti (~590). JC-1 se vyskytuje ve formě monomeru, který vykazuje zelenou fluorescenci. Ve vyšších koncentracích této látky nebo při vyšším membránovém potenciálu dochází k tvorbě takzvaných J-agregátů, které vykazují červenou fluorescenci. Poměr zelené k červené fluorescenci je závislý pouze na membránovém potenciálu, a ne na dalších faktorech jako velikost mitochondrie, tvar atd.



Obr. č. 18: Chemická struktura 5,5',6,6'tetrachloro-1,1',3,3' tetraethylbenzimidazolylkarbocyanin chlorid (JC-1, Biotium).

Buňky byly s fotosenzitivní látkou inkubovány po dobu 24 hodin. Následně bylo médium nahrazeno fosfátovým pufrém (1× PBS) a buňky byly ozářeny. Buňky byly po ozáření inkubovány v kultivačním médiu po dobu 24 hodin. Poté bylo médium nahrazeno roztokem sondy JC-1 rozpuštěné v 1× PBS pufru na výslednou koncentraci 2 µg/l a buňky byly inkubovány 20 minut ve tmě. Po inkubaci byla měřena fluorescence při 530, resp. 590 nm

při excitační vlnové délce 490 nm. Fluorescence byla měřena pomocí fluorescenčního readeru Tecan Infinite 200pro (Tecan Group, Švýcarsko).

4.1.4.4 Kometová analýza (Comet assay)

Kometová analýza se využívá pro hodnocení míry fragmentace DNA. Tato metoda je založena na schopnosti negativně nabitých fragmentů pohybovat se v agarózovém gelu.

Na HeLa buněčnou linii byla aplikována 5 Jcm⁻² ZnPC PDT při EC₅₀, poté byly buňky ponechány v inkubačním médiu DMEM k inkubaci po dobu 24 hodin při 37 °C a 5% CO₂. Byla připravena sklíčka pro následnou elektroforetickou separaci, kdy bylo každé potaženo 1% standardní (HMP – high melting point) agarózou rozpuštěnou v destilované vodě a po uschnutí vloženo do sušárny na 60°C po dobu 30 minut. Na takto připravené sklíčko bylo přidáno 85 µl 1% HMP agarózy v 1× PBS a ihned překryto krycím sklíčkem. Skla byla dána ke ztuhnutí do lednice na dobu 30 minut. Po inkubaci byly buňky s médiem v mikrotitrační desce vystaveny účinku TrypLE pro jejich uvolnění ze dna desky, přesunuty do mikrozkuhavky a centrifugovány v médiu po dobu 2 minut na 150 g. Pelet buněk o objemu 25 µl byl smíchan s 85 µl 1% nízkotuhnoucí agarózy (LMP – low melting point) v 1× PBS s teplotou 37 °C. Směs LMP agarózy a buněk byla pipetována na políčka s HMP agarózou a překryta krycím sklíčkem. Poté byla skla vložena na 15 minut do lednice. Po 15 minutách byla odstraněna krycí sklíčka, skla byla vložena do kyvety se 100 ml lyzačního roztoku smíchaného s 1 ml Tritonu X, vložena na 60 minut do lednice a ponechána k lyzaci. Po lyzaci byla skla vložena do elektroforetického pufru na dobu 40 minut. Po 40 minutách byla provedena elektroforetická separace, která probíhala po dobu 20 minut při napětí 0,8 Vcm⁻¹ a proudu 350 mA. Po elektroforetické separaci byla skla vložena do kyvet a promývána vychlazeným neutralizačním roztokem po dobu 3 × 5 minut. Po promytí byla skla ponechána k usušení a následně barvena 20 µl roztoku fluorescenčního barviva SYBR® Green (1:10 000) po dobu 15 minut. Následně byla skla vyhodnocována pomocí fluorescenčního mikroskopu a programu CometScore 1.5 (TriTec, USA).

4.1.4.5 Mikroskopie atomárních sil (AFM)

Pro experimenty s využitím mikroskopu atomárních sil byly použity speciální Petriho misky o průměru 50 mm se skleněným dnem WillCo. Do nich bylo vyseto $1 \cdot 10^5$ buněk s 2 ml kultivačního média DMEM. Snímání buněk probíhalo při pokojové teplotě s čerstvě vyměněným kultivačním médiem pomocí mikroskopu atomárních sil Bioscope Catalyst od firmy Bruker. Obraz topografie byl získán pomocí PeakForce QNM (Quantitative Nanomechanical Mapping, Bruker Daltonics, Německo) skenovacího módu při rychlosti snímání 0,1 – 0,2 Hz a s PeakForce amplitudou 1000 nm. Pro zobrazování byl použit hrot z nitridu křemíku s rezonanční frekvencí 16–28 kHz a nominální hodnotou konstanty tuhosti $0,12 \text{ Nm}^{-1}$. Obrazy ze systému AFM byly zpracovány v programu Gwyddion 2.40 (Český metrologický institut, Česká republika).

4.1.4.6 Sledování změn aktinové struktury pomocí fluorescenční mikroskopie

Buňky pro fluorescenční barvení byly adherované na krycích sklech. Sterilizované krycí sklo bylo vloženo do Petriho misek o průměru 35 mm a na ně vyseto $5 \cdot 10^4$ buněk. Adheze buněk proběhla přes noc. Po adhezi byl k buňkám přidán fotosenzitizér v koncentraci EC50 (30 nM) s následnou inkubací 24 hodin ve tmě při 37 °C a 5% CO₂. Po 24 hodinách byly buňky ozářeny a ponechány k inkubaci 24 hodin ve tmě při 37 °C a 5% CO₂. Následně byly buňky fixovány 4 % p-formaldehydem po dobu 1 h při pokojové teplotě. Buněčná stěna byla permeabilizována 0,1 % Tritonem X-100 po dobu 10 min při pokojové teplotě. Fluorescenčně byl značen cytoskelet – aktin. Pro vizualizaci aktinu byla použita fluorescenční sonda Alexa Fluor 532 Phalloidin po dobu 1 h v koncentraci 1:200 při 37°C. Po každém kroku barvení byly buňky dvakrát propláchnuty fosfátovým puřem (1× PBS). Fluorescenční značení bylo vyhodnocováno pomocí konfokální mikroskopu Axio Observe Z1 (Zeiss, Německo) doplněného o rotující disk Yokogawa CSU X1 (Yokogawa, Japonsko). Byl použit imerzní objektiv 63× s 1,4 NA, excitace fluoroforů proběhla systémem laserů, jenž nabízí excitační vlnové délky 405, 488,

532/561 a 639 nm. Zpracování fluorescenčních obrazů proběhlo v programu ImageJ (Wisconsinzká Univerzita, USA).

4.1.4.7 Proteomická část

Pracovní postup byl zvolen dle standardních metod využívaných na pracovišti Oddělení biochemie proteinů a proteomiky, Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci (Petřík, 2013).

4.1.4.7.1 Fotodynamická terapie

Buňky HeLa byly v počtu $1 \cdot 10^7$ inkubovány s fotosenzitivní látkou o koncentraci EC₅₀ (30 nM) po dobu 24 hodin. Poté byly buňky ozářeny po dobu 5 min a 33 s (odpovídá 5 Jcm⁻²). Následně byly buňky sbírány v příslušném časovém odstupu – ihned po ozáření, po 4 hodinách a po 24 hodinách. Buňky byly centrifugovány po dobu 2 minut při 1500 rpm. Supernatant byl odebrán a pelet buněk zamražen při -80 °C.

4.1.4.7.2 Lýze buněk

K peletu buněk z jedné kultivační desky bylo přidáno 100 µl lyzačního pufru. Pomocí Hamiltonovy pipety byla suspenze několikrát (alespoň desetkrát) rozsuspendována. Následně bylo přidáno 200 jednotek benzoázy (4 µl). Poté byla suspenze promíchána a inkubována 15 minut na ledu. Po 15 minutách byla suspenze centrifugována po dobu 15 minut při 4 °C a 15000 g. Supernatant byl přepipetován do čisté mikrokumavky a následně opět centrifugován po dobu 30 minut při 4 °C a 30000 g.

4.1.4.7.3 Stanovení koncentrace proteinů pomocí 2-D QUANT-iT Kitu

2-D Quant-iT Kit (Invitrogen™, USA) je kit sloužící pro přesné určení koncentrace proteinů ve vzorku. Tato metoda je založena na specifické vazbě iontů mědi na proteiny. Precipitované proteiny jsou resuspendovány v roztoku obsahujícím měď a následně je kolorimetricky měřeno množství mědi, která zůstala nenavázaná. Intenzita barvy je nepřímo úměrná množství proteinů ve vzorku.

Složení kitu:

Precipitant: způsobuje nerozpustnost proteinů.

Ko-precipitant: tento roztok obsahuje činidla, která koprecipitují s proteiny a zvyšují účinnost jejich extrakce z roztoku.

Roztok mědi: precipitované proteiny jsou resuspendovány s tímto roztokem.

Barevné činidlo A: toto činidlo je smícháno s barevným činidlem B pro vytvoření směsi používané pro měření nenavázaných iontů mědi.

Barevné činidlo B: toto činidlo je smícháno s barevným činidlem A pro vytvoření směsi používané pro měření nenavázaných iontů mědi.

Roztok bovinního sérového albuminu (BSA): roztok používaný pro přípravu standardní křivky.

Nejprve byla vytvořena koncentrační řada bovinního sérového albuminu (BSA) s koncentrací zásobního roztoku 2 mgml^{-1} , která sloužila jako standard pro určení koncentrace proteinů ve vzorku. Koncentrační řada je uvedena v tabulce č. 1.

Číslo zkušavky	1	2	3	4	5	6
Množství BSA o koncentraci 2 mg/ml	0 [μl]	5 [μl]	10 [μl]	15 [μl]	20 [μl]	25 [μl]
Množství proteinů [μg]	0	10	20	30	40	50

Tabulka č. 1: Koncentrační řada bovinního sérového albuminu vytvořená pro stanovení koncentrace proteinů v analyzovaných vzorcích.

Následně byly připraveny mikrozkušavky obsahující 7,5 μl vzorku. Poté bylo do každé mikrozkušavky přidáno 500 μl precipitantu (včetně mikrozkušavek obsahujících danou koncentraci BSA). Mikrozkušavky byly krátce zvertexovány a inkubovány 2-3 minuty při pokojové teplotě. Poté bylo přidáno 500 μl koprecipitantu do všech zkušavek včetně koncentrační řady, opět krátce zvertexováno a inkubováno 2-3 minuty při pokojové teplotě. Následně byla směs centrifugována při 10000 g po dobu 5 minut pro vytvoření sedimentu proteinů. Po centrifugaci byl pozorován pelet proteinů. Supernatant byl dekantován. Ke každému peletu bylo přidáno 100 μl roztoku mědi a 400 μl destilované vody. Do každé mikrozkušavky byl přidán 1 ml směsi barevných činidel A a B a vzorky byly promíchány. Poté byly vzorky inkubovány při pokojové teplotě po dobu 15 minut. Po inkubaci byla měřena absorbance jednotlivých vzorků při vlnové délce 480 nm a byla vytvořena standardní křivka BSA, na základě které byla následně vypočítána koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích.

4.1.4.7.4 Precipitace proteinů

K lyzátu buněk o příslušném objemu (stanoven tak, aby bylo ve všech vzorcích stejné množství proteinů) byl přidán vychlazený aceton ve čtyřnásobném objemovém nadbytku, směs byla důkladně promíchána a

inkubována při -20 °C přes noc. Poté byly vzorky promývány v čistém acetonu, kdy byl precipitát nejprve centrifugován při 4 °C, 20 000 g po dobu 15 minut. Následně došlo k odstranění supernatantu, promytí peletu 0,5 ml čistého acetonu a centrifugaci vzorku při 4 °C, 20 000 g po dobu 10 minut (dvakrát zopakováno). Od precipitátu bylo opatrně odpipetováno asi 80 % objemu acetonu a zbytek byl odpařen na vakuové odparce.

4.1.4.7.5 Štěpení proteinů

K proteinovému peletu byl přidán močovinový pufr o objemu 20 µl na každých 100 µg proteinů. Proteiny byly rozpouštěny za neustálého míchání (1200 rpm a 25 °C) 2 hodiny. K proteinům bylo přidáno redukční činidlo TCEP ve výsledné koncentraci 5 mM a vzorky byly inkubovány 45 min ve tmě při pokojové teplotě. Po inkubaci bylo ke vzorkům přidáno alkylační činidlo IAM ve výsledné koncentraci 55 mM a následovala další inkubace ve tmě při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Vzorky byly poté zředěny 170 µl deionizované vody a jejich pH bylo změřeno pomocí kalibrovaných pH papírků a v případě potřeby upraveno na hodnoty 7,5 – 8,5 přípravkem 1M TEAB. Ke vzorkům byl přidán trypsin v poměru 1:20 (trypsin: proteiny) a vzorky byly inkubovány 16 hodin při 37 °C.

4.1.4.7.6 Purifikace na C18 reverzní fázi

Ke vzorkům byla přidána 30% kyselina mravenčí (TFA) pro snížení pH vzorku na hodnotu menší než 5. Byly připraveny Macro Spin kolony, které byly upevněny v mikrozkuvkách o objemu 2 ml. Kolony byly promyty 60 µl izopropanolu a centrifugovány 5 minut a 4000 rpm. Poté byly promyty 5% kyselinou mravenčí a centrifugovány 5 minut a 2500 rpm. 2ml mikrozkuvky byly nahrazeny novými o objemu 1,5 ml. Okyselené vzorky byly nanášeny na kolony a pomalu centrifugovány po dobu 10 min při 1500 rpm. Poté byly kolony 2x promyty 5% kyselinou mravenčí (2500 rpm, 5 minut). 1,5 ml mikrozkuvky byly nahrazeny novými pro zachycení eluátů. Peptidy byly

eluovány pomocí 50% MeOH + 2% kyseliny mravenčí (1500 rpm, 10 min). Eluáty byly vysušeny na vakuové odparce Speed Vac a uchovány v -20 °C.

4.1.4.7.7 Značení peptidů pomocí dimetylace

Vzorek byl rozpuštěn ve 100 μ l 100mM TEAB. Následně bylo zkontrolováno a popřípadě upraveno pH na hodnotu v rozmezí 5–8,5. Ke vzorku byla přidána buď lehká (CH_2O , Sigma Aldrich) nebo těžká (CD_2O , Izotopové laboratoře Cambridge, UK) forma značky, vzorek byl promíchán, stočen, byl přidán 0,6 M NaBH_3CN a vzorky byly inkubovány na třepačce (700 rpm) při pokojové teplotě po dobu 40 minut. Toto bylo zopakováno dvakrát. Poté byly vzorky přesunuty do ledu a následně do digestoře. Byl přidán 1% NH_4OH pro zastavení značení. Vzorky byly lehce promíchány a stočeny. Poté byla ke vzorkům přidána 5% kyselina mravenčí. Vzorky byly promíchány a smíchány po dvojicích, které měly být vůči sobě porovnávány. Směs byla odpařena na vakuové odparce.

4.1.4.7.8 LC-MS/MS analýza

Vzorky byly změřeny pomocí systému kapilární chromatografie a tandemové hmotnostní spektrometrie (LC-MS/MS) s ESI ionizací (UHR-QTOF maXis, Bruker Daltonics, Německo) na analytické koloně plněné RP fází (reverzní fáze C18). Sběr dat byl proveden metodou DDA (data dependent analysis) s cyklickým sběrem MS a variabilního počtu MS/MS spekter ve 2s cyklu. Surová data byla zpracována pomocí DataAnalysis (Bruker Daltonics, Německo) a byly extrahovány MGF (soubory obsahující seznam prekurzorů a jejich fragmentační spektra). Pomocí ProteinScape v3.1 byla provedena identifikace proteinů s využitím softwaru MASCOT (MatrixScience, Anglie) proti referenční databázi HUMAN získané z deponitáře UNIPROT. Kvantifikace proteinů byla provedena s využitím souboru nástrojů firmy Bruker a výsledná kvantitativní data byla zpracována pomocí software Perseus v. 1.3.5 (Max-

Planck-Institute of Biochemistry, Mnichov, Německo). Celkové počty identifikovaných peptidů a proteinů jsou uvedeny v tabulce č. 5.

Pro analýzu změn hladin proteinů byla použita relativní kvantifikace, která byla vypočítána jako podíl ploch chromatografických píků reprezentujících peptidy vzorků značených jednou značkou (HeLa buňky ovlivněné 5 Jcm⁻² ZnPc PDT v koncentraci EC50) vs plochy chromatografických píků reprezentujících peptidy vzorků značených opačnou značkou (kontrolní HeLa buňky bez ozáření a fotosenzitivní látky). Tento poměr byl vypočítán pro všechny detegované peptidy daného proteinu a byla určena hodnota mediánu, která byla použita v grafech prezentujících dynamiku změn hladin proteinů v jednotlivých časových odstupech po terapii.

4.1.4.8 Statistická analýza

Data byla analyzována pomocí statistického software IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp. Kvantitativní proměnné byly prezentovány pomocí průměrů a směrodatných odchylek (SD), minimálních a maximálních hodnot. Rozdíly mezi dvěma nezávislými výběry v kvantitativních veličinách byly ověřovány dvouvýběrovým *t*-testem. Rozdíly mezi více nezávislými výběry byly hledány pomocí analýzy rozptylu (ANOVA). Následně byly provedeny Dunnettovy post hoc testy, které porovnály všechny vzorky vůči kontrole. Všechny testy byly provedeny na hladině statistické významnosti $\alpha = 0,05$. Výsledky, u nichž byla *p*-hodnota nižší než 0,05, byly považovány za statisticky významné a jsou v grafech označeny hvězdičkou.

