

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

**Disertační práce**

**Olomouc 2021**

**Mgr. Lukáš Malina**

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Lékařská fakulta

Ústav lékařské biofyziky



Studium porfyrinových sensitizérů a xanthenových barviv indukujících  
fotodynamickou reakci *in vitro*

**Mgr. Lukáš Malina**

Studijní program: Lékařská biofyzika

Forma studia: prezenční

**Olomouc 2021**

Vedoucí práce: **doc. Ing. Kateřina Bartoň Tománková, Ph.D.**

Prohlašuji, že jsem tuto disertační práci vypracoval samostatně v průběhu postgraduálního studia pod vedením doc. Ing. Kateřiny Bartoň Tománkové, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

Olomouc, 2021

Mgr. Lukáš Malina

.....

Děkuji vedoucímu disertační práce doc. Ing. Kateřině Bartoň Tománkové, 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. Josefovi Skopalíkovi, Ph.D. za pomoc při analýze buněčného cyklu a Mgr. Kateřině Polákové, Ph.D. z RCPTM za pomoc při charakterizaci GO/TMPyP. Děkuji také zaměstnancům Ústavu lékařské biofyziky za cenné rady a pomoc při praktické části disertační práce.

# OBSAH

1	CÍLE PRÁCE.....	13
2	ÚVOD.....	14
3	LITERÁRNÍ REŠERŠE .....	16
3.1	HISTORIE .....	16
3.2	FOTODYNAMICKÁ TERAPIE.....	17
3.2.1	FOTOSENSITIZÉRY.....	18
3.2.1.1	ROZDĚLENÍ PODLE GENERACE .....	18
3.2.1.2	DALŠÍ DĚLENÍ FOTOSENSITIZÉRŮ.....	30
3.2.1.3	IDEÁLNÍ FOTOSENSITIZÉR.....	31
3.2.2	ZÁŘENÍ.....	33
3.2.2.1	ZDROJE ZÁŘENÍ .....	34
3.2.2.2	METODY OZAŘOVÁNÍ.....	39
3.2.3	KYSLÍK.....	41
3.2.4	MECHANISMY BUNĚČNÉ SMRTI .....	45
3.2.4.1	PŘÍMÉ USMRCENÍ.....	48
3.2.4.2	NEPŘÍMÉ USMRCENÍ .....	52
4	MATERIÁL.....	55
4.1	BUNĚČNÉ LINIE .....	55
4.2	FOTOSENSITIZÉRY.....	55
4.3	OSTATNÍ MATERIÁL.....	57
4.4	LABORATORNÍ ZAŘÍZENÍ A POUŽITÉ PROGRAMY .....	58
5	METODY .....	59
5.1	PŘÍPRAVA FOTOSENSITIZÉRU A OZAŘOVÁNÍ.....	59
5.2	MTT TEST.....	62
5.3	DETEKCE REAKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU .....	62
5.4	ZTRÁTA MITOCHONDRIÁLNÍHO MEMBRÁNOVÉHO POTENCIÁLU.....	63
5.5	DETEKCE APOPTOTICKÝCH A NEKROTICKÝCH BUNĚK .....	64
5.6	KOMETOVÁ ANALÝZA .....	64

5.7	URČENÍ FÁZE BUNĚČNÉHO CYKLU .....	65
5.8	MĚŘENÍ YOUNGOVA MODULU PRUŽNOSTI.....	66
5.9	SPEKTROSKOPICKÉ URČENÍ ABSORPČNÍHO MAXIMA .....	67
5.10	KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIE .....	67
5.11	STATISTICKÁ ANALÝZA.....	67
6	VÝSLEDKY .....	69
6.1	PORFYRINOVÉ FOTOSENSITIZÉRY .....	69
6.1.1	KOMETOVÁ ANALÝZA .....	69
6.1.2	URČENÍ FÁZE BUNĚČNÉHO CYKLU .....	73
6.1.3	MĚŘENÍ YOUNGOVA MODULU PRUŽNOSTI.....	78
6.2	XANTHENOVÁ BARVIVA .....	80
6.2.1	MTT TEST.....	80
6.2.2	DETEKCE REAKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU .....	86
6.2.3	ZTRÁTA MITOCHONDRIÁLNÍHO MEMBRÁNOVÉHO POTENCIÁLU....	88
6.2.4	DETEKCE APOPTOTICKÝCH A NEKROTICKÝCH BUNĚK .....	91
6.2.5	KOMETOVÁ ANALÝZA .....	93
6.2.6	KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIE .....	96
6.3	FOTOSENSITIZÉR 3. GENERACE .....	97
6.3.1	SPEKTROSKOPICKÉ URČENÍ ABSORPČNÍHO MAXIMA .....	97
6.3.2	KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIE .....	98
6.3.3	MTT TEST.....	100
6.3.4	DETEKCE REAKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU .....	101
7	DISKUZE .....	103
8	ZÁVĚR.....	109
9	SEZNAM ZKRATEK .....	111
10	POUŽITÉ ZDROJE .....	112
11	PUBLIKAČNÍ ČINNOST AUTORA .....	129

## SOUHRN

Tato disertační práce se zabývá studiem sensitizérů a fotodynamické terapie *in vitro*. Fotodynamická terapie je neustále se vyvíjející metoda, která využívá 3 základní složky – fotosensitivní látku, světlo a kyslík. Principem této terapie je aktivace fotosensitivní látky pomocí světelného záření o vhodné vlnové délce. Takto aktivovaná látka může poté svou energii předat kyslíku za vzniku jeho reaktivních forem, které jsou pro buňky cytotoxické a vedou k její destrukci. Fotodynamická terapie má velmi velký potenciál a všestranné využití. Používá se jako hlavní, doplňková (například po resekci nádoru) nebo paliativní léčebná metoda. Využívá se zejména při léčbě nádorového onemocnění (zhoubného i nezhooubného), nenádorového onemocnění (lupénka, akné, lidský papilomavirus nebo sklerodermie) nebo jako antimikrobiální metoda (zejména proti resistantním bakteriím).

Teoretická část této práce se zaměřuje na shrnutí všech důležitých poznatků ohledně fotodynamické terapie, jako je přehled fotosensitizérů a jejich rozdělení do různých skupin, příklady zdrojů záření a způsobů ozařování nebo mechanismy vzniku reaktivních forem kyslíku, včetně buněčných struktur, které poškozují. Součástí je také vysvětlení procesů vedoucí k přímé buněčné smrti a k nepřímému celkovému zničení nádoru.

Experimentální část zahrnovala *in vitro* experimenty s celkem 3 druhy fotosensitizérů – porfyrinovými látkami, xanthenovými barvivy a fotosensitizérem 3. generace. První část experimentů navazovala na diplomovou práci a zahrnovala pokusy s porfyrinovými fotosensitizéry (TPPS<sub>4</sub>, ZnTPPS<sub>4</sub>, PdTPPS<sub>4</sub> a MgTPPS<sub>4</sub>) na nádorových G361 a nenádorových NIH3T3 buněčných liniích a při plošné hustotě světelné energie o velikosti 1 J/cm<sup>2</sup>, 5 J/cm<sup>2</sup> a 10 J/cm<sup>2</sup>. Výsledky kometové analýzy neprokázaly, že by některá z těchto látek svým působením poškozovala DNA a způsobovala tak její fragmentaci. V případě analýzy fáze buněčného cyklu byl předpoklad, že by fotodynamická terapie mohla způsobovat zastavení cyklu v určité fázi, nicméně výsledky z průtokové cytometrie neprokázaly signifikantní rozdíly mezi jednotlivými fázemi při porovnání s kontrolními buňkami. Pomocí mikroskopu atomárních sil byly zjištěny hodnoty Youngova modulu, které vyjadřovaly pružnost buněčných membrán. Pružnost těchto membrán je ovlivněna zejména

cytoskeletem buňky. Výsledky měření Youngova modulu po fotodynamické terapii pak v případě nádorové buněčné linie prokázaly změnu v pružnosti, což značí poškození cytoskeletální struktury buněk.

Druhá část experimentů se týkala studie xanthenových barviv (Rose Bengal a erythrosinu B) a jejich účinků ve fotodynamické terapii u G361 a NIH3T3 buněčných liniích a při plošné hustotě světelné energie 5 J/cm<sup>2</sup>. Jelikož nebyla známa toxicita samotných látek, bylo potřeba provést MTT test bez ozáření, který však neprokázal signifikantní snížení životnosti v porovnání s kontrolou. Z výsledků MTT testu po fotodynamické terapii je patrná závislost životnosti buněk na koncentraci jednotlivých fotosensitizerů, kdy s rostoucí koncentrací klesala také životnost. Zjištěné hodnoty IC<sub>50</sub> (koncentrace, při které se životnost sníží o 50 %) ukázaly u obou látek větší účinnost (menší IC<sub>50</sub>) u nádorové linie než v případě nenádorové linie. Vzájemné srovnání xanthenových barviv prokázalo více jak 20× větší účinnost látky Rose Bengal. Detekcí produkce reaktivních forem kyslíku bylo zjištěno, že u obou fotosensitizerů dochází v porovnání s kontrolou při koncentraci IC<sub>50</sub> k nárůstu o minimálně 200 %, u dvojnásobné koncentrace pak minimálně o 400 %. Tento fakt je velice důležitý, protože potvrzuje zvýšenou produkci reaktivních forem kyslíku, která je jednou z podmínek pro potenciální fotosensitizerů. Analýzou detekce ztráty mitochondriálního membránového potenciálu bylo zjištěno, že dochází k určitému poškození mitochondrií. Jelikož však podle naměřených hodnot nebylo toto poškození rozsáhlé, lze konstatovat, že Rose Bengal i erythrosin B primárně nepoškozují tyto buněčné organely. K určení, k jaké formě buněčné smrti po fotodynamické terapii dochází, byl použit Annexin FITC kit, který umožňuje rozlišit apoptotické a nekrotické buňky. Z výsledných grafů bylo patrné, že po fotodynamické terapii s xanthenovými barvivy převažovala u obou buněčných linií nekróza. Tato převaha poté rostla s vyšší koncentrací jednotlivých látek. Cílem kometové analýzy bylo určit, zda některý z fotosensitizerů poškozuje DNA a způsobuje její fragmentaci. Výsledky v případě Rose Bengal i erythrosinu B prokázaly, že k určité fragmentaci dochází, a že rozsah tohoto poškození je přímo úměrný koncentraci látek.

