

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Fotodynamický účinek nových heterocyklických zlúčenín na nádorové bunky in vitro

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Zdenko Duben**
Studijní program: B1406
Studijní obor: Biochemie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.**
Rok: 2024

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracoval samostatne s vyznačením všetkých použitých prameňov a spoluautorstvami. Súhlasím so zverejnením bakalárskej práce podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v znení pozdejších predpisov. Bol som zoznámený s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znení pozdejších predpisov.

V Olomouci dňa

.....

Podpis studenta

Pod'akovanie

Na tomto mieste by som chcel poďakovať vedúcemu práce pánovi prof. RNDr. Vladimírovi Kryštofovi, Ph.D. za odborné vedenie a korekciu bakalárskej práce. Ďalej by som chcel poďakovať Mgr. Eve Řezníčkovej, Ph.D. a Mgr. Veronike Vojáčkovej a ostatným pracovníkom z katedry experimentálnej biológie za trpezlivosť a pomoc v laboratóriu. Vďaka patrí aj Aste Žukauskaite, Dr., Ph.D. (Univerzita Palackého v Olomouci), Prof. Algirdasu Šačkusovi (Kaunas University of Technology) a dr. Eglė Arbačiauskienė (Kaunas University of Technology) za poskytnutie študovaných látok. Bakalárska práca bola podporená Univerzitou Palackého v Olomouci (IGA_PrF_2024_005) a Európskou úniou – Next Generation EU (Národní ústav pro výzkum rakoviny, program EXCELES, LX22NPO5102).

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Zdenko Duben
Názov práce	Fotodynamický účinok nových heterocyklických zlúčenín na nádorové bunky in vitro
Typ práce	Bakalárska
Pracovisko	Katedra biochemie
Vedúci práce	prof. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2024

Abstrakt

Fotodynamická terapia je neinvazívny a veľmi selektívny druh liečby rôznych druhov ochorení, kde patrí napríklad rakovina, kožné ochorenia, či infekcie. Základ terapie tvoria tri zložky – svetlo, kyslík a látka aktivovaná svetlom – fotosenzitizér. Aktiváciou fotosenzitizéra svetlom vznikajú reaktívne formy kyslíka, ktoré spôsobujú poškodenie buniek. Praktická časť sa zaoberá testovaním nových látok, ktoré by mohli mať fotodynamický účinok na bunkovej línii ľudského melanómu G361. Všetky analyzované látky boli netoxické vo tme, ale vykazovali cytotoxické účinky po ožiarení modrým svetlom. Najviac účinná sa ukázala byť látka 8646. Pomocou prietokovej cytometrii bol overený vplyv látok na indukciu smrti buniek G361 po ožiarení. Pomocou western blottingu boli potvrdené zmeny v bunkových proteínoch, ktoré súvisia so smrťou buniek. Experimenty preukázali toxicitu pri správnej kombinácii koncentrácie látky a energie svetla, ktorou boli bunky ožarované.

Kľúčové slová	fotodynamická terapia, fotosenzitizér, nádorové bunky, cytotoxicita, reaktívne formy kyslíka
Počet strán	37
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Zdenko Duben
Title	Photodynamic activity of new heterocyclic compounds against cancer cells in vitro.
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	prof. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.
The year of presentation	2024

Abstract

Photodynamic therapy is a non-invasive and highly selective treatment various types of diseases, including cancer, skin diseases, and infections. The therapy is based on three components - light, oxygen and a light-activated substance - a photosensitizer. The activation of the photosensitizer by light produces reactive oxygen species that cause damage to cells. The practical part deals with the testing of new substances that could have a photodynamic effect on the human melanoma cell line G361. All the analyzed substances lacked cytotoxicity in dark, but showed cytotoxic effects after blue light irradiation. Substance 8646 proved to be the most effective. Flow cytometric analysis of treated and irradiated G361 cells confirmed the induction of cell death. Changes in protein levels associated with apoptotic cell death were confirmed by Western blotting. Experiments revealed cytotoxicity at the right combination of the concentration of the substance and the energy of the light with which the cells were irradiated.

Keywords	photodynamic therapy, photosensitizer, tumor cells, cytotoxicity, reactive oxygen species
Number of pages	37
Number of appendices	0
Language	Slovak

OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	PRINCÍP FOTODYNAMICKEJ TERAPIE.....	2
2.1	Fotodynamická reakcia.....	2
2.2	Fotosenzitizéry	4
2.2.1	Fotosenzitizéry prvej generácie	6
2.2.2	Fotosenzitizéry druhej generácie	6
2.2.3	Fotosenzitizéry tretej generácie	7
2.2.4	Experimentálne zlúčeniny	7
2.3	Svetlo	8
2.4	Kyslík	10
2.5	Fotodynamická terapia na bunkovej úrovni.....	11
2.5.1	Nekróza.....	11
2.5.2	Apoptóza	12
2.5.3	Autofágia	13
2.5.4	Narušenie ciev	14
2.5.5	Imunitná odpoveď organizmu na fotodynamickú terapiu	14
2.6	Možné využitia fotodynamickej terapie.....	14
3	PRAKTICKÁ ČASŤ	16
3.1	Materiál.....	16
3.1.1	Chemikálie	16
3.1.2	Roztoky	17
3.1.3	Zoznam použitých protilátok.....	18
3.1.4	Prístrojové vybavenie.....	18
3.1.5	Programy k prístrojom	19
3.2	Metódy.....	19
3.2.1	Práca s bunkovou kultúrou	19
3.2.2	Test cytotoxicity	20
3.2.3	SDS-PAGE a western blotting s imunodetekciou	20
3.2.4	Analýza bunkového cyklu pomocou prietokovej cytometrie.....	22
4	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	23
4.1	Cytotoxicita testovaných fotosenzitizérov	23
4.2	Vplyv látok na bunkový cyklus	24
4.3	Vplyv látok na proteíny súvisiace s apoptózou	26

5	ZÁVER.....	29
6	LITERATÚRA.....	30
7	ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK.....	37

Ciele práce

Teoretická časť

Cieľom teoretickej časti bolo zoznámenie s problematikou a vypracovanie literárnej rešerše na tému fotodynamická protinádorová terapia, fotosenzitizéry aktivované viditeľným svetlom a mechanizmus pôsobenia tejto terapie.

Experimentálna časť

Cieľom experimentálnej časti bolo overenie účinku nových fotosenzitizačných zlúčenín na modelovej bunkovej kultúre ľudského melanómu, meraním antiproliferačného a cytotoxického účinku, analýzou zmien bunkových proteínov so zameraním na poškodenie DNA a bunkovú smrť. Ďalej získané poznatky z experimentálnej časti zaradiť do kontextu informácií z odbornej literatúry.

1 Úvod

Pacient, ktorý trpí rakovinou akéhokoľvek typu sa obvykle lieči chemoterapiou. Táto liečebná metóda však môže viesť k veľmi závažným vedľajším účinkom keďže postihuje nie len rakovinové bunky ale aj zdravé bunky tkaniva. Práve z tohto dôvodu sa dnes výskum zameriava na metódy, ktoré dokážu cielene likvidovať transformované bunky. Jednou z takýchto metód je aj fotodynamická terapia (Otvagin et al., 2022).

Fotodynamická terapia je okrem iných indikácií tiež klinicky schválený postup liečby rakoviny s minimálnym zásahom do tela pacienta. Oproti iným metódam liečby rakoviny je fotodynamická terapia oveľa šetrnejšia pre okolité tkanivá či orgány, čo tiež znižuje riziko pre pacienta (Agostinis et al., 2011).

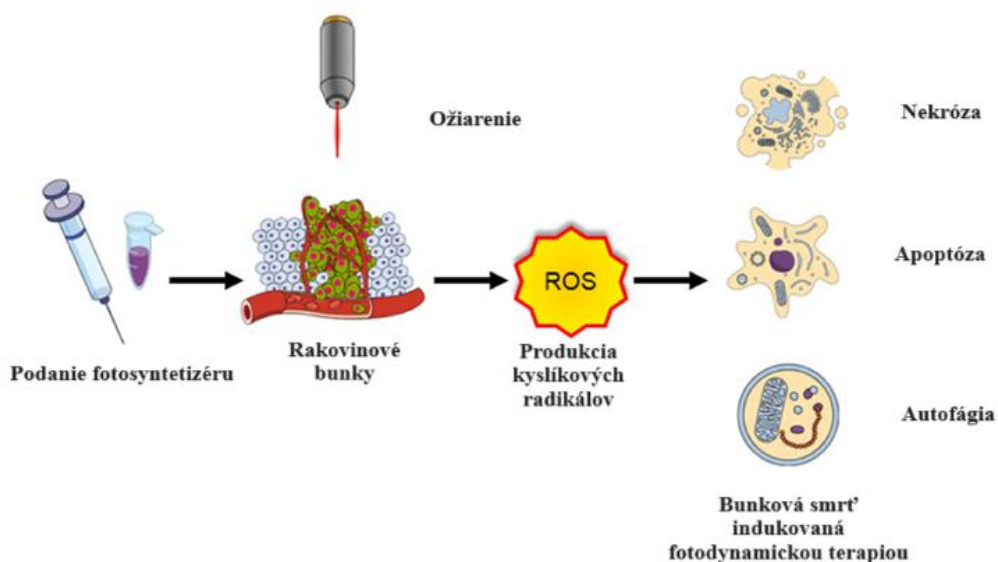
Základ fotodynamickej terapie tvoria tri hlavné zložky, a to svetlo, kyslík a látka citlivá na svetlo (fotosenzitizér). Kombináciou týchto komponentov, dokážeme donútiť bunky k ich zániku. Nemusia to byť len bunky nádorové, ale aj baktérie či huby. Základný krok pri fotodynamickej terapii je fotosenzitizér, ktorý po ožiarení dokáže tvoriť singletový kyslík alebo radikály. Práve reaktívne formy kyslíku zodpovedajú za poškodenie buniek, čo je dôvodom bunkovej smrti. Tento proces je riadený žiarením, ktorým je možné zacieliť na konkrétne miesto v tele a tým špecificky aktivovať fotosenzitizér (Bacellar et al., 2015). Vzniknuté reaktívne formy kyslíka vyvolajú zápalovú a následne imunitnú reakciu práve na ožiarenom mieste, čo znižuje poškodenie iných tkanív a vedľajšie účinky liečby (van Straten et al., 2017).

Fotodynamická terapia pozostáva z dvoch súčasne prebiehajúcich dejov. Počas týchto dejov vznikajú cytotoxické radikály, ktoré sú zodpovedné za bunkovú smrť (Kadkhoda et al., 2022).

Základnými výhodami tejto terapie je neinvazívnosť a schopnosť zacieliť celkom presne na malú oblasť. Na druhej strane práve výhody spojené so svetlom sú taktiež nevýhodami fotodynamickej terapie. Pri ožiarení dochádza pri vstupe svetla do tkaniva k rozptylu alebo absorpcii, pričom záleží na type tkaniva a vlnovej dĺžke svetla. Obecne platí že, absorpcia svetla v tkanivách klesá so zvyšujúcou sa vlnovou dĺžkou. Dlhšie vlnové dĺžky svetla prenikajú hlbšie do tkaniva, a teda sú pre fototerapie efektívnejšie. Pri kratších vlnových dĺžkach dochádza hlavne k absorpcii svetla kožou či iným tkanivom čo môže spôsobiť ich podráždenie (Yoon et al., 2013).

2 Princíp fotodynamической terapie

Fotodynamická terapia je založená na interakciách medzi svetlocitlivou látkou, svetlom špecifickej vlnovej dĺžky a molekulárnym kyslíkom. Pacientovi sa podáva fotosenzitizér, buď lokálne alebo intravenózne, ktorý však sám o sebe nereaguje s okolitými biomolekulami. Pri osvetlení dochádza k prenosu energie zo svetla na fotosenzitizér a následne na prítomný molekulárny kyslík, čo vedie k vzniku reaktívnych foriem kyslíka ako sú singletový kyslík ($^1\text{O}_2$), hydroxylový radikál (HO^\bullet), superoxidový radikál (O_2^-), či peroxid vodíku (H_2O_2). Práve tieto produkty reakcie môžu poškodiť popri prípade usmrtiť ciele bunky či tkanivá (Hamblin, 2017). Celý tento postup je vyobrazený na obrázku (Obr. 1).



Obrázok 1: Postup fotodynamической terapie. Pacientovi sa podá vhodný fotosenzitizér, ktorý sa následne ožiari svetlom vhodnej vlnovej dĺžky. Po ožiarení dochádza k vzniku reaktívnych foriem kyslíka, čo vyvoláva bunkovú smrť jedným z mechanizmov (prevzaté a upravené z Kolarikova et al., 2023).

2.1 Fotodynamická reakcia

Samotná fotodynamická reakcia začína absorpciou svetla fotosenzitizérom v ožiarenej časti tkaniva. Toto ožiarenie vyvoláva reakciu, ktorá má za následok sled fotochemických reakcií, čo vedie k vzniku reaktívnych foriem kyslíka (Correia et al., 2021). Po absorpcii svetla fotosenzitizérom dochádza k excitácii jeho singletového stavu ($^1\text{PS}^*$). Táto jeho excitovaná forma je veľmi nestabilná, a tak dochádza k rozpadu naspäť do základného stavu, pričom prebytočná energia je vypudená vo forme svetla (fluorescencia) alebo tepla.

Avšak môže dôjsť aj k prechodu singletového stavu fotosenzitizéru do stabilnejšieho tripletového stavu prostredníctvom spinovej konverzie elektrónu v orbitáli s vyššou energiou (Donnelly et al., 2008). Tento excitovaný stav môže prechádzať do základného stavu prostredníctvom svetla (fosforescencie) alebo prechádza dvoma druhmi reakcií (Dolmans et al., 2003). Jednou z reakcií je priamy prenos energie na molekulárny kyslík (O_2), čo vedie k vzniku singletového kyslíku (1O_2) a základného stavu fotosenzitizéru. Táto reakcia sa označuje ako reakcia typu II. Singletový kyslík je veľmi reaktívny a reaguje s množstvom biologických substrátov, čo poškodzuje bunky a napokon spôsobuje aj ich smrť (Correia et al., 2021).

Ku reakcii typu I dochádza, keď excitovaný stav fotosenzitizéru priamo reaguje s okolitými substrátmi. Tu dochádza k prenosu vodíku alebo elektrónu za vzniku voľných radikálov alebo radikálových iónov. Dochádza k reakcii s prítomným molekulárnym kyslíkom a vznikajú reaktívne formy kyslíku ($O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} , H_2O_2). Tieto formy sú taktiež veľmi reaktívne a môžu spôsobovať poškodenia a následnú smrť bunky (Kwiatkowski et al., 2018).