4.1.5 Použité roztoky, média a chemikálie

- **DMEM** – kultivační medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium): Práškové DMEM (D5523-10L, Sigma); 500 ml 10% fetálního séra (F7524, Sigma); 100 ml 1% glutaminu (G7513, Sigma); 100 ml 1% penicilin/streptomycin (P 4333, Sigma)
- **DMSO** (dimethyl sulfoxid)
- **Lyzační roztok pro ELFO**– 1000 ml: 146,1 g 2,5M NaCl; 29,23 g 100 mM EDTA; 1,21 g 10 mM TRIS; pH upravit koncentrovaným roztokem NaOH na pH = 10
- **Neutralizační roztok pro ELFO**– 1000 ml: 48,64 g 0,4 M Tris; upravit koncentrovanou HCl na pH = 7,5
- **Roztok pro ELFO** – 1500 ml: 18 g 300 mM NaOH; 0,438 g 1 mM EDTA, pH ≥ 13
- **Roztok SYBR GREEN**
- **PBS 10x** (Phosphate Buffered Saline) – pH 7,4: 80 g NaCl; 2 g KCl; 14,4 g KH₂PO₄; HCl (pro úpravu konečného pH); doplnit destilovanou vodou do 1 l
- **MTT** (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) (M 5655, Sigma)
- **DCF** (5-(a-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát, acetyl ester (CM-H₂DCFDA)) (C6827, Invitrogen)
- **Quant-iT Protein Assay kit** (Invitrogen)
- **Lyzační pufr**: 25mM HEPES/NaOH pH 7,5; 150mM NaCl; 1% IGEPAL CA 630; 0,1% deoxycholát sodný; 0,1% SDS; 1mM MgCl₂; 1mM DTT; 1mM PMSF; Roche EDTA free (50x); 1mM Na₃VO₄; 10mM NaF; 5mM β-glycerolfosfát; 1mM Na₂MoO₄; 4mM tartarát sodný; 10mM butyrát sodný
- **Močovínový pufr**: 100mM TEAB pH 8,0; 6M močovina; 2M thiomočovina
- **Redukční činidlo**: 100mM TEAB pH 8,0; 25mM TCEP
- **Alkylační činidlo**: 100mM TEAB pH 8,0; 330mM IAM
- **Nanášecí pufr pro C18 purifikaci**: 30% TFA
- **Promývací pufr pro C18 purifikaci**: 0,4% FA; 2% TFA

- **Eluční pufr pro C18 purifikaci:** 90% ACN; 50mM TEAB
- **Roztok pro rozpuštění peptidů před MS měřením:** 0,5% FA
- **Nanášecí pufr A:** 1% TFA; 30% ACN
- **Promývací pufr A1:** 1% TFA; 50% ACN
- **Promývací pufr A2:** 1% TFA; 75% ACN
- **Nanášecí pufr B:** 20% AA; 420mM OSA; 50 mg/ml DHB; 0,1% HFBA
- **Promývací pufr B:** 0,1% TFA; 80% ACN
- **Nanášecí pufr C:** 2% TFA; 65% ACN; satureovaná kyselina glutamová (25 mg·ml⁻¹)
- **Promývací pufr C1:** 0,5% TFA; 65% ACN
- **Promývací pufr C2:** 0,1% TFA; 65% ACN
- **Nanášecí pufr D:** 5% TFA; 80% ACN; 1M kyselina glykolová
- **Promývací pufr D1:** 1% TFA; 80% ACN
- **Promývací pufr D2:** 0,1% TFA; 20% ACN
- **Nanášecí pufr E:** 0,1% TFA, 70% (v/v) ACN, 3,33M kyselina mléčná
- **Promývací pufr: E:** 0,1% TFA, 70% ACN
- **Eluční pufr 1:** 40% ACN; 1% NH₄OH
- **Eluční pufr 2:** 40% ACN; 1% NH₄OH; 50mM ATP
- **Aktivační roztok:** 100% 2-propanol
- **Nanášecí a promývací roztok:** 5% FA
- **Eluční roztok:** 50% methanol; 2,5% FA

4.1.6 Použité laboratorní vybavení a programy

- Laboratorní váhy
- Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (BioTek, USA)
- CO₂ inkubátor (BioTek, USA)
- LED diody (Kingbright Corporation, Taiwan)
- Spektrofotometr Synergy HT (Tecan, Švýcarsko)
- Microsoft Excel (analýza dat)
- DAVID Bioinformatics Resources 6.8 (National Cancer Institute Frederick Campus, USA)
- CometScore 1.5 (TriTec, USA)

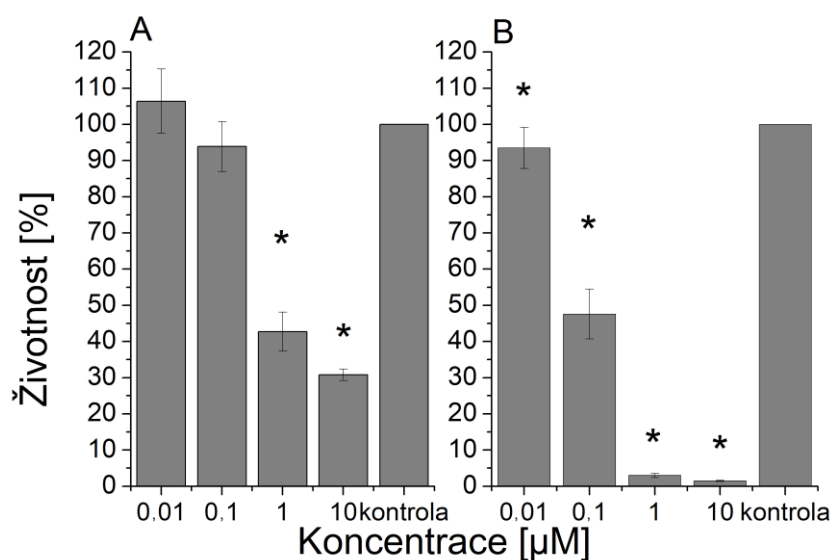
- UHR-QTOF maXis (Bruker Daltonics, Německo)
- DataAnalysis (Bruker Daltonics, Německo)
- ProteinScape v3.1 (Bruker Daltonics, Německo)
- Software MASCOT (MatrixScience, Anglie)
- Software Perseus v. 1.3.5 (Max-Planck-Institute of Biochemistry, Mnichov, Německo)
- Konfokální mikroskop Axio Observe Z1 (Zeiss, Německo) doplněný o rotující disk Yokogawa CSU X1 (Yokogawa, Japonsko)
- Mikroskop atomárních sil Bioscope Catalyst (Bruker Daltonics, Německo)
- AFM program Gwyddion 2.40 (Český metrologický institut, ČR)
- Thermomixer (Eppendorf)
- Termostat (Eppendorf)
- Sonifikační lázeň (Kraintek)
- Centrifuga IEC CL31R Multispeed (Conquer scientific, USA)
- Spektrofotometr Synergy H4 Hybrid reader (BioTek)

5 VÝSLEDKY

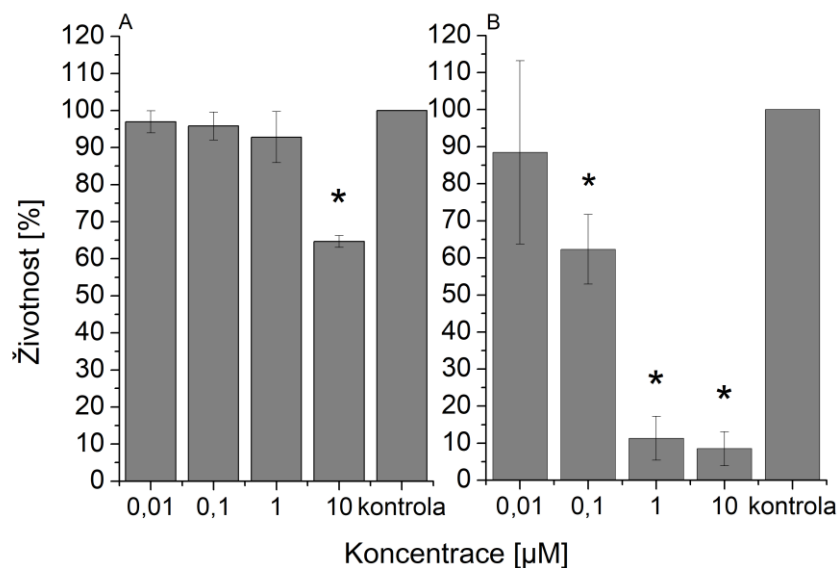
5.1 Měření změn životnosti – MTT test

MTT test je založen na enzymatické redukci žlutého rozpustného 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenylnitrazolium bromidu (MTT) na nerozpustný formazan, který vytváří fialově zbarvené krystaly hvězdicového tvaru. Míra konverze MTT na formazan je úměrná % živých buněk. Krystaly formazanu jsou následně rozpuštěny silným detergentem (DMSO) a vzniklý roztok je spektrofotometricky měřen. Výsledné hodnoty absorbance byly následně převedeny na procenta a vztaženy ke kontrolám v každé desce, kdy průměrné hodnoty z kontrolních jamek představovaly životnost 100 %. Výsledky jsou uvedeny v grafech č. 2-6. Z vypočítaných hodnot byla následně stanovena hodnota EC50 (tabulka č. 2) v programu Phototox 2.0.

5.1.1 Nenádorové buněčné linie

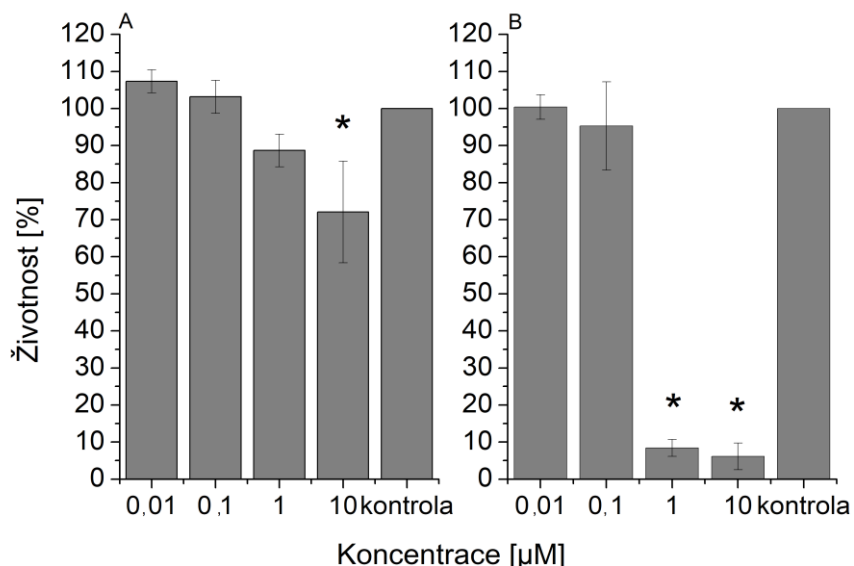


Graf č. 2: Závislost životnosti buněk linie BJ na koncentraci fotosenzitivní látky (A) BJ buňky po 5 Jcm⁻² 2HPc PDT, (B) BJ buňky po 5 Jcm⁻² ZnPc PDT.

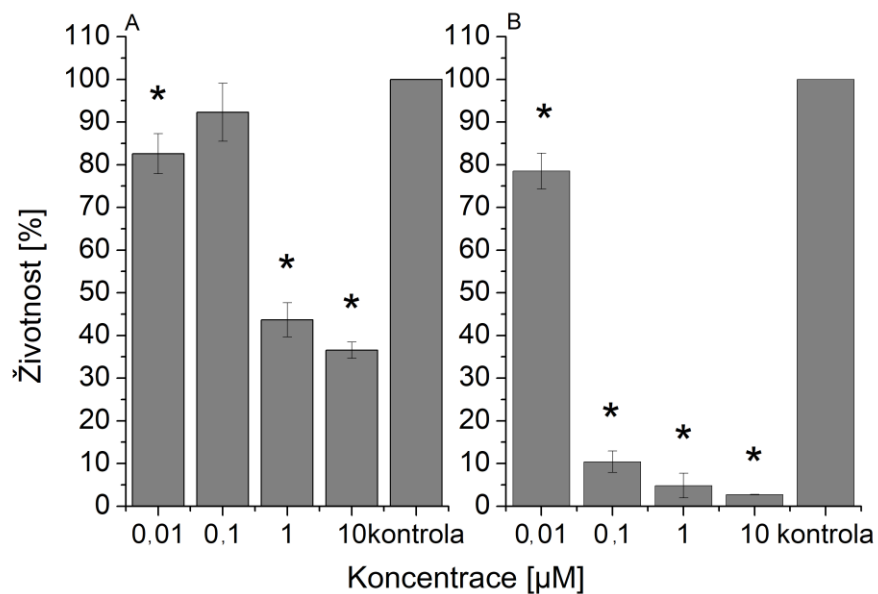


Graf č. 3: Závislost životnosti buněk linie HaCat na koncentraci fotosenzitivní látky (A) HaCat buňky po 5 Jcm⁻² 2HPc PDT, (B) HaCat buňky po 5 Jcm⁻² ZnPc PDT.

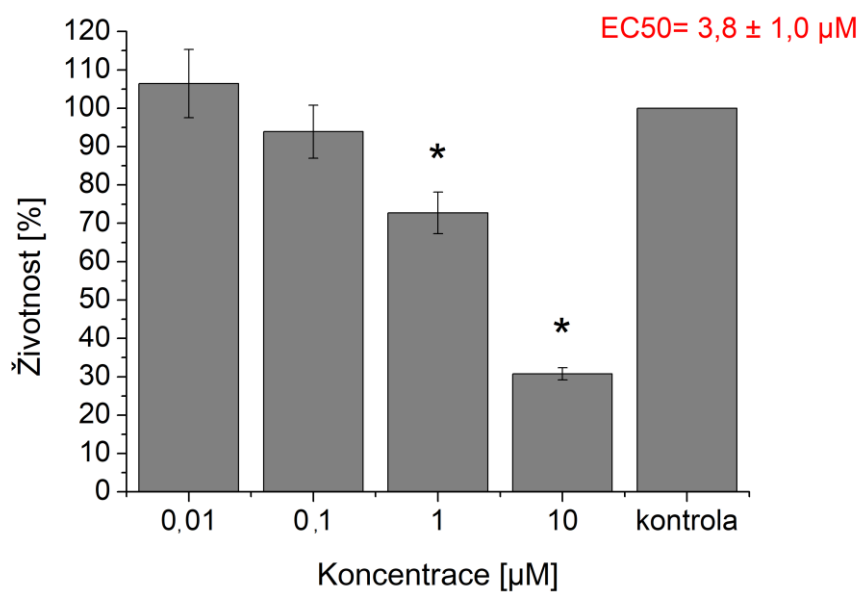
5.1.2 Nádorové buněčné linie



Graf č. 4: Závislost životnosti buněk linie MCF7 na koncentraci fotosenzitivní látky (A) MCF7 buňky po 5 Jcm⁻² 2HPc PDT, (B) MCF7 buňky po 5 Jcm⁻² ZnPc PDT.



Graf č. 5: Závislost životnosti buněk linie HeLa na koncentraci fotosenzitivní látky (A) HeLa buňky po 5 Jcm⁻² 2HPc PDT, (B) HeLa buňky po 5 Jcm⁻² ZnPc PDT.



Graf č. 6: Závislost životnosti buněk linie HeLa na koncentraci fotosenzitivní látky při 1 Jcm⁻² ZnPc PDT.

Buněčná linie	EC50 [μM] ZnPc	EC50 [μM] 2HPc
BJ	0,09 \pm 0,02	0,86 \pm 0,14
HaCat	0,17 \pm 0,03	> 10
MCF7	0,45 \pm 0,17	> 10
HeLa	0,03 \pm 0,01	0,90 \pm 0,13

Tabulka č. 2: Hodnoty EC50 pro jednotlivé nádorové i nenádorové buněčné linie při 5 Jcm⁻² ZnPc a 5 Jcm⁻² 2HPc fotodynamické terapie.

Fotodynamická terapie využívající zinečnatý derivát ftalocyaninu (ZnPc) byla nejefektivnější na nádorové linii karcinomu děložního čípku HeLa (tabulka č. 2). Pro nenádorovou linii BJ (lidské kožní fibroblasty) byla hodnota EC50 v porovnání s linií HeLa trojnásobná. Pro nenádorovou linii HaCat (lidské kožní keratinocyty) byla hodnota EC50 v porovnání s linií HeLa téměř šestinásobná. U buněk adenokarcinomu prsu MCF7 byla 5 Jcm⁻² ZnPc PDT účinná nejméně. V tomto případě byla hodnota EC50 v porovnání s nádorovou linií HeLa patnáctkrát vyšší. Hodnota EC50 pro buňky MCF7 byla také vyšší než pro nenádorové buněčné linie (pětkrát vyšší v porovnání s buněčnou linií BJ a 2,6krát vyšší v porovnání s buněčnou linií HaCat).

Účinnost 5 Jcm⁻² fotodynamické terapie s využitím nekovového ftalocyaninu (2HPc) byla v porovnání s terapií využívající zinečnatý derivát ftalocyaninu mnohem nižší (tabulka č. 2). V případě buněčných linií BJ a HeLa byla hodnota EC50 pro linii BJ rovna hodnotě 0,86 μM a pro buněčnou linii HeLa hodnotě 0,90 μM . V případě buněčných linií HaCat a MCF7 byly hodnoty EC50 dokonce vyšší než 10 μM .

V případě buněčné linie HeLa byla provedena také 1 Jcm⁻² ZnPc fotodynamická terapie (graf č. 6), avšak bylo zjištěno, že koncentrace EC50 byla v tomto případě mnohonásobně větší (přibližně 127krát) v porovnání 5 Jcm⁻² ZnPc fotodynamickou terapií.

Vzhledem k výše uvedeným výsledkům byla pro další analýzy vybrána buněčná linie karcinomu děložního čípku HeLa, na které byl sledován účinek 5 Jcm⁻² ZnPc fotodynamické terapie při koncentraci EC50. Změny proteinového

aparátu byly hodnoceny pomocí LC-MS/MS analýzy, jejíž souhrné výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 3.

	Celkové počty		
	0 h	4 h	24 h
Proteinů	1491	1220	742
Peptidů	11977	9676	5918
PSM (spekter)*	67225	54377	42045
Kvantifikace (počet PSM)	23733	20119	17521
Celkový počet posbíraných spekter	297251	283728	245738

*PSM – přiřazená peptidová spektra (angl. **peptide spectral match**)

Tabulka č. 3: Celkový souhrn výsledků identifikace proteinů a peptidů z LC–MS/MS analýzy.

5.2 Měření produkce reaktivních kyslíkových radikálů a dynamika změn hladin vybraných proteinů zapojených v buňce v reakci na oxidační stres

V rámci dizertační práce byly sledovány změny v produkci kyslíkových radikálů vznikajících I. a II. typem fotodynamické reakce (viz str. 17-19) po 5 Jcm⁻² ZnPc PDT *in vitro* v koncentraci EC50 na HeLa buňkách pomocí dvou fluorescenčních sond (SOSG a CM-H₂DCFDA). Dále byla hodnocena změna hladin vybraných proteinů zapojených v odpovědi buňky na oxidační stres pomocí LC-MS/MS analýzy.