Poslední část experimentů měla za cíl ověřit fotodynamický účinek fotosensitizeru třetí generace, který vznikl spojením TMPyPu (fotosensitizer druhé generace) s přenašečem, kterým byl oxid grafenu. Takto vytvořený



fotosensitizer GO/TMPyP byl poté porovnán se samotným TMPyPem. Pokusy byly provedeny na buněčné linii HeLa a s plošnou hustotou světelné energie  $30 \text{ J/cm}^2$  (740 nm záření) a  $1 \text{ J/cm}^2$  (414 nm záření). První rozdíl byl zaznamenán v UV-Vis absorpčním spektru, kde došlo k posunu z 417 nm (TMPyP) na 437,5 nm (GO/TMPyP). Větší účinnost kompozitu GO/TMPyP pak potvrdila naměřená koncentrace IC<sub>50</sub>, kdy došlo ke snížení této koncentrace z 8,224  $\mu\text{M}$  (TMPyP) na 5,228  $\mu\text{M}$  (GO/TMPyP). Ze srovnání výsledků produkce reaktivních forem kyslíku je patrné, že ačkoliv při nízkých koncentracích 0,25  $\mu\text{M}$  a 2,5  $\mu\text{M}$  není rozdíl v produkci příliš velký, při následné vyšší koncentraci došlo k viditelně většímu nárůstu v produkci reaktivních forem kyslíku u kompozitu GO/TMPyP než v případě samotného TMPyPu.

Na základě provedených experimentů lze tedy konstatovat, že Rose Bengal spolu s GO/TMPyP kompozitem představují vhodné kandidáty pro další *in vitro* studie, které by následně mohly vést k *in vivo* studiím.

## SUMMARY

This thesis is focused on the effect of sensitizers and photodynamic therapy *in vitro*. The photodynamic therapy is permanently evolving method using 3 main components – a photosensitive substance, a light and an oxygen. Principle of the therapy is an activation of photosensitive substance by irradiation with appropriate wavelength. Then, the activated substance can transfer its energy to oxygen to produce reactive oxygen species, which are cytotoxic and lead to cell destruction. Photodynamic therapy has a great potential and versatile application. It can be used as a primary, additional (e.g. after tumour resection) or palliative therapeutic method. It is used particularly to treat tumour diseases (both malignant and benign), non-cancerous diseases (e.g. psoriasis, acne, human papilloma virus and morphea) or as antimicrobial method (especially against resistant bacteria).

The theoretical part of the thesis is focused on summary of all relevant knowledge about photodynamic therapy such as an overview of photosensitizers and their sorting into various categories, an examples of irradiation sources and irradiation methods or mechanisms of reactive oxygen species production together with cell structures affected by them. There is also part explaining processes leading to direct cell death or indirect destruction of the tumour.

The experimental part included *in vitro* experiments with 3 different kinds of photosensitizers – porphyrin derivates, xanthene dyes and 3<sup>rd</sup> generation photosensitizer. First part of experiments were sequels to master's thesis research and included tests of porphyrin photosensitizers (TPPS<sub>4</sub>, ZnTPPS<sub>4</sub>, PdTPPS<sub>4</sub> a MgTPPS<sub>4</sub>) on melanoma G361 and non-melanoma NIH3T3 cell lines with light dose in the range of 1 J/cm<sup>2</sup>, 5 J/cm<sup>2</sup> a 10 J/cm<sup>2</sup>. The results of comet assay didn't prove any damage of DNA or its fragmentation caused by any of these substances. In case of cell cycle arrest analysis, there was an assumption that the photodynamic therapy could be the cause of cell cycle arrest in specific phase. However, the the results from flow cytometry didn't show any significant differences between individual phases in comparison with control. Using atomic force microscope, Young's modulus corresponding with elasticity of cell membrane was measured. The membrane elasticity is influenced mainly by cellular cytoskeleton. The results of Young's modulus measurement after photodynamic therapy showed in case of cancer cell line a change in elasticity of the cell, which point to damage of cytoskeleton.

The second part of experiments included a study of xanthene dyes (Rose Bengal and erythrosin B) and their effect in photodynamic therapy on G361 and NIH3T3 cell lines with light dose of 5 J/cm<sup>2</sup>. Since a toxicity of these dyes was unknown, a MTT test with no irradiation needed to be done. However, the test didn't prove any significant decrease in viability in comparison with the control. The results of MTT test after photodynamic therapy showed a dependency of cell viability on the concentration of both photosensitizers - the higher concentration the lower viability of cells. Determined values of IC50 (the concentration causing the decrease of cell viability by 50 %) showed higher efficacy (lower IC50) of both dyes in case of cancer cell line compared with non-cancer cell line. Mutual comparison of both xanthene dyes proved more than 20 times higher efficacy of Rose Bengal. By detection of reactive oxygen species production was found out that in comparison with control, there is at least 200 % increase of reactive oxygen species in case of IC50 of both photosensitizers and at least 400 % in case of twofold concentration. This finding is very important because it confirms higher production of reactive oxygen species, which is one of several conditions for potential photosensitizers. Analysis of mitochondrial membrane potential loss proved there is some mitochondrial damage. Since the measured values didn't prove the damage to be extensive, it can be stated that both Rose Bengal and erythrosin B do not primarily harm these cell organelles. To determine the mode of cell death after photodynamic therapy, the Annexin FITC kit enabling apoptotic and necrotic cell distinguishing was used. The necrotic predominance in case of both cell lines and both xanthene dyes after photodynamic therapy was evident from the resulting graphs. The higher concentration of both substances the bigger superiority of necrotic cells. The aim of comet assay was to determine any damage and fragmentation of DNA caused by any of both photosensitizers. In case of both Rose Bengal and erythrosin B, the results proved certain degree of fragmentation and that the fragmentation is dependent on the concentration of dyes – the higher concentration the bigger damage and fragmentation of DNA.

The aim of the last part of experiments was to verify photodynamic effect of 3<sup>rd</sup> generation photosensitizer which was created by conjugation of TMPyP (2<sup>nd</sup> generation photosensitizer) with suitable carrier – graphene oxide. Then, the conjugated photosensitizer GO/TMPyP was compared with TMPyP itself. The experiments included HeLa cell line and two light doses – 30 J/cm<sup>2</sup> (740 nm) and 1

J/cm<sup>2</sup> (414 nm). The first difference between both photosensitizers was detected in UV-Vis spectrum where the absorption band at 417 (TMPyP) shifted to 437,5 nm (GO/TMPyP). Then, the higher efficacy of GO/TMPyP conjugate was confirmed by measured IC50 values, where the concentration decreased from 8,224 μM (TMPyP) to 5,228 μM (GO/TMPyP). Although the results of reactive oxygen species production didn't show any significant differences in low concentrations (0,25 μM and 2,5 μM), the increase of reactive oxygen species production in followed concentration was in case of GO/TMPyP evident in comparison with TMPyP alone.

Based on the performed experiments, it can be stated that Rose Bengal and GO/TMPyP composite represent potentially applicable candidates for another *in vitro* studies which may subsequently lead to *in vivo* studies.

# 1 CÍLE PRÁCE

1. Ověřit účinnost fotodynamického jevu *in vitro* s využitím porfyrinových a xanthenových fotosensitivních látek.
2. Charakterizovat vliv fotosensitizerů na nádorové a nenádorové buněčné linie.
3. Zhodnotit míru buněčného poškození po aplikaci porfyrinových a xanthenových fotosensitizerů s využitím fluorescenčních metod a moderních mikroskopických technik.

## 2 ÚVOD

Fotodynamická terapie (PDT) je neinvazivní metoda léčby premaligních a neoplastických lézí, která je založena na kombinaci monochromatického světla a fotosensitizeru (Kaleta-Richter a kol., 2019). Jedná se o lékařskou metodu, která byla schválena k léčbě určitých forem rakoviny. Používá se v kombinaci s tradičními protinádorovými terapiemi, jako je například operace, chemoterapie a radioterapie. V určitých situacích může tyto metody dokonce i zcela nahradit (McFarland a kol., 2020).

Fotosensitivní látky by neměly být samy o sobě toxické, dokud nedojde k jejich aktivaci světlem. K tomu je potřeba světelný zdroj, který světlo vede k postiženému místu například pomocí optických vláken (Houthoofd a kol., 2020). Dalším zdrojem mohou být například lampy nebo LED (světlo emitující diody).