Podstata fotodynamickej terapie teda spočíva v spolupráci reakcie typu I a reakcie typu II, čo zámerne vedie k bunkovej smrti. Pomer v akom sa jednotlivé reakcie v celom procese vyskytujú závisí od fotosenzitizéru, substrátu, koncentrácii kyslíku a schopnosti fotosenzitizéru viazať sa na substrát (Donnelly et al., 2008). Vo väčšine prípadov však je pri terapii pozorovaná reakcia typu II, kde vzniká ako hlavný cytotoxický produkt singletový kyslík. Vzhľadom k vysokej reaktivite a krátkemu polčasu rozpadu reaktívnych foriem kyslíka je pri fotodynamickej terapii zasiahnutá len malá oblasť v okolí tvorby týchto reaktívnych foriem. To v akej miere budú bunky poškodené závisí od typu fotosenzitizéru, jeho intracelulárnej a extracelulárnej lokalizácii, celkovej podanej dávke, dávke svetla a rýchlosti svetelného toku, dostupnosti kyslíku a dobe medzi podaním liečiva a pôsobením svetla (Dolmans et al., 2003). Z toho je možné predpovedať, na akom mieste môžeme túto terapiu použiť. Pri hlbších nádoroch, pri malej koncentrácii kyslíku, a teda pri nízkomu prieniku svetla bude táto terapia málo efektívna. Naopak pri povrchových a viac okysličených bunkách, bude produkcia reaktívnych foriem kyslíka oveľa efektívnejšia a teda liečba pomocou fotodynamickej terapie účinnejšia (Dąbrowski, 2017).

2.2 Fotosenzitizéry

Fotosenzitizéry sú definované ako látky schopné absorbovať svetlo, o špecifickej vlnovej dĺžke, čo spúšťa fotochemické alebo fotofyzikálne reakcie (Kwiatkowski et al., 2018).

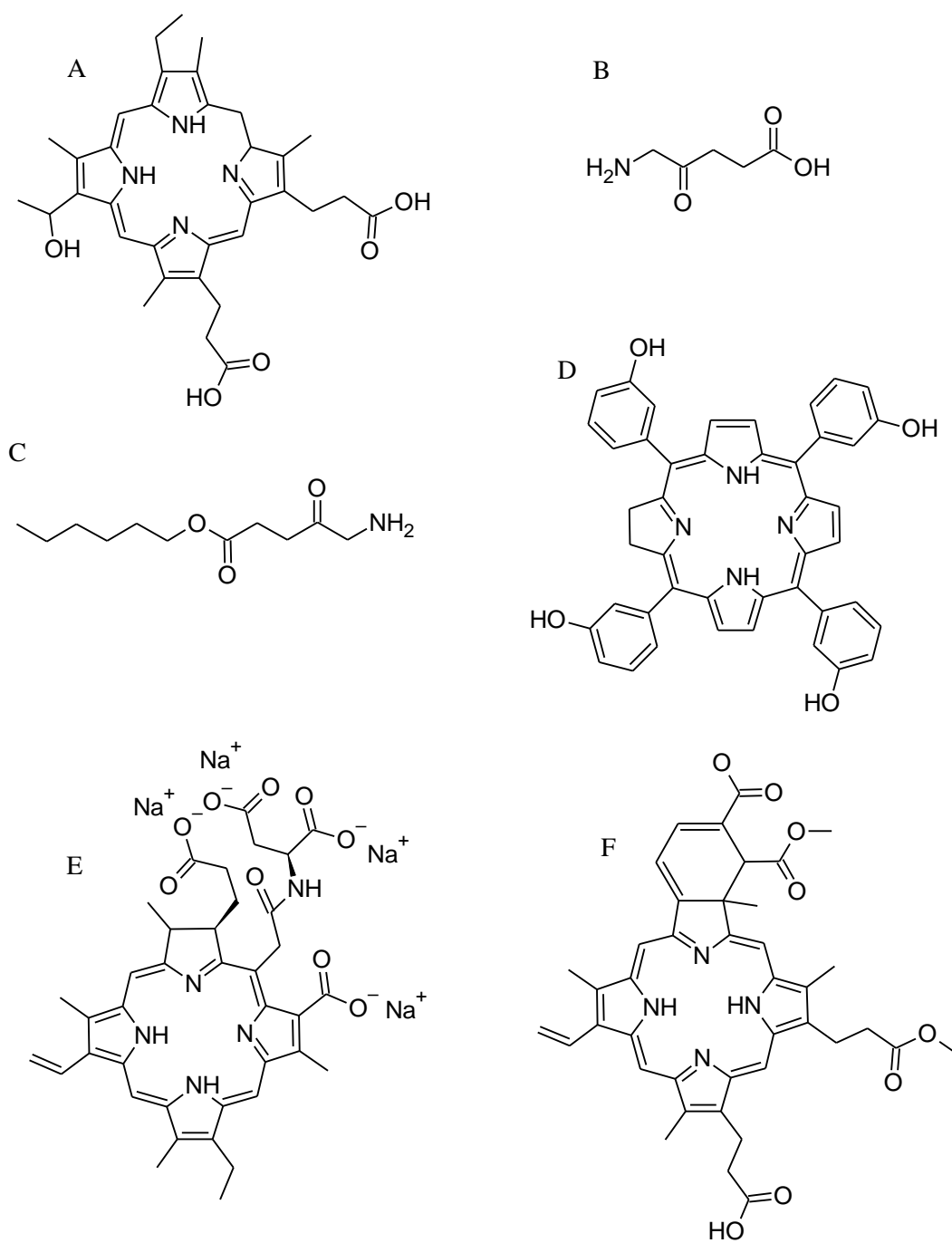
„Ideálny“ fotosenzitizér by mal spĺňať tieto podmienky: (Dąbrowski, 2017)

- **Nízka toxicita** – v neožiarených častiach tkaniva
- **Vysoká absorpcia žiarenia** – obvyklé fototerapeutické prostredie (630-850 nm)
- **Schopnosť generovať reaktívne formy kyslíku s vysokým výťažkom**
- **Prednostná afinita k cieľovým rakovinovým bunkám**

Najbežnejšie fotosenzitizéry sú vypísané v tabuľke (tab. 1) a ich štruktúry sú vyobrazené na obrázku (obr. 2).

Tabuľka 1: Príklady fotosenzitizérov používaných vo fotodynamickej terapii s chemickým a obchodným názvom, sumárnym vzorcom a absorpčným maximom (prevzaté a úpravené Przygoda et al., 2023).

Chemický názov	Obchodný názov	Sumárny vzorec	absorpčné maximum [nm]
porfimer sodný	Photofrin [®]	$C_{34}H_{38}N_4NaO^+$	630
kyselina 5-aminolevulinová	Ameluz [®]	$C_5H_9NO_3 \cdot HCl$	630
hexaminolevulinát	Hexvix [®]	$C_{11}H_{21}NO_3$	635
meta-tetrahydroxyfenyl chlorín	Foscan [®]	$C_{44}H_{32}O_4N_4$	652
mono-L-aspartyl chlorín	Laserphyrin [®]	$C_{38}H_{37}N_5Na_4O_9$	664
benzoporfyrínový derivát	Visudyne [®]	$C_{41}H_{42}N_4O_8$	690



Obrázok 2: Štruktúry vybraných fotosenzitizérov: A: porfimer sodný, B: kyselina 5-aminolevulinová C: hexaminolevulinát, D: meta-tetrahydroxyfenyl chlorín E: mono-L-aspartyl chlorín, F: benzoporfyriínový derivát

2.2.1 Fotosenzitizéry prvej generácie

Jedna z prvých zmienok o použití fotosenzitizéru v kombinácii so svetlom sa pripisuje študentovi medicíny z Mníchova. Oscar Raab si pri pokusoch s akridinovými farbivami na prvkoch všimol, že u prvkov, ktoré boli ošetrované týmto farbivom a následne ožiarené, dochádza nielen k fluorescencii, ale tento jav vyvolal spotrebu kyslíku a pôsobil na prvky toxicky (Ackroyd et al., 2001).

Medzi fotosenzitizéry prvej generácie patria hematoporfyríny. Prvé hematoporfyríny vznikli zo sušenej krvi a boli zmesou niekoľkých porfyrínov, kde každý mal svoje vlastnosti. Najprv boli využívané ako fluorescenčný diagnostický nástroj pre nádorové ochorenia (van Straten et al., 2017; Przygoda et al., 2023). Pri ďalšom spracovaní vznikol hematoporfyrinový derivát, ktorý bol získaný purifikáciou a modifikáciou hematoporfyrínu (Hamblin & Newman, 1994). Mal lepšie lokalizačné schopnosti (Lipson et al., 1961) a dokonca mohol byť použitý na liečbu gliómu (nádoru na mozgu) u myši. V ďalšom spracovaní vznikol porfimér sodný, ktorý bol schválený na liečbu rakoviny pľúc, pažeráku, mozgu, či močového mechúra (Kelly et al., 1975; Dougherty et al., 1978; Dougherty et al., 1998). Avšak porfimér nie je dokonalým fotosenzitizérom. Jeho vysoká potrebná dávka, nízka svetelná absorpcia svetla, zlý prienik svetla tkanivom, zlá schopnosť vypudzovania z tela a pomerne zlá selektivita nádorov patria medzi najväčšie mínusy tohto liečiva. Tieto nevýhody viedli k vývoju druhej generácie fotosenzitizérov (van Straten et al., 2017).

2.2.2 Fotosenzitizéry druhej generácie

Cieľom druhej generácie fotosenzitizérov bolo dosiahnutie lepšej nádorovej selektivity, zníženie dávky a zlepšenie čistoty liečiva. Pri dávkovaní fotosenzitizérov je dôležité zvoliť takú látku, ktorá bude najúčinnjšia v čo najmenej koncentracii. Malá koncentrácia vedie k zníženiu vedľajších účinkov, a teda k rýchlejšiemu zotaveniu pacienta. Záujmom druhej generácie bolo taktiež využiť na liečbu vyššie vlnové dĺžky svetla (oblasť červeného spektra), čo napomáha k liečbe nádorov v hlbších častiach tkaniva (van Straten et al., 2017; Kwiatkowski et al., 2018). V súčasnej dobe patria do skupiny fotosenzitizérov druhej generácie deriváty hematoporfyrínu a syntetické fotosenzitizéry (napr. kyselina 5-aminolevulová, obr. 2). Hlavnou nevýhodou fotosenzitizérov druhej generácie je ich zlá rozpustnosť vo vode, čo vedie k zníženiu

účinnosti produkcie reaktívnych foriem kyslíka a tiež spôsobuje problémy v prípade intravenózneho podávania (Kwiatkowski et al., 2018).

2.2.3 Fotosenzitizéry tretej generácie

Tretia generácia fotosenzitizérov sa zaoberá modifikáciou druhej generácie. Fotosenzitizéry tretej generácie sú molekuly zapuzdrené do nosičov (Abrahamse & Hamblin, 2016). Fotosenzitizéry môžu byť aj kovalentne naviazané na niektoré biomolekuly, ktoré majú afinitu k nádorom. Medzi tieto biomolekuly patria hlavne protilátky (Sato et al., 2015), proteíny (Hamblin & Newman, 1994), sacharidy (Park et al., 2011). Tiež to môžu byť rôzne nosiče na báze nanočastíc. Najčastejšie sa používajú nanočastice zlata, oxidu kremičitého, kvantové bodky, uhlíkové nanotrubičky alebo iné nosiče, ktoré dokážu viesť liečivo k nádorovému tkanivu (Correia et al., 2021). Tieto modifikácie dokážu zvýšiť stabilitu, hydrofilitu, distribúciu, vstrebávanie, elimináciu liečiva a znížiť nežiadúce vedľajšie účinky a toxicitu v tme (Setaro et al., 2020; Gualdesi et al., 2021). Tretia generácia fotosenzitizérov je stále vo fázi testovania, aj keď niektoré z nich dosahujú veľmi dobré výsledky (Przygoda et al., 2023).

V súčasnej dobe sa pracuje aj na zvýšeníach selektivity liečiva prostredníctvom výroby aktivovateľných multifunkčných fotosenzitizérov, ktoré dokážu rozoznať biologický či fyzikálny podnet, pomocou ktorého sa aktivujú. Medzi biologické podnety spojené s rakovinou patrí hlavne teplota, pH a enzymatická aktivita. V rakovinových bunkách je mierne kyslejšie prostredie, čo môže byť využité práve na aktiváciu fotosenzitizéru. K aktivácii pomocou fyzikálneho podnetu môže nastať napríklad pri pôsobení magnetického či elektrického poľa, ultrazvuku alebo svetla (Simões et al., 2020).

2.2.4 Experimentálne zlúčeniny

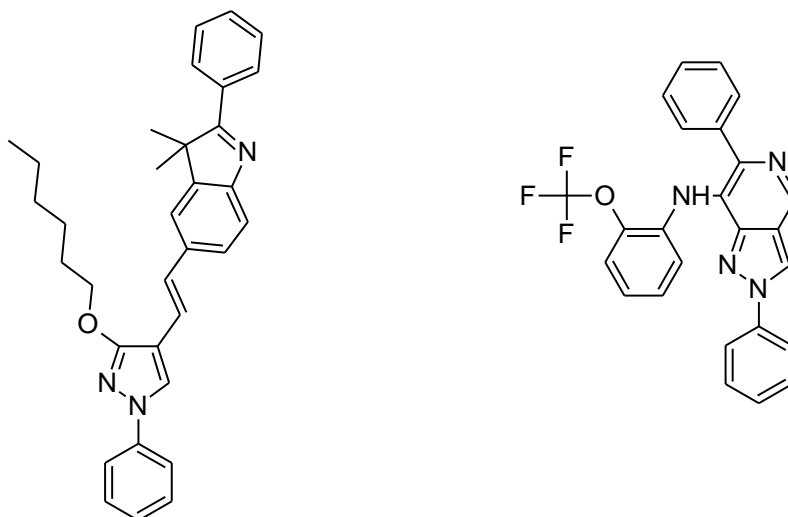
Tradičné organické fotosenzitizéry, kde napríklad patrí aj zmieňovaný porfyrín, je celkom náročné nasyntetizovať a purifikovať. Okrem toho, je potrebná celkom vysoká dávka liečiva na efektívnu produkciu kyslíkových radikálov, nemajú dobrú rozpustnosť vo vode a nevedia efektívne cieľiť na nádorové tkanivo (Pham et al., 2021). Z týchto dôvodov je potrebné vymýšľať a testovať nové látky, ktoré by mohli byť lepšími fotosenzitizérmami.