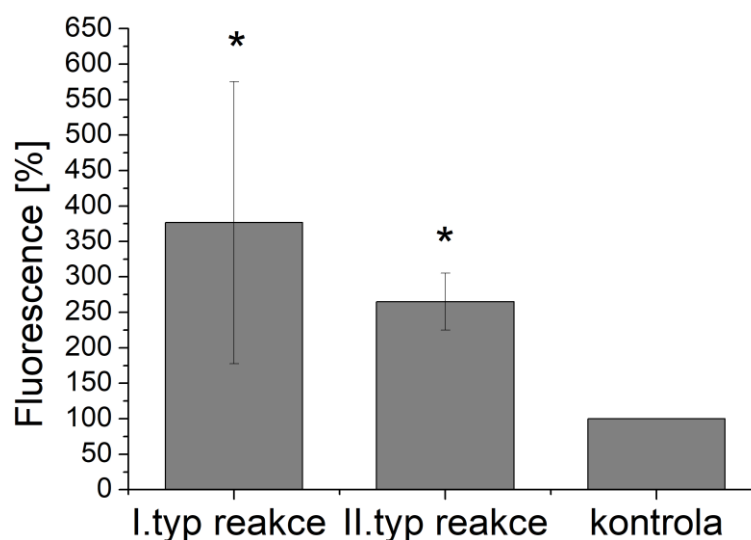
5.2.1 Měření produkce kyslíkových radikálů vznikajících I. a II. typem fotodynamické reakce

Pro měření reaktivních kyslíkových radikálů vznikajících *in vitro* při fotodynamických reakcích I. i II. typu byly použity dvě fluorescenční sondy umožňující detekci různých typů ROS (výsledky jsou uvedeny v grafu č. 7).

Pro měření reaktivních kyslíkových radikálů vznikajících reakcí I. typu (peroxidové radikály, hydroxylové radikály, peroxylové radikály apod.) byla použita sonda CM-H₂DCFDA. Měření produkce kyslíkových radikálů touto

metodou je založeno na reakci sondy CM-H₂DCFDA a reaktivních kyslíkových radikálů vznikajících při působení fotodynamické terapie na buňku za vzniku fluorescenčního záření.

SOSG (Singlet oxygen sensor green) je fluorescenční sonda, která není schopna detekce výše zmíněných radikálů jako je např. hydroxylový radikál a superoxidový radikál, avšak vykazuje vysokou selektivitu pro singletní kyslík. Excitační/ emisní maxima sondy odpovídají hodnotám 504/ 525 nm.



Graf č. 7: Měření produkce reaktivních kyslíkových radikálů vznikajících *in vitro* I. a II. typem fotodynamické reakce po 5 Jcm⁻² ZnPc PDT v koncentraci EC50 na buněčné linii HeLa. Výsledky jsou uvedeny jako procentuální vyjádření fluorescence, kdy kontrola představuje 100 %.

Z výsledků uvedených v grafu č. 7 je patrné, že u HeLa buněk dochází po *in vitro* 5 Jcm⁻² ZnPc PDT v koncentraci EC50 k nárůstu hladin reaktivních kyslíkových radikálů vznikajících oběma typy reakcí. Větší produkce kyslíkových radikálů v porovnání s kontrolou byla detegována při reakci I. typu, kdy byl zjištěn průměrný nárůst fluorescence přibližně o 276 %. V případě produkce kyslíkových radikálů vznikajících reakcí II. typu byl zaznamenán nárůst přibližně o 165 %.

5.2.2 Dynamika změn vybraných hladin proteinů zapojených v buňce při odpovědi na oxidační stres

V rámci dizertační práce byla pomocí kapilární chromatografie a tandemové hmotnostní spektrometrie s ESI ionizací provedena analýza změn hladin vybraných proteinů zapojených v buňce při odpovědi na oxidační stres způsobený reaktivními kyslíkovými radikály (ROS). V rámci analýzy, jejíž výsledky jsou uvedeny v grafu č. 8, byly sledovány hladiny následujících proteinů:

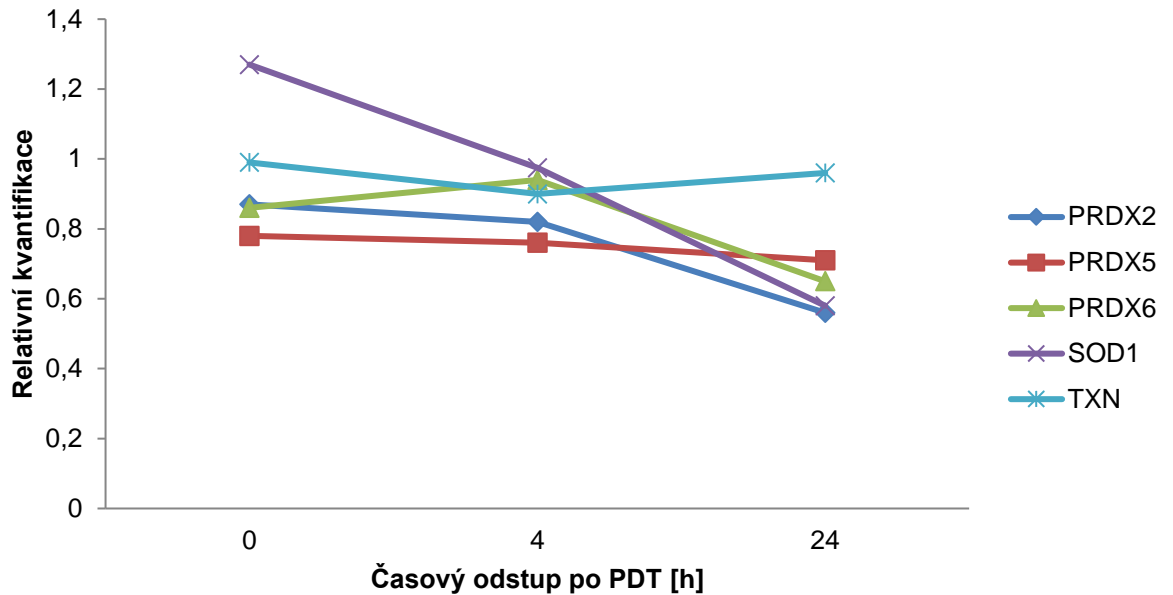
PRDXn (P32119, P30044, P30041) – peroxiredoxiny; tvoří základ redoxní regulace buněk, slouží k redukci a eliminaci peroxidů vytvářených metabolismem, regulují vnitrobuněčnou koncentraci peroxidu vodíku v buňkách.

SOD1 (P00441) – superoxid dismutáza 1; účinně zhasí superoxidový radikál a přeměňuje jej na méně toxický peroxid vodíku.

TXN (P10599) – thioredoxin; participuje v řadě redoxních reakcí, hraje důležitou roli v reverzibilní S-nitrosylaci cysteinových cílů, přispívá k regulaci NO v buňkách, zapojuje se v mezibuněčné komunikaci a v redukci oxidovaných peroxiredoxinů.

Pozn.: V závorce jsou uvedena čísla pro identifikaci v UniProtu (<http://www.uniprot.org/>).

Dynamika změn hladin proteinů zapojených v odpovědi buňky na oxidační stres



Graf č. 8: Dynamika změn hladin vybraných proteinů zapojených v buňce při odpovědi na oxidační stres v různých časových odstupech po *in vitro* 5 Jcm⁻² ZnPc PDT HeLa buňkách. Relativní kvantifikace představuje podíl mediánové hodnoty ploch chromatografických píků reprezentujících peptidy daného proteinu ve vzorku buněk ovlivněných 5 Jcm⁻² ZnPc PDT v koncentraci EC50 vůči vzorku kontrolních buněk.

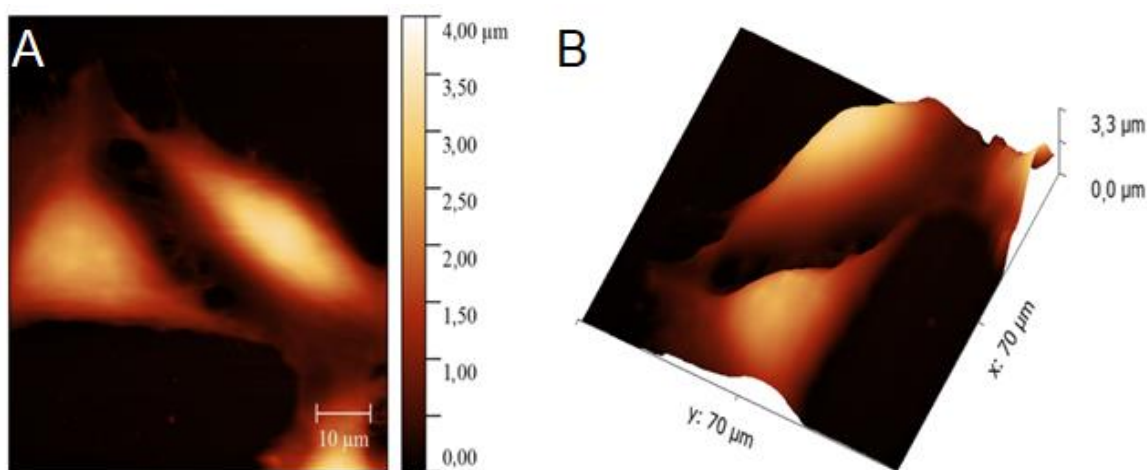
Bezprostředně po ozáření došlo v porovnání s kontrolou k nárůstu pouze hladiny proteinu superoxid dismutáza 1, přičemž v dalších časových odstupech po terapii byl v porovnání se vzorkem buněk sesbíraných bezprostředně po terapii (v čase 0) pozorován prudký pokles hladiny tohoto proteinu, kdy po 24 hodinách došlo k poklesu na méně než polovinu. Pokles hladiny byl pozorován také u proteinu peroxiredoxinu 2. U proteinů thioredoxin a peroxiredoxin 5 k výraznějším změnám hladin nedošlo.

5.3 Změny v buňce na cytoskeletární úrovni

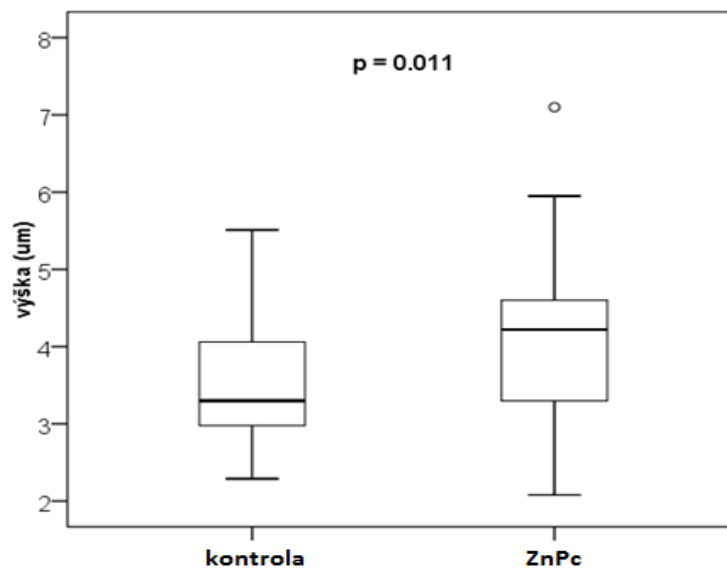
V rámci dizertační práce byly sledovány změny na cytoskeletární úrovni po 5 Jcm⁻² ZnPc PDT v koncentraci EC50, kdy byla sledována změna aktinové struktury pomocí konfokální mikroskopie, změna výškového profilu pomocí mikroskopie atomárních sil a změna hladin vybraných cytoskeletárních proteinů pomocí LC-MS/MS analýzy.

5.3.1 Detekce změn výškového profilu HeLa buněk pomocí mikroskopie atomárních sil

Pro detekci vlivu *in vitro* 5 Jcm⁻² ZnPc PDT na změny výškového profilu buněk HeLa byla využita mikroskopie atomárních sil, což je mikroskopická technika využívající se pro 2D a 3D zobrazování povrchů. Obraz je sestavován postupně bod po bodu, díky čemuž je možno dosáhnout vysokého rozlišení. Na obrázku č. 19 je příklad 2D skenu výškového profilu, ze kterého byl následně vytvořen pomocí programu NanoScope Analysis 3D profil.



Obr. č. 19: 2D (A) a 3D (B) výškový profil kontrolních HeLa buněk vizualizovaný pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM).

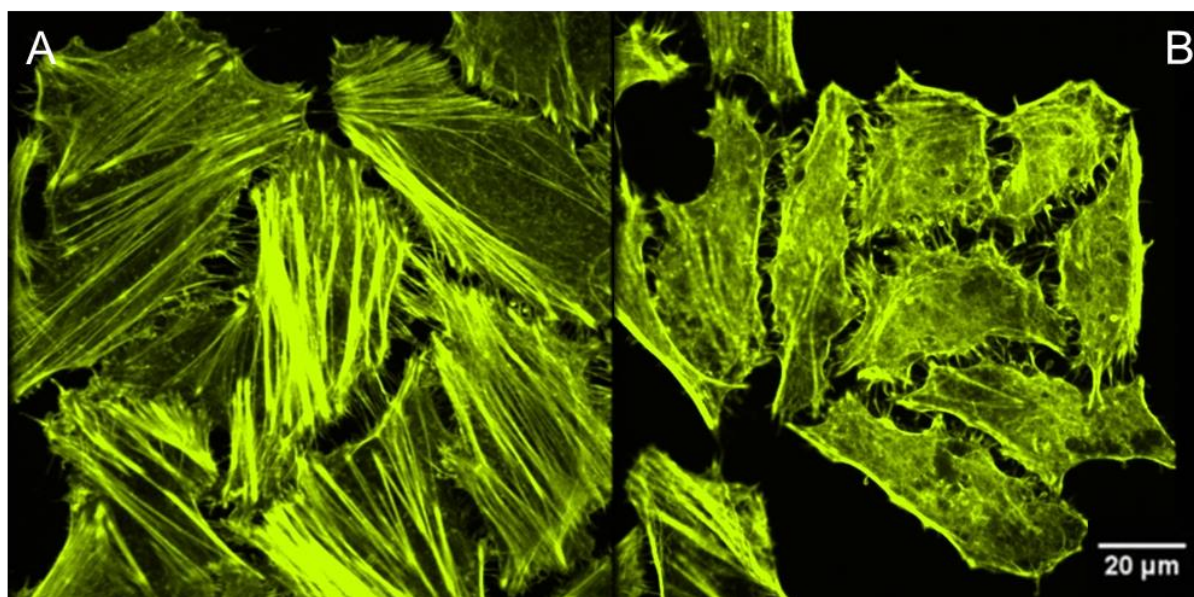


Graf č. 9: Statistická analýza výšky 50 HeLa buněk. ZnPc představuje HeLa buňky vystavené *in vitro* 5 Jcm⁻² ZnPc fotodynamické terapii při koncentraci EC50, kontrolu představují HeLa buňky bez ozáření a fotosenzitivní látky.

Při sledování změn maximální výšky v rámci výškového profilu HeLa buněk po 5 Jcm⁻² ZnPc PDT (graf č. 9) byl prokázán signifikantní rozdíl ($p = 0,011$) mezi mediánem kontroly a buněk vystavených 5 Jcm⁻² ZnPc PDT v koncentraci EC50.

5.3.2 Vizualizace aktinové struktury HeLa buněk pomocí konfokální mikroskopie

Pro vizualizaci aktinových vláken cytoskeletální struktury kontrolních HeLa buněk a HeLa buněk vystavených 5 Jcm^{-2} ZnPc PDT v koncentraci EC50, jejíž výsledky jsou zobrazeny na obr. č. 20, byla využita fluorescenční sonda Alexa Fluor 532 Phalloidin. Jedná se o mykotoxin, který je schopen vazby na F – aktin.



Obr. č. 20: Cytoskeletální aktinová struktura HeLa buněk. A – kontrolní buňky bez ozáření a fotosenzitivní látky; B – buňky vystavené *in vitro* 5 Jcm^{-2} fotodynamické terapie s využitím ZnPc v koncentraci EC50 v odstupu 24 hodin po terapii.

Po 5 Jcm^{-2} ZnPc PDT bylo v porovnání s kontrolou pozorováno přeskupení aktinové struktury, kdy po terapii byly patrné změny v uspořádanosti cytoskeletální struktury.

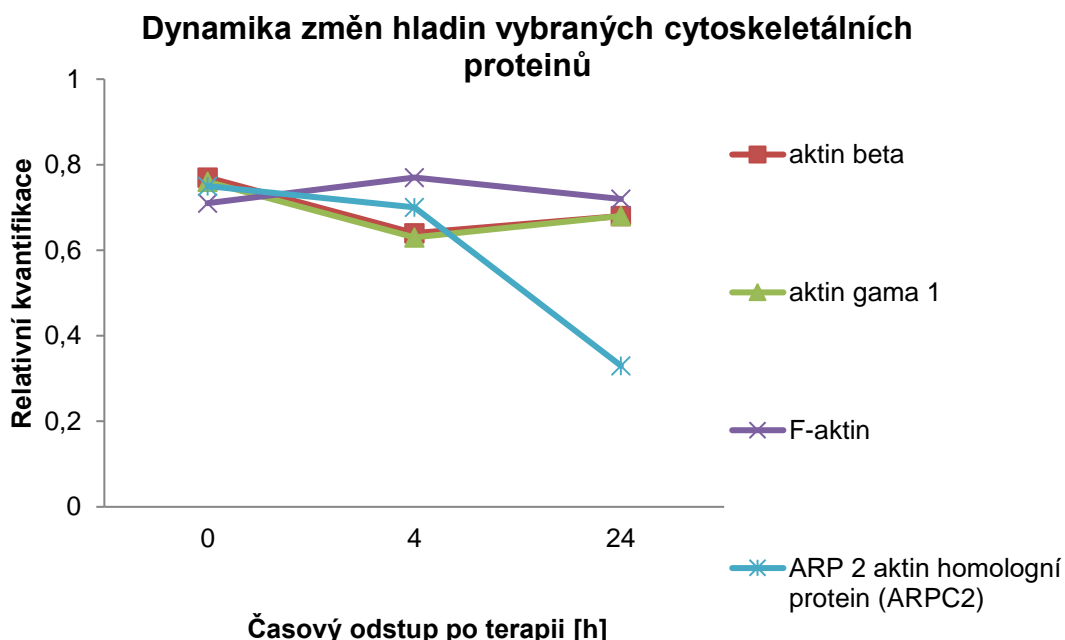
5.3.3 Detekce změn hladin vybraných cytoskeletárních proteinů

Pro analýzu změn vybraných cytoskeletárních proteinů byla použita kapilární chromatografie a tandemová hmotnostní spektrometrie s ESI ionizací. V rámci analýzy, jejíž výsledky jsou uvedeny v grafu č. 10, byly sledovány hladiny následujících proteinů:

Aktiny (P60709, P63261, P47756) – globulární strukturní proteiny, které polymerují za vzniku dlouhých vláken – tzv. mikrofilament. Tato vlákna tvoří součást cytoskeletu, determinují její tvar, umožňují pohyby uvnitř buněk, zpevňují mezibuněčné spoje a během dělení umožňují zaškrcení a oddělení dceřiných buněk.