Ozáření fotosensitivní látky světlem určité vlnové délky dodá fotosensitizeru (PS) potřebnou energii ke změně ze svého základního stavu do excitovaného, který má však velmi krátké trvání. Ke ztrátě této energie dochází jednak ve formě tepla a fluorescence, ale také předáním této energie dvěma mechanismy, které generují reaktivní formy kyslíku (ROS) a označují se jako I. a II. typ (Roguin a kol., 2019). V I. typu reakce dojde k předání energie excitovaného PS interakcí s buněčným substrátem, který pak následně tuto energii předá kyslíku za vzniku reaktivních forem kyslíku, jako jsou superoxidové, hydrogen peroxidové nebo hydroxylové radikály. II. typ reakce zahrnuje přenos energie mezi excitovaným PS a molekulou kyslíku za vzniku singletního kyslíku, který se také řadí k ROS (Figueira a Veltrini, 2017). Výsledné produkty obou typů reakcí jsou cytotoxické a poškozují mnoho buněčných molekul (membránové lipidy, proteiny, DNA, RNA). Výsledný efekt těchto změn závisí u cílových buněk na mnoha faktorech – typ PS, koncentrace, doba ozáření, ale také různé děje uvnitř samotné buňky (Grandi a kol., 2018).

Porfyriny i xanthenová barviva jsou fotosensitizery druhé generace (Chudy a kol., 2018). Díky jejich rozdílnému složení se také liší i jejich vlastnosti jako je například aktivační vlnová délka nebo jejich charakter. Zatímco porfyrinové fotosensitizery jsou aktivované v modrofialové oblasti a mají hydrofobní charakter, xanthenová barviva jsou aktivovaná v zelené oblasti a mají hydrofilní charakter. Právě jejich rozpustnost ovlivňuje způsob procházení skrze buněčnou membránu. To má následně také vliv na struktury v buňce, které jsou poté vlivem fotodynamické terapie poškozeny.

Výhodou xanthenových barviv je lepší nádorová selektivita a vysoký výtěžek při tvorbě ROS (Wang a kol., 2019; Reis a kol., 2019).

Tato práce se zabývá studiem účinků porfyrinových fotosensitizerů a xanthenových barviv indukujících fotodynamický jev *in vitro* u nádorové G361 a nenádorové NIH3T3 buněčné linie. Cílem není pouze určit, který z daných fotosensitizerů je nejúčinnější proti nádorové buněčné linii, ale také odhalit vlastnosti daných látek. Toto zjištění pomůže nejen určit, zda jsou tyto látky vhodné pro fotodynamickou terapii, ale také umožní upřesnit, jaké struktury v buňce každá z látek poškozuje, a také k jaké formě buněčné smrti tato poškození vedou.

## 3 LITERÁRNÍ REŠERŠE

### 3.1 HISTORIE

Fototerapie hrála důležitou roli při léčbě dermatologických chorob již před více než 3500 lety, kdy egyptští a indiští léčitelé používali k tomuto účelu kombinaci slunečního světla (helioterapii) a požívání rostlinných výtažků (DePry a kol., 2015). Staří Egypťané používali kombinaci perorálně podávaných rostlin (obsahující světlem aktivované psoraleny) a slunečního záření k úspěšné léčbě vitiliga (Sternberg a kol., 1998). Existují také záznamy o indických léčitelích, kteří využívali léčení založené na požívání semen rostliny *Psoralea corylifolia* a slunečním světlem. Využívalo se toho například při léčbě leukodermy. Okolo roku 1100 zmiňuje arabský fyzik Ibn al-Bitar ve své knize léčbu vitiliga pomocí orálně podávaných extraktů z *Ammi majus* a slunečního světla (Hönigsmann 2013). Také známý řecký lékař Hérodotos, zvaný též „otec helioterapie“, zdůrazňoval vliv světla na obnovu zdraví (Zimčík a Miletín, 2004).

Ačkoliv lze jen těžko porovnávat tato zmíněná léčení se současnou terapií, tak je patrné, že už v dávných dobách si lidé uvědomovali vlastnosti slunečního záření a zároveň předpokládali jeho léčebné účinky v kombinaci s určitými látkami.

Průlom nastal až v roce 1900, kdy Oscar Raab popsal usmrcení prvoků rodu *Paramecium* prostřednictvím interakce mezi akridinovou červení a infračerveným zářením (Oniszczyk a kol., 2016).

V roce 1903 Yon Tappeiner a Jesionek poté použili topicky aplikovaný eosin a světlo k léčbě kožních nádorů (Kessel 2004). Následně Tappeiner a jeho skupina určili, že tento „fotodynamický efekt“ vyžaduje přítomnost fotosenzitizéru, světla a kyslíku.

Niels R. Finsen získal v roce 1903 Nobelovu cenu za Fyziologii a Medicínu díky své práci, která se zabývala léčbou kožní tuberkulózy (Maeda a kol., 2016). Právě Finsenovi se připisují velké zásluhy za pokrok v oblasti fototerapie.

Další významnou osobností v oblasti PDT byl Dr. Sam Schwartz. Ten se velmi zajímal o porfyriny a experimentoval s různými porfyriny, u kterých se zdálo, že se lokalizují v neoplastické tkáni. Pokusil se vyčistit hematoporfyrin, jeden z porfyrinů, který lze získat z protoporfyrinu v hemoglobinu za přítomnosti silných kyselin. Schwartz vystavil hematoporfyrin působení směsi sírové a octové kyseliny a následně ho neutralizoval pomocí hydroxidu sodného. Výsledkem byla velice komplexní směs, která vykazovala mimořádné tumor-lokalizující vlastnosti. Schwartz tento produkt pojmenoval HPD (derivát hematoporfyrinu) (Kessel 2015).

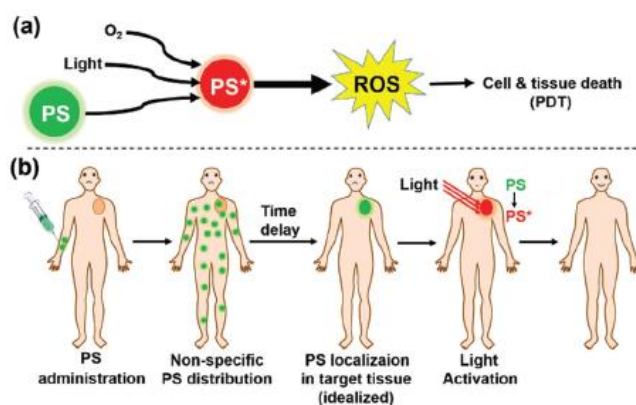


Friederich Meyer-Betz provedl první hematoporfyrinem zprostředkovanou fotodynamickou terapii na člověku tak, že si sám sobě aplikoval 200 mg látky a zůstal stát na světle (Cengel a kol., 2016). Během tohoto pokusu došlo k šokové reakci, která ho málem připravila o život.

Využití fotodynamické terapie pro léčbu rakoviny kůže u lidí zkoumal v 90. letech 19. století Thomas Dougherty. Jeho využití derivátu hematoporfyrinu bylo založeno na průkopnické práci Policarda a jeho kolektivu, ve které demonstroval, že porfyriny jsou přednostně distribuovány do maligních tkání než do normálních zdravých tkání (Dobson a kol., 2018). V roce 1978 Dougherty a jeho spolupracovníci publikovali působivé výsledky léčby 113 kožních nebo podkožních maligních tumorů. Výsledkem byla úplná nebo alespoň částečná rezoluce 111 tumorů (Honigsmann 2013).

### 3.2 FOTODYNAMICKÁ TERAPIE

Fotodynamická terapie je metoda, která se neustále vyvíjí a zahrnuje tři základní prvky – fotosensitivní látku (fotosensitizer), světlo a kyslík (Lakouas a kol., 2017). Jedná se v podstatě o dvou krokový proces, kdy dojde nejprve k podání netoxického fotosensitizeru, který je poté aktivován zářením o určité vlnové délce. Takto aktivovaný fotosensitizer je poté schopný předat svou energii kyslíku, jehož reaktivní formy se poté podílí na samotné léčbě, což může být například destrukce nádorových buněk (Qiu a kol., 2018) (Obr. 1). Jde tedy o neinvazivní formu léčení, která se snaží odstranit potíže a zároveň být velice šetrná k pacientovi.



**Obr. 1: Schématické znázornění a) základních mechanismů PDT a b) obecného postupu při použití PDT (převzato od Li a kol., 2018).**

Od svých počátků si fotodynamická terapie prošla řadou změn. Postupně docházelo k vývoji účinnějších fotosensitizerů, kdy se zlepšovaly jejich potřebné vlastnosti a zároveň odstraňovaly nežádoucí účinky. Vylepšení se nevyhnulo ani zdrojům záření, kde obyčejnou žárovku vystřídali různé lampy a výkonné lasery. S tímto pokrokem souvisí i rozšíření oblastí, kde se dá fotodynamická terapie využít.

### 3.2.1 FOTOSENSITIZÉRY

Objev fotosensitivní látky byl klíčovým faktorem, který umožnil vznik fotodynamické terapie. Fotosensitizer je látka, která se vyznačuje velkou citlivostí na světlo, které ho aktivuje. Poté, co aktivovaný fotosensitizer předá svou energii, vrací se zpět do základního stavu.

Ačkoliv existuje velké množství fotosensitivních látek, pouze několik z nich je povoleno pro klinické využití (Sener a kol., 2019). Jednotlivé fotosensitizerů můžeme rozdělit do několika skupin na základě určitých kritérií.

#### 3.2.1.1 ROZDĚLENÍ PODLE GENERACE

Jedním ze základních rozdělení fotosensitizerů je podle jejich generace. Rozdíl mezi jednotlivými generacemi spočívá zejména v postupném vylepšování určitých vlastností.

##### a) PRVNÍ GENERACE

První generace fotosensitizerů zahrnuje v podstatě z hemu izolovaný hematoporfyrin (Hp) a jeho deriváty (HpD) (Gomes a kol., 2018) (Obr. 2).