Vývoj nových fotosenzitizérov však nesie radu obmedzení. Medzi najhlavnejšie patrí napríklad fotosenzitivita tkaniva po liečbe, čo blízko súvisí so svetelnou aktiváciou.

Kľúčovou podmienkou je tiež dostatočná prítomnosť kyslíka v ošetrovanej oblasti (Simões et al., 2020). Ďalšou výzvou nových fotosenzitizérov je aj liečba metastatických druhov rakoviny, čo zatiaľ nie je pomocou fotodynamickej terapie možné (Calixto et al., 2016).

Na druhej strane však liečba na základe fotosenzitizérov prináša značné množstvo výhod. Malé nežiadúce účinky, ambulantné ošetrenie, či krátky čas liečby patrí medzi tie najlepšie (Brown et al., 2004).

V poslednej dobe sa výskum zaoberá fotosenzitizérmi, ktoré sú založené na báze tetrapyrolu, BODIPY, tetrafenyletylénových farbivách (Pham et al., 2021), rôznych pyrazolových kruhových systémoch (Obr. 3) (Varvuolyté et al., 2020; Razmiené et al., 2022), alebo tiež na báze benzo[e]indolových derivátoch (V. Kryštof, nepublikované výsledky) a mnohých ďalších.



Obrázok 3: Príklady štruktúr experimentálnych fotosenzitizérov študovaných na Přírodovědecké fakultě Univerzity Palackého (Varvuolyté et al., 2020; Razmiené et al., 2022).

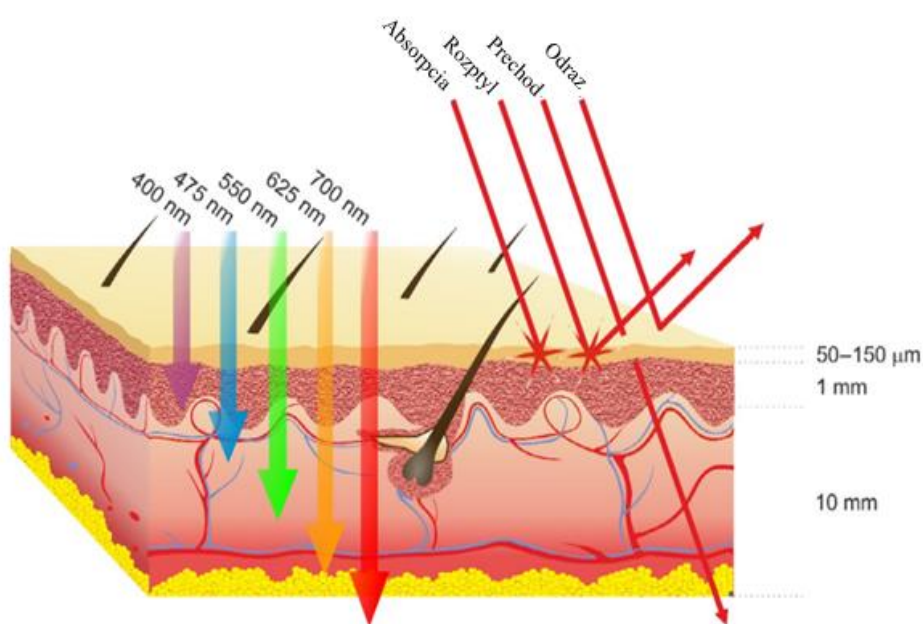
2.3 Svetlo

Fotodynamická terapia bola otestovaná s rôznymi zdrojmi svetla ako sú denné svetlo žiarovky, lasery či laserové diódy (Yanovsky et al., 2019). Všetky svetelné zdroje majú svoje výhody aj nevýhody, napríklad laserové zdroje sú celkom drahé a potrebujú dodatočnú optiku na osvietenie väčšej plochy tkaniva. Bežné lampy sa dajú použiť s optickými vláknami na určenie vlnovej dĺžky svetla. Nevýhodou u takýchto lúčov je tepelný účinok, ktorý môže negatívne ovplyvniť terapiu. Celkom dobrými zdrojmi svetla

vo fotodynamickej terapii sú svetelné diódy (LED). Sú cenovo dostupnejšie, menej škodlivé a tepelne neovplyvňujú priebeh reakcie (Correia et al., 2021).

Hĺbka prieniku svetla do tkaniva je relatívne malá a závisí hlavne na vlnovej dĺžke pôsobiaceho svetla (Shackley et al., 2000). Okrem toho, pri ožarovaní tkaniva nedochádza len k absorpcii, ale aj k odrazu, prechodu či rozptylu svetla, ako znázorňuje obrázok (Obr. 4) (Dąbrowski, 2017). Obecne platí, že svetlo s vyššou vlnovou dĺžkou v oblasti blízkeho infračerveného svetla, preniká do tkaniva hlbšie. Problém nastáva, ak má svetlo dlhé vlnové dĺžky (>850 nm). Svetlo s dlhými vlnovými dĺžkami totiž nemá dostatok energie, aby bola produkcia singletového kyslíka pre terapiu dostatočná (Celli et al., 2010).

Na druhú stranu, ani krátke vlnové dĺžky nie sú optimálne na terapeutické účely. Vlnové dĺžky kratšie ako 600 nm, sú absorbované tkanivom, a môžu vyvolať podráždenie kože (Dąbrowski, 2017). Vo väčšine prípadov sa vo fotodynamickej terapii pracuje s vlnovými dĺžkami 650-900 nm, čo sa tiež nazýva ako „fototerapeutické okno“ (Chinna Ayya Swamy et al., 2020; Dąbrowski, 2017).



Obrázok 4: Možnosti interakcii medzi svetlom a tkanivami človeka (prevzaté a upravené Dąbrowski, 2017).

Avšak je možné využiť aj kratšie vlnové dĺžky s vhodnou kombináciou fotosenzitizéru. Tieto látky sú aktivované svetlom o vlnovej dĺžke 400-500 nm. Jeden z príkladov je sinoporfyrín sodný, ktorý vykazuje antimikrobiálny efekt pri osvetlení svetlom o vlnovej dĺžke 390-400 nm. Táto látka sa ukazuje ako účinná v boji proti *Porphyromonas gingivalis* (Song et al., 2021), ktorý je príčinou chronického zápalu ďasien vedúceho až k paradentóze (Naito et al., 2008).

Pri liečbe rakoviny krčka maternice boli navrhnuté fotosenzitizéry na báze organických komplexov obsahujúcich irídium, ktoré pri ožiarení modrým svetlom o vlnovej dĺžke 470 nm indukovali bunkovú smrť podobnú nekróze (Yokoi et al., 2023). Problém pri modrom svetle, ktoré má krátku vlnovú dĺžku je ale jeho nízka penetrácia tkanivom, ktorá činí približne 1 mm (Ash et al., 2017).

Zaujímavým zdrojom svetla, ktoré je možné použiť na fotodynamickú terapiu je denné svetlo. Pri tomto type terapie je pacient ožarovaný prirodzeným slnečným svetlom namiesto umelého svetla. Veľkou výhodou je pohodlie pacienta, pretože pacient dokáže po krátkej inštrukcii zvládnuť terapiu aj sám u seba doma. Ukázalo sa, že fotodynamická terapia, ktorá využíva prirodzené svetlo je rovnako účinná na liečbu kožných lézií, ako terapia, ktorá využíva svetlo umelé. Postup liečby je jednoduchý, pacient aplikuje svetlocitlivú látku na postihnuté miesto a po 30 minútach sa toto miesto vystaví slnečnému svetlu po dobu 2 hodín. Tým sa fotosenzitizér aktivuje v menšej ale trvalejšej miere, čo vedie k nižšiemu podráždeniu a minimálnej bolestivosti zákroku (Morton & Braathen, 2018; Nguyen et al., 2019).

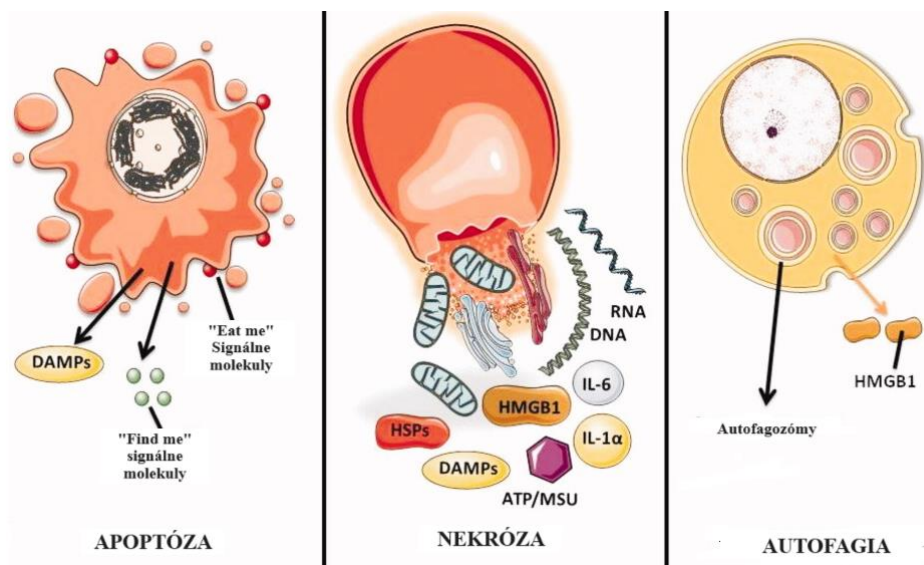
2.4 Kyslík

Kyslík tvorí neodlučiteľnú časť fotodynamickej terapie. Je dôležitý na generovanie reaktívnych foriem kyslíka behom terapie. Koncentrácia kyslíku nie je pri všetkých nádoroch a ani pri jednotlivých nádorových bunkách v jednom nádore rovnaká. Na koncentracii kyslíku sa podieľa hlavne hustota ciev. Pri ožarovaní koncentrácia kyslíku klesá z dôvodu vzniku reaktívnych foriem kyslíka, čo môže mať negatívny vplyv na liečebné účinky fotodynamickej terapie (Correia et al., 2021; Przygoda et al., 2023). Hlavne u solídnych nádoroch je nedostatok kyslíku pri liečbe pomocou fotodynamickej terapie veľký problém. Nádorové mikroprostredie väčšiny solídnych nádorov vykazuje silnú hypoxiu, ktorá podporuje metastázovanie nádoru, a zároveň obmedzuje účinnosť fotosenzitizérov (Kolarikova et al., 2023).

Doposiaľ bolo popísaných päť rôznych typov stratégie tvorby kyslíka, aby sa zabránilo hypoxii nádoru (Zhang et al., 2020). Tieto stratégie využívajú rozložiteľné biomateriály uvoľňujúce (Camci-Unal et al., 2013), či produkujúce kyslík (Zhou et al., 2019), svetlom riadené štiepenie vody s následnou produkciou kyslíka (Martin et al., 2014) a zlúčeniny schopné využiť peroxid vodíka na tvorbu kyslíka (Fu et al., 2018).

2.5 Fotodynamická terapia na bunkovej úrovni

Sú známe tri hlavné mechanizmy, ktoré môžu spôsobiť zánik nádorových buniek (Dolmans et al., 2003). Reaktívne formy kyslíku dokážu nádorové bunky poškodiť priamo, čo vyvolá apoptózu nekrózu alebo tvorbu autofagozómov pri autofagii (Obr 5). Tiež môže dôjsť k narušeniu cievneho riečiska a tým k obmedzeniu živín a kyslíka do nádorovej bunky, čo má za následok hypoxiu spojenú so smrťou bunky, alebo k zápalovej reakcii, ktorá aktivuje imunitný systém pacienta, smerovaný práve proti nádorovým bunkám. Počas terapie dochádza ku všetkým zmieným typom mechanizmov. V akej miere ku nim dochádza záleží na liečebnom postupe (Correia et al., 2021).



Obrázok 5: Priame spôsoby bunkovej smrti (prebrané a upravené z Agostinis et al., 2011).

2.5.1 Nekróza

Nekróza vzniká v dôsledku závažného poškodenia buniek, čo narúša integritu bunkovej membrány. Nekróza vedie k vyliatiu obsahu bunky do okolitých tkanív (Obr. 5), čo

indukuje zápalovú reakciu (Nath et al., 2019). Zatiaľ čo apoptóza je naprogramovaná smrť bunky, ktorá vyžaduje energiu, nekróza je energeticky nezávislá forma smrti bunky. Bunky sú vážne poškodené v dôsledku náhlych šokov, ako je teplo, žiarenie, hypoxia alebo šok z chemických látok. Donedávna bola nekróza považovaná za jedinú cestu bunkovej smrti indukované fotodynamickou terapiou, avšak zistilo sa, že existuje oveľa viac mechanizmov bunkovej smrti, ako napríklad sú ferroptóza (Wang et al., 2023) či pyroptóza (Li et al., 2021).

2.5.2 Apoptóza

Apoptóza je charakterizovaná kondenzáciou chromatínu, zmršťovaním buniek, membránovým blebbingom, štiepením chromozomálnej DNA na fragmenty a tvorbou apoptotických teliesok bez rozpadu plazmatickej membrány. Bunky v apoptotickom štádiu vysielajú takzvané „find me“ a „eat me“ signály, ktoré slúžia fagocytom pri likvidácii buniek (Obr. 5) (Agostinis et al., 2011).

Apoptóza je naprogramovaná cesta bunkovej smrti, ktorá si vyžaduje aktiváciu enzýmov ako sú kaspázy a endonukleázy (Nath et al., 2019). Apoptózu je možné rozdeliť na dve dráhy, vnútorná (mitochondriálna) a vonkajšia (dráha receptorov smrti) (Przygoda et al., 2023).

Vonkajšia dráha je založená na tzv. receptore smrti, ktorý spúšťa kaskádu procesov vedúcich apoptóze. Reaktívne formy kyslíka spôsobujú oxidatívny stres, ktorý aktivuje receptor Fas. Ten sa následne spája s adaptorovým proteínom FADD. Nastáva interakcia medzi adaptorovým proteínom FADD a prokaspázou-8 za vzniku proteínového komplexu, vzniká komplex indikujúci smrť (Zhuang et al., 2001). Tento komplex autokatalyzuje aktiváciu prokaspázy-8 na kaspázu-8. Kaspáza-8 spôsobuje degradáciu niektorých bunkových proteínov a tiež dokáže aktivovať kaspázu-7 a kaspázu-3 (Stennicke et al., 1998). Kaspáza-3 dokáže štiepiť dôležité bunkové proteíny a je najčastejšie aktivovanou proteázou smrti. Okrem toho je zodpovedná za uvoľňovanie kaspázou aktivovanej deoxyribonukleázy (DNáza). Aktivácia tejto DNázy zahajuje degradáciu DNA počas apoptózy (Enari et al., 1998). Medzitým kaspáza-7 štiepi bunkové proteíny.