ARP2 aktin 2 homologní protein ARPC2 (O15144) – jedna z komponent komplexu Arp 2/3, který se podílí na regulaci polymerace aktinu a také na tvorbě rozvětvených aktinových sítí.

Pozn.: V závorce jsou uvedena čísla pro identifikaci v UniProtu (<http://www.uniprot.org/>).



Graf č. 10: Dynamika změn hladin vybraných cytoskeletárních proteinů v různých časových odstupech po *in vitro* 5 Jcm⁻² ZnPc PDT na HeLa buňkách. Relativní kvantifikace představuje podíl mediánové hodnoty ploch

chromatografických píků reprezentujících peptidy daného proteinu ve vzorku buněk ovlivněných 5 Jcm⁻² ZnPc PDT v koncentraci EC50 vůči vzorku kontrolních buněk.

Z výsledků uvedených v grafu č. 10 je patrné, že v případě proteinů aktin beta, aktin gama 1 a F – aktin nedošlo v různých časových odstupech k výraznějším změnám v jejich hladinách. V případě ARP2 aktin homologního proteinu došlo k prudkému poklesu hladiny tohoto proteinu ve vzorku a po 24 hodinách po terapii došlo v porovnání se vzorkem buněk sesbíraných bezprostředně po terapii (v čase 0 h) ke snížení jeho hladiny o 56 %.

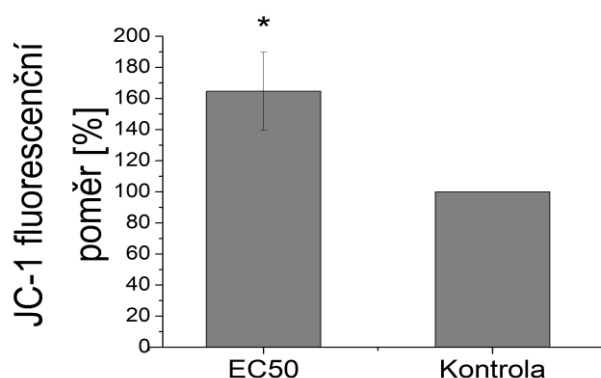
5.4 Změny v buňce na mitochondriální úrovni

V rámci dizertační práce byly sledovány změny na mitochondriální úrovni po *in vitro* 5 Jcm⁻² ZnPc PDT v koncentraci EC50 na HeLa buňkách, kdy byla měřena změna mitochondriálního membránového potenciálu pomocí fluorescenční spektrofotometrie a změna hladin vybraných mitochondriálních proteinů pomocí LC-MS/MS analýzy.

5.4.1 Detekce změn mitochondriálního membránového potenciálu

Pro detekci změn membránového potenciálu byla použita sonda JC-1 (5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-Tetraethyl-benzimidazolokarbocyanin Iodid), která umožňuje rychlou detekci jeho změny. V nepoškozených buňkách se vlivem elektrochemického potenciálu látka koncentruje v mitochondriální matrix. Zde poté vytváří červené fluorescenční agregáty. Při ztrátě elektrochemického potenciálu, dojde také k rozptýlení fluorescenční sondy po celé buňce a k přeměně z červeně fluoreskujících agregátů na zeleně fluoreskující monomery, což umožňuje určit rozdíly mezi nepoškozenou a narušenou (poškozenou) buňkou. Po vložení destičky do fluorescenčního readeru byla měřena fluorescence v zelené (530 nm) a červené oblasti (590 nm). Jejich vzájemným poměrem došlo k získání hodnot, které vyjadřují změnu membránového potenciálu. Čím vyšší je hodnota tohoto poměru, tím více je

narušen elektrochemický potenciál buněk a tím větší je poškození buněk. Výsledky analýzy jsou uvedeny v grafu č. 11.



Graf č. 11: Detekce změn mitochondriálního membránového potenciálu po *in vitro* 5 Jcm⁻² ZnPc fotodynamické terapii při koncentraci EC50 na HeLa buňkách. Výsledek je uveden jako procentuální vyjádření JC-1 fluorescenčního poměru (J-monomery: J-agregátům), kdy kontrola představuje 100 %.

Z výsledků uvedených v grafu č. 11 je patrné, že u HeLa buněk vystavených 5 Jcm⁻² ZnPc fotodynamické terapii dochází při koncentraci EC50 k signifikantním ($p < 0,0001$) změnám mitochondriálního membránového potenciálu, přičemž byl pozorován nárůst JC-1 poměru o 65 % v porovnání s kontrolními buňkami.

5.4.2 Detekce změn vybraných mitochondriálních proteinů

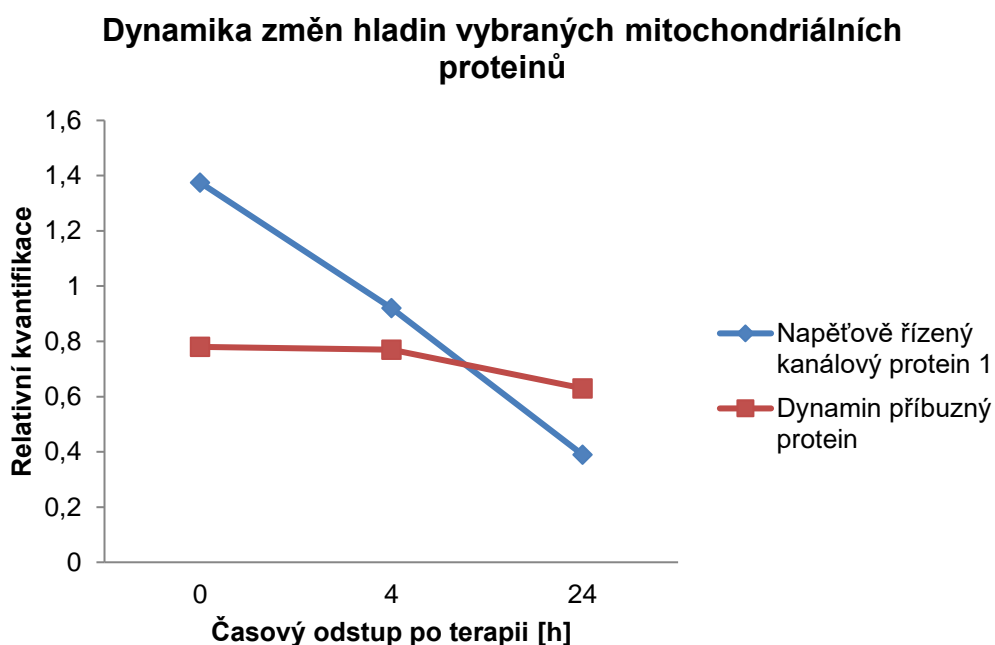
Pro detekci změn vybraných mitochondriálních proteinů byla použita kapilární chromatografie a tandemová hmotnostní spektrometrie s ESI ionizací. V rámci analýzy, jejíž výsledky jsou uvedeny v grafu č. 12, byly sledovány hladiny následujících proteinů:

Dynamamin příbuzný protein OPA1 (O60313) – dynamin příbuzná GTPáza, která je esenciální pro normální mitochondriální morfologii prostřednictvím regulace rovnováhy mezi mitochondriální fúzí a štěpením. Hraje roli při remodelování krist, které zasahují do prostoru matrix a značně zvětšují povrch vnitřní membrány, díky čemuž je zajištěn velký povrch pro syntézu ATP,

a uvolňování cytochromu c během apoptózy. Proteolytické zpracovávání v odpovědi na vnitřní apoptotické signály může vést k rozkladu OPA1 oligomerů a uvolnění kaspázového aktivátoru cytochromu c (CYCS) do mitochondriálního mezimembránového prostoru. Hraje roli při udržování mitochondriálních genomů.

Napětově řízený kanálový protein (P21796) – vytváří kanál přes vnější mitochondriální membránu a také plazmatickou membránu. Kanál na vnější mitochondriální membráně umožňuje difúzi malých hydrofilních molekul, v plazmatické membráně se podílí na regulaci buněčného objemu a apoptóze. Při nízkém nebo nulovém potenciálu membrány má otevřenou konformaci a při potenciálu nad 30–40 mV má konformaci uzavřenou. V otevřeném stavu má slabou selektivitu pro anionty, zatímco v uzavřeném stavu je kationt selektivní. Může se podílet na tvorbě permeabilních tranzičních pórů (PTPC).

Pozn.: V závorce jsou uvedena čísla pro identifikaci v UniProtu (<http://www.uniprot.org/>).



Graf č. 12: Dynamika změn hladin dvou vybraných mitochondriálních proteinů v různých časových odstupech po *in vitro* 5 Jcm⁻² ZnPc fotodynamické terapii na HeLa buňkách. Relativní kvantifikace představuje podíl mediánové hodnoty ploch chromatografických píků reprezentujících peptidy daného

proteinu ve vzorku buněk ovlivněných 5 Jcm⁻² ZnPc PDT v koncentraci EC50 vůči vzorku kontrolních buněk.

Z výsledků uvedených v grafu č. 12 vyplývá, že v případě napětově řízeného kanálového proteinu 1 došlo bezprostředně po terapii k nárůstu jeho hladiny ve vzorku (téměř o 40 % vůči kontrole), přičemž v dalších časových odstupech po terapii byl pozorován prudký pokles jeho hladiny v jednotlivých vzorcích, kdy 24 hodin po terapii byl pokles hladiny toho proteinu ve studovaném vzorku o více než 70 % oproti hodnotě naměřené bezprostředně po terapii. V případě dynamin příbuzného proteinu byl bezprostředně po terapii pozorován pokles jeho hladiny o přibližně 20 % a v dalších časových odstupech k dalšímu výraznějšímu poklesu nedošlo.

5.5 Změny v buňce na úrovni jádra a DNA

V rámci dizertační práce byly sledovány změny na úrovni jádra a DNA u HeLa buněk po *in vitro* 5 Jcm⁻² ZnPc PDT v koncentraci EC50, kdy byla míra fragmentace DNA hodnocena pomocí kometové analýzy a změna hladin vybraných proteinů zapojených v opravě poškození DNA pomocí LC-MS/MS analýzy.

5.5.1 Detekce míry fragmentace DNA pomocí kometové analýzy

Kometová analýza je metoda, která byla publikována v roce 1984 (Ostling *et* Johanson, 1984) a která se v praxi využívá pro studium poškození DNA. Jedná se o metodu založenou na gelové elektroforetické separaci jednotlivých buněk, resp. na schopnosti negativně nabitých fragmentů DNA vlivem elektrického pole vycestovat z buněčného jádra a seskupit se do tvaru obdobného kometě (Obr. č. 21 – schématické znázornění komety). Kometová analýza může být kvalitativní, kdy jsou jednotlivé komety rozděleny dle velikosti a tvaru komety do skupin 0–4 (0 – nepoškozené, 4 – největší fragmentace) nebo kvantitativní, při níž jsou jednotlivé parametry komety hodnoceny pomocí např. programu CometScore™,1.5 (TriTec, USA). V rámci dizertační práce byla

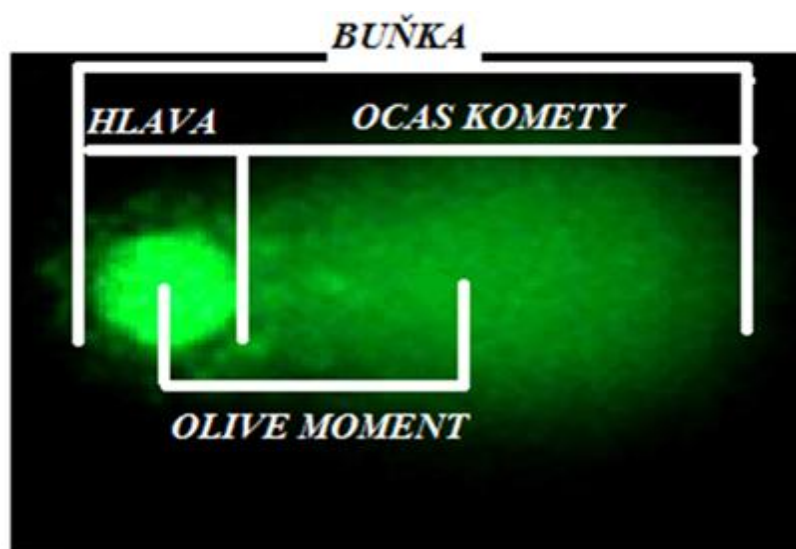
provedena kvantitativní analýza, při níž byly hodnoceny parametry Olive moment a % DNA v ocasu komety. Pro analýzu poškození DNA po terapii byla použita koncentrace fotosenzitizéru EC50 (30 nM), výsledky této analýzy jsou uvedeny v grafu č. 13.

Olive moment – intenzita těžiště (střední vzdálenosti) ocasu komety vynásobená vzdáleností tohoto bodu od středu jádra, vydělená celkovou intenzitou komety

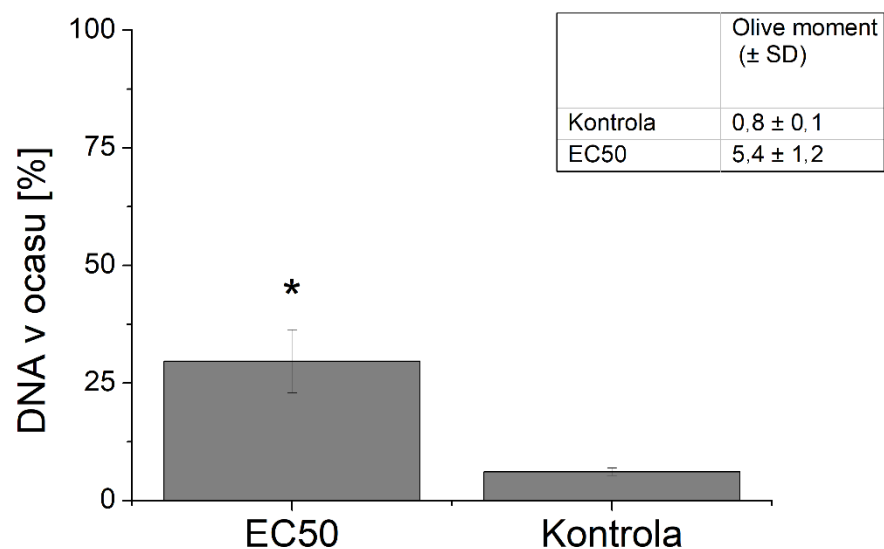
DNA v ocasu komety - $100 \times (I_t / I_c)$

I_t = celková intenzita ocasu (součet všech pixelů ocasu)

I_c = celková intenzita komety (součet všech pixelů komety)



Obr. č. 21: Schématické znázornění komety.



Graf č. 13: Hodnoty parametrů % DNA v ocasu (množství fragmentované DNA) a Olive moment po *in vitro* 5 Jcm⁻² ZnPc fotodynamické terapii při koncentraci EC50 na HeLa buňkách, kontrolu představují buňky bez ozáření a fotosenzitivní látky. Uvedené hodnoty byly stanoveny jako průměr hodnot ze tří nezávislých měření. V každém měření bylo hodnoceno 80 buněk.

Z výsledků uvedených v grafu č. 13 je patrné, že dochází k signifikantnímu poškození DNA po *in vitro* 5 Jcm⁻² ZnPc fotodynamické terapii v koncentraci EC50 na HeLa buňkách, kdy v porovnání s kontrolou byly hodnoty množství DNA v ocasu komety 4,9krát a Olive momentu 6,8krát větší.

5.5.2 Dynamika změn hladin vybraných proteinů zapojených v opravě poškození DNA

Pro detekci změn hladin vybraných proteinů zapojených v opravě poškození DNA byla použita kapilární chromatografie a tandemová hmotnostní spektrometrie s ESI ionizací. V rámci analýzy, jejíž výsledky jsou uvedeny v grafu č. 14, byly sledovány hladiny následujících proteinů:

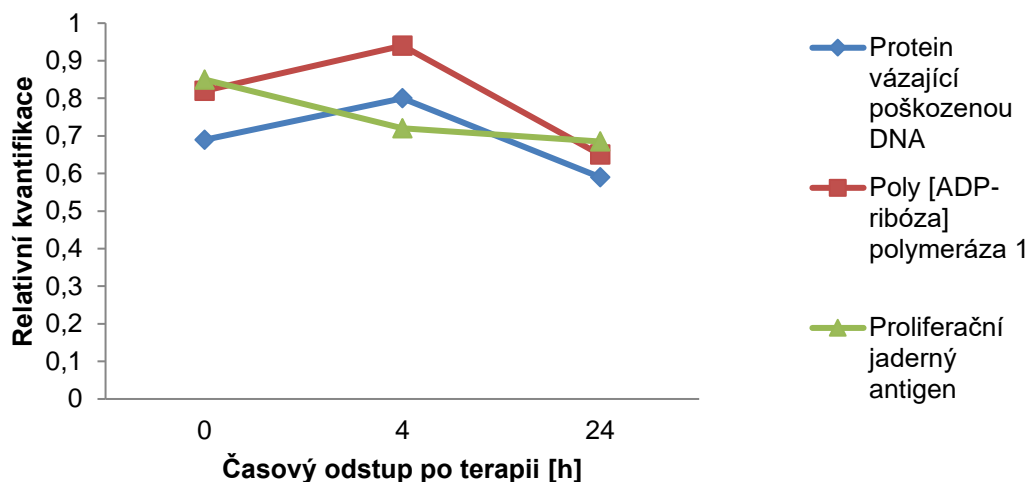
Protein vázající poškozenou DNA DDB1 (Q16531) – protein potřebný pro opravu DNA. Spolu s DDB2 vytváří komplex vázající DNA poškozenou UV zářením (UV-DDB komplex). Tento komplex je schopen rozpoznat poškození DNA a připojit proteiny z dráhy nukleotidové excizní opravy (NER dráha) za účelem iniciace opravy DNA.