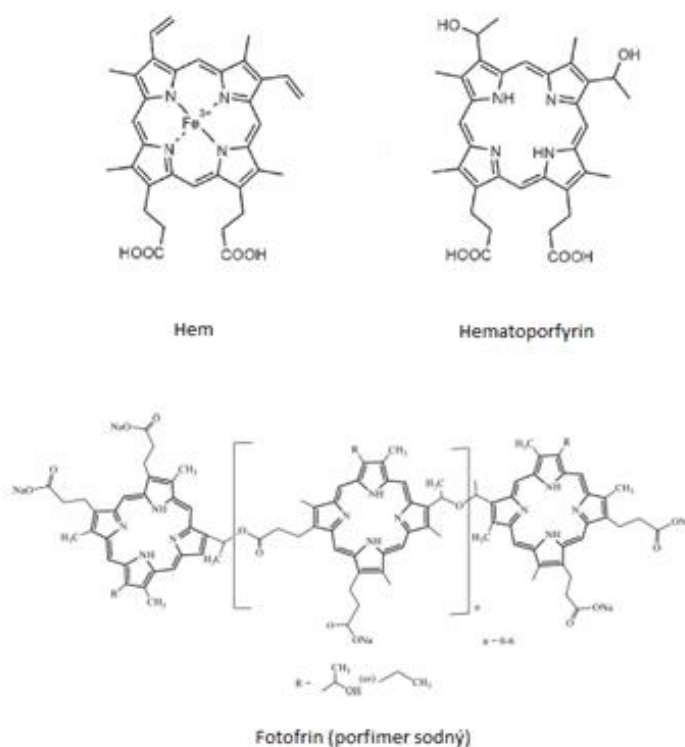
Jednotlivé deriváty se připravovaly z hematoporfyrinu, který se izoloval z hemu (Matoba a kol., 2018). V počátcích fotodynamické terapie se používal i samotný hematoporfyrin, nicméně časem se zjistilo, že za výsledný fotoefekt není zodpovědný samotný hematoporfyrin, ale jeho oligomerní frakce.

Základ HpD tvoří cyklická tetrapyrolová struktura, ve které jsou jednotlivé pyroly spojené methinovými můstky. V centrální části obsahují prostor, do kterého je možné navázat kovy. Některé porfyriny mohou mít absorpční maximum mezi 610-630 nm a jiné zase okolo 400 nm.

Už od prvního použití derivátu hematoporfyrinu k potlačení růstu tumoru prsního tukového polštáře u myši v roce 1975, byly porfyriny a jejich analogy úspěšně zavedeny do PDT (Fan a kol., 2016).

Typickým zástupcem je porfimer sodný, známý také jako Fotofrin, což je v podstatě purifikovaný Hp. Tento fotosensitizer byl jako první schválený pro klinické použití (Lange a kol., 2019). Používal se například při léčbě rakoviny plic, močového měchýře nebo jícnu. Hlavním problémem Fotofrinu, při jeho použití ve fotodynamické terapii, spočíval ve fotosensitivitě a hypoxii. Fotosensitivita trvala obvykle v rozmezí 4-6 týdnů. Během této doby museli pacienti nosit sluneční brýle a zakrývat si kůži, aby zabránili vystavení se přímému slunečnímu nebo i pokojovému světlu (Shafirstein a kol., 2016).

Celá tato generace měla kromě výše zmíněné fotosensitivitě i několik dalších nevhodných vlastností, mezi které patří například malá rozpustnost, ne zcela známé strukturní složení látek, nízká selektivita nebo absorpční maximum okolo 400 nm (Zavadskaya 2015).



**Obr. 2: Struktura hemu, hematoporphyrinu a Fotofrinu.** (převzato od Chilakamarthi a Giribabu, 2017; Zimčik a Miletin, 2004)

#### b) DRUHÁ GENERACE

Druhá generace fotosensitizerů (Obr. 3) měla za cíl odstranit nedostatky předchozí generace a vylepšit požadované vlastnosti. Výsledkem bylo zvýšení

selektivity nádorové tkáně, menší akumulace ve zdravé tkáni nebo větší rozpustnost. Další výhodou byla nižší fotosensitivita a zpravidla vyšší absorpční maximum fotosensitizerů (630-800 nm), které umožnilo dosáhnout větší penetrace do tkáně. Výhodou je také oproti první generaci známá struktura fotosensitizeru (Kou a kol., 2017; Park a kol., 2018). Tuto generaci můžeme ještě dále rozdělit na porfyrinové a neporfyrinové fotosensitizerý.

- **PORFYRINOVÉ FOTOSENSITIZÉRY**

Tyto látky v podstatě vychází přímo z první generace a mají tudíž stejný strukturní základ. Tato skupina fotosensitizerů zahrnuje:

- **PORFYRINY**

Problém malé rozpustnosti u porfyrinů předchozí generace se podařilo překonat díky navázání dalších skupin jako  $\text{SO}_3$ , OH nebo COOH do polohy *meso*. Toto zjištění umožnilo vznik syntetického porfyrinu TPPS<sub>4</sub> (*meso*-tetrakis(4-sulfonatofenyl) porfyrin). Kromě zvýšené rozpustnosti byla u tohoto fotosensitizeru, v porovnání s dalšími HpD, pozorována také větší lokalizace v nádorové tkáni (Chilakamarthi a Giribabu, 2017). Nevýhodou bylo, že TPPS<sub>4</sub> nemohl být podáván systémově, jelikož pak vykazoval neurotoxické účinky. Při lokální aplikaci však žádné takové účinky pozorovány nebyly a použití TPPS<sub>4</sub> tímto způsobem tak bylo v České republice schváleno.

Typickým zástupcem této skupiny je aminolevulová kyselina (5-ALA). Jedná se o prekurzor fotosensitizeru protoporfyrinu IX. V savcích buňkách dochází běžně k metabolizaci 5-ALA přes protoporfyrin IX až na konečný hem. Tato dráha má však svůj vlastní zpětnovazebný regulační mechanismus, kdy nadbytek hemu inhibuje ALA-syntázu a brání tak akumulaci fototoxických meziproductů. Ovšem při vnějším dodání 5-ALA dojde k nahromadění protoporfyrinu IX uvnitř buňky, který následně po ozáření vytváří reaktivní formy kyslíku, což vede k apoptóze a nekróze v cílové tkáni (Wen a kol., 2017). Jelikož je tento fotosensitizer aktivován vlnovou délkou v rozmezí 375-445 nm (Namikawa a kol., 2018), což neumožňuje velkou penetraci tkáně, využívá se hlavně v dermatologii pro povrchovou léčbu. 5-ALA byla schválena pro použití při léčbě například

povrchových kožních nádorů, Bowenovy choroby, aktinové keratózy nebo pro povrchové nádory hlavy a krku.

Dalším porfyrinovým derivátem je TMPyP (5,10,15,20-tetrakis(1-metyl-4-pyridinio) porfyrin tetra(p-toluensulfonát)). Jedná se o kationovou syntetickou a ve vodě rozpustnou látku, která vykazuje přednostní akumulaci v nádorové tkáni (Goncalves a kol., 2011). Jeho nevýhodou může být nízká aktivační vlnová délka, která se pohybuje okolo 420 nm.

#### ○ CHLORINY

Jedná se o látky velice podobné porfyrinům, které však mají jednu konjugovanou vazbu navíc. Chlorin obsahující ve své centrální části hořčík, označujeme jako chlorofyl, který se běžně vyskytuje ve volné přírodě.

Nejvýznamnějším fotosensitizerem z této skupiny je *meta* izomer chlorinu (*m*THPC, tetra(*meta*-hydroxyfenyl)chlorin), známý také jako Foscan nebo Temoporfin. Tento fotosensitizer byl schválený pro léčbu pokročilé rakoviny hlavy a krku a rané fáze centrálně lokalizované rakoviny plic (Dichiara a kol., 2017). Několik klinických studií prokázalo, že *m*THPC je 100-200krát více účinný než Fotofrin, což je nejvíce používaný fotosensitizer první generace. Jedná se také o hydrofobní molekulu, díky čemuž je schopna lokalizovat se v klíčových intracelulárních membránových organelách (Gheewala a kol., 2017).

Dalším známým zástupcem chlorinů je tzv. Verteporfin, což je derivát benzoporfyrinu. Tento fotosensitizer se běžně používá například pro léčbu vlhké formy věkem podmíněné makulární degenerace (Min a kol., 2015).

#### ○ BAKTERIOCHLORINY

Jsou velice podobné chlorinům, a tudíž i porfyrinům. Rozdíl spočívá v tom, že mají oproti chlorinům ještě o jednu konjugovanou vazbu méně.

Jejich výhodnou vlastností je silná absorpce v blízké infračervené (NIR) oblasti. NIR fotony jsou ideální pro fotodynamickou terapii, protože jsou relativně neškodné a prochází velmi hluboko do tkáně.

Nevýhodou bakteriochlorinů je jejich malá stabilita, protože jsou náchylné k oxidaci. Toto zjištění vedlo k výzkumu stabilních derivátů.

Tyto deriváty obsahují F nebo Cl substituenty v pozici *ortho* fenylových kruhů, což zvýšilo jak jejich oxidační potenciál, tak jejich fotostabilitu (Oniszuk a kol., 2016).

Jako příklad lze uvést relativně novou látku, která je známa jako **TOOKAD**. Jedná se o derivát bakteriochlorinu, který obsahuje substituované palladium a jeho absorpční maximum je při 763 nm. **TOOKAD** působí tak, že poškozuje v dané oblasti cévy a omezuje tak krevní zásobení. Po poškození endotelu cév dochází k sérii dějů jako je trombóza, krevní stáze nebo cévní okluze, což vede k nekróze tumoru (Gheewala a kol., 2017).