Vnútorná dráha sa neriadi receptorom, ako to je u vonkajšej dráhy, ale je založená na mitochondriálnych udalostiach vyvolávajúcich apoptózu. Singletový kyslík dokáže aktivovať alebo inaktivovať procesy súvisiace s mitochondriálnou permeabilitou, ktorá

je regulovaná proteínmi rodiny Bcl-2. Bax je proteín patriaci do tejto rodiny a dokáže zvýšiť permeabilitu mitochondriálnej membrány. Naopak Bcl-2 ju dokáže potláčať. Keďže pôsobia ako vzájomní antagonisti, ich koncentrácia ovplyvňuje priepustnosť mitochondriálnej membrány (Youle & Strasser, 2008). Fotodynamická terapia dokáže zničiť proteín Bcl-2, kvôli čomu sa proteín Bax aktivuje. Bax zvyšuje priepustnosť mitochondriálnej membrány, čím sa do cytoplazmy uvoľňujú proteíny z mitochondrie (napr. cytochróm c, faktor vyvolávajúci apoptózu (AIF)). Práve cytochróm c sa viaže s faktorom aktivujúcim apoptotickú proteázu (APAF1), čo vedie k tvorbe proteínového komplexu apoptozómu. Tento apoptozóm dokáže aktivovať prokaspázu-9 za vzniku kaspázy-9. Kaspáza-9 aktivuje kaspázu-3 a kaspázu-7, čo vedie k digescii bunkového obsahu. AIF sa podieľa na fragmentácii jadrovej DNA a kondenzácii jadrového chromatinu (Maharjan et al., 2022).

2.5.3 Autofagia

Autofagia je recyklačný bunkový proces, ktorý zahŕňa tvorbu dvojmembránových vezikúl nazývaných autofagozómy. Úloha autofagozómov je pohlcovanie bunkového obsahu, pozostávajúceho napríklad z poškodených organel (Anding & Baehrecke, 2015). Po pohltení sa autofagozómy spoja s lyzozómami. Lyzozómy obsahujú hydrolázy a lipázy, ktoré dokážu rozložiť obsah v autofagozómoch. Tento rozklad umožní odstránenie poškodeného materiálu a recykláciu živín, pričom sa uvoľňujú mastné kyseliny, aminokyseliny či nukleozidy. Prítomnosť autofagozómov v umierajúcich bunkách neznamená, že autofagia je príčina bunkovej smrti, ale môže to znamenať snahu buniek sa zachrániť (Denton et al., 2012). Autofagická bunková smrť sa pozoruje pri bunkách, ktoré sú rezistentné na apoptózu (napr. bunka s nedostatkom proteínu Bax) (Denton & Kumar, 2019).

Funkcia autofágie ako mechanizmu prežitia alebo smrti závisí od stupňa fotopoškodenia. Po aktivácii autofágie môže dôjsť k zániku práve autofagiou alebo aktiváciou regulovanej bunkovej smrti, väčšinou apoptózy. Ukázalo sa, že inhibíciou autofágie je možné zvýšiť fototoxicitu sprostredkovanú reaktívnymi formami kyslíku. Z toho vyplýva, že autofagia je viac mechanizmom záchranným ako mechanizmom bunkovej smrti (Donohoe et al., 2019).

2.5.4 Narušenie ciev

Nadmerná koncentrácia reaktívnych foriem kyslíka môže narušiť cievny systém pri liečbe fotodynamickou terapiou (Abels, 2004). Príliš vysoká koncentrácia reaktívnych foriem kyslíka spôsobuje oxidáciu proteínov, lipidov, poškodenie DNA či indukciu prozápalových reakcií (Dąbrowski, 2017). Avšak v istej miere sú reaktívne formy kyslíka dôležité vnútrobunkové signálne molekuly, ktoré regulujú funkciu ciev zmenou kontrakcie, rastu, apoptózy či migrácie cievnych buniek. Poškodenie ciev obmedzenie alebo úplné zastavenie prietoku krvi, je typickým dôsledkom fotodynamickej terapie, hlavne pri solídnych nádoroch (Abels, 2004). Nádorové tkanivá vytvárajú nové cievny zväzok z už existujúcich ciev na svoje zásobovanie krvou. Narušenie týchto ciev významne prispieva k účinnosti fotodynamickej terapie, dokonca terapia zameraná na cievny zväzok vedie k dlhodobším pozitívnym výsledkom (Krzykawska-Serda et al., 2014).

2.5.5 Imunitná odpoveď organizmu na fotodynamickú terapiu

Ak počas terapie všetko funguje, dochádza k dostatočnej produkcii reaktívnych foriem kyslíka, ktoré vyvoláva silné zápalové reakcie. Tento zápal podporuje imunitné mechanizmy, ktoré sa podieľajú na eliminácii liečeného nádoru (Dąbrowski, 2017). Zápalové mediátory, uvoľňované behom oxidačného stresu, spôsobia nahromadenie imunitných buniek. Medzi tieto bunky patria neutrofil, mastocyty, makrofágy a dendritické bunky, ktoré sa snažia o obnovenie homeostázy (Reginato, 2014). Makrofágy pohltia už poškodené rakovinové bunky, a prezentujú proteíny z nádorových buniek pomocným T-lymfocytom, ktoré následne dokážu aktivovať cytotoxické T-lymfocyty. Cytotoxické T-lymfocyty tak dokážu bojovať proti nádorovým bunkám v celom tele (Correia et al., 2021).

2.6 Možné využitia fotodynamickej terapie

Fotodynamická terapia sa klinicky používa pri liečbe niektorých onkologických ochorení človeka. Medzi najčastejšie patrí rakovina kože, pľúc, pažeráka, močového mechúra alebo rakovina hlavy a krku (Plaetzer et al., 2013). Taktiež je túto metódu možné využiť na liečbu nerakovinových ochorení kde patria hlavne dermatologické, kardiovaskulárne či dokonca neurologické ochorenia. Liečba je obmedzená na nádory a lézie, nachádzajúce sa na povrchu, či tesne pod povrchom tela. Taktiež je možné cieľiť len nádory, ktoré sa nachádzajú na povrchu vnútorného epitelu. Prienik svetla je obmedzený tkanivom, a teda hlboko uložené nádory nie je možné efektívne zacieliť (Lange et al., 2021).

Zaujímavým využitím fotodynamickej terapie je takzvaná fotodynamická inaktivácia mikroorganizmov. Touto metódou by sa dala obísť rezistencia proti antibiotikám či antivirotikám (Almeida, 2020). Využitie antimikrobiálnej fotodynamickej terapie môžeme nájsť pri liečbe chronických vredov na nohách. V ranách je prítomný *Staphylococcus aureus*, pričom značná časť týchto mikroorganizmov je rezistentná na bežnú antibiotickú liečbu. Antimikrobiálna fotodynamická liečba pomocou kyseliny aminolevulínovej, výrazne zlepšila hojenie chronických vredov (Lin et al., 2021).

Escherichia coli, *S. aureus* či *Enterobacter aerogenes* sa bežne vyskytujú v implantačných jamkách a v oblasti implantátov u pacientov s periimplantitídov (Belibasakis, 2014). Pri periimplantitíde je možné antimikrobiálne využitie fotodynamickej terapie v kombinácii s chitosanom na dekontamináciu. Táto kombinácia sa zdá byť účinnejšou regeneračnou liečbou ako doposiaľ používané väčšinou manuálne metódy (Camacho-Alonso et al., 2022).

Trichosporon asahii sú mikroorganizmy podobné kvasinkám (Mariné et al., 2015), ktoré môžu spôsobovať rôzne kožné infekcie. Liečba týchto kožných ochorení, spočíva v hlavne v medikácii antifungálnymi látkami (Colombo et al., 2011). Trvalé užívanie antifungálnych látok, však môže viesť k rezistencii mikroorganizmov voči týmto látkam. Fotodynamická terapia s použitím 5-aminolevulínovej kyseliny, v kombinácii s antifungálnou látkou itraconazolom, sa ukazuje byť efektívnym riešením v boji proti týmto mikroorganizmom (Lan et al., 2021).

Fotodynamická terapia má využitie aj v čistení odpadových vôd. Problémom pri odpadových vodách sú *E. coli* a *S. aureus*, či iné koliformné baktérie. Fotodynamická terapia, v kombinácii s pyrogallolom a terpinolénom, sa zdá byť účinnou metódou v inaktivácii týchto mikroorganizmov (Sarker & Ahn, 2022).

Niektoré zdroje hovoria, o pozitívnom účinku fotodynamickej terapie na pomerne nedávny celosvetový problém COVID-19 (Tariq et al., 2021). Výsledky dokazujú potenciál fotodynamickej terapie k liečbe pacientov s COVID-19 v rannom štádiu infekcie, ktorý vykazujú mierne alebo stredne závažné príznaky tohto ochorenia. Optimálnym fotosenzitizérom v tomto prípade by mohol byť kurkumín, prípadne metylénová modrá (Law et al., 2024). Kurkumín preukázal vysoké antivirotické účinky po ožiarení svetlom o vlnovej dĺžke 445 nm (Zupin et al., 2022). Obe tieto látky vykazujú antibakteriálny a antivirotický efekt. Toto nové využitie fotodynamickej terapie môže pacientom lepšie zvládnuť liečbu COVID-19 (Weber et al., 2020).

3 Praktická časť

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

2-Merkaptoethanol 97% (Serva, Nemecko), akrylamid (VWR, USA), hovädzí sérový albumin: BSA (VWR, USA), bromfenolová modrá (Sigma-Aldrich, Rakousko), Coomassie-brilliant blue (Sigma-Aldrich, USA), dekahydrát tetraboritanu sodného (Sigma-Aldrich, USA), dihydrogenfosforečnan draselný (Lachema, ČR), dimethylsulfoxid: DMSO (PanReach AppliChem, Nemecko), dithiothreitol: DTT (Roche, Nemecko), dodecylsírán sodný: SDS (Lach-Ner, ČR), ECL substrát: peroxid vodíku a luminol (Thermo Fisher Scientific, USA), ethanol 96% (Lach-Ner, ČR), fenylmethylsulfonylfluorid: PMSF (Sigma-Aldrich, Čína), fetálne hovädzie sérum: FS (Biowest, Francie), fluorid sodný (Lach-Ner, ČR), glycerol (Lach-Ner, ČR), glycin (Sigma-Aldrich, USA), hydrogenfosforečnan sodný (Penta, ČR), chlorid draselný (Lachema, ČR), chlorid sodný (Penta, ČR), kultivačné médium DMEM (Sigma-Aldrich, USA), kyselina ethylendiamintetraoctová: EDTA (Sigma-Aldrich, Čína), kyselina ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová: EGTA (Sigma-Aldrich, USA), kyselina chlorovodíková 35% (Lach-Ner, ČR), kyselina octová 99% (Lach-Ner, ČR), L-glutamin (Sigma-Aldrich, USA), leupeptin (Sigma-Aldrich, USA), MTT (methyl-thiazolyl-tetrazolium) n-butanol (Lach-Ner, ČR), N',N',N',N'-tetramethylethylendiamin: TEMED (BioRad, USA), N',N'-methylenbisakrylamid (Sigma-Aldrich, Čína), nonidet: P 40 (Fluka, Švýcarsko), orthovanadičnan sodný (Sigma-Aldrich, USA), penicilin (Sigma-Aldrich, USA), propidium jodid (Sigma-Aldrich, USA), proteinový detekčný marker: Spectra Multicolor Broad PageRuler Prestained Protein Ladder 10-250 kDa (Thermo Fisher Scientific, USA), Ponceau S (Serva, Nemecko), streptomycin (Sigma-Aldrich, USA), tris(hydroxymethyl)aminomethan: TRIS (Serva, Nemecko), trypsin (Thermo Fisher Scientific, USA), tween-20: polyoxyethylensorbitanmonolaurát (Sigma-Aldrich, USA).

Všetky skúmané látky **8393**, **8646**, **8647** a **8650** sú novo substituované deriváty indolu. Zlúčeniny navrhol a syntetizoval tím pod vedením Dr. Eglė Arbačiauskienė a Prof. Algirdasa Šačkusa z Katedry organickej chémie na Technologickej univerzite v Kaunase (Litva). Chemická štruktúra zlúčenín bola potvrdená ¹H, ¹³C and ¹⁵N NMR a vysokorozlišujúcou hmotovou spektroskopiou. Čistota testovaných zlúčenín

bola > 95%. Zlúčeniny sa rozpúšťali v dimetylsulfoxide, roztoky sa skladovali pri teplote +4 °C a bezprostredne pred použitím sa riedili do kultivačného média. Obsah dimetylsulfoxidu v kultivačnom médiu nikdy neprekročil 0,1 %. Presné štruktúry nemôžu byť zverejnené, kvôli prioritám ešte neriešených otázok týkajúcich sa duševného vlastníctva. Z tohto dôvodu sú zlúčeniny uvedené pod kódmi.

3.1.2 Roztoky

- blokovací pufr: 5% (w/v) BSA; 0,1% (v/v) Tween 20 v TBS
- blottovací pufr: 25 mmol·l⁻¹ TRIS; 192 mmol·l⁻¹ glycín v dH₂O (pH 8,3)
- Bradfordovo činidlo: 0,01% (w/v) Coomassie-Brilliant blue; 4,7% (v/v) ethanol; 8,5% (v/v) kyselina fosforečná v dH₂O
- ECL roztok: 1:1 luminol a H₂O₂
- elektródový pufr: 25 mmol·l⁻¹ TRIS; 192 mmol·l⁻¹ glycín; 0,1% (w/v) SDS v dH₂O (pH 8,3)
- kultivačné médium DMEM s 10% FS: 10 g práškového média v 1 l sterilnej dH₂O; doplnené: 10% (v/v) FS; penicilín 100 U·ml⁻¹; streptomycín 100 µg·ml⁻¹; 2 mmol·l⁻¹ L-glutamín
- lyzačný pufr RIPA: 20 mmol·l⁻¹ TRIS (pH 7,4); 100 mmol·l⁻¹ NaCl, 2 mmol·l⁻¹ EGTA; 5 mmol·l⁻¹ EDTA; 0,2% (v/v) nonidet P-40 (pH 7,4); 1 mol·l⁻¹ DTT; 1 mmol·l⁻¹ PMSF; 1 mmol·l⁻¹ vanadičnan sodný; 1 mmol·l⁻¹ NaF; 2 µg·ml⁻¹ leupeptín; 0,5 µg·ml⁻¹ aprotinin v dH₂O
- MTT roztok: 2,5 mg·ml⁻¹ práškového MTT v PBS
- odfarbovací roztok: 0,1% (v/v) SDS v dH₂O
- fosfátový pufr (PBS): 137 mmol·l⁻¹ NaCl; 2,7 mmol·l⁻¹ KCl; 10 mmol·l⁻¹ Na₂HPO₄; 2 mmol·l⁻¹ KH₂PO₄ (pH 7,4) v dH₂O
- Ponceau S: 0,2% (w/v) Ponceau S; 1% (v/v) kyselina octová v dH₂O
- SDS vzorkovací pufr: 0,3 mol·l⁻¹ TRIS (pH 6,8); 50% (v/v) glycerol; 10% (w/v) SDS; 5% (v/v) 2-merkapt ethanol; 0,05% (w/v) bromfenolová modrá v dH₂O
- TBS: 137 mmol·l⁻¹ NaCl; 20 mmol·l⁻¹ TRIS (pH 6,8) v dH₂O; pH upravené koncentrovanou HCl na hodnotu 7,6
- TBS-T 20: 137 mmol·l⁻¹ NaCl; 20 mmol·l⁻¹ TRIS; 0,05% (v/v) Tween 20 v dH₂O

3.1.3 Zoznam použitých protilátok

Imunodetekcia proteínov bola prevedená pomocou primárnych (Tab. 2) a sekundárnych protilátok, konjugovaných s chrenovou peroxidásou (Tab. 3). Všetky protilátky boli riedené v BSA ako je uvedené v tabuľkách (Tab. 2, Tab. 3).