Poly [ADP-ribóza] polymeráza 1 (P09874) – protein zapojený v dráze báze excizní opravy (BER) prostřednictvím katalýzy poly-ADP-ribosylace akceptorových proteinů zapojených do chromatinové architektury a DNA metabolismu. Tento modifikační krok následuje po poškození DNA a je patrně nezbytným krokem v detekční/ signální dráze vedoucí k opravám DNA řetězců.

Proliferační jaderný antigen PCNA (P12004) – pomocný protein DNA polymerázy delta, který se podílí na replikaci eukaryotní DNA prostřednictvím zvýšení polymerázové činnosti během elongace vedoucího řetězce. Díky vhodnému umístění na replikační vidličce má klíčovou roli v odpovědi na poškození DNA prostřednictvím koordinace replikace s opravami DNA a drahami tolerance poškození DNA. Funguje jako platforma pro připojení DDR proteinů, což umožňuje kompletní DNA replikaci po DNA poškození a podněcuje postreplikační opravy.

Pozn.: V závorce jsou uvedena čísla pro identifikaci v UniProtu (<http://www.uniprot.org/>).

Dynamika změn hladin vybraných proteinů zapojených v opravě poškození DNA

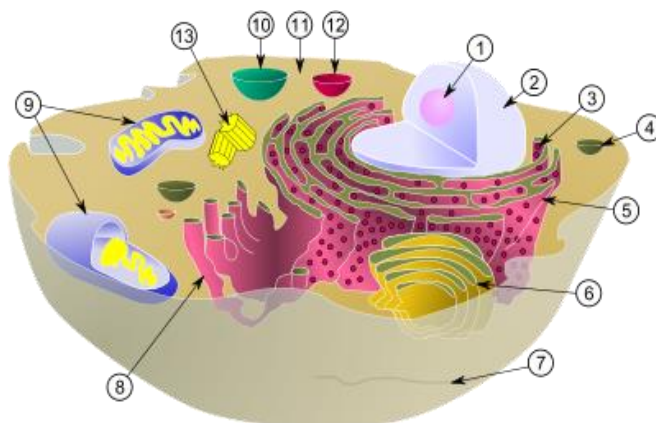


Graf č. 14: Dynamika změn hladin vybraných proteinů zapojených v opravě DNA v různých časových odstupech *in vitro* 5 Jcm⁻² ZnPc fotodynamické terapie na HeLa buňkách. Relativní kvantifikace představuje podíl mediánové hodnoty ploch chromatografických píků reprezentujících peptidy daného proteinu ve vzorku buněk ovlivněných 5 Jcm⁻² ZnPc PDT v koncentraci EC₅₀ vůči vzorku kontrolních buněk.

Z výsledků uvedených v grafu č. 14 je patrné, že 4 hodiny po terapii byla v porovnání se vzorkem buněk sesbíraných bezprostředně po terapii pozorována zvýšená hladina proteinů DDB1 (protein vázající poškozenou DNA) a poly [ADP-ribose] polymerázy 1, což jsou proteiny zapojené v detekci a spouštění drah vedoucích k opravám DNA, avšak 24 hodin po terapii bylo detegováno snížení hladin obou těchto proteinů. V případě proliferačního jaderného antigenu nárůst hladiny zjištěn nebyl a jeho hladina v závislosti na časovém odstupu po terapii klesala.

5.6 Buněčná lokalizace a molekulární funkce degradovaných proteinů

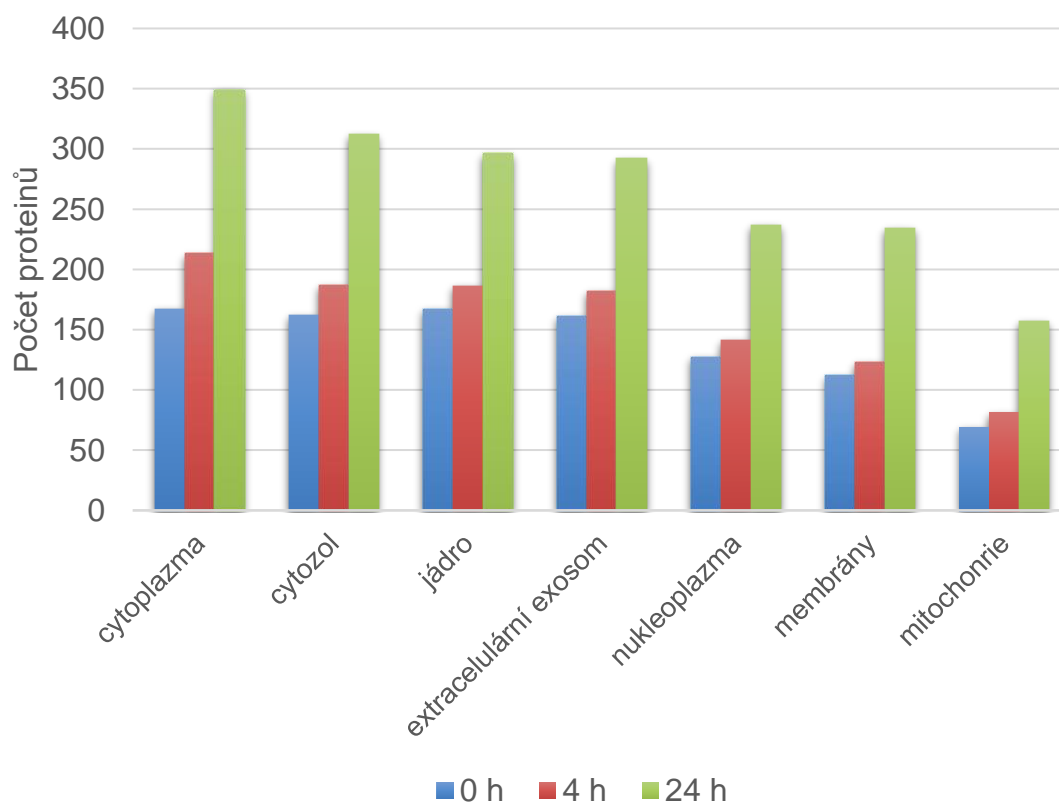
Pro výsledný příznivý léčebný účinek fotosenzitivní látky je důležitá nejen dávka terapie ale také místo akumulace léčivé látky. Akumulace fotodynamické látky je pro fotodynamickou terapii jedním z klíčových parametrů vzhledem k tomu, že dosah kyslíkových radikálů v buňce je malý (např. maximální délka dosahu $^1\text{O}_2$ v buňce je okolo 20 nm; schéma eukaryotní buňky je uvedeno na obr. č. 22) a degradovány bývají obvykle buněčné struktury a proteiny, v nichž je fotosenzitivní látka akumulována. Destrukce specifických skupin proteinů následně vede k narušení konkrétních buněčných funkcí, což má vliv na výsledný účinek použité terapie.



Obr. č. 22: Schématické znázornění eukaryotické buňky:

- (1) Nukleolus – jádérko, (2) Buněčné jádro, (3) Ribozomy (malé body), (4) Vezikul, (5) Drsné endoplazmatické retikulum, (6) Golgiho aparát, (7) Cytoskelet, (8) Hladké endoplazmatické retikulum, (9) Mitochondrie, (10) Vakuola, (11) Cytozol, (12) Lysozom, (13) Centriola

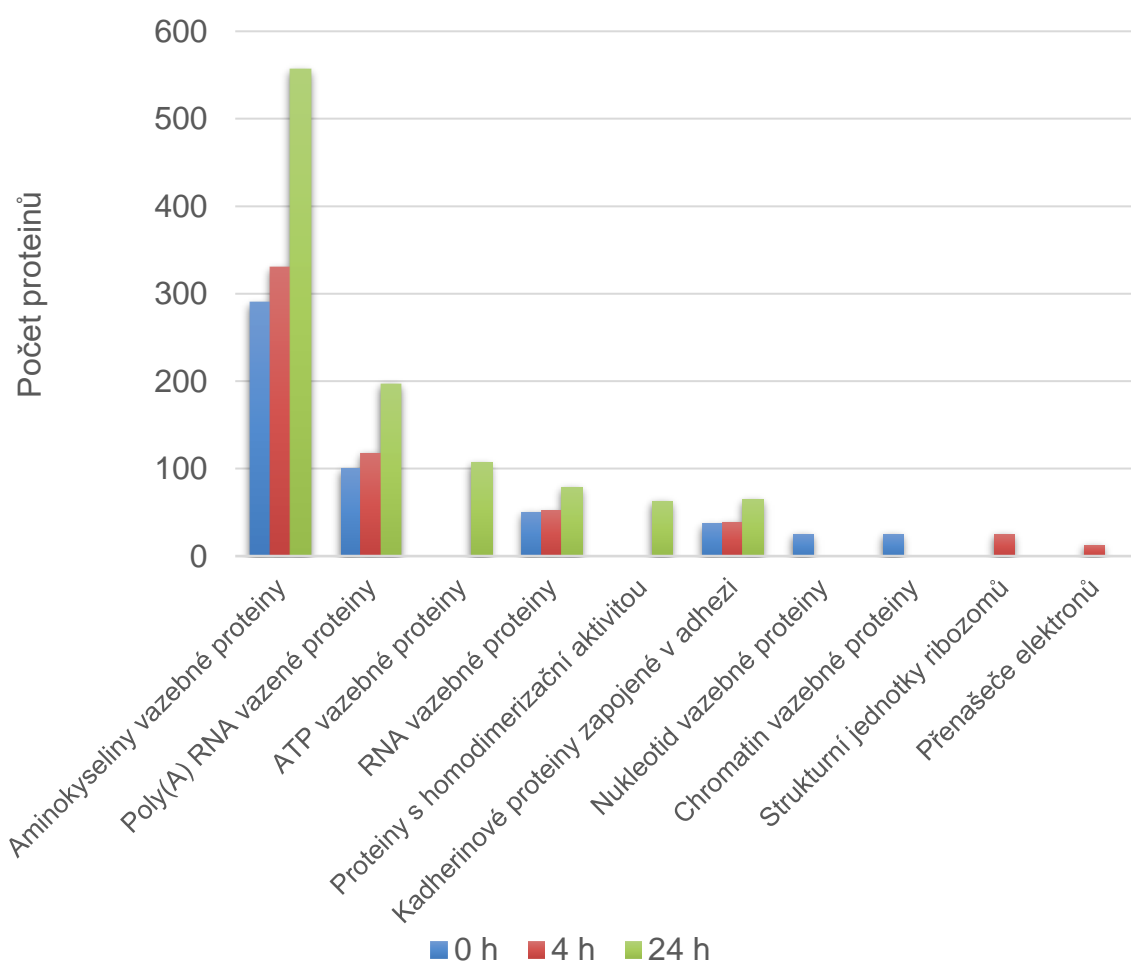
(http://www.gasos.cz/uploads/DUMICI/BOT/1.%20VY_32_INOVACE_BOT.1%20%20Eukaryotick%C3%A1%20bu%C5%88ka.pptx)



Graf č. 15: Počty degradovaných proteinů identifikovaných ve vzorcích s 0, 4 a 24hodinovou inkubací po *in vitro* 5 Jcm⁻² ZnPc PDT v koncentraci EC50 na HeLa buňkách z hlediska buněčné lokalizace (G0 terms). Parametry nastavení analýzy v programu David 6.8: count – 2; $p < 0,001$. Bylo vybráno 7 nejhojněji zastoupených skupin. Degradované proteiny byly identifikovány na základě porovnání měřeného vzorku se vzorkem kontrolních buněk bez ozáření a fotosenzitivní látky.

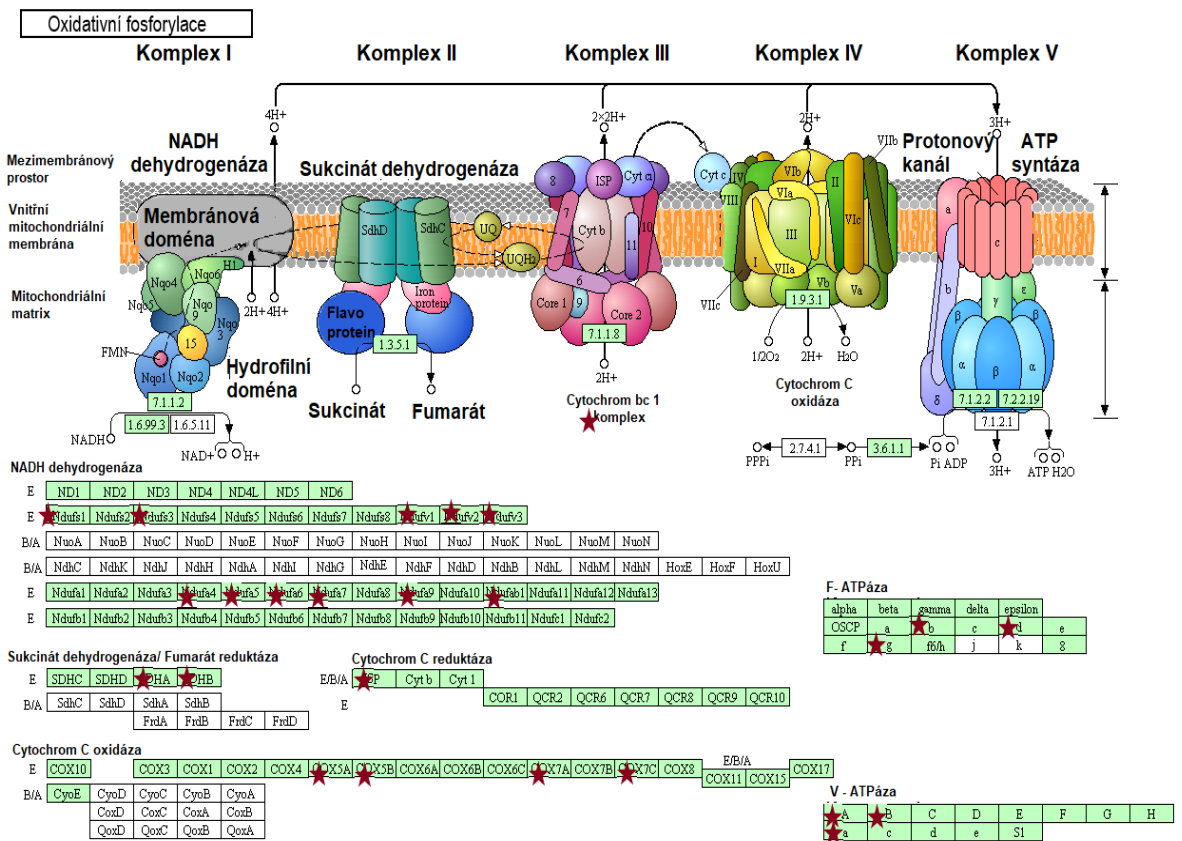
Z výsledků uvedených v grafu č. 15 vyplývá, že po *in vitro* 5 Jcm⁻² ZnPc fotodynamické terapii v koncentraci EC50 bylo nejvíce degradovaných proteinů s buněčnou lokalizací v cytoplazmě. Nicméně ve všech testovaných vzorcích jsou hojně zastoupeny i skupiny degradovaných proteinů s buněčnou lokalizací např. v cytozolu, jádře či extracelulárním exosomu. Při sledování změn v různých časových odstupech po terapii je patrné, že se nemění zastoupení jednotlivých skupin, avšak dochází k výrazným změnám v počtu degradovaných proteinů, přičemž je patrná vzrůstající tendence počtu degradovaných proteinů. Při porovnání vzorku s inkubační dobou 4 hodiny od terapie se vzorkem

sesbíraných buněk bezprostředně po terapii není zvýšení počtu degradovaných proteinů tak výrazné (od 9 % (membrány) do 27 % (cytoplazma)), ale při porovnání vzorku sesbíraných buněk bezprostředně po terapii se vzorkem s inkubační dobou 24 hodin po terapii dochází ve všech skupinách k výraznému nárůstu počtu degradovaných proteinů od 75 % (jádro) do 128 % (mitochondrie).



Graf č. 16: Počty degradovaných proteinů identifikovaných ve vzorcích s 0, 4 a 24hodinovou inkubací po *in vitro* 5 Jcm⁻² ZnPc PDT v koncentraci EC50 z hlediska molekulární funkce (G0 terms). Parametry nastavení analýzy v programu David 6.8: count – 2; $p < 0,001$. Z výsledků bylo vybráno 6 nejhojněji zastoupených skupin proteinů. Degradované proteiny byly identifikovány na základě porovnání měřeného vzorku se vzorkem kontrolních, neovlivněných buněk.

Z výsledků uvedených v grafu č. 16 vyplývá, že ve všech analyzovaných vzorcích tvořily nejhojněji zastoupenou skupinu degradovaných proteinů aminokyseliny vazebné proteiny, dále poly(A) RNA vazebné proteiny, RNA vazebné proteiny a kadherinové proteiny zapojené v adhezi. Ve vzorku buněk sesbíraných bezprostředně po *in vitro* 5 Jcm⁻² ZnPc PDT v koncentraci EC50 byla zjištěna dále absence proteinů, které se váží na chromatin a účastní se epigenetických změn a modulace genové exprese. Ve vzorku buněk sesbíraných 4 hodiny po PDT byl pozorován v porovnání se vzorkem s inkubací 0 h výraznější úbytek proteinů, které fungují jako strukturní jednotky ribozomů, nezbytných pro translaci, při níž dochází přepisu RNA do polypeptidového řetězce. Dále byla zjištěna absence proteinů zapojujících se do dýchacího řetězce a tvorby ATP (schematické znázornění oxidativní fosforylace a proteinů, jejichž absence byla zjištěna 4 hodiny po terapii, je zobrazeno na obr. č. 23). ATP neboli adenosintrifosfát je důležitý nukleotid, jež má zcela zásadní funkci ve všech známých buňkách. Při rozkladu ATP na ADP dochází k uvolnění velkého množství energie, která je následně využita prakticky ve všech buněčných pochodech (např. vnitrobuněčný transport, tvorba RNA a proteinů atd.). Poškození tvorby ATP má tedy zásadní dopad na buňku a její přežití. Ve vzorku buněk sesbíraných 24 hodin po 5 Jcm⁻² ZnPc PDT dochází v porovnání se vzorkem s inkubací 4 h po terapii k úbytku proteinů, které se na ATP váží (ATP vazebných proteinů), a které v buňce slouží jako významné koenzymy a enzymové regulátory (NAD kinázy, DEAD-box helikázy, adenosin kináza (ADK), atd.).