#### ○ CYANINOVÁ BARVIVA

Jedná se o látky se dvěma aromatickými heterocykly, které obsahují dusík a jsou spojeny polymethinovým mostem. Tato barviva jsou zajímavá pro své výborné spektrální vlastnosti v NIR oblasti (Deng a kol., 2017). Mezi tato barviva řadíme ftalocyaniny a naftalocyaniny.

Ftalocyaniny jsou synteticky připravovaná barviva, jejichž absorpční maximum se pohybuje v rozmezí 650-700 nm. Jejich využití bylo omezeno díky jejich velmi malé rozpustnosti ve vodě. Za účelem překonání tohoto problému byly vytvořeny ve vodě rozpustné ftalocyaniny pomocí různého stupně sulfonace nebo vložení  $\text{OH}^-$  skupin (Chilakamarthi a Giribabu, 2017; Kucinska a kol., 2015). Kromě  $\text{SO}_3^-$  nebo  $\text{OH}^-$  skupin kvůli lepší rozpustnosti, byly také navazovány do centrální části ionty diamagnetických kovů (např.  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Si}^{4+}$  nebo  $\text{Zn}^{2+}$ ). Takto pozměněné ftalocyaninové komplexy dosahovaly vyšší frekvence tzv. intersystémového přechodu a delšího tripletového stavu. Díky tomu tyto komplexy vykazovaly účinnější vytváření reaktivních forem kyslíku (Li a kol., 2018). Příkladem hydrofilního fotosensitizeru s kovovým iontem je sulfonovaný hlinitý ftalocyanin (ALPcS), označovaný také jako Photosens. Jedná se o komerčně dostupný prostředek, který se využívá například při léčbě kožních nádorů, rakoviny plic nebo močového měchýře.

Naftalocyaniny mají své absorpční maximum dokonce v delších vlnových délkách (740-780 nm) než ftalocyaniny, a to díky dalšímu

benzenovému kruhu na každé *iso*indolové podjednotce ftalocyaninu (Deng a kol., 2017). Takto dlouhé vlnové délky umožňují použití tohoto fotosensitizeru i pro velice pigmentované melanomy, protože jsou schopny při léčbě dosáhnout větší hloubky.

- NEPORFYRINOVÉ FOTOSENSITIZÉRY

Ačkoliv porfyrinové deriváty představují většinu fotosensitizerů, několik neporfyrinových chromogenů vykazuje také fotodynamickou aktivitu. Tato skupina látek zahrnuje například antrachinony, fenothiaziniové soli nebo xantheny (Nesi-Reis a kol., 2018).

SGX301 je syntetický antrachinonový derivát hypericinu, jehož absorpční vlnová délka činí 590 nm a podléhá v současnosti klinickému hodnocení pro léčbu kožního lymfomu z T-buněk (CTCL).

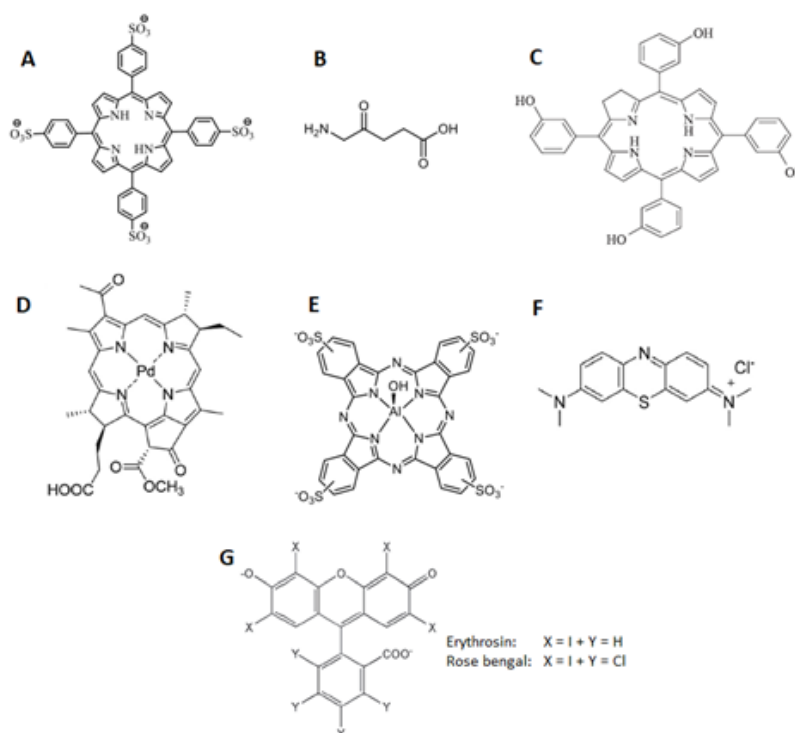
Pravděpodobně nejpopulárnějším zástupcem fenothiaziniových barviv je methylenová modř. Jedná se o heterocyklické aromatické barvivo, které je rozpustné v alkoholu a vodě. Benzenový kruh ve struktuře methylenové modři umožňuje vynikající průchod do buněčné membrány a také se koncentrovat v mitochondriích, lysozómech a dvoušroubovici DNA (Jesus a kol., 2018). Toto barvivo umožňuje také spustit produkci vysoké hladiny  $^1\text{O}_2$  nebo reaktivních forem kyslíku. Obecným problémem při fotodynamické terapii je fotosensitivita kůže, nicméně použití methylenové modři snižuje toto riziko díky své hydrofilní, rychlé absorpci a rychlému vyloučení z cílové tkáně. Methylenová modř absorbuje fotony o vlnové délce v rozmezí 600-800 nm, ve které světlo prochází tkání nejvíce (Silva a kol., 2018).

Spousta studií se věnuje hledání nových fotosensitizerů, které by kombinovaly vysokou fotodynamickou účinnost, malé vedlejší účinky a nízké náklady. A právě proto byla některá xanthenová barviva, jako Rose Bengal nebo erythrosin, navržena na vhodné kandidáty pro fotodynamickou terapii (Pellosi a kol., 2013).

Erythrosin B je hydrofilní xanthenové barvivo, které vykazuje podle některých studií antimikrobiální aktivitu proti Gram-pozitivním a Gram-negativním bakteriím v ústech. I když je erythrosin schopný obecně absorbovat světlo viditelné oblasti, jeho oblast maximální absorpce je v

rozmezí 500-550 nm. Výsledky některých studií prokázaly, že fotodynamická terapie při použití erythrosinu byla 5-10krát účinnější než při použití methylenové modři. Tento fakt je velice povzbuzující, protože methylenová modř je uznávaný a efektivní nádorový a antimikrobiální fotosensitizer (Mahdi a kol., 2015).

Rose Bengal (4,5,6,7-tetrachloro-2',4',5',7'-tetraiodofluoresceindi-sodium) je anionové ve vodě rozpustné (hydrofilní) xanthenové barvivo, které je po ozáření zeleným světlem schopno fotokatalytické konverze molekuly kyslíku na singletový kyslík. Používá se jako fotodynamický sensitizér pro nádorovou chemoterapii nebo topické oční diagnostice (Mousavi a kol., 2009). Jeho výhodou je velký kvantový výtěžek a malá fotodegradace. Rose Bengal prokázal vysokou účinnost při inaktivaci bakterií pomocí fotodynamické terapie. Používá se také, spolu s nanočásticemi oxidu křemičitého, k inaktivaci gram-pozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* (Paszko a kol., 2011).

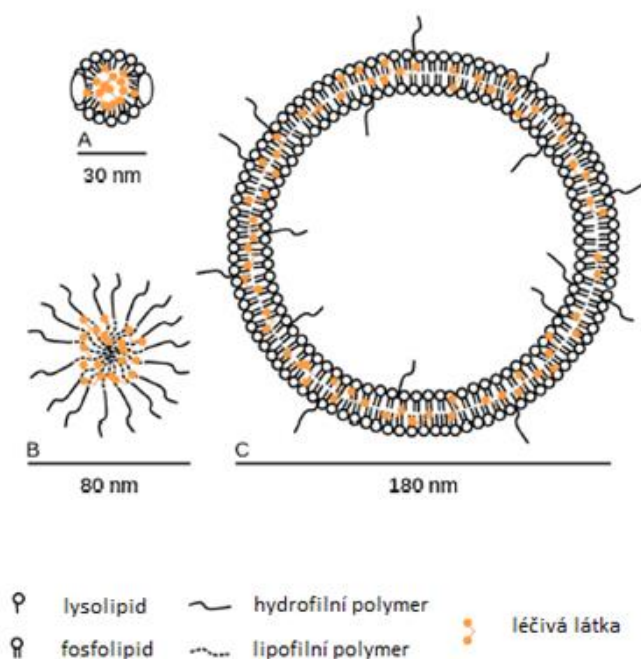


**Obr. 3: Struktura vybraných fotosensitizerů 2. generace: A – TPPS<sub>4</sub>, B – ALA, C – mTHPC, D – TOOKAD, E – Photosens, F – methylenová modř, G – erythrosin a Rose Bengal (převzato od Castano a kol., 2004, Chilakamarthi a Giribabu, 2017, Dichiara a kol., 2017, Pellosi a kol., 2013, van Dongen a kol., 2004, Yoon a kol., 2013)**



### c) TŘETÍ GENERACE

Za účelem přesnějšího zacílení fotosensitizerů, zvýšení jejich akumulace v nádorových buňkách a minimalizování jejich přítomnosti ve zdravé tkáni, byla snaha upřena do vývoje další generace. Jako třetí generaci fotosensitizerů tedy označujeme kombinaci fotosensitizeru (nejčastěji druhé generace) a jeho „přenašeče“, na který je kovalentně navázaný nebo je do něj zabalený. Toto obalení fotosensitizeru přenašečem a následný transport do cílové tkáně je také velice vhodný pro velmi hydrofobní látky, které se ve vodě nerozpouští, ale shlukující se, což velice omezuje jejich samotnou distribuci do nádoru. Mezi nejvýznamnější přenašeče řadíme albumin, lipoproteiny, micely, lipozómy (Obr. 4) nebo nejmodernější přenašeče vytvořené pomocí nanotechnologie.