Tabuľka 2: Prehľad použitých primárnych protilátok (R = rabbit, M = mouse).

Proteín	M _r antigénu [kDa]	Protilátka	Typ; klon	Výrobca	Riedenie
PARP	116, 97	Anti-PARP	R; 46D11	Cell signaling	1:1000
γH2AX	17	Anti-γH2AX	M; JBW301	Millipore	1:500
Mcl-1	40	Anti-Mcl-1	R; D35A5	Cell signaling	1:500
Bcl-2	26	Anti-Bcl-2	M; -	Sigma Aldrich	1:500
CASP7	35, 20	Anti-CASP7	R; -	Cell signaling	1:500
CASP9	47, 37, 35	Anti-CASP9	R; -	Cell signaling	1:500
HO-1	28	Anti-HO-1	R; P109	Cell signaling	1:500
HQO1	29	Anti-HQO1	M; A180	Cell signaling	1:500
BAX	20	Anti-BAX	R; D2E11	Cell signaling	1:500
GAPDH	37	Anti-GAPDH	M; 0411	Santa Cruz Biotechnology	1:500

Tabuľka 3: Prehľad sekundárnych protilátok.

Protilátka	Typ	Výrobca	Riedenie
Anti-rabbit	IgG-HRP	Cell signaling	1:1000
Anti-mouse	IgG-HRP	Cell signaling	1:1000

3.1.4 Prístrojové vybavenie

- CCD chemiluminiscenčná kamera LAS-4000 (FujiFilm, Japonsko)
- centrifúga BR4i (Jouan, USA)
- centrifúga 5702 (Eppendorf, Nemecko)
- CO₂ inkubátor (Sanyo, Japonsko)
- fluorescenční mikroskop IX 51 (Olympus, Japonsko)
- laminárny box s vertikálnym preúdením vzduchu (Alpina, Poľsko)
- LED matica 414 nm (ULB UPOL)
- magnetická miešačka s ohrevom Arex 6 (Velp Scientifics, Taliansko)

- mikrodôštičkový fluorimeter Tecan infinite 200 pro (Life Sciences, Rakúsko)
- minicentrifúga 5702R (Eppendorf, Nemecko)
- odsávací pumpa FTA2i (Biosan, Lotyšsko)
- optický mikroskop TMS (Nikon, Japonsko)
- prietokový cytometer BD FACS VERSE™ (Becton-Dickinson Company, USA)
- predvážky laboratórne (Kern, Nemecko)
- súprava pre vertikálnu elektroforézu: Mini Protean Tetra Cell (BioRad, USA)
- súprava pro western blotting: Mini Trans-Blot Module (BioRad, USA)
- spektrofotometer UV-1800 (Shimadzu, Japonsko)
- termostat blokový (Kleinfeld labortechnik, Nemecko)
- trepačka vírivá Vortex mixer (Velp Scientifics, Taliansko)
- trepačka s kývavým pohybom MiniRocker MR-1 (Biosan, Lotyšsko)
- ultrazvukový homogenizátor Bandeli Sonopulz
- vodná kúpeľ (GFL, Nemecko)
- zdroj pro elektroforézu a western blotting (E-C Apparatus Corporation, USA)

3.1.5 Programy k prístrojom

Prietokový cytometer BD FACS VERSE™: BD FACSuite (v1.0.6.5230), mikrodôštičkový fluorimeter Tecan infinite 200 pro: Tekan i-control (3.4.2.0), CCD chemiluminiscenčná kamera LAS-4000: LAS-4000 (ver.2.1), Origin (6.0).

3.2 Metódy

3.2.1 Práca s bunkovou kultúrou

Všetky experimenty boli prevádzané na bunkovej línii G361. Táto línia pochádza zo zhubného ľudského melanómu. Bunková kultúra bola kultivovaná v inkubátore na Petriho miskách (\varnothing 9,6 cm, kultivačný povrch 60 cm²) pri 37 °C a 5% CO₂. Línia bola udržiavaná v sterilnom DMEM médiu s 10% fetálnym sérom. Línia buniek bola pasážovaná 2-3x do týždňa, v závislosti na rýchlosti rastu buniek. Keďže línia G361 patrí medzi adherentné línie, zbieranie buniek prebiehalo procesom trypsinizácie. Najprv bolo všetko médium odsaté z kultivačnej nádoby. Nasledoval oplach roztokom 2 ml EDTA, ktorý bol hneď odsatý. Pre uvoľnenie adherentnej línie bolo použitých 1,5 ml, 0,1% roztoku trypsinu, po 2-4 minútach v inkubátore došlo k uvoľneniu buniek z povrchu

Petriho misky. Bunky boli spláchnuté 5 ml DMEM média a rozdelené do ďalších kultivačných nádob. Kultivačné nádoby boli doplnené čerstvým médiom.

3.2.2 Test cytotoxicity

Bunky boli počas experimentu kultivované v 96-jamkových mikrodôštičkách. Množstvo buniek bolo prispôsobené experimentu. Pri 24-hodinovom experimente sa v jednej jamke nachádzalo 20 000 buniek. Do jednotlivých jamiek bola napipetovaná zriedená suspenzia buniek (80 μ l na jamku) podľa príslušného experimentu. Po 24 hodinách v inkubátore boli pridané nariedené (3,3 μ M; 1,1 μ M; 0,3 μ M; 0,1 μ M; 0,03 μ M; 0,01 μ M) testované látky (20 μ l na jamku). Testované látky boli riedené v kultivačnom médiu (DMEM). Prvý stĺpec tvorilo čisté médium bez buniek. V druhom stĺpci bolo k bunkovej suspenzii pridané čisté médium. Následne boli bunky ošetrené jednotlivými zriedenými látkami vždy v duplikátoch. Bunky boli vložené do inkubátoru na 4 hodiny a následne ožiarené svetlom (414 nm) o dávke 10 J·cm⁻². Po 24 hodinách v inkubátore, bol pridaný roztok MTT v PBS. Po 4 hodinách bolo pridaných 100 μ l 10% SDS. Z dôvodu tvorenia bublín roztokom SDS, meranie pokračovalo až nasledujúci deň. Nasledovalo meranie absorbancie pomocou mikrodôštičkového spektrometru (excitácia λ = 570 nm/ emisia λ = 630 nm) a následná analýza dát.

3.2.3 SDS-PAGE a western blotting s imunodetekciou

Na analýzu proteínov boli bunky kultivované na Petriho miskách. Na každej Petriho miske bol rovnaký počet buniek (1 500 000 buniek na miskú). Bunky boli inkubované 24 hodín, a následne ošetrené pomocou jednej zriedenej skúmanej látky (látka 8646). Pred ošetrením bola látka nariedená v kultivačnom médiu (DMEM) na koncentrácie 1,1 μ M; 0,3 μ M a kontrola, ktorá obsahovala len čisté médium. Po 4 hodinách inkubácie, boli vybrané misky rôznej koncentrácie ožiarené energiou 10 J·cm⁻², ďalšie vybrané misky 5 J·cm⁻², a posledné misky boli ponechané v tme. Energia, ktorú bunky dostávali počas experimentu bola určená podľa doby ožiarovania, a podľa elektrického prúdu. Bunky boli inkubované do ďalšieho dňa. Po uplynutí inkubačnej doby boli bunky zozbierané pomocou škrabky do predom vychladených skúmaviek. Skúmavky s bunkovou suspenziou, boli hneď centrifugované (8 min, 1 000 g, 4 °C). Bunky boli 2x premyté PBS a odsaté. Pelety boli uložené do mraziaceho boxu (-80 °C).

V deň experimentu boli pelety vybrané z mraziaceho boxu na ľad a necháné voľne sa rozmraziť. Následne bol pridaný RIPA lyzačný pufr, v ktorom bol pelet rozsuspendovaný. Nasledovala 30-minútová inkubácia, počas ktorej sa roztok ešte niekoľkokrát prepipetoval. Po inkubačnej dobe boli bunkové lyzáty sonikované v ultrazvukovom homogenizátore (10 s, 3 cykly, intenzita 40 %). Po homogenizácii boli skúmavky centrifugované (30 min, 14 000 g, 4 °C).

Po centrifugácii bol supernatant prenesený do čistej skúmavky a bol zaznamenaný jeho objem. Následne bola stanovená celková koncentrácia proteínov Bradfordovou metódou (Bradford, 1976). Ku každej vzorke bol pridaný vzorkovací pufr SDS (5x) v objeme jednej štvrtiny z finálneho objemu jednotlivých vzoriek. Vzorky sa následne premiešali a boli zahrievané 5 minút pri 95 °C.

Pomocou metódy SDS-PAGE bola prevedená separácia proteínov. Elektroforéza bola vykonaná na polyakrylamidovom géle o šírke 1 mm, zloženého z 5% zaostrovacej časti a 15% deliacej časti. Prvá etapa elektroforézy prebiehala pri 80 V, 40 minút. Po vstupe vzoriek do deliaceho gélu bolo zvýšené napätie elektroforézy na 120 V. Druhá etapa elektroforézy trvala 2 hodiny.

Po elektroforéze boli separované proteíny prenesené na nitrocelulóзовú membránu pomocou elektroblottingu. Prenos prebiehal po dobu 3 hodín za stáleho chladenia a konštantného prúdu 280 mA.

Prenesené proteíny boli ofarbené v roztoku Ponceau S. Následne bolo nadbytočné farbivo opláchnuté v destilovanej vode a membrána bola vysušená. Proteíny boli vyrezané z membrány podľa markeru molekulových hmotností a odfarbené v TBS. Po odfarbení boli membrány blokované pomocou 5% roztoku BSA v TBS-T na trepačke. Zablockované membrány boli vysušené filtračným papierom a prenesené do navlhčenej uzatvárateľnej krabičky na podstavec. Každý prúžok membrány bol prevrstvený príslušnou primárnou protilátkou. Prevrtvené membrány sa ponechali cez noc v chladničke pri 4 °C. Nasledujúci deň boli membrány premyté v TBS a TBS-T. Po premytí boli membrány osušené filtračným papierom a znovu prevrstvené, tentokrát sekundárnou protilátkou. Membrány so sekundárnou protilátkou sa nechali hodinu inkubovať pri laboratórnej teplote. Po ukončení inkubačnej doby boli membrány znovu premyté v TBS a TBS-T. Premyté membrány boli osušené na filtračnom papieri a položené na podstavec, kde boli prevrstvené chemiluminiscenčným substrátom ECL na detekciu proteínov. Membrány boli inkubované s ECL 5 minút. Následne prebehla detekcia chemiluminiscenčného signálu pomocou kamery LAS-4000.

3.2.4 Analýza bunkového cyklu pomocou prietokovej cytometrie

Pre analýzu bunkového cyklu boli bunky kultivované v dvanástich malých Petriho miskách (\varnothing 6 cm). Bunky boli inkubované 24 hodín, a následne ošetrené pomocou jednej zriedenej skúmanej látky (látka 8646). Pred ošetrením bola látka nariedená v kultivačnom médiu (DMEM) na koncentrácie 3,3 μM ; 1,1 μM ; 0,3 μM ; kontrola obsahovala len adekvátne nariedený DMSO. Po 4 hodinách inkubácie boli štyri misky rôznej koncentrácie ožiarené svetlom o dávke 10 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$, ďalšie štyri misky 5 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$, a posledné štyri misky boli ponechané v tme. Bunky boli inkubované do ďalšieho dňa. Po uplynutí inkubačnej doby boli bunky pozbierané do skúmavky, pomocou trypsinizácie, podobne ako v kapitole 3.2.1. Následne boli skúmavky centrifugované (8 min, 1000 g, 4 °C). Po centrifugácii bol supernatant odsatý a pelet premytý v 1 ml vychladeného PBS. Nasledovala druhá centrifugácia, po ktorej bol supernatant odsatý a pelet premytý v 100 μl PBS. Bunky boli následne fixované pomocou 1 ml vychladeného ethanolu, ktorý bol za stáleho miešania na vortexe po kvapkách pridávaný. Vzorky boli uskladnené do mrazničky (-20 °C).