Obr. č. 23: Schématické znázornění oxidativní fosforylace. ★ znázorňuje proteiny, jež byly identifikovány v kontrolním vzorku, avšak ve vzorku buněk sesbíraných 4 hodiny po 5 Jcm⁻² ZnPc PDT v koncentraci EC₅₀ již nalezeny nebyly. Schéma bylo vytvořeno pomocí webového rozhraní David 6.8. (<https://david.ncicrf.gov/>).

NADH dehydrogenáza (též komplex I) je velký enzymatický komplex, který je prvním článkem v tzv. dýchacím řetězci buněčného dýchání. Hraje tedy zásadní roli ve vytváření tzv. protonového gradientu napříč vnitřní membránou mitochondrií, což následně umožňuje syntézu ATP. 4 hodiny po 5 Jcm⁻² ZnPc PDT při EC₅₀ byla zjištěna absence proteinů: NADH: ubichinon oxidoreduktázová podjednotka S1, S3, V1, V2, V3, podjednotky alfa 4, 5, 6, 7, 9; beta 1 a 6.

Sukcinátdehydrogenáza (též komplek II) je enzymatický komplex, který katalyzuje oxidaci sukcinátu na fumarát za současné redukce ubichinonu na ubichinol. Je tedy řazena mezi oxidoreduktázy. Celý komplex je navázán

na vnitřní straně vnitřní membrány mitochondrií a obsahuje kovalentně navázaný koenzym FAD. FAD se díky oxidaci sukcinátu na fumarát redukuje na FADH a následně vstupuje do dýchacího řetězce. Sukcinátdehydrogenáza je tedy jedním z enzymů citrátového cyklu, ale zároveň má právě přímé napojení na další fáze buněčného dýchání – proto je jediným enzymem citrátového cyklu, který není volně v mitochondriální matrix, ale na membráně. 4 hodiny po 5 Jcm⁻² ZnPc PDT při EC50 byla zjištěna absence flavoproteinových podjednotek A a B.

Cytochrom c reduktáza (též komplex III) je enzymový komplex který přijme elektrony z redukovaného CoQ a předá je (přes dva cytochromy a FeS klaster) na další mobilní přenašeč elektronů – cytochrom c. 4 hodiny po 5 Jcm⁻² ZnPc PDT při EC50 byla zjištěna absence Rieskeho Fe-S polypeptidu 1 a cytochromu b.

Cytochrom c oxidáza (též komplex IV nebo cytochrom aa₃ komplex) je enzymatický membránový komplex oxidující cytochrom c a využívající energii k tvorbě protonového gradientu. Představuje velmi významný článek tzv. dýchacího řetězce. 4 hodiny po 5 Jcm⁻² ZnPc PDT při EC50 byla zjištěna absence proteinových podjednotek 5A, 5B, 7A a 7C.

V-ATPáza (V₁-V₀ ATPáza či též vakuolární H⁺-ATPáza) je ATPázová pumpa vyskytující se v buňkách všech eukaryotických organismů. Přenáší protony ("vodíkové kationty") přes buněčné membrány dovnitř různých vnitrobuněčných váčků či přes cytoplazmatickou membránu, čímž je okyseluje. Okyselení obsahu těchto váčků je zásadní pro správný průběh tzv. váčkového transportu a reguluje takové děje, jako je endocytóza, buněčná signalizace, vyměšování hormonů či uvolňování neuropřenašečů. 4 hodiny po 5 Jcm⁻² ZnPc PDT při EC50 byla zjištěna absence proteinových podjednotek A, B1 a a1.

F₀-F₁ ATPáza neboli **ATP syntáza**, je specifická pro vnitřní membránu mitochondrií. Na rozdíl od ostatních protonových pump propouští protony pasivně po směru jejich gradientu, není to tedy pumpa v pravém slova smyslu. energii procházejících protonů využívá k syntéze ATP. 4 hodiny po 5 Jcm⁻² ZnPc PDT při EC50 byla zjištěna absence proteinových podjednotek B1, D a G.

6 DISKUZE

V této dizertační práci byl sledován *in vitro* vliv fotodynamické terapie s využitím dvou derivátů ftalocyaninů na změny životnosti u nádorové linie HeLa (karcinom děložního čípku) a MCF7 (adenokarcinom prsu) a nenádorové linie BJ (lidské fibroblasty) a HaCat (lidské kožní keratinocyty). Ačkoliv je téma dizertační práce koncipováno jako analýza účinků *in vitro* terapie na nádorové buněčné linie, byly do analýzy vlivu terapie na životnosti buněk zařazeny i nenádorové buněčné linie vyskytující se obvykle v okolí nádorové tkáně (pojivové tkáně a pokožka). Důvodem pro zařazení těchto linií do experimentů je skutečnost, že jednou z hlavních nevýhod terapie je nespecifické vychytávání fotosenzitivní látky nenádorovými buňkami, což vede k poškození i zdravé tkáně, přičemž jsou v současné době tendence hledat takovou látku, která by zdravé tkáně zasahovala co nejméně (Zhang *et al.*, 2018).

In vitro analýza účinku terapie na životnost buněk byla provedena pomocí MTT testu. Z výsledků je patrné, že 5 Jcm⁻² PDT využívající zinečnatý derivát ftalocyaninu je nejúčinnější na buněčné linii karcinomu děložního čípku HeLa, kdy hodnota EC50 je rovna hodnotě 0,03 μM. U nenádorových buněčných linií byla hodnota EC50 třikrát (BJ) respektive šestkrát (HaCat) vyšší. V případě buněčné linie MCF7 (adenokarcinom prsu) byla stanovena hodnota EC50 patnáctkrát vyšší než u buněčné linie HeLa, přičemž tato koncentrace je také vyšší než u buněk nenádorových, což znamená, že by v případě terapie tohoto druhu karcinomu mohlo dojít ve velké míře k nespecifickému vychytávání fotosenzitivní látky nenádorovými buňkami, a tudíž k jejich rozsáhlému poškození. Z tohoto důvodu byla tato terapie na buňkách adenokarcinomu prsu v *in vitro* podmínkách zhodnocena jako neperspektivní.

Na všech buněčných liniích byla provedena i 5 Jcm⁻² fotodynamická terapie využívající nekovový derivát ftalocyaninu (2HPc). Z výsledků však vyplývá, že tato fotosenzitivní látka je v porovnání se zinečnatým derivátem u všech testovaných buněčných linií mnohem méně účinná (hodnota EC50 přibližně třicetkrát vyšší u HeLa a desetkrát u BJ), přičemž u buněčných linií HaCat a MCF7 byla hodnota EC50 dokonce vyšší než 10 μM. Toto zjištění je

v souladu se závěry Josefsenové a Boylea (2008), kteří uvádějí, že fotosenzitivní látky, které mají ve své struktuře diamagnetický kov jako např. zinek, generují v porovnání s nekovovými deriváty velké kvantové tripletové výtěžky a velké množství singletního kyslíku, díky čemuž jsou potenciálně více účinné a vhodné pro fotodynamickou terapii.

Vzhledem k výše uvedeným výsledkům byla pro další analýzy vybrána buněčná linie karcinomu děložního čípku HeLa. Pro tuto buněčnou linii byla hledána optimální kombinace koncentrace použitého fotosensitizeru a plošné hustoty světelné energie. Z tohoto důvodu byla provedena i 1 Jcm⁻² ZnPc PDT, avšak dle zjištěných výsledků při této terapii dosahovala hodnota EC50 v porovnání s 5 Jcm⁻² ZnPc PDT 30krát vyšších hodnot. Toto zjištění je v souladu se závěry Castana *et al.* (2005), kteří uvádějí, že míra destrukce buněk přímo souvisí s koncentrací fotosenzitivní látky a plošnou hustotou světelné energie.

Na základě výše uvedených výsledků byla pro podrobnější *in vitro* analýzu účinku vybrána 5 Jcm⁻² ZnPc fotodynamická terapie karcinomu děložního čípku (HeLa). Na této linii bylo při koncentraci EC50 provedeno měření produkce reaktivních kyslíkových radikálů vznikajících při reakcích I. i II. typu, detekce změn cytoskeletální struktury pomocí mikroskopie atomárních sil a konfokální mikroskopie, detekce změn mitochondriálního membránového potenciálu pomocí JC - 1 sondy a detekce poškození DNA pomocí kometové analýzy. Dále byly studovány změny proteinového komplexu buňky pomocí kapilární chromatografie a tandemové hmotnostní spektrometrie s ESI ionizací.

Při měření produkce reaktivních kyslíkových radikálů bylo zjištěno, že dochází ke zvýšené produkci kyslíkových radikálů vznikajících zejména reakcí I. typu. Ačkoliv se obecně jako primární činitel fotodynamické terapie považuje singletní kyslík, který vzniká reakcí II. typu, většina fotosenzitivních látek způsobuje oba typy reakcí a tyto reakce spolu soupeří. V případě 5 Jcm⁻² ZnPc PDT tedy zřejmě dochází ve velké míře k reakci I. typu, jejímiž produkty jsou zejména H₂O₂, superoxidový radikál, který může v buňce reagovat s oxidem dusným za vzniku vysoce reaktivních peroxinitritů, apod. Toto zjištění je v souladu i s výsledky z analýzy změn hladin vybraných proteinů zapojených v odpovědi buňky na oxidační stres, kdy po 4 hodinách po terapii bylo zjištěno

zvýšení hladiny proteinu peroxiredoxin 6, což je specifická peroxidáza zodpovědná za redukci hydrogen peroxidu na vodu a alkohol. Bylo zjištěno, že antioxidační aktivita tohoto proteinu může hrát hlavní roli v opravě lipidových peroxidací v buněčné membráně a přežití buňky (Lien *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015; Fisher *et al.*, 2018). Bezprostředně po terapii bylo zjištěno výrazné zvýšení hladiny proteinu superoxid dismutáza 1, což je protein, který účinně zháší superoxidový radikál a přeměňuje jej na méně toxický peroxid vodíku. Dále byla ve vzorku buněk sesbíraných 24 hodin po terapii detegována zvýšená hladina proteinu thioredoxinu, což je protein, který má důležitou roli v reverzibilní S-nitrosylaci cysteinových cílů a také přispívá k regulaci NO v buňkách, díky čemuž může být v buňce regulována reakce superoxidového radikálu s oxidem dusným za vzniku vysoce reaktivních peroxinitritů (Pillay *et al.*, 2011; Hanschmann *et al.*, 2013; Greetham *et al.*, 2010).

Z výsledků měření změn hladin proteinů zapojených v odpovědi buňky na oxidační stres je patrné, že u ostatních analyzovaných proteinů ke zvýšení hladiny nedošlo, resp. byly sníženy. Gille *et al.* (1988) a Porta C. *et al.* (1996) pozorovali zvýšenou citlivost HeLa buněk k oxidačnímu stresu, přičemž výsledky z analýzy změn hladin proteinů mohou naznačovat její příčinu.

V této dizertační práci byly dále studovány *in vitro* účinky 5 Jcm⁻² ZnPc PDT v koncentraci EC50 na cytoskeletální strukturu HeLa buněk. Z výsledků topografických změn z AFM analýzy vyplývá, že dochází k signifikantním změnám výšky HeLa buněk po terapii. Rozdíl v organizaci cytoskeletální struktury byl pozorován i při vizualizaci této struktury pomocí Alexa Fluor 532 Phalloidinu, kdy je po terapii patrné přeuspořádání mikrofilamentární struktury. Z výsledků proteinové analýzy vyplývá, že v případě proteinů aktin beta, aktin gama 1 a F-aktin nedošlo v různých časových odstupech k výraznějším změnám v jejich hladinách. V případě ARPC2 aktin homologního proteinu došlo k prudkému poklesu hladiny tohoto proteinu ve vzorku a po 24 hodinách po terapii došlo ke snížení jeho hladiny o 56 %. Z výsledků lze tedy usoudit, že ačkoliv hladiny proteinů aktinové povahy byly změněny minimálně, hladina proteinu ARPC2, který odpovídá za jejich polymerizaci, byla snížena o více než polovinu, a tudíž v důsledku této skutečnosti patrně došlo ke změnám v cytoskeletálním aparátu. Tato zjištění odpovídají závěrům několika autorů,

kteří také pozorovali reorganizaci cytoskeletálního aparátu po fotodynamické terapii za použití několika různých fotosenzitivních látek (Pacheco-Soares *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2004; Tsai *et al.*, 2009; Juarranz *et al.*, 2005; Villanueva *et al.*, 2003; Tsai *et al.*, 2005). Vzhledem ke skutečnosti, že cytoskeletální struktura zajišťuje v buňce např. její dělení, tvar, transport vezikul a buněčných komponent, je výrazné narušení této struktury pro buňku obvykle letální. Destabilizace cytoskeletálního aparátu je tudíž pravděpodobně jedním z faktorů způsobujících po *in vitro* 5 Jcm⁻² ZnPc PDT úhyn HeLa buněk.

Tvorba protonového gradientu napříč mitochondriální membránou je zásadní událostí pro zachování energie, která kombinuje kabohydrátové a lipidové oxidace s produkcí ATP. Zachování a podpora membránového potenciálu je nezbytná pro fungování mitochondrií a jakákoliv změna vyvolaná jakoukoliv škodlivou příčinou, jako například zvýšení množství kyslíkových radikálů, může poškodit jejich funkci (Wang *et Youle*, 2009; Postiglione *et al.*, 2015; Ehlers *et al.*, 1999). V této dizertační práci byla sledována změna membránového potenciálu pomocí JC-1 fluorescenční sondy. Z výsledků je patrné, že 24 hodin po terapii u buněk ovlivněných 5 Jcm⁻² ZnPc PDT v koncentraci EC50 došlo ke změně JC-1 fluorescenčního poměru v porovnání s neovlivněnými buňkami o přibližně 65 %. Bylo doloženo, že v buněčných kulturách existuje vztah mezi mitochondriální dysfunkcí a poškozením proteazomu. Konkrétně je proteazomová funkce ovlivněna prostřednictvím redukce mitochondriálně závislých ATP syntéz. Bylo zjištěno, že mitochondriální selhání je primární událostí, po které následuje poškození proteazomu (Postiglione *et al.*, 2015; Hsieh *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2009). Tyto skutečnosti jsou v souladu s výsledky této dizertační práce, kdy bylo zjištěno, že hladiny napěťově řízeného kanálového proteinu byly bezprostředně po terapii v porovnání s kontrolními buňkami zvýšené, avšak pravděpodobně vlivem poškození mitochondriální membrány došlo v dalších časových odstupech po terapii k prudkému poklesu jeho hladin v jednotlivých vzorcích. V případě dynamin příbuzného proteinu OPA1 byl bezprostředně po terapii detegován mírný pokles (přibližně 20 %) hladiny ve vzorku, přičemž v dalších časových odstupech po terapii již další pokles detegován nebyl. Dynamin příbuzný protein OPA1 je protein, mezi jehož funkce patří udržování integrity mitochondriálního genomu (Elachouri *et al.*, 2011).

Na základě těchto skutečností lze tedy usoudit, že v důsledku *in vitro* 5 Jcm⁻² ZnPc PDT v koncentraci EC50 dochází u HeLa buněk k poškození mitochondriální membrány, nicméně k narušení funkce udržování integrity mitochondriálního genomu pravděpodobně dochází zcela minimálně.

V této dizertační práci byl sledován vliv *in vitro* 5 Jcm⁻² ZnPc PDT v koncentraci EC50 na DNA HeLa buněk. Při analýze změn hladin vybraných proteinů zapojených v opravě DNA bylo zjištěno, že 4 hodiny po terapii došlo v porovnání se vzorkem buněk sesbíraných bezprostředně po terapii ke zvýšení hladin proteinů DDB1 a poly [ADP-ribóza] polymerázy 1, což jsou proteiny zapojené v detekci a spouštění drah vedoucích k opravám DNA, avšak 24 hodin po terapii bylo detegováno snížení hladin obou těchto proteinů. V případě proliferčního jaderného antigenu, který má klíčovou roli v odpovědi na poškození DNA prostřednictvím koordinace replikace s opravami DNA a drahami tolerance poškození DNA, došlo k postupnému poklesu jeho hladiny v jednotlivých vzorcích. Protein DDB1 je důležitý pro udržování genomové integrity, přičemž u buněk s defektním DDB1 proteinem dochází k hromadění dvouvláknových zlomů (Lovejoy *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2004, <http://www.uniprot.org/uniprot/Q16531>). Tato skutečnost koreponduje se závěry z kometové analýzy, což je metoda umožňující detekci míry fragmentace DNA, kdy bylo zjištěno, že 24 hodin po této terapii došlo v porovnání s kontrolou k nárůstu množství fragmentované DNA ze 6,1 na 29,6 %.

V rámci této dizertační práce byla provedena i analýza proteinového aparátu v různých časových intervalech po terapii z hlediska buněčné lokalizace a molekulární funkce identifikovaných proteinů. V případě analýzy proteinového aparátu z hlediska buněčné lokalizace bylo hodnoceno 7 nejhojněji zastoupených skupin degradovaných proteinů. Z výsledků vyplývá, že po 5 Jcm⁻² ZnPc fotodynamické terapii v koncentraci EC50 bylo nejvíce degradovaných proteinů s buněčnou lokalizací v cytoplazmě, cytozolu, jádře, extracelulárním exosou, nukleoplazmě, membránách a mitochondriích, a to ve všech testovaných vzorcích (0, 4 a 24 h inkubace po terapii). Tyto výsledky jsou v souladu se závěry několika studií ftalocyaninových fotosenzitivních látek, kdy bylo zjištěno, že se ftalocyaniny neakumulují jen v jedné buněčné organeli, ale zasahují více buněčných struktur (Dougherty *et al.*, 1998; Wood *et al.*,

1997). V různých časových odstupech dochází pouze k nárůstu počtu degradovaných proteinů, což poukazuje na skutečnost, že jednotlivé vzorky byly ovlivněny pouze použitou terapií a kultivačními podmínkami, přičemž pravděpodobně nedošlo k ovlivnění vnějším zásahem (např. chybou při manipulaci se vzorky, špatnou kultivací buněk), který by nebyl spojen s použitou terapií. V případě takového vnějšího ovlivnění by pravděpodobně došlo k výrazným změnám v zastoupení jednotlivých skupin, popřípadě k výraznějšímu nárůstu počtu degradovaných proteinů mezi skupinami buněk sesbíraných bezprostředně a po 4 hodinách po terapii, a to vzhledem ke skutečnosti, že reakce buňky na stres a spouštění obranných a reparačních mechanismů, popř. apoptózy probíhá v delším časovém úseku (např. apoptóza trvá 6–24 hodin v závislosti na typu buněk) (Saraste, 1999). Tyto skutečnosti jsou v souladu s výsledky dizertační práce, kdy se počet degradovaných proteinů v případě vzorku buněk sesbíraných bezprostředně a po 4 hodinách od terapie zvýšil málo (od 9 % (membrány) do 27 % (cytoplazma)), avšak po 24 hodinách po terapii již byl patrný výrazný nárůst počtu degradovaných proteinů od 75 % (jádro) do 128 % (mitochondrie) v porovnání se vzorkem buněk sesbíraných bezprostředně po terapii.