**Obr. 4: Velikost a struktura vybraných přenašečů: A – LDL, B – micela, C – lipozóm (převzato a upraveno od Allijn a kol., 2016)**

V lidském těle má ze sérových proteinů největší koncentraci albumin. Jednou z jeho nejdůležitějších vlastností je schopnost navázat a přenést spoustu endogenních a exogenních látek, které nemají přímo určené vlastní transportní proteiny. Tento fakt však neznamená, že by albumin nemohl přenášet i látky, které mají svůj specifický transportní protein. Utvoření komplexu albumin-ligand v krevním séru chrání ligand proti oxidaci, snižuje jejich toxicitu a zlepšuje jejich rozpustnost. Díky tomu lze konstatovat, že vytvoření tohoto

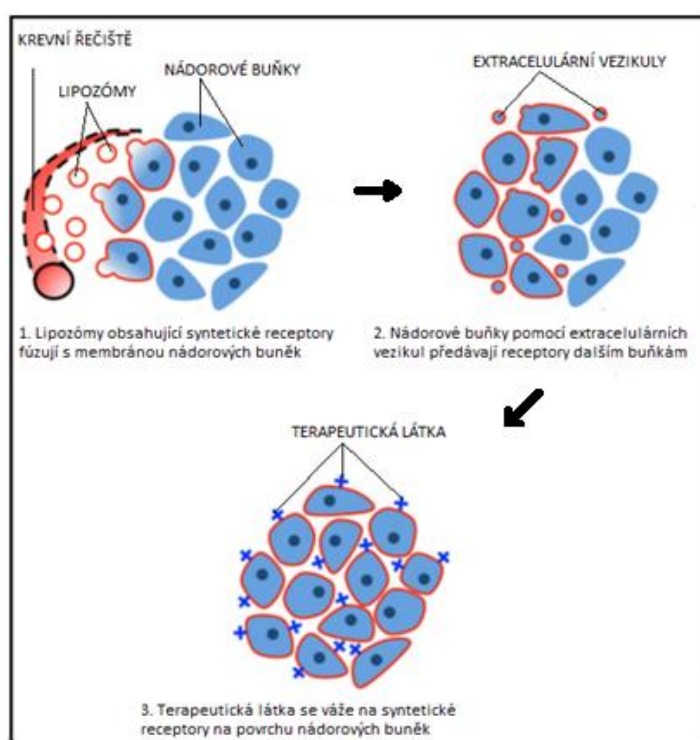
komplexu zlepšuje transport těchto ligandů (Sulkowski a kol., 2016). Pro sérové proteiny, jako je právě albumin, platí, že na sebe vážou převážně hydrofilní fotosensitizéry.

Lipoproteiny jsou struktury podobné právě micelám. Skládají se z lipidů, které se v rozpouštědle orientují stejně jako micely. Kromě těchto lipidů obsahují na svém povrchu ještě proteiny. Hlavní funkcí lipoproteinů je zejména transport vysoce hydrofobních lipidů. Nejvýznamnějšími lipoproteiny jsou LDL (Low Density Lipoproteins) a HDL (High Density Lipoproteins). Důležitým faktem je, že tumory mají v porovnání s jinými buňkami na svém povrchu více LDL receptorů. A jelikož LDL na sebe váže převážně hydrofobní fotosensitizéry, byla většina fotosensitizérů druhé generace navržena tak, aby byla právě co nejméně ve vodě rozpustná (Bayona a kol., 2017).

Micely jsou v podstatě malé shluky molekul tenzidů. Při kontaktu s rozpouštědlem dochází k vytváření shluků. Každá molekula má dvě části – hydrofilní a hydrofobní. V závislosti na prostředí dochází k orientaci těchto částí tak, aby to bylo pro dané molekuly energeticky nejvýhodnější. V případě polárního prostředí tvoří povrch micely hydrofilní části a hydrofobní části jsou uschované uvnitř. V nepolárním prostředí je pak toto uspořádání opačné a vznikají tak tzv. reverzní micely. Typickými zástupci jsou micely globulárních bílkovin a micely polárních lipidů. Přestože tyto micelární přenašeče mohou navýšit akumulaci látky (fotosensitizéru) v nádorové tkáni díky lepší permeabilitě a schopnosti udržet se uvnitř nádoru, může uvnitř micely také docházet k agregaci určitého množství fotosensitizéru, což zase na druhou stranu omezuje fotodynamický efekt (Luo a kol., 2017).

Jako lipozóm označujeme uměle vytvořenou strukturu kulovitého tvaru, která se skládá z lipidové dvouvrstvy. V ní se nachází jednotlivé fosfolipidy, které jsou tvořeny hydrofobní a hydrofilní částí a v rozpouštědle se chovají stejně jako micely. Micely jsou však na rozdíl od lipozómů tvořeny pouze jednou vrstvou lipidů. Spousta terapií se snaží zlepšit zacílení na nádorovou tkáň třeba i prostřednictvím imunoterapie. Problémem však je heterogenita nádoru (různé typy buněk v mikroprostředí tumoru a různé receptory na jejich povrchu). Kim a kol. (2017) ve své studii upozorňují na možnost, jak tuto problematiku vyřešit s pomocí lipozómů a syntetických receptorů. Metoda je navržena na principu extracelulárních vezikul, které zprostředkovávají vnitrobuněčný přenos lipidů,

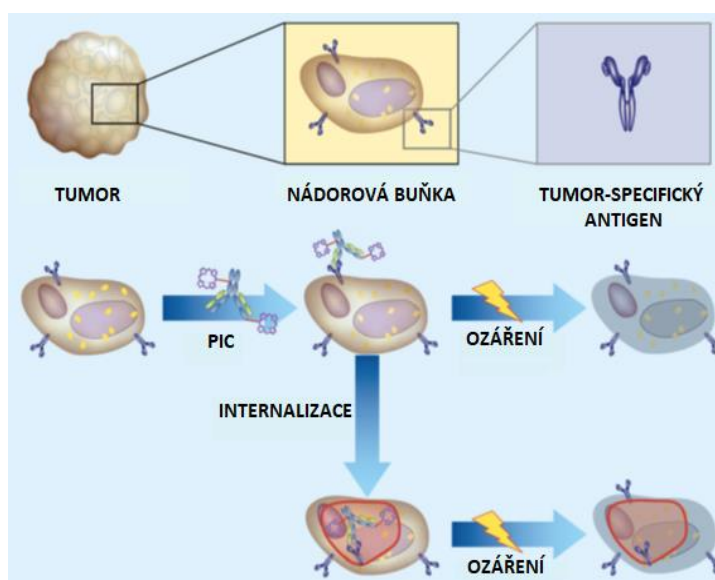
cytozolických proteinů a RNA pomocí membránové fúze. Syntetické lipozómy, navržené tak, aby se spojily s plazmatickou membránou, se využívají k doručení lipidových syntetických receptorů. Lipozómy se syntetickými receptory se spojí s nejbližšími buňkami, odkud se poté ve formě extracelulárních vezikul šíří dál. Následně může terapeutická látka cílit právě na tyto syntetické receptory na povrchu celého tumoru (Obr.5). Tato metoda se jeví vhodná právě ve spojení s fotodynamickou terapií proto, že právě možnost přesného ozáření pouze postiženého místa s tumorem zajistí, že nedojde k poškození zdravých buněk, u kterých došlo také k fúzi s lipozómem.



**Obr. 5: Schématické znázornění principu přenosu syntetických receptorů.**  
(převzato a upraveno od Kim a kol., 2017)

Jak bylo uvedeno dříve, problémem využití protilátek spočívá v tom, že na nádorových buňkách je přítomno velké množství povrchových antigenů různého typu. V případě, že se však objeví antigeny, které jsou specifické pouze pro tumor nebo jsou přítomny na povrchu tumoru v mnohem větším množství než u nenádorové tkáně (častější jev), označujeme je pojmem tumor-asociované antigeny. Protilátky proti takovým antigenům se snadno vytváří a mohou tak ve spojení s fotosensitizerem dát vzniknout tzv. fotoimunokonjugátům, které

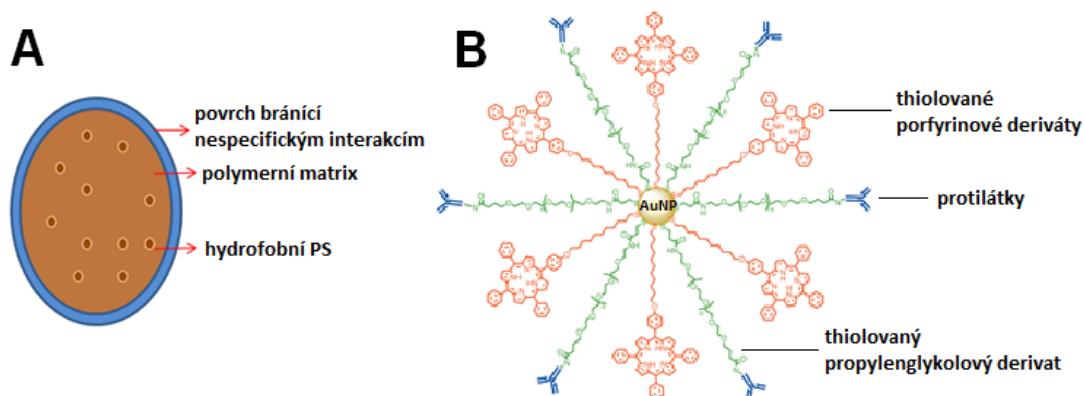
umožňují průběh fotodynamické terapie. Cílem těchto fotoimunokonjugátů je buněčná membrána. Navázání fotosensitizerů na buněčnou membránu je výhodné proto, že ve výsledku vede k oxidaci lipidů v membráně, což má za následek její porušení, únik vnitřního obsahu buňky a tím i jisté a rychlé zničení buňky (Denis a Hamblin 2013). Může ovšem nastat i situace, kdy dojde k internalizaci fotoimunokonjugátů dovnitř buňky. V takovém případě pak dochází k vnitřnímu poškození buňky (Obr. 6)