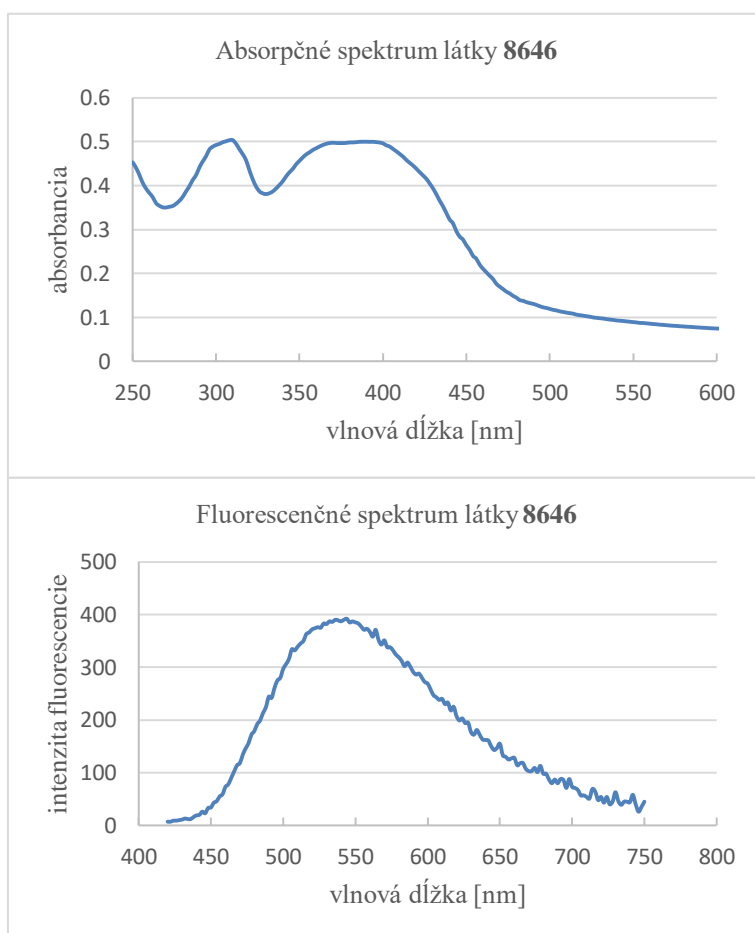
V deň analýzy boli bunky premiešané na vortexe a centrifugované (8 min, 1000 g, 4 °C). Po centrifugácii bol supernatant odsatý, a pelet premytý v 1 ml vychladeného PBS a vzorky boli znovu centrifugované (8 min, 1000 g, 4 °C). Po druhej centrifugácii bol supernatant odsatý, a pelet premytý v 50 μl PBS. Následne bolo po kvapkách pridaných 1 ml HCl za stáleho vortexovania. Nasledovala 15min inkubačná doba, počas ktorej boli vzorky niekoľkokrát premiešané na vortexe. Po inkubačnej dobe boli vzorky centrifugované (8 min, 1000 g, 4 °C). Po centrifugácii bol supernatant opatrne odsatý, a pelet bol zneutralizovaný tetraboritanom sodným. Vzorky boli znovu centrifugované (8 min, 1000 g, 4 °C), a supernatant bol odsatý. Pelet bol rozsuspendovaný v 600 μl filtrovaného roztoku PBS s propidium jodidom o koncentrácii 0,1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Vzorky boli inkubované 30 minút v tme pri laboratórnej teplote. Po inkubačnej dobe bola prevedená analýza bunkového cyklu na prietokovom cytometri. Pre kvantifikáciu zastúpenia buniek v jednotlivých fázach bunkového cyklu, bolo v každej vzorke analyzovaných aspoň 10 000 buniek. Po excitácii pri $\lambda = 535 \text{ nm}$ bola meraná emisia fluorescencie propidium jodidu pri $\lambda = 617 \text{ nm}$.

4 Výsledky a diskusia

4.1 Cytotoxicita testovaných fotosenzitizérov

Cieľom práce bolo zistiť cytotoxický účinok nových zlúčenín po ožiarení svetlom. Prvým krokom bolo overenie spektrálnych vlastností skúmaných látok. Na obrázku (Obr. 5) je znázornené absorpčné a fluorescenčné spektrum látky **8646**. Zo spektier vyplýva, že látka **8646** absorbuje ultrafialové a viditeľné modré svetlo. Preto bol k ďalším experimentom použitý zdroj emitujúci svetlo o vlnovej dĺžke 414 nm. Obdobný postup bol použitý aj vo Varvuolyté et al., 2020, kde boli skúmané látky s podobným absorpčným a fluorescenčným spektrom.



Obrázok 6: Absorpčné a fluorescenčné spektrum látky **8646**.

Cytotoxicita látok študovaných v tejto práci bola určená na základe na metabolickej aktivity prežívajúcich buniek určenej pomocou MTT testu. Z nameraných hodnôt boli určené hodnoty inhibičnej koncentrácie IC_{50} (Tab. 4). Inhibičná koncentrácia (IC_{50}) je koncentrácia, pri ktorej dochádza k zamedzeniu rastu buniek z 50 %. Všetky študované látky mali v tme hodnotu IC_{50} vyššiu ako 10 μ M, čo napovedá o ich obmedzenej

cytotoxicite. Po ožiarení vzoriek svetlom o energii $10 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ sa hodnota IC_{50} viditeľne znížila, čo naznačuje ich toxicitu pri ožiarení svetlom. Látka **8646** bola skoro až päťkrát viac toxická ako najmenej toxická látka **8650**. Z týchto dôvodov bola látka **8646** vybraná pre ďalšie testovanie.

Klinicky používané lieky sú určite účinnejšie, v bunkových experimentoch sa používajú v rádovo nižších koncentráciách než látky popisované v tejto práci. V porovnaní s publikovanými experimentálnymi liekmi však majú skúmané látky aj určitý potenciál. Rozdiel v citlivosti buniek vystavených modrému svetlu a tme na nové študované zlúčeniny je minimálne desaťnásobný, podobne ako v prípade príbuzných zlúčenín (Varvuolyte et al, 2020, Razmiene et al, 2022). V prípade niektorých iných zlúčenín môže byť rozdiel v účinku v tme a na svetle ešte väčší, ale použité svetlo už nemusí byť pre cieľové tkanivo bezpečné. Viditeľné modré svetlo je teda pre ľudské bunky výrazne bezpečnejšie ako napríklad ultrafialové svetlo, ktoré sa používalo na vyvolanie fotodynamického účinku inými heterocyklickými zlúčeninami (Barreca et al., 2022).

Tabuľka 4: Cytotoxická účinnosť analyzovaných látok (IC_{50}) v tme a po ožiarení modrým svetlom o energii $10 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$.

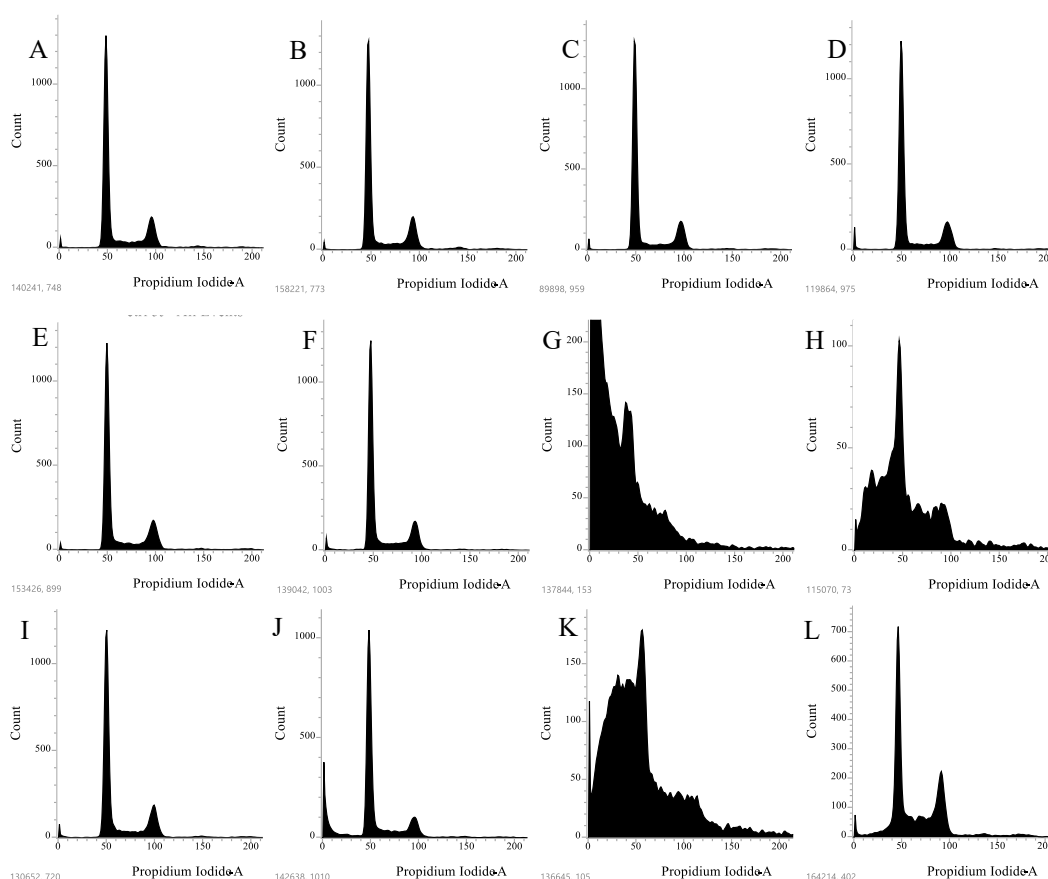
látka	IC_{50} (tma) [μM]	IC_{50} ($10 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$) [μM]
8393	>10	$2,49 \pm 0,27$
8646	>10	$0,93 \pm 0,18$
8647	>10	$1,44 \pm 0,14$
8650	>10	$4,62 \pm 0,44$

4.2 Vplyv látok na bunkový cyklus

V rámci bakalárskej práce bolo cieľom preskúmať cytotoxické účinky štyroch nových látok na bunkovej línii G361 v kombinácii s ožiarením svetlom o vlnovej dĺžke 414 nm. Po prvotných testoch cytotoxicity prevedených s pomocou MTT bola vybraná látka **8646**, ktorá sa javila ako najúčinnjšia. S touto látkou bola prevedená analýza bunkového cyklu pomocou prietokovej cytometrie. Bunky boli ošetrené rôznymi koncentraciami (0,3 μM , 1,1 μM a 3,3 μM) analyzovanej látky, a tiež boli ožiarené rôznymi dávkami svetla (5 a 10 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$).

Profil buniek ošetrovanej látkou **8646** v koncentráciách 0,3 μM ; 1,1 μM ; 3,3 μM (Obr 7B, 7C, 7D), ktoré neboli vystavené žiareniu, je podobný bunkám z kontrolnej neovplyvnenej vzorky (Obr 7A), neobsahujúcej žiadnu svetlocitlivú látku. Väčšina buniek sa nachádza v G_0/G_1 -fáze, čo odpovedá najmenšiemu obsahu DNA, a teda aj najmenšiemu množstvu naviazaného propidium jodidu. Nasleduje S-fáza, kde sa postupne zvyšuje naviazané množstvo propidium jodidu, čo značí postupnú replikáciu DNA, až na G_2 -fázu, kde je najväčšie množstvo DNA a teda najviac naviazaného propidium jodidu. Dôležitou vlastnosťou fotosenzitizéru je netoxičita v tme (Agostinis et al., 2011), čo látka **8646** splnila.

Pri bunkách ošetrovaných rovnakou koncentráciou svetlocitlivej látky **8646** (0,3 μM ; 1,1 μM ; 3,3 μM), ktoré boli po 4 hodinách od aplikácie tejto látky ožiarené svetlom o dávke 5 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$, bola pozorovaná zmena. V prípade vyššej koncentrácie aplikovanej látky, konkrétne 1,1 μM ; 3,3 μM (Obr. 7G, 7H), bola pozorovaná rastúca subdiploidná populácia, čo naznačuje aktiváciu apoptózy. Pri nižších koncentráciách (ctrl, 0,3 μM)



Obrázok 7: Vplyv látky **8646** v kombinácii s modrým svetlom na bunkový cyklus línie G361. (A-D): tma, koncentrácia látky 0; 0,3 μM ; 1,1 μM ; 3,3 μM . (E-H): 5 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$, koncentrácia látky 0; 0,3 μM ; 1,1 μM ; 3,3 μM . (I-L): 10 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$, koncentrácia látky 0; 0,3 μM ; 1,1 μM ; 3,3 μM .

(Obr 7E, 7F), nebol pozorovaný zvýšený apoptotický pík; tieto dva vzorky boli podobné neoštrenej a neožiarenej kontrole (Obr. 7A).

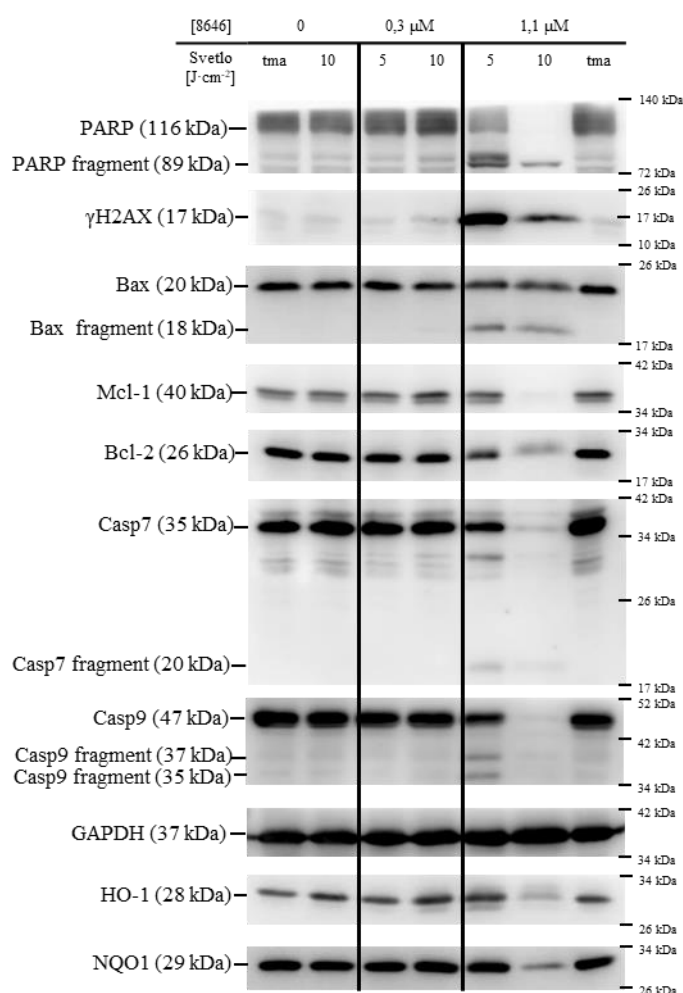
V prípade ožiarenia buniek svetlom o dávke $10 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ nastalo postupné zvyšovanie subdiploidnej populácie. Bunky neošetrené látkou **8646** (Obr. 7I) boli podobné kontrole (Obr. 7A), čo vylučuje poškodenie samotným svetlom. V ďalšej vzorke oštrenej $0,3 \mu\text{M}$ látkou **8646** je subdiploidná populácia výrazne vyššia, a teda je možné predpokladať silnejšiu apoptózu. Vo vzorke s $1,1 \mu\text{M}$ látkou **8646** (Obr. 7K) je ťažké určiť píky jednotlivých fáz bunkového cyklu. V tomto prípade je možné pozvať výraznú apoptotickú aktivitu. Zaujímavým výsledkom je posledná vzorka (Obr. 7L), kde boli píky podobné s kontrolnou vzorkou s vyšším zastúpením G_2 populácie (Obr. 7I). Vizuálna kontrola buniek pod mikroskopom potvrdila silné poškodenie buniek, takže profil bunkového cyklu je neočakávaný. Vysvetlenie môže byť založené na technickej chybe pri manipulácii s bunkami počas farbenia. Je pravdepodobné, že silne poškodené bunky sa vznášali v kultúre, počas centrifugácie nesedimentovali a neboli prítomné v analyzovanej vzorke.