Dále byly sledovány změny 6 největších skupin degradovaných proteinů v různých časových odstupech po 5 Jcm⁻² ZnPc PDT v koncentraci EC₅₀ na HeLa buňkách z hlediska jejich molekulární funkce. Bezprostředně po terapii bylo detegováno například poškození nukleotid a chromatin vazebných proteinů účastnících se epigenetických změn a modulace genové exprese. Ve vzorku s inkubační dobou 4 hodiny po terapii byla v porovnání s kontrolou zjištěna absence proteinů zapojených v elektron – transportním řetězci a tvorbě ATP (přenašečů elektronů), které slouží jako zdroj energie pro téměř všechny buněčné procesy (např. membránový transport, biosyntéza proteinů, syntéza RNA atd.). Pokles hladiny těchto proteinů vede patrně k dalším změnám, které byly pozorovány ve vzorku buněk sesbíraných 24 hodin po terapii, a to k poklesu hladin ATP vazebných proteinů, které slouží např. jako významné koenzymy a enzymové regulátory (NAD kinázy, DEADbox helikázy, adenosin kináza (ADK), atd.). Vzhledem k tomu, že molekuly ATP a NAD(P)H jsou velice důležitými aktivovanými nosiči v buňce, které se účastní mnoha biosyntetických reakcí, dochází při jejich poškození k narušení buněčného anabolického –

katabolického systému a tím i k narušení zásadních životních buněčných pochodů s následným úhynem buňky (Alberts, 1998).

7 ZÁVĚR

Tato dizertační práce je zaměřena na *in vitro* studium účinku fotodynamické terapie s využitím dvou derivátů ftalocyaninu na vybrané buněčné linie (MCF7, BJ, HeLa a HaCat). U všech buněčných linií byl proveden MTT test životnosti s detekcí hodnoty EC50. Z výsledků testů životnosti vyplývá, že fotosenzitivní látka obsahující ve své struktuře atom zinku je v porovnání s nekovovým derivátem ftalocyaninu mnohem účinnější na všech testovaných buněčných liniích. Zinečnatý derivát vykazuje největší účinnost na buněčné linii karcinomu děložního čípku, a to jak v porovnání s nenádorovými buněčnými liniemi HaCat a BJ, tak i s linií nádorovou MCF7, u níž je naopak ze všech zkoumaných linií účinek nejmenší. Vzhledem k závěrům testů životnosti na nenádorových buňkách můžeme konstatovat, že v porovnání s buněčnou linií karcinomu děložního čípku, jsou tyto buněčné linie zasaženy terapií méně.

Pro další analýzy byla vybraná buněčná linie karcinomu děložního čípku a zvolena optimální kombinace koncentrace fotosenzitizéru a plošné hustoty světelné energie. Na této buněčné linii bylo při 5 Jcm^{-2} a koncentraci EC50 (30 nm) provedeno měření produkce ROS, analýza změn mitochondriálního membránového potenciálu, cytoskeletu, míry poškození DNA a analýza změn proteinového aparátu pomocí kapilární chromatografie a tandemové hmotnostní spektrometrie s ESI ionizací. Z výše uvedených výsledků vyplývá, že *in vitro* 5 Jcm^{-2} ZnPc fotodynamická terapie v koncentraci EC50 zasahuje v buňkách karcinomu děložního čípku zásadní buněčné struktury (mitochondrie, DNA, cytoskeletální aparát) a vede k narušení základních buněčných pochodů v buňce (např. tvorba ATP) vedoucích k buněčné smrti. Z výsledků z analýzy proteinového aparátu z hlediska molekulární funkce a buněčné lokalizace degradovaných proteinů je možno pozorovat účinek terapie na jednotlivé buněčné struktury a s nimi související pochody v buňce v závislosti na časovém odstupu po terapii.

Na základě těchto zjištění je možno označit testovaný zinečnatý derivát ftalocyaninu za potenciálně perspektivní pro analýzu *in vivo* účinků na karcinom děložního čípku na zvířecích modelech, popř. pro jeho zařazení do klinických studií.

8 SEZNAM ZKRATEK

- ALA – 5-aminolevulinová kyselina
- AMD – s věkem spojená makulární degenerace
- ATP – adenosint trifosfát
- Cdk – cyklindependentní kináza
- CW – kontinuální vlna (Continuos Wave)
- DNA – deoxyribonukleová kyselina
- ER – endoplazmatické retikulum
- ESI – Elektrosprejová ionizace
- FAD – Flavinadenindinukleotid
- FDA – Food and Drug Administration (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv USA)
- GA – Golgiho aparát
- HDL – vysokodenzitní lipoprotein
- HpD – hematoporfyrinový derivát
- Hsp – heat shock proteiny (stresové faktory)
- LDL – nízkodenzitní lipoprotein
- NAD – nikotinamidadenindinukleotid
- PDT – fotodynamická terapie
- PDT – fotodynamická terapie
- PpIX – protoporfyrin IX
- PRX – peroxiredoxin
- PS – fotosenzitivní látka
- RNA – ribonukleová kyselina
- ROS – reaktivní kyslíkové radikály
- SOD – superoxid dismutáza
- TX – thioredoxin

9 POUŽITÉ ZDROJE

- 1) Abdel-Hady ES *et al.*: Immunological and viral factors associated with the response of vulval intraepithelial neoplasia to photodynamic therapy. *Cancer Res.* 2001;61:192–196.
- 2) Abels C: Targeting of the vascular system of solid tumours by photodynamic therapy (PDT). *Photochem Photobiol Sci.* 2004;3:765–771.
- 3) Afonso SC *et al.*: The photodynamic and non-photodynamic actions of porphyrins. *Brazil J Med Biol Res.* 1999;32:255-26.
- 4) Agostinis P *et al.*: Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA: A cancer Journal for Clinicians.* 2011; 61(4):250-28.
- 5) Agostinis P *et al.*: Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. *Photochem Photobiol Sci.* 2004 Aug;3(8):721-9.
- 6) Alberts B *et al.*: *Základy buněčné biologie*, 2.vydání, Espero Publishing, s.r.o., 1998, 740 s, ISBN 80-902906-2-0.
- 7) Allison RR *et al.*: Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodyn Ther.* 2004;1(1):24-42.
- 8) Allison RR *et al.*: Sibata CH: Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2010;7(2): 61–75.
- 9) Al-Mutairi DA *et al.*: Inactivation of metabolic enzymes by photo-treatment with zinc meta-N-methylpyridylporphyrin. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1770:1520-1527.
- 10) Bazylińska U *et al.*: The effect of anionic dicephalic surfactants on fabrication of varied-core nanocarriers for sustained release of porphyrin photosensitizers. *J Photochem Photobiol B.* 2017;166:169-179.
- 11) Beckman JS *et al.*: Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite – implications for endothelial injury from nitric-oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87:1620-1624.
- 12) Benov L *et al.*: Protein damage by photo-activated Zn(II) N-alkylpyridylporphyrins. *Amino Acids* 2012; 42:117-128.
- 13) Benov L: Photodynamic therapy: current status and future directions. *Med Princ Pract.* 2015;24 Suppl 1:14-28.

- 14) Betrouni N *et al.*: Real-time light dosimetry for intra-cavity photodynamic therapy: Application for pleural mesothelioma treatment. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2017;18:155-161.
- 15) Bisland SK *et al.*: Metronomic photodynamic therapy as a new paradigm for photodynamic therapy: rationale and preclinical evaluation of technical feasibility for treating malignant brain tumors. *Photochem Photobiol.* 2004; 80:22-30.
- 16) Brancalion L, Moseley H: Laser and non-laser sources for photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* 2002;17(3):173–186.
- 17) Bryk R *et al.*: Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins *Nature.* 2000;14:211-215.
- 18) Buggiani G *et al.*: Photodynamic therapy: off-label and alternative use in dermatological practice. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2008;5(2):134-8.
- 19) Buytaert E *et al.*: Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1776(1):86-107.
- 20) Canti G *et al.*: Photodynamic therapy and the immune system in experimental oncology. *Photochem Photobiol Sci.* 2002; 1:79–80.
- 21) Castano AC *et al.*: Mechanisms in photodynamic therapy: part two – cellular signalling, cell metabolism and modes of cell death *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2005;2(1):1-23.
- 22) Castano AP *et al.* Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2004;1(4):279-93.
- 23) Castano AP *et al.*: Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer.* 2006;6:535–45.
- 24) Castano P *et al.*: Mechanisms in photodynamic therapy: part two – cellular signalling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2005;2:1–23.
- 25) Cidlina A.: Syntéza kationických ftalocyaninů. Diplomová práce, 2011, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. 72 s.
- 26) Cole GW *et al.*: Photodynamic Therapy (PDT or Blue Light Therapy). 2016; [cit. 26.6.2019]. Dostupné z: www.medicinenet.com.

- 27) Comtois SL *et al.*: Role of the thioredoxin system and the thiol-peroxidases Tpx and Bcp in mediating resistance to oxidative and nitrosative stress in *Helicobacter pylori*. *Microbiology*. 2003;149:121-9.
- 28) Da Silva EF *et al.*: Intracellular singlet oxygen photosensitizers: on the road to solving problems of sensitizer degradation, bleaching and relocalization. *Integr Biol (Camb)*. 2016;8(2):177-93.
- 29) d'Alessandro N *et al.*: Reaction of superoxide with phenoxyl-type radicals. *J Chem Soc Perkin Trans II*.2000;1862-1867.
- 30) Das AB *et al.*: Reactions of superoxide with the myoglobin tyrosyl radical. *Free Radic Biol Med*. 2010;48:1540-1547.
- 31) Davids LM *et al.*: Hypericin phototoxicity induces different modes of cell death in melanoma and human skin cells. *J Photochem Photobiol B*. 2008;91(2-3):67-76.
- 32) Davies MJ: The oxidative environment and protein damage. *Biochim Biophys Acta* 2005;1703:93-109.
- 33) Detty MR *et al.*: Current Clinical and Preclinical Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy *J. Med. Chem.* 2004;47(16):3897–915.
- 34) Dougherty IJ *et al.*: Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst*.1998;90(12):889-905.
- 35) Dubuisson M *et al.*: Human peroxiredoxin 5 is a peroxynitrite reductase. *FEBS Lett*. 2004;571:161-165.
- 36) Dumoulin F.: Presentation of the different types and generations of photosensitizers. *Photosensitizers in Medicine, Environment, and Security*. Springer Netherlands, 2012, 664 s. ISBN 9401783314.
- 37) Ehlers RA *et al.*: Mitochondrial DNA damage and altered membrane potential ($\Delta\Psi$) in pancreatic acinar cells induced by reactive oxygen species. *Surgery*. 1999;2:148–155.
- 38) Elachouri G *et al.*: OPA1 links human mitochondrial genome maintenance to mtDNA replication and distribution. *Genome Res*. 2011;21(1):12-20.
- 39) Erkiert-Polguj A *et al.*: Light-emitting diodes in photodynamic therapy in non-melanoma skin cancers--own observations and literature review. *J Cosmet Laser Ther*. 2016;18(2):105-10.
- 40) Ethirajan *et al.*: Photosensitizers for Photodynamic Therapy and Imaging. *Advances in photodynamic therapy – Basic, Translational, and Clinical*.

Artech House,2008, 559 s. Editoři: Hamblin, MR; Mróz, P. ISBN-13: 978-1-59693-277-7.

- 41) Ferreira SDRM *et al.*: Analysis of mitochondria, endoplasmic reticulum and actin filaments after PDT with AIPcS(4). *Lasers Med Sci.* 2044;18:207–12.
- 42) Fingar VH: Vascular effects of photodynamic therapy. *J. Clin. Laser Med Surg.* 1996;14:323–8.
- 43) Fisher AB *et al.* Peroxiredoxin 6 phospholipid hydroperoxidase activity in the repair of peroxidized cell membranes. *Redox Biol.* 2018;14:41–46.
- 44) Fridovich I: Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol* 1998; 201:1203-1209. Fee JA: Is superoxide important in oxygen poisoning? *Trends Biochem Sci.* 1982;7:84-86.
- 45) Garrison WM: Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. *Chem Rev.* 1987;87:381-398.
- 46) Gille JJ *et al.*: Effect of normobaric hyperoxia on antioxidant defenses of HeLa and CHO cells. *Free Radic Biol Med.* 1988;4(2):85-91.
- 47) Gola GF *et al.*: Synthesis of chemically diverse esters of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy via the multicomponent Passerini reaction. *RSC Adv.* 2016;6:89492-89498.
- 48) Gollnick SO *et al.*: Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation. *Br J Cancer.* 2003;42:1772–9.
- 49) Greetham *et al.*: Thioredoxins function as deglutathionylase enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Biochem.* 2010; 11:3.
- 50) Hamblin, MR: PDT for cardiovascular disease. *Advances in photodynamic therapy – Basic, Translational, and Clinical.* Artech House,2008, 559 s. Editoři: Hamblin, MR; Mróz, P. ISBN-13: 978-1-59693-277-7.
- 51) Hamblin MR *et al.*: Nanotechnology for photodynamic therapy: A perspective from the Laboratory of Dr. Michael R. Hamblin in the Wellman Center for Photomedicine at Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School. *Nanotechnol Rev.* 2015;4(4):359-372.
- 52) Hanschmann EM *et al.* Thioredoxins, Glutaredoxins, and Peroxiredoxins—Molecular Mechanisms and Health Significance: from Cofactors to Antioxidants to Redox Signaling. *Antioxid Redox Signal.* 2013; 19(13):1539–605.

- 53) Haqq C *et al.*: The gene expression signatures of melanoma progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(17):6092-7.
- 54) Hempstead J *et al.*: Low-cost photodynamic therapy devices for global health settings: Characterization of battery-powered LED performance and smartphone imaging in 3D tumor models. *Sci Rep.* 2015;5:10093.
- 55) Henderson BW *et al.*: Relationship of tumor hypoxia and response to photodynamic treatment in an experimental mouse tumor. *Cancer Res.* 1987;47:3110–4.
- 56) Hopper C: Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer. *Lancet Oncol.* 2000;1:212-9.
- 57) Hsieh YJ *et al.*: Subcellular localization of Photofrin® determines the death phenotype of human epidermoid carcinoma A431 cells triggered by photodynamic therapy: When the plasma membranes are the main targets. *J Cell Physiol.* 2003;194:363–75.
- 58) Hu J *et al.*: Targeted ubiquitination of CDT1 by the DDB1-CUL4A-ROC1 ligase in response to DNA damage. *Nat Cell Biol.* 2004;6(10):1003-9.
- 59) Huang Y *et al.*: Anemonin is a natural bioactive compound that can regulate tyrosinase-related proteins and mRNA in human melanocytes. *J Dermatol Sci.* 2008; 49(2):115-23.
- 60) Huang Z *et al.*: Studies of a vascular-acting photosensitizer, Pd-bacteriopheophorbide (Tookad), in normal canine prostate and spontaneous canine prostate cancer. *Lasers Surg Med.* 2005;36:390–7.
- 61) Huang Z *et al.*: Photodynamic therapy for treatment of solid tumors – potential and technical challenges. *Technol Cancer Res Treat.* 2008;7(4):309-20.
- 62) Huie RE *et al.*: The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun.* 1993;18:195-9.
- 63) Chowdhary RK *et al.*: Correlation of photosensitizer delivery to lipoproteins and efficacy in tumor and arthritis mouse models; comparison of lipid-based and Pluronic® P123 formulations. *J Pharm Pharm. Sci.* 2003;6(2):198–204.
- 64) Imlay JA: The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nat Rev Microbiol* 2013; 11:443-54.

- 65) Jerjes W *et al*: The Surgical Palliation of Advanced Head and Neck Cancer using Photodynamic Therapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2010;22(9):785-91.
- 66) Josefren LB *et Boyle W*: Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. *Met Based Drugs*. 2008; 276109.
- 67) Juarranz A *et al*.: Photodynamic effects of the cationic porphyrin meso-tetra(4-N-methylpyridyl)porphine, on microtubules of HeLa cells. *J Photochem Photobiol B*. 2005;27(1):47–53.
- 68) Juarranz A *et al*: Photodamage induced by Zinc(II)- phthalocyanine to microtubules, actin, alpha-actinin and keratin of HeLa cells. *Photochem Photobiol*. 2001;73:283–9.
- 69) Juzeniene A *et Moan J*: The history of PDT in Norway Part one: Identification of basic mechanisms of general PDT. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2007;4(1):3-11.
- 70) Kataoka H *et al*: New photodynamic therapy with next-generation photosensitizers. *Ann Transl Med*. 2017;5(8):183.
- 71) Kessel D *et Oleinick NL*: Initiation of autophagy by photodynamic therapy. *Methods Enzymol* 2009; 453:1–16.
- 72) Kessel D *et al*: Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy. *Lasers Surg. Med*. 2006;38:482–8.
- 73) Kessel D: Photodynamic therapy: from the beginning. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2004;1(1):3-7.
- 74) Ketabchi A *et al*.: Induction of apoptotic cell death by photodynamic therapy in human kerationcytes. *Arch Oral Biol*.1998;43:143-9.
- 75) Kolarova H *et al*.: Assesment of cellular damage by inverted fluorescent microscopy. *Sci Tech Educ Microsci*. 2000;1:464-8.
- 76) Korbelik M *et al*.: Adjuvant treatment for complement activation increases the effectiveness of photodynamic therapy of solid tumors. *Photochem Photobiol Sci*. 2004;3:812–6.
- 77) Korbelik M *et al*.: The role of host lymphoid populations in the response of mouse EMT6 tumor to photodynamic therapy. *Cancer Res*. 1996;15:5647–52.
- 78) Korbelik M: Induction of tumor immunity by photodynamic therapy. *J Clin La ser Med Surg*. 1996;14:329–34.