**Obr. 6: Princip využití fotoimunokonjugátů (PIC) ve fotodynamické terapii.** (převzato a upraveno od Denis a Hamblin, 2013)

S velkým pokrokem na poli nanotechnologie vznikly kromě polymerních micel a lipozómů také další přenašeče jako například polymerní nanočástice nebo kovové nanočástice (Obr. 7), jejichž úkolem bylo dopravit fotosensitizer do nádorových buněk pro jejich následnou eliminaci (Hong a kol., 2016). Polymerní nanočástice (PNP) se připravují zachycením fotosensitizeru do polymeru nebo hydrofobní a elektrostatickou interakcí mezi fotosensitizerem a polymerem. Rozměry, povrchové vlastnosti nebo morfologie může být snadno upraven na základě požadavků. PNP se připravují přírodních nebo syntetických polymerů jako chitosan, želatina apod. Zatím co předchozí přenašeče byly vytvořeny z organických polymerů, kovové nanočástice se připravují z anorganických kovů jako je například zlato, stříbro nebo křemík. Díky tomu jsou více stabilní při různých biologických podmínkách jako např. pH, iontová

síla a tlak. Nanočástice křemíku ( $\text{SiO}_2$ ) jsou chemicky inertní a jsou tudíž univerzálnější při biologických aplikacích (Chilakamarthi a Giribabu, 2017). Mezi všemi kovovými nanočásticemi si nanočástice zlata získaly určitou pozornost díky kombinaci charakteristických vlastností, které jim umožňovaly mnohé využití jako např. při značení, přenášení, zobrazování atd. Díky jejich biokompatibilitě, velikosti a jedinečnému povrchu, ale také optickým a termálním vlastnostem si vysloužily pozornost pro využití při fotodynamické terapii. Přítomnost některých funkčních skupin (např. thiolové, amino a kyano skupiny) jim zajišťuje koloidní stabilitu. Navíc spojení nanočástic zlata s biomolekulami jako lipidy, proteiny nebo s molekulami fotosensitizeru může vylepšit jejich vlastnosti. Spojení fotosensitizeru na povrch nanočástic zlata může zvýšit účinek PDT pomocí zesíleného elektromagnetického pole, které vznikne po ozáření nanočástic zlata. Díky tomu dojde k účinnější aktivaci fotosensitizeru a ke zvýšené produkci ROS (Mesquita a kol. 2018).



**Obr. 7: Složení nanočásticových přenašečů: A – polymerní nanočástice, B – kovové nanočástice (AuNPs).** (převzato a upraveno od Chilakamarthi a Giribabu, 2017, Mesquita a kol., 2018)

Za jeden z velmi nadějných nanomateriálů s využitím pro bioaplikace je považován grafen a zejména jeho derivát oxid grafenu (GO). Jejich 2D planární struktura, která zajišťuje velmi velkou plochu povrchu, chemickou a mechanickou inertnost a tepelnou odolnost z nich činí velice vhodné přenašeče (Allen a kol., 2010; Zhang a kol., 2013; Xu a kol., 2009). Přítomnost hydrofilních skupin (např. hydroxylové a karboxylové) na povrchu oxidu

grafenu umožňuje jeho rozpustnost ve vodě (Xu a kol., 2014), což z něj dělá potenciálně ideálního přenašeče hlavně pro hydrofobní fotosensitivní látky.

### 3.2.1.2 DALŠÍ DĚLENÍ FOTOSENSITIZÉRŮ

Kromě základního rozdělení podle generace lze fotosensitizéry dělit i podle jeho vlastností a způsobu podání.

#### a) PODLE CHARAKTERU

Fotosensitizéry lze také rozdělit na hydrofobní a hydrofilní. Hlavní rozdíl mezi nimi spočívá v jejich průchodnosti membránou, což do jisté míry může i určovat místo jejich akumulace. Všeobecně lze říci, že hydrofobní fotosensitizéry pronikají membránou vcelku jednoduše a mohou se tak lokalizovat v membránách buněčných organel včetně jádra. Naproti tomu hydrofilní fotosensitizéry velice těžko pronikají skrze membránu a dovnitř buňky se tak dostanou pomocí pinocytózy a/nebo endocytózy a lokalizují se tudíž převážně v extranukleárních granulech – hlavně lysozómech. Cílem několika hydrofilních fotosensitizérů může být také endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát, kde však důležitost fotochemického poškození jejich funkce není dosud dostatečně prozkoumána (Calzavara-Pinton a kol., 2007).

#### b) PODLE NÁBOJE

Náboj hraje spolu s charakterem fotosensitizéru velice důležitou roli při určování, kde se bude tento fotosensitizér v buňce hromadit. Například pozitivně nabitě (kationové) fotosensitizéry (porfyriny, cyaninová barviva, rhodaminy atd.) se lokalizují hlavně v mitochondriích, protože jsou elektrostaticky přitahovány jejich záporným elektrochemickým transmembránovým potenciálem. Naproti tomu záporně nabitě (anionové) fotosensitizéry (chlorin e6, ALPcS<sub>2</sub> nebo Rose Bengal) se spíše lokalizují v lysozómech poté, co jsou pohlceny endocytózou a následně spojeny právě s lysozomy (Bacellar a kol., 2015).

### c) PODLE ZPŮSOBU PODÁNÍ

Fotosensitizer lze aplikovat v podstatě dvěma základními způsoby – lokálně a systémově. Každá možnost má své výhody i nevýhody. Lokální způsob umožňuje přímé vpravení fotosensitizeru do místa nádoru a zajistí tak tím jeho dostatečnou koncentraci v požadovaném místě. To je však možné pouze u nádorů menší velikosti, protože lokální aplikace u rozsáhlých nádorů a jejich metastáz by byla velice náročná. Navíc by se tím zvýšilo i riziko, že se fotosensitizer nedostane do každé léze. Další výhodou je, že po skončení fotodynamické terapie pacient dané místo pouze překryje (kvůli ochraně před světlem) a není nijak omezen v běžném životě. V případě systémového podání je situace po terapii složitější, protože tento způsob aplikace doprovází tzv. systémová fotosensitivita. Při tomto způsobu je totiž pacientovi fotosensitizer aplikován do krevního řečiště. Je tedy potřeba, aby se pacient po terapii vyhýbal jak slunečnímu světlu, tak i běžnému domácímu osvětlení, což pacienta může značně omezovat. Výhodou však je, že se takto fotosensitizer snadno rozšíří po celém těle a dostane se tedy do každého nádoru, který se v těle nachází, což značně urychlí léčbu.

#### 3.2.1.3 IDEÁLNÍ FOTOSENSITIZÉR

V současnosti bohužel nemůžeme považovat žádný fotosensitizer za naprosto dokonalý. Existuje totiž spousta vlastností, které ovlivňují jak účinnost fotosensitizeru, tak i škodlivost lidskému tělu. Naštěstí nejnovější fotosensitizer se těm ideálním velice blíží a nabízí velkou účinnost při zanedbatelných negativních účincích. Mezi základní vlastnosti ideálního fotosensitivní látky patří:

- **AKTIVACE IR NEBO NIR ZÁŘENÍM**

Excitace fotosensitizeru infračerveným (IR) nebo blízkým infračerveným zářením je žádoucí, protože právě vlnová délka v rozmezí 600-800 nm penetruje tkáň nejhluběji. V případě tenkých lézí nebo lézí na povrchu je žádoucí samozřejmě i záření s nižší vlnovou délkou, jelikož není potřeba pronikat hluboko do tkáně.

- ČISTOTA LÁTKY

Fotosensitizer by měl mít známé složení a měl by být chemicky čistý a stabilní. Výjimku představují některé fotosensitizery jako například 5-ALA, ze které vzniká fotosensitivní látka až po její metabolizaci na protoporfyrin IX.

- TOXICITA

Bez aplikace světla by měl PS zůstat fotochemicky inertní a ve tmě by neměl být nijak toxický a neměl by vytvářet žádné reaktivní formy kyslíku. Toxické by neměly být ani metabolity této látky. Fotosensitizer nesmí jakkoliv vyvolat nové onemocnění, vytvářet sraženiny, způsobit infarkt myokardu či cévní mozkovou příhodu.

- PRODUKCE ROS

Velice důležitá je také vlastnost fotosensitizeru produkovat reaktivní formy kyslíku. Žádoucí je tzv. tripletový stav PS. Ten totiž trvá delší dobu a umožňuje tak vysokou produkci cytotoxického singletního kyslíku.

- HROMADĚNÍ V NÁDOROVÉ TKÁNÍ A RYCHLÉ VYLOUČENÍ

Fotosensitizer by se měl přednostně hromadit v nádorové tkáni a naopak se měl v ideálním případě úplně vyhnout zdravé tkáni. Tato vlastnost by tak razantně zvýšila účinek léčby. Této selektivní akumulace lze dosáhnout právě pomocí nosičů a v současnosti je jedním z hlavních cílů výzkumu. V současnosti se však stále nelze vyhnout přítomnosti fotosensitizeru i ve zdravé tkáni, což způsobuje systémovou fotosensitivitu. Z toho důvodu je také důležité, aby se zbylý nenavázaný fotosensitizer co nejrychleji vyloučil z těla ven.