Poškodenie DNA ľudských buniek, či už vyvolané priamo ionizujúcim žiarením alebo genotoxickými zlúčeninami (napr. niektorými protinádorovými cytostatikami) alebo reaktívnymi formami kyslíka vznikajúcimi počas fotodynamickej terapie, je zvyčajne nasledované zastavením proliferácie buniek a indukciou opravných mechanizmov (Agostinis et al., 2011). Zastavenie bunkového cyklu sa zvyčajne pozoruje vo fázach G_1 a G_2 , t. j. pred kritickými fázami replikácie DNA, resp. mitotického delenia (Morales et al., 2014). V prípade masívneho poškodenia DNA sa zvyčajne indukuje smrť buniek. Zvýšenie počtu reaktívnych kyslíkových radikálov, poškodenia DNA a subdiploidnej populácie buniek sa často pozorovalo po pôsobení fotosenzitizérov vrátane syntetických derivátov pyrazoloindolu alebo pyrazolo[4,3-c]pyridínu (Varvuolyte et al, 2020, Razmiene et al, 2022), ktoré sú štruktúrne príbuzné testovanej zlúčenine **8646**.

4.3 Vplyv látok na proteíny súvisiace s apoptózou

Pomocou imunoblottingu bolo sledovaných desať proteínov, ktoré súvisia s apoptózou, či poškodením DNA. Bunky boli ošetrené látkou **8646** v koncentráciách $0,3 \mu\text{M}$ a $1,1 \mu\text{M}$. Po 4 hodinách boli tieto bunky ponechané v tme alebo ožiarené svetlom o energii 5 a $10 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$. Po ďalších 20 hodinách boli bunky zozbierané a analyzované (Obr. 8).

PARP patrí medzi proteíny zapojené do dráh odpovede na poškodenie DNA a je zodpovedný za opravu dvojlákových zlomov homologickou rekombináciou (Morales et al., 2014). Jeho inaktivácia špecifickým štiepením produkujúci fragment o veľkosti 89 kDa je typickým a dobre akceptovaným markerom apoptotickej bunkovej smrti. PARP bol štiepený vo vzorke z buniek s najvyššou koncentráciou a najvyššou dávkou svetla. Podobne fosforylácia histónu H2AX na seríne 139 je uznávaným markerom poškodenia DNA po expozícii žiareniu γ ; označuje sa ako γ H2AX (Solier & Pommier, 2014). Najvyššia hladina tohto proteínu bola pozorovaná vo vzorkách s koncentráciou 1,1 μ M a dávkou svetla 5 a 10 $J \cdot cm^{-2}$. Nárast γ H2AX bol pozorovaný aj u buniek vystavených iným fotosenzitizérom (Varvuolyte et al, 2020).



Obrázok 8: Detekcia proteínov súvisiacich s apoptózou buniek G361, ošetrených analyzovanou látkou **8646** o koncentracii 0,3 μ M a 1,1 μ M a ožiarených modrým svetlom o energii 5 a 10 $J \cdot cm^{-2}$.

Ako už bolo spomenuté v kapitole 2.5.2, proteíny Bax a Bcl-2 sú antagonistami a riadia permeabilitu mitochondriálnej membrány. Vo vzorkách s najvyššou koncentráciou látky **8646** a dávkou svetla 5 a 10 J·cm⁻², bolo pozorované menšie množstvo proteínu Bcl-2 a naopak väčšie množstvo proteínu Bax. To značí zvýšenú permeabilitu mitochondriálnej membrány v týchto vzorkách. Proteín Mcl-1 patrí do rovnakej rodiny proteínov ako proteíny Bax a Bcl-2. Absencia Mcl-1 proteínu odpovedá apoptotickej smrti (Sancho et al., 2022). Absenciu tohto proteínu je možné pozorovať vo vzorke s najvyššou koncentráciou (1,1 μM) a najvyššou dávkou svetla (10 J·cm⁻²).

Medzi ďalšie typické markery apoptotickej bunkovej smrti patria kaspázy. Každá kaspáza má odlišnú úlohu v apoptóze. Aktivácia kaspázy-9 spúšťa proteolytickú kaskádu reakcii, pri ktorých sa aktivujú efektorové kaspázy a ďalšie proteíny spolupracujúce na apoptóze. Kaspáza-7 má podpornú úlohu v apoptóze, ako napríklad akumuláciu produkcie reaktívnych foriem kyslíka (Brentnall et al., 2013). Ich aktivácia je založená na proteolytickom štiepení neaktívnej prekursorovej kaspázy, čo vedie k poklesu jej hladiny a zodpovedajúcemu zvýšeniu hladiny štiepných fragmentov. Tieto zmeny možno ľahko monitorovať pomocou imunoblotu a vhodných protilátok. Prítomnosť aktivovaných kaspáz vo vzorkách s najvyššou koncentráciou (1,1 μM) a s dávkou svetla 5 alebo 10 J·cm⁻², tiež potvrdzuje bunkovú smrť detegovanú prietokovou cytometriou.

Proteíny HO-1 a NQO1 patria antioxidantného obranného mechanizmu buniek. Ich zvýšenou hladinou sa bunky bránia proti apoptóze. U pacientov s rakovinou sa ukázala zvýšená hladina týchto proteínov (Lawal et al., 2015; Zhou et al., 2019). Pokles HO-1 a NQO1 teda naznačuje prebiehajúce apoptotické procesy, čo bolo pozorované vo vzorke s najvyššou koncentráciou (1,1 μM) a najvyššou dávkou svetla (10 J·cm⁻²). Látky na báze pyridínovej štruktúry boli testované aj v Razmiené et al., 2022, kde boli dosiahnuté podobné výsledky.

5 Záver

Cieľom práce bolo overenie účinku nových fotosenzitizačných zlúčenín na bunkovej línii G361 pomocou vybraných metód molekulárnej biológie a biochémie. V prvotnom testovaní bola určená cytotoxicita po ožiarení svetlom, pričom všetky látky mali po ožiarení modrým svetlom ($10 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$) cytotoxickú koncentráciu IC_{50} v intervale 0,9-4,6 μM . Cytotoxicita vo tme bola výrazne slabšia. Látka **8646** bola zo všetkých testovaných zlúčenín po ožiarení najúčinnějšía. Nasledujúca analýza bunkovej DNA farebnej propidium jodidom a meranej pomocou prietokovej cytometrie preukázala, že táto látka spôsobuje nárast subdiploidnej populácie, čo značí prebiehajúcu apoptózu. Podiel subdiploidnej populácie bol závislý na rôznych koncentráciách látky a rôznych dávkach svetla, čo naznačuje špecifický fotodynamický efekt.

Prebiehajúcu apoptózu potvrdila tiež analýza proteínov pomocou imunoblottingu, pre ktorú boli vybrané proteíny súvisiace s bunkovou smrťou. Bolo preukázané, že látka **8646** pri koncentrácii 1,1 μM a pri dávke svetla $10 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ spôsobuje špecifickú fragmentáciu proteínu PARP a kaspáz 7 a 9, a ďalej pokles mitochondriálnych proteínov Bcl-2 a Mcl-1. Výrazný nárast signálu fosforylovaného histónu H2AX potvrdzuje predpokladané poškodenie DNA, spôsobené pravdepodobne nárastom reaktívnych foriem kyslíka. Zmeny v redoxnom stave buniek odrážali tiež poklesy hemoxygenázy HO-1 a dehydrogenázy NQO1.

Získané výsledky naznačujú, že látka **8646** môže mať silné cytotoxické účinky pri vhodnej koncentrácii a po ožiarení vhodnou dávkou svetla. Dôležitým zistením je aj obmedzená cytotoxicita v tme, čo je kľúčové pre ďalší vývoj skúmanej generácie látok s fotosenzitizačným efektom. Aj keď bol fotodynamický účinok skúmaných látok na bunkovom modeli potvrdený, bude potrebné previesť ďalšie testy, zamerané na podrobný mechanizmus účinku týchto látok.

6 Literatúra

- Abels, C. (2004). Targeting of the vascular system of solid tumours by photodynamic therapy (PDT). *Photochemical & Photobiological Sciences*, 3(8), 765-771. <https://doi.org/10.1039/b314241h>
- Abrahamse, H., & Hamblin, M. (2016). New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochemical Journal*, 473(4), 347-364. <https://doi.org/10.1042/BJ20150942>
- Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K., Foster, T., Girotti, A., Gollnick, S., Hahn, S., Hamblin, M., Juzeniene, A., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J., Mroz, P., Nowis, D., Piette, J., Wilson, B., & Golab, J. (2011). Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(4), 250-281. <https://doi.org/10.3322/caac.20114>
- Almeida, A. (2020). Photodynamic Therapy in the Inactivation of Microorganisms. *Antibiotics*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040138>
- Anding, A., & Baehrecke, E. (2015). Autophagy in Cell Life and Cell Death. In *Apoptosis and Development* (pp. 67-91). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.07.012>
- Ash, C., Dubec, M., Donne, K., & Bashford, T. (2017). Effect of wavelength and beam width on penetration in light-tissue interaction using computational methods. *Lasers in Medical Science*, 32(8), 1909-1918. <https://doi.org/10.1007/s10103-017-2317-4>
- Bacellar, I., Tsubone, T., Pavani, C., & Baptista, M. (2015). Photodynamic Efficiency: From Molecular Photochemistry to Cell Death. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 20523-20559. <https://doi.org/10.3390/ijms160920523>
- Barreca, M., Ingarra, A., Raimondi, M., Spanò, V., De Franco, M., Menilli, L., Gandin, V., Miolo, G., Barraja, P., & Montalbano, A. (2022). Insight on pyrimido[5,4-g]indolizine and pyrimido[4,5-c]pyrrolo[1,2-a]azepine systems as promising photosensitizers on malignant cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 237. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114399>
- Belibasakis, G. (2014). Microbiological and immuno-pathological aspects of peri-implant diseases. *Archives of Oral Biology*, 59(1), 66-72. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2013.09.013>
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brentnall, M., Rodriguez-Menocal, L., De Guevara, R., Cepero, E., & Boise, L. (2013). Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2121-14-32>
- Brown, S., Brown, E., & Walker, I. (2004). The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *The Lancet Oncology*, 5(8), 497-508. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(04\)01529-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(04)01529-3)
- Calixto, G., Bernegossi, J., de Freitas, L., Fontana, C., & Chorilli, M. (2016). Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review. *Molecules*, 21(3). <https://doi.org/10.3390/molecules21030342>

- Camacho-Alonso, F., Salinas, J., Sánchez-Siles, M., Pato-Mourelo, J., Cotrina-Veizaga, B., & Ortega, N. (2022). Synergistic antimicrobial effect of photodynamic therapy and chitosan on the titanium-adherent biofilms of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*: An in vitro study. *Journal of Periodontology*, 93(6). <https://doi.org/10.1002/JPER.21-0306>
- Camci-Unal, G., Alemdar, N., Annabi, N., & Khademhosseini, A. (2013). Oxygen-releasing biomaterials for tissue engineering. *Polymer International*, 62(6), 843-848. <https://doi.org/10.1002/pi.4502>
- Celli, J., Spring, B., Rizvi, I., Evans, C., Samkoe, K., Verma, S., Pogue, B., & Hasan, T. (2010). Imaging and Photodynamic Therapy: Mechanisms, Monitoring, and Optimization. *Chemical Reviews*, 110(5), 2795-2838. <https://doi.org/10.1021/cr900300p>
- Colombo, A., Padovan, A., & Chaves, G. (2011). Current Knowledge of *Trichosporon* spp. and Trichosporonosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(4), 682-700. <https://doi.org/10.1128/CMR.00003-11>
- Correia, J., Rodrigues, J., Pimenta, S., Dong, T., & Yang, Z. (2021). Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions. *Pharmaceutics*, 13(9). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091332>
- Dąbrowski, J. (2017). Reactive Oxygen Species in Photodynamic Therapy: Mechanisms of Their Generation and Potentiation. In *Inorganic Reaction Mechanisms* (pp. 343-394). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.adioch.2017.03.002>
- Denton, D., Nicolson, S., & Kumar, S. (2012). Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. *Cell Death & Differentiation*, 19(1), 87-95. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.146>
- Denton, D., & Kumar, S. (2019). Autophagy-dependent cell death. *Cell Death & Differentiation*, 26(4), 605-616. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0252-y>
- Dolmans, D., Fukumura, D., & Jain, R. (2003). Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 380-387. <https://doi.org/10.1038/nrc1071>
- Donnelly, R., McCarron, P., & Tunney, M. (2008). Antifungal photodynamic therapy. *Microbiological Research*, 163(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2007.08.001>
- Donohoe, C., Senge, M., Arnaut, L., & Gomes-da-Silva, L. (2019). Cell death in photodynamic therapy: From oxidative stress to anti-tumor immunity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1872(2). <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.07.003>
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., & Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 391(6662), 43-50. <https://doi.org/10.1038/34112>
- Fu, L., Qi, C., Lin, J., & Huang, P. (2018). Catalytic chemistry of glucose oxidase in cancer diagnosis and treatment. *Chemical Society Reviews*, 47(17), 6454-6472. <https://doi.org/10.1039/C7CS00891K>
- Gualdesi, M., Vara, J., Aiassa, V., Alvarez Igarzabal, C., & Ortiz, C. (2021). New poly(acrylamide) nanoparticles in the development of third generation photosensitizers. *Dyes and Pigments*, 184. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108856>