- 79) Krosi G *et al.*: Induction of immune cell infiltration into murine SCCVII tumour by photofrin-based photodynamic therapy. *Br J Cancer*. 1995;71:549–55.
- 80) Kübler AC: Photodynamic therapy. *Medical Laser Application*. 2005; 20(1):37-45.
- 81) Kudinova NV *et Berezov TT*: Photodynamic therapy: search for ideal photosensitizer. *Biomed Khim*. 2009;55(5):558-69.
- 82) Lamch L *et al.*: Polymeric micelles for enhanced Photofrin II ® delivery, cytotoxicity and pro-apoptotic activity in human breast and ovarian cancer cells. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2014;11(4):570-85.
- 83) Li H *et al.*: Critical role of peroxiredoxin 6 in the repair of peroxidized cell membranes following oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2015;87:356-65.
- 84) Lien YC *et al.*: The roles of peroxidase and phospholipase A2 activities of peroxiredoxin 6 in protecting pulmonary microvascular endothelial cells against peroxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2012;16(5):440-51.
- 85) Lipson RL *et al.* (a): Hematoporphyrin derivative: a new aid for endoscopic detection of malignant disease. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1961;42:623-9.
- 86) Lipson RL *et al.* (b): The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *J Natl Cancer Inst*. 1961;26:1-11.
- 87) Liu JY *et al.*: *In vitro* photodynamic activities of zinc(II) phthalocyanines substituted with pyridine moieties. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2016;13:341-3.
- 88) Liu W *et al.*: PINK1 defect causes mitochondrial dysfunction, proteasomal deficit and α -synuclein aggregation in cell culture models of Parkinson's disease. *PLoS ONE*. 2009;4(2):e4597.
- 89) Lovejoy CA *et al.*: DDB1 Maintains Genome Integrity through Regulation of Cdt1. *Mol Cell Biol*. 2006;26(21):7977-90.
- 90) Lyman SV *et Hurst JK*: Rapid reaction between peroxonitrite ion and carbon dioxide: implications for biological activity. *J Am Chem Soc* 1995;117:8867-8.
- 91) Lyons M *et al.*: The effects of PDT in primary malignant brain tumours could be improved by intraoperative radiotherapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2012;9(1):40-5.

- 92) Mang, TS.: Lasers and light sources for PDT: past, present and future. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2004;1(1):43–8.
- 93) McCall K: Genetic control of necrosis – another type of programmed cell death. *Curr Opin Cell Biol.* 2010;22(6):882–8.
- 94) Medinas DB *et al*: The carbonate radical and related oxidants derived from bicarbonate buffer. *IUBMB Life.* 2007;59:255-62.
- 95) Miller JD *et al.*: Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc4: the case experience with preclinical mechanisitic and early clinical-translational studies. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007; 244(3):290-9.
- 96) Misiaszek R *et al.*: Oxidative DNA damage associated with combination of guanine and superoxide radicals and repair mechanisms via radical trapping. *J Biol Chem* 2004;279:32106-15.
- 97) Moan J *et* Peng Q: An outline of the hundred-year history of PDT. *Anticancer Res.* 2003;23(5A):3591-600.
- 98) Mroz P *et al.* Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers (Basel).* 2011;3(2):2516-39.
- 99) Mroz P *et al.*: Imidazole metalloporphyrins as photosensitizers for photodynamic therapy: role of molecular charge, central metal and hydroxyl radical production. *Cancer Lett* 2009;282:63-76
- 100) Nagy P *et al.*: Superoxide-mediated formation of tyrosine hydroperoxides and methionine sulfoxide in peptides through radical addition and intramolecular oxygen transfer. *J Biol Chem.* 2009;284:14723-33.
- 101) Nečas E *et al.*: *Obecná patologická fyziologie.* Nakladatelství Karolinum, Praha, 2009, 380 s. ISBN 978-80-246-1688-9.
- 102) Nowis D *et al.*: The influence of photodynamic therapy on the immune response. *Photodiag Photodyn Ther.* 2005;2:283–98.
- 103) Nowis D *et* Golab J: *Photodynamic Therapy and Oxidative Stress.* Advances in photodynamic therapy – Basic, Translational, and Clinical. Artech House, 2008, 559 s. Editoři: Hamblin, MR; Mróz, P. ISBN-13: 978-1-59693-277-7.
- 104) Nyman ES *et* Hynninen PH: Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B.* 2004;73:1–28.

- 105) O'Connor AE *et al.*: Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 2009;85(5):1053-74.
- 106) Oleinick *et al.*: Cell Killing by Photodynamic Therapy. *Advances in photodynamic therapy – Basic, Translational, and Clinical.* Artech House, 2008, 559 s. Editoři: Hamblin, MR; Mróz, P. ISBN-13: 978-1-59693-277-7.
- 107) Ongarora BG *et al.* Synthesis, spectroscopic, and cellular properties of α -pegylated cis-A2B2- and A3B-types ZnPcs. *J Porphyr Phthalocyanines.* 2014;18(10-11):1021-33.
- 108) Ormond AB *et Freeman HS*: Dye sensitizers for photodynamic therapy. *Materials (Basel).* 2013; 6(3):817-40.
- 109) Ostling O *et Johanson KJ*: Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984;30:291-8.
- 110) Pacheco-Soares C *et al.* Evaluation of photodynamic therapy in adhesion protein expression. *Oncol Lett.* 2014; 8(2): 714–8.
- 111) Palumbo G: Photodynamic therapy and cancer: a brief sightseeing tour. *Photodynamic therapy and cancer: a brief sightseeing tour. Expert Opin Drug Deliv.* 2007;4(2):131-48.
- 112) Pattison DI *et al.*: Photo-oxidation of proteins. *Photochem Photobiol Sci* 2012;11:38-53.
- 113) Pazos MDC *et Nader HB*: Effect of photodynamic therapy on the extracellular matrix and associated components. *Braz J Med Biol Res.* 2007;40(8):1025-35.
- 114) Peshenko IV *et Shichi H*: Oxidation of active center cysteine of bovine 1-Cys peroxiredoxin to the cysteine sulfenic acid form by peroxide and peroxyxynitrite *Free Radic Biol Med.* 2001;31(3):292-303.
- 115) Petřík I.: Analýza proteinových fosforylací proteomickými metodami. Olomouc, bakalářská práce. 2013. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, 62s.
- 116) Pillay SCh *et al.*: The logic of kinetic regulation in the thioredoxin systém. *BMC Syst Biol.* 2011;5:15.

- 117) Plaetzer K *et al.* The Modes of Cell Death Induced by PDT: An Overview. *Med Laser Appl.* 2003; 18(1):7-19.
- 118) Porta *et al.* Antioxidant enzymatic system and free radicals pathway in two different human cancer cell lines. *Anticancer Res.* 1996;16(5A):2741-7.
- 119) Postiglione I *et al.* Mitochondrial Malfunctioning, Proteasome Arrest and Apoptosis in Cancer Cells by Focused Intracellular Generation of Oxygen Radicals. *Int J Mol Sci.* 2015;16(9):20375–20391.
- 120) Radi R *et al.*: Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem.* 1991;266(7):4244-50.
- 121) Redmond RW: Photophysics and Photochemistry in Photodynamic Therapy. *Advances in photodynamic therapy – Basic, Translational, and Clinical.* Artech House,2008, 559 s. Editoři: Hamblin, MR; Mróz, P. ISBN-13: 978-1-59693-277-7.
- 122) Reiners JJ *et al.*: Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy. *Autophagy.* 2010;6(1):7–18.
- 123) Robertson CA *et al.* Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J Photochem Photobiol B.* 2009;96(1):1-8.
- 124) Roland CL *et al.*: Evidence-based surgical hypothesis: ICAM-1 expression determines malignant potential of cancer. *Surgery.* 2007;141(6):705-7.
- 125) Santonocito C *et al.*: Comparison between three molecular methods for detection of blood melanoma tyrosinase mRNA. Correlation with melanoma stages and S100B, LDH, NSE biochemical markers. *Clin Chim Acta.* 2005;362(1-2):85-93.
- 126) Saraste A: Morphologic criteria and detection of apoptosis. *Henz.* 1999;24(3):189-95.
- 127) Sasnauskiene A *et al.*: Apoptosis, autophagy and cell cycle arrest following photodamage to mitochondrial interior. *Apoptosis.* 2009;14(3): 276–86.
- 128) Shafirovich V *et al.*: The carbonate radical is a site-selective oxidizing agent of guanine in double-stranded oligonucleotides. *J Biol Chem.* 2001;276:24621-24626.

- 129) Sharma KS *et al.*: Photodynamic Therapy for Cancer and for Infections: What Is the Difference? *Isr J Chem.* 2012;52(8-9):691–705.
- 130) Scherz-Shouval R *et al.*: Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J.* 2007, 26,1749–60.
- 131) Scherz-Shouval R *et* Elazar Z: ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends Cell Biol.* 2007;17(9):422–7.
- 132) Sibata CH *et al.*: Photodynamic therapy in oncology. *Expert Opin Pharmacother.* 2001;2(6):917-27.
- 133) Simplicio FI *et al.*: Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Quím Nova.* 2002;25(5):801-7.
- 134) Soukos NS *et* Goodson JM: Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol 2000.* 2011;55(1):143-66.
- 135) Stadtman ER: Protein Oxidation and Aging. *Free Radic Res.* 2006;40(12):1250-8.
- 136) Sun X *et* Leung WN: Photodynamic therapy with pyropheophorbide-a methyl ester in human lung carcinoma cancer cell: efficacy, localization and apoptosis. *Photochem Photobiol.* 2002;75(6):644-51.
- 137) Tsai J *et al.*: Reorganization of cytoskeleton induced by 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy and its correlation with mitochondrial dysfunction. *Lasers Surg Med.* 2005; 36(5):398–408.
- 138) Tsai T *et al.*: ALA-PDT results in phenotypic changes and decreased cellular invasion in surviving cancer cells. *Lasers Surg Med.* 2009;41(4):305–15.
- 139) Tynga IM *et al.*: The primary subcellular localization of Zinc phthalocyanine and its cellular impact on viability, proliferation and structure of breast cancer cells (MCF-7). *J Photochem Photobiol B.* 2013;120:171-6.
- 140) Van Duijnhoven FH *et al.*: The immunological consequences of photodynamic treatment of cancer, a literature review. *Immunobiol.* 2003;207:105–113.
- 141) Villanueva A *et al.*: Photodynamic effects on cultured tumor cells. Cytoskeleton alterations and cell death mechanisms. N.S. Nalwa (Ed.)

- Handbook of Photochemistry and Photobiology. American Scientific Publishers, California, USA; 2003:79–117.
- 142) Von tappeiner HVH: Die photodynamische Erscheinung. Sensibilisierung durch fluoreszierende Stoffe. *Ergebnisse der Physiologie*. 1909;8(1):698-741.
- 143) Wang C *et Youle* RJ: The role of mitochondria in apoptosis. *Annu Rev Genet*. 2009;43:95–118.
- 144) Winterbourn CC *et al*: Requirements for superoxide-dependent tyrosine hydroperoxide formation in peptides. *Biochem J* 2004;381:241-8.
- 145) Winterbourn CC *et Kettle* AJ: Radical-radical reactions of superoxide: a potential route to toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;305:729-36.
- 146) Wong CM *et al*: Cooperation of yeast peroxiredoxins Tsa1p and Tsa2p in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *J Biol Chem*. 2002;277(7):5385-94.
- 147) Wood SR *et al*: The subcellular localization of Zn (II) phthalocyanines and their redistribution on exposure to light. *Photochem Photobiol*. 1997;65(3):397-402.
- 148) Yamamoto N *et al*: Photodynamic immunopotential: *in vitro* activation of macrophages by treatment of mouse peritoneal cells with haematoporphyrin derivative and light. *Eur J Cancer*. 1991;27:467–71.
- 149) Yano S *et al*: Current states and future views in photodynamics therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 2011;12(1):46-67.
- 150) Zhang W *et al*: Targeting prostate cancer cells with hybrid elastin-like polypeptide/liposome nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:293–305.
- 151) Zimčák P *et Miletín* M: Fotodynamická terapie jako nová perspektivní metody léčby nádorových onemocnění I. Přehled fotosenzitizérů. *Česká a slovenská Farmacie*. 2004;53: 271–9.

Internetové zdroje:

- 1) www.bioletcpharma.com
- 2) www.thermofisher.com
- 3) www.visudyne.com
- 4) <http://www.dojindo.com/store/p/302-MTT.html>
- 5) <http://www.dusapharma.com/>
- 6) http://www.gasos.cz/uploads/DUMICI/BOT/1.%20VY_32_INOVACE_BOT.1%20%20Eukaryotick%C3%A1%20bu%C5%88ka.pptx
- 7) <http://www.uniprot.org/>
- 8) <http://www.uniprot.org/uniprot/P30041>
- 9) <http://www.uniprot.org/uniprot/Q16531>
- 10) <https://books.google.cz/books?id=CmckBQAAQBAJ&pg=PA537&lpg=PA537&dq=Benzvix+aminolevulinic+acid&source=bl&ots=WY5N2XmBXj&sig=XTmlzRJnrCJjEpvy9NMR5yQZT8&hl=cs&sa=X&ved=0ahUKEwjXnZDqhtnVAhUGEJoKHcubDH0Q6AEIKjAB#v=onepage&q=Benzvix%20aminolevulinic%20acid&f=false>
- 11) https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Porphyrin,_chlorin,_bacteriochlorins.png
- 12) https://www.drugs.com/clinical_trials/dusa-pharmaceuticals-receives-orphan-designation-levulan-pdt-esophageal-dysplasia-923.html
- 13) https://www.iic.cas.cz/cz/vyzkum_fotofyzika_fotochemie_molekularni_skladacky
- 14) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6647>
- 15) <https://david.ncifcrf.gov/>
- 16) https://cs.wikipedia.org/wiki/Protonov%C3%A1_pumpa
- 17) https://cs.wikipedia.org/wiki/Cytochrom_c_oxid%C3%A1za

10 PUBLIKAČNÍ ČINNOST AUTORKY

Vědecké publikace uveřejněné v časopisech s IF

Manisova B, Binder S, Malina L, Jiravova J, Langova K, Kolarova H: Phthalocyanine-mediated Photodynamic Treatment of Tumoural and Non-tumoural cell lines. *Anticancer Res.* 2015;35(7), 3943-51. IF 1,865

Jiravová J, Bartoň Tománková K, Harvanová M, Malina L, Malohlava J, Luhová L, Panáček A, **Manišová B**, Kolářová H: The effect of silver nanoparticles and silver ions on mammalian and plant cells *in vitro*. *Food Chem Toxicol.* 2016;96:50-61. IF: 3,58.

Malina L, Bartoň Tománková K, Malohlava J, Jiravová J, **Manišová B**, Zapletalová J, Kolářová H (2016). The *in vitro* cytotoxicity of metal-complexes of porphyrin sensitizer intended for photodynamic therapy. *Toxicol In Vitro.* 2016;34:246-56. IF 3,338.

Binder S, Hanakova A, Tomankova K, Pizova K, Bajgar R, **Manisova B**, Kejllova K, Bendova H, Jirova D, Kolarova H: Adverse phototoxic effect of essential plant oils on NIH 3T3 cell line after UV light exposure. *Cent Eur J Public Health.* 2016;24(3):234-40. IF 0,8

Jirova G, Vlkova A, Wittlerova M, Dvorakova M, Kasparova L, Chrz J, Kejllova K, Wittlingerova Z, Zimova M, **Hosikova B**, Jiravova J, Kolarova H: Toxicity of waste water from health care facilities assessed by different bioassays. *Neuro Endocrinol Lett.* 2019;39(6):441-53. IF 0,847

Původní vědecké publikace uveřejněné v časopisech bez IF

Hošíková B, Binder S, Lenobel R, Malohlava J, Hosik J, Jiravová J, Malina L, Zapletalová J, Kolářová H. Effect of the zinc phthalocyanine mediated photodynamic therapy on cytoskeletal apparatus of hela cells. *Lékař a technika.* [v tisku]. 2019. ISSN 0301-5491.

Kapitoly v monografii

Horáková J, Tománková K, Harvanová M, Hradilová Š, Mašek V, Malohlava J, Malina L, **Manišová B**, Kejlová K, Jírová D, Kolářová H: Study of the penetration of silver nanoparticles into SVK14 cells. Méndez-Vilas A. ed. Microscopy: advances in scientific research and education. Badajoz: Formatex Research Center, 2014, 173-178. ISBN 978-84-942134-3-4.

Publikace abstrakt ve sbornících

B Manišová, S Binder, L Malina, H Kolářová: Studium účinku nově syntetizovaných derivátů azaftalocyaninů na nádorovou a nenádorovou buněčnou linii a jejich využitelnost pro PDT, XXXVII. Dni lékařské biofyziky, Demänovská Dolina, 2014

L Malina, K Tománková, **B Manišová**, H Kolářová: Studium fotodynamického vlivu na buněčné linie užitím fluorescenčních metod, XXXVII. Dni lékařské biofyziky, Demänovská Dolina, 2014

S Binder, **B Manišová**, H Kolářová: 1,9 - dimethyl methylene blue a jeho použití ve fotodynamické terapii, XXXVII. Dni lékařské biofyziky, Demänovská Dolina, 2014

Barbora Manišová, Svatopluk Binder, Lukáš Malina, Hana Kolářová: Studium a využití fotodynamicky aktivních látek v protinádorové terapii, Konference vědeckých prací studentů DSP, Olomouc, 2014

Lukáš Malina, Kateřina Tománková, **Barbora Manišová**, Hana Kolářová: Srovnání účinku metalo-komplexů porfyrinových sensitizérů na nádorové a nenádorové buněčné linie, Konference vědeckých prací studentů DSP, Olomouc, 2014

Binder S, Tománková K, Bajgar R, Hanaková A, **Manišová B**, Pížova K, Kolářová H: Synergic effect of clalpcs2 photodynamic and sonodynamic therapy, XXXVIII. Dny lékařské biofyziky, Staré Splavy, 2015

Manišová B, Binder S, Kolářová H: Studium účinku zinečnatého derivátu ftalocyaninu na buněčné linie a jeho využití ve fotodynamické terapii, XXXIX. Dny lékařské biofyziky, Piešťany, 2016

Manišová B, Binder S, Lenobel R, Kolářová H: Studium změn hladin vybraných proteinů po fotodynamické terapii na buněčné linii HeLa. XXXX. Dny lékařské biofyziky, Praha, 2017

Hošíková B, Binder S, Lenobel R, Malohlava J, Kolářová H: Analýza vlivu zinečnatého ftalocyaninu na HeLa buňky pomocí biofyzikálních metod. 41.dni lekárskej biofyziky, Martin, SK, 2018