- Hamblin, M. (2017). *Imaging in Photodynamic Therapy*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b21922>
- Hamblin, M., & Newman, E. (1994). Photosensitizer targeting in photodynamic therapy I. Conjugates of haematoporphyrin with albumin and transferrin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 26(1), 45-56. [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(94\)85035-6](https://doi.org/10.1016/1011-1344(94)85035-6)
- Chinna Ayya Swamy, P., Sivaraman, G., Priyanka, R., Raja, S., Ponnuvel, K., Shanmugpriya, J., & Gulyani, A. (2020). Near Infrared (NIR) absorbing dyes as promising photosensitizer for photodynamic therapy. *Coordination Chemistry Reviews*, 411. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213233>
- Kadkhoda, J., Tarighatnia, A., Barar, J., Aghanejad, A., & Davaran, S. (2022). Recent advances and trends in nanoparticles based photothermal and photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 37. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102697>
- Kolarikova, M., Hosikova, B., Dilenko, H., Barton-Tomankova, K., Valkova, L., Bajgar, R., Malina, L., & Kolarova, H. (2023). Photodynamic therapy: Innovative approaches for antibacterial and anticancer treatments. *Medicinal Research Reviews*, 43(4), 717-774. <https://doi.org/10.1002/med.21935>
- Krzykawska-Serda, M., Dąbrowski, J., Arnaut, L., Szczygieł, M., Urbańska, K., Stochel, G., & Elas, M. (2014). The role of strong hypoxia in tumors after treatment in the outcome of bacteriochlorin-based photodynamic therapy. *Free Radical Biology and Medicine*, 73, 239-251. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.05.003>
- Kwiatkowski, S., Knap, B., Przystupski, D., Saczko, J., Kędzierska, E., Knap-Czop, K., Kotlińska, J., Michel, O., Kotowski, K., & Kulbacka, J. (2018). Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 1098-1107. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.049>
- Lange, N., Szlasa, W., Saczko, J., & Chwiłkowska, A. (2021). Potential of Cyanine Derived Dyes in Photodynamic Therapy. *Pharmaceutics*, 13(6). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060818>
- Lan, Y., Lu, S., Zheng, B., Tang, Z., Li, J., & Zhang, J. (2021). Combinatory Effect of ALA-PDT and Itraconazole Treatment for *Trichosporon asahii*. *Lasers in Surgery and Medicine*, 53(5), 722-730. <https://doi.org/10.1002/lsm.23343>
- Lawal, A., Marnewick, J., & Ellis, E. (2015). Heme oxygenase-1 attenuates cadmium-induced mitochondrial-caspase 3- dependent apoptosis in human hepatoma cell line. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s40360-015-0040-y>
- Law, S., Leung, A., & Xu, C. (2024). Photodynamic Action of Curcumin and Methylene Blue against Bacteria and SARS-CoV-2 — A Review. *Pharmaceutics*, 17(1). <https://doi.org/10.3390/ph17010034>
- Li, L., Song, D., Qi, L., Jiang, M., Wu, Y., Gan, J., Cao, K., Li, Y., Bai, Y., & Zheng, T. (2021). Photodynamic therapy induces human esophageal carcinoma cell pyroptosis by targeting the PKM2/caspase-8/caspase-3/GSDME axis. *Cancer Letters*, 520, 143-159. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.07.014>

- Lin, M., Lee, J., Pan, S., & Wong, T. (2021). Enhancing wound healing in recalcitrant leg ulcers with aminolevulinic acid-mediated antimicrobial photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 33. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102149>
- Maharjan, P., Bhattarai, H., & Zhuo, Z. (2022). Singlet Oxygen, Photodynamic Therapy, and Mechanisms of Cancer Cell Death. *Journal of Oncology*, 2022, 1-20. <https://doi.org/10.1155/2022/7211485>
- Mariné, M., Brown, N., Riaño-Pachón, D., Goldman, G., & Heitman, J. (2015). On and Under the Skin: Emerging Basidiomycetous Yeast Infections Caused by Trichosporon Species. *PLOS Pathogens*, 11(7). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004982>
- Martin, D., Reardon, P., Moniz, S., & Tang, J. (2014). Visible Light-Driven Pure Water Splitting by a Nature-Inspired Organic Semiconductor-Based System. *Journal of the American Chemical Society*, 136(36), 12568-12571. <https://doi.org/10.1021/ja506386e>
- Morales, J., Li, L., Fattah, F., Dong, Y., Bey, E., Patel, M., Gao, J., & Boothman, D. (2014). Review of Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) Mechanisms of Action and Rationale for Targeting in Cancer and Other Diseases. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 24(1), 15-28. <https://doi.org/10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2013006875>
- Morton, C., & Braathen, L. (2018). Daylight Photodynamic Therapy for Actinic Keratoses. *American Journal of Clinical Dermatology*, 19(5), 647-656. <https://doi.org/10.1007/s40257-018-0360-y>
- Naito, M., Hirakawa, H., Yamashita, A., Ohara, N., Shoji, M., Yukitake, H., Nakayama, K., Toh, H., Yoshimura, F., Kuhara, S., Hattori, M., Hayashi, T., & Nakayama, K. (2008). Determination of the Genome Sequence of Porphyromonas gingivalis Strain ATCC 33277 and Genomic Comparison with Strain W83 Revealed Extensive Genome Rearrangements in P. gingivalis. *DNA Research*, 15(4), 215-225. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsn013>
- Nath, S., Obaid, G., & Hasan, T. (2019). The Course of Immune Stimulation by Photodynamic Therapy: Bridging Fundamentals of Photochemically Induced Immunogenic Cell Death to the Enrichment of T-Cell Repertoire. *Photochemistry and Photobiology*, 95(6), 1288-1305. <https://doi.org/10.1111/php.13173>
- Nguyen, M., Sandhu, S., & Sivamani, R. (2019). pClinical utility of daylight photodynamic therapy in the treatment of actinic keratosis – a review of the literature. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 12, 427-435. <https://doi.org/10.2147/CCID.S167498>
- Otvagin, V., Kuzmina, N., Kudriashova, E., Nyuchev, A., Gavryushin, A., & Fedorov, A. (2022). Conjugates of Porphyrinoid-Based Photosensitizers with Cytotoxic Drugs: Current Progress and Future Directions toward Selective Photodynamic Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 65(3), 1695-1734. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01953>
- Park, S., Baik, H., Oh, Y., Oh, K., Youn, Y., & Lee, E. (2011). A Smart Polysaccharide/Drug Conjugate for Photodynamic Therapy. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(7), 1644-1647. <https://doi.org/10.1002/anie.201006038>
- Pham, T., Nguyen, V., Choi, Y., Lee, S., & Yoon, J. (2021). Recent Strategies to Develop Innovative Photosensitizers for Enhanced Photodynamic Therapy. *Chemical Reviews*, 121(21), 13454-13619. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00381>

- Plaetzer, K., Berneburg, M., Kiesslich, T., & Maisch, T. (2013). New Applications of Photodynamic Therapy in Biomedicine and Biotechnology. *BioMed Research International*, 2013, 1-3. <https://doi.org/10.1155/2013/161362>
- Przygoda, M., Bartusik-Aebisher, D., Dynarowicz, K., Ciešlar, G., Kawczyk-Krupka, A., & Aebisher, D. (2023). Cellular Mechanisms of Singlet Oxygen in Photodynamic Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(23). <https://doi.org/10.3390/ijms242316890>
- Razmienė, B., Vojáčková, V., Řezníčková, E., Malina, L., Dambrauskienė, V., Kubala, M., Bajgar, R., Kolářová, H., Žukauskaitė, A., Arbačiauskienė, E., Šačkus, A., & Kryštof, V. (2022). Synthesis of N-aryl-2,6-diphenyl-2H-pyrazolo[4,3-c]pyridin-7-amines and their photodynamic properties in the human skin melanoma cell line G361. *Bioorganic Chemistry*, 119. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105570>
- Reginato, E. (2014). Immune response after photodynamic therapy increases anti-cancer and anti-bacterial effects. *World Journal of Immunology*, 4(1). <https://doi.org/10.5411/wji.v4.i1.1>
- Sancho, M., Leiva, D., Lucendo, E., & Orzáez, M. (2022). Understanding MCL1: from cellular function and regulation to pharmacological inhibition. *The FEBS Journal*, 289(20), 6209-6234. <https://doi.org/10.1111/febs.16136>
- Sarker, M., & Ahn, Y. (2022). Photodynamic inactivation of multidrug-resistant bacteria in wastewater effluent using green phytochemicals as a natural photosensitizer. *Environmental Pollution*, 311. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120015>
- Sato, K., Nagaya, T., Choyke, P., & Kobayashi, H. (2015). Near Infrared Photoimmunotherapy in the Treatment of Pleural Disseminated NSCLC: Preclinical Experience. *Theranostics*, 5(7), 698-709. <https://doi.org/10.7150/thno.11559>
- Setaro, F., Wennink, J., Mäkinen, P., Holappa, L., Trohopoulos, P., Ylä-Herttuala, S., van Nostrum, C., de la Escosura, A., & Torres, T. (2020). Amphiphilic phthalocyanines in polymeric micelles: a supramolecular approach toward efficient third-generation photosensitizers. *Journal of Materials Chemistry B*, 8(2), 282-289. <https://doi.org/10.1039/C9TB02014D>
- Shackley, D., Whitehurst, C., Moore, J., George, N., Betts, C., & Clarke, N. (2000). Light penetration in bladder tissue: implications for the intravesical photodynamic therapy of bladder tumours. *BJU International*, 86(6), 638-643. <https://doi.org/10.1046/j.1464-410x.2000.00872.x>
- Simões, J., Sarpaki, S., Papadimitroulas, P., Therrien, B., & Loudos, G. (2020). Conjugated Photosensitizers for Imaging and PDT in Cancer Research. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(23), 14119-14150. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00047>
- Solier, S., & Pommier, Y. (2014). The nuclear γ -H2AX apoptotic ring: implications for cancers and autoimmune diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(12), 2289-2297. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1555-2>
- Song, Y., Lin, J., Zhang, Z., Xu, B., & Bi, L. (2021). Antimicrobial effect of photodynamic therapy using sinoporphyrin sodium and 390–400 nm light-emitting diode on *Porphyromonas gingivalis* in vitro. *Lasers in Medical Science*, 36(1), 153-164. <https://doi.org/10.1007/s10103-020-03067-2>
- Stennicke, H., Jürgensmeier, J., Shin, H., Deveraux, Q., Wolf, B., Yang, X., Zhou, Q., Ellerby, H., Ellerby, L., Bredesen, D., Green, D., Reed, J., Froelich, C., & Salvesen, G. (1998). Pro-caspase-

- 3 Is a Major Physiologic Target of Caspase-8. *Journal of Biological Chemistry*, 273(42), 27084-27090. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.42.27084>
- Tariq, R., Khalid, U., Kanwal, S., Adnan, F., & Qasim, M. (2021). Photodynamic Therapy: A Rational Approach Toward COVID-19 Management. *Journal of Exploratory Research in Pharmacology*, 000(000), 000-000. <https://doi.org/10.14218/JERP.2020.00036>
- van Straten, D., Mashayekhi, V., de Bruijn, H., Oliveira, S., & Robinson, D. (2017). Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions. *Cancers*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/cancers9020019>
- Varvuolytė, G., Malina, L., Bieliauskas, A., Hošíková, B., Simerská, H., Kolářová, H., Kleizienė, N., Kryštof, V., Šačkus, A., & Žukauskaitė, A. (2020). Synthesis and photodynamic properties of pyrazole-indole hybrids in the human skin melanoma cell line G361. *Dyes and Pigments*, 183. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108666>
- Wang, H., Qiao, C., Guan, Q., Wei, M., & Li, Z. (2023). Nanoparticle-mediated synergistic anticancer effect of ferroptosis and photodynamic therapy: Novel insights and perspectives. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18(4). <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2023.100829>
- Weber, H., Mehran, Y., Orthaber, A., Saadat, H., Weber, R., & Wojcik, M. (2020). Successful Reduction of SARS-CoV-2 viral load by Photodynamic Therapy (PDT) verified by QPCR -a novel approach in treating patients in early infection stages Background. *Medical & Clinical Research*, 5(11), 311-341.
- Yanovsky, R., Bartenstein, D., Rogers, G., Isakoff, S., & Chen, S. (2019). Photodynamic therapy for solid tumors: A review of the literature. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 35(5), 295-303. <https://doi.org/10.1111/phpp.12489>
- Yokoi, K., Yasuda, Y., Kanbe, A., Imura, T., & Aoki, S. (2023). Development of Wireless Power-Transmission-Based Photodynamic Therapy for the Induction of Cell Death in Cancer Cells by Cyclometalated Iridium(III) Complexes. *Molecules*, 28(3). <https://doi.org/10.3390/molecules28031433>
- Yoon, I., Li, J., & Shim, Y. (2013). Advance in Photosensitizers and Light Delivery for Photodynamic Therapy. *Clinical Endoscopy*, 46(1). <https://doi.org/10.5946/ce.2013.46.1.7>
- Youle, R., & Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(1), 47-59. <https://doi.org/10.1038/nrm2308>
- Zhang, C., Qin, W., Bai, X., & Zhang, X. (2020). Nanomaterials to relieve tumor hypoxia for enhanced photodynamic therapy. *Nano Today*, 35. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2020.100960>
- Zhou, H., Zeng, H., Yuan, D., Ren, J., Cheng, S., Yu, H., Ren, F., Wang, Q., Qin, Y., Huang, A., & Chen, J. (2019). NQO1 potentiates apoptosis evasion and upregulates XIAP via inhibiting proteasome-mediated degradation SIRT6 in hepatocellular carcinoma. *Cell Communication and Signaling*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0491-7>
- Zhou, T., Xing, L., Fan, Y., Cui, P., & Jiang, H. (2019). Light triggered oxygen-affording engines for repeated hypoxia-resistant photodynamic therapy. *Journal of Controlled Release*, 307, 44-54. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.06.016>

Zhuang, S., Demirs, J., & Kochevar, I. (2001). Protein kinase C inhibits singlet oxygen-induced apoptosis by decreasing caspase-8 activation. *Oncogene*, 20(46), 6764-6776. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204867>

Zupin, L., Fontana, F., Clemente, L., Borelli, V., Ricci, G., Ruscio, M., & Crovella, S. (2022). Optimization of Anti-SARS-CoV-2 Treatments Based on Curcumin, Used Alone or Employed as a Photosensitizer. *Viruses*, 14(10). <https://doi.org/10.3390/v14102132>

7 Zoznam použitých symbolov a skratiek

AIF	apoptosis-inducing factor
APAF1	apoptotic protease activating factor-1
Bax	BCL2 Associated X protein
Bcl-2	B-cell Lymphoma 2
BSA	bovine serum albumine
CASP7	Caspase 7
CASP9	Caspase 9
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimethylsulfoxide
DTT	dithiotreitol
ECL	enhanced chemiluminiscent substrate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
FADD	Fas-associated death domain
FS	fetal serum
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HO-1	Heme oxygenase-1
HQO1	NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1
HRP	horseradish peroxidase
Mcl-1	Myeloid cell leukemia-1
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
PARP	poly(ADP-ribose) polymerase-1
SDS	sodium dodecyl sulfate
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
γ H2AX	H2AX histone phosphorylated at serine 139