- ZPŮSOB PODÁNÍ

Většina fotosensitizerů se podává systémově do krevního řečiště, nicméně v některých případech, jako jsou léze v oblasti hlavy a krku, mohou být podávány i lokálně (Sunar, 2013). Některé situace však mohou vyžadovat i



jiné formy podání, proto je vhodné, aby fotosensitizer bylo možno podávat například i orálně nebo inhalací.

Některé fotosensitizery splňují alespoň ta nejdůležitější kritéria a byly tudíž v různých zemích povoleny pro klinické užití. Příkladem je například Fotofrin (porfimer sodný), mTHPC, ALA nebo methylenová modř (Abrahamse a Hamblin, 2016; Bown, 2013; Denis a Hamblin, 2013).

### 3.2.2 ZÁŘENÍ

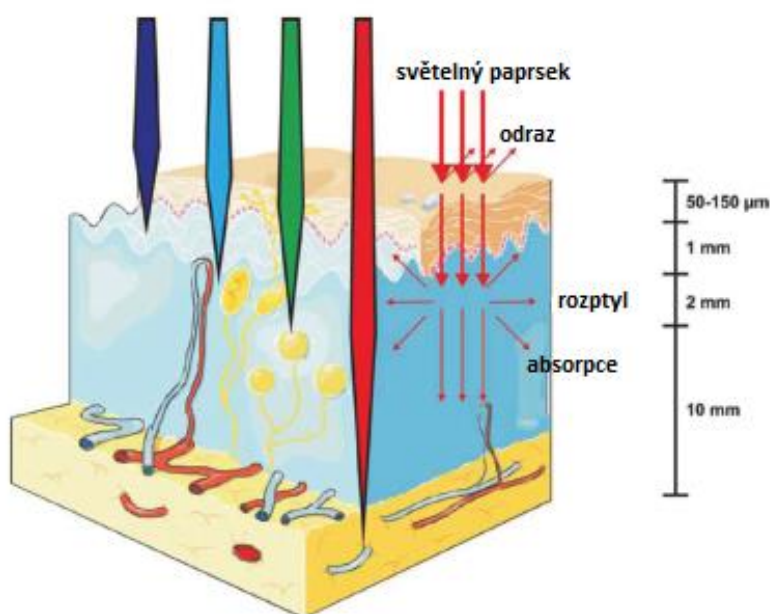
Nezbytnou součástí fotodynamické terapie je také zdroj záření, jehož úkol je excitovat fotosensitizer. Bez tohoto vybuzení nemůže proběhnout fotodynamická reakce a samotný neaktivní PS tak zůstává neškodný a časem se vyloučí. O tom, který zdroj použít, rozhodují v podstatě dva hlavní faktory – typ fotosensitivní látky a hloubka penetrace.

Různé fotosensitizery mohou být aktivovány různou vlnovou délkou. Pro dosažení maximálního terapeutického účinku, je potřeba zvolit vhodné záření s vhodnou vlnovou délkou, při které dochází k maximální absorpci světla fotosensitizerem (Kim a kol., 2015). Například u porfyrinů odpovídá maximální absorpce světla přibližně 405 nm. Tato oblast maximální absorpce se označuje jako tzv. Soretův pás. Další nižší absorpční píky lze nalézt při 510, 545, 580 a 630 nm a označují se jako Q-pásky (Issa a Manela-Azulay, 2009).

Kromě toho je potřeba brát v úvahu také jak hluboko je potřeba proniknout tkání. U tenkých povrchových lézí lze použít zdroje s nižší vlnovou délkou (v modrofialové oblasti). Pokud se však nádorová tkáň nachází hlouběji, je potřeba použít vyšší vlnové délky (v červené oblasti), které pronikají řádově několik milimetrů hluboko (Obr. 8). Při použití příliš dlouhých vlnových délek může ovšem nastat situace, že záření nebude mít dostatečnou energii pro vznik reaktivních forem kyslíku.

Je třeba mít také na paměti, že tkáň jako taková není čistě homogenní, ale obsahuje spoustu nehomogenních částí, které značně ztěžují aktivaci fotosensitizeru. Díky přítomnosti rozličných buněčných struktur může docházet k rozptylu světla a různé chromofory uvnitř tkáně (hemoglobin nebo myoglobin) mohou zase světlo absorbovat namísto fotosensitizeru. Další překážku při aktivaci PS představuje tzv. „self-shielding“ a „fotobleaching“. Jako self-shielding se označuje děj, kdy sama

fotosensitivní látka svou absorpcí světla postupně omezuje průnik světla a brání tak aktivaci hlouběji se nacházejících molekul PS. Pojem fotobleaching by se dal přeložit jako vyblednutí či fotodestrukce fotosensitizeru. Jedná se o obecnou vlastnost barviv, kdy absorpce světla způsobí různé chemické změny (nejčastěji oxidací) a naruší tak chromofor. Díky tomu dochází ke ztrátě schopnosti absorbovat či emitovat světlo. Dalo by se tedy říci, že fotobleaching do jisté míry brání self-shieldingu, protože se daná molekula stává neaktivní, neabsorbuje záření a světlo tudíž může pronikat hlouběji do tkáně. Na druhou stranu se však tato neaktivní molekula nemůže podílet na tvorbě reaktivních forem kyslíku, a tudíž cytotoxickém účinku.



**Obr. 8: Schéma průniku světla s různou vlnovou délkou skrze tkáň. (převzato a upraveno od Meng a kol., 2017)**

### 3.2.2.1 ZDROJE ZÁŘENÍ

S rozvojem technologie vzniká vcelku široké spektrum zdrojů záření. O tom, který zdroj použít rozhoduje zejména druh fotosensitivní látky a pak také to, jak hluboko se nádorová tkáň nachází. Zdroje záření, které se využívají ve fotodynamické terapii, lze všeobecně rozdělit na přirozené a umělé.

Přirozený zdroj záření představuje Slunce. V současnosti se několik studií soustředí na využití slunečního světla pro fotodynamickou terapii. Důvodem je snížení bolesti, která může v některých případech nastat. V porovnání s běžnou fotodynamickou terapií, která využívá intenzivních světelných pulzů, poskytuje denní

světlo nižší fluenci (hustotu prošlých fotonů). Současný protokol doporučuje 2-2,5 hodiny vystavení se dennímu světlu ihned po aplikaci fotosensitizeru. Využitím denního světla jako zdroje podstupuje například fotoporfyrin IX neustálou, avšak pomalou fotokonverzi na cytotoxické reaktivní formy kyslíku. Snížená lokální koncentrace ROS snižuje stimulaci volných nervových zakončení a minimalizuje bolest (Wang a kol., 2017).

Mezi základní umělé zdroje záření se řadí lampy, LED a lasery. Každý z nich má pro fotodynamickou terapii své výhody a využití. Jako první se používali zejména lampy, které byly doplněny ještě o příslušné filtry. Nelaserové zdroje se využívají zejména v dermatologii (Mitton a Ackroyd, 2008).

#### a) LAMPY

Lampy poskytují nekoherentní polychromatické záření. Jejich výhodou je, že nejsou nákladné, jsou snadné na údržbu, lze s jejich pomocí ozářit větší plochu a díky tomu, že poskytují širokou škálu vlnových délek je lze použít pro aktivaci více fotosensitizerů s různými absorpčními maximy současně. Existuje několik druhů lamp (Obr. 9), které se mezi sebou liší způsobem, jakým vytváří světlo:

- **OBLOUKOVÉ LAMPY**

Obloukové lampy jsou tvořeny dvěma elektrodami, které jsou uzavřeny v průhledné nádobě s plynem (např. xenon nebo rtuť). Při průchodu napětí dojde k excitaci elektronů a k emisi světla dochází při jejich návratu do základního stavu (Ahmad a kol., 2017).

- **VYSOKOTLAKÉ VÝBOJKY**

Vysokotlaké výbojky představovaly velký pokrok od tradičních rtuťových obloukových lamp, se kterými sdílejí podobný koncept. Uzavřená trubice obsahuje inertní plyny (neon-argon nebo krypton-argon), určité množství rtuti a směs kovových halogenidů. Vysokotlaké výbojky lze rozlišovat podle přítomnosti jednotlivých kovových halogenidů: výbojky s kombinací sodík/thallium/indium + jodid, dysprosium halogenid, thulium halogenid atd. (Calin a Parasca. 2009). Jejich výhodou je vysoká intenzita záření, která umožňuje použít vysoké dávky v krátkých intervalech. Jejich

nevýhodou může být určitá technická složitost a nerovnoměrné ozařování větších oblastí (Herzinger a kol., 2016).

- FLUORESCENČNÍ LAMPY

Fluorescenční lampy jsou cylindrické skleněné trubice potažené vrstvou fosforu a obsahující rtuť. Při průchodu proudu dochází k vypařování rtuti do vyššího energetického stavu a při návratu do jeho základního stavu vzniká záření. Vrstva fosforu se pak zachová jako fluorofor, absorbuje záření a emituje ho delšími vlnovými délkami (Ahmad a kol., 2017).



**Obr. 9: Základní typy lamp: A – xenonová oblouková lampa, B – vysokotlaká výbojka, C – fluorescenční lampa**

<https://www.newport.com/f/xenon-arc-lamps>, <https://eyelighting.com/hid-lamps/high-pressure-sodium>, <https://www.clackamas.us/recycling/fluorescentlamps.html>

b) LED

LED emitují nekoherentní světlo o určité vlnové délce, a to v rozmezí od UV, přes barvy viditelného spektra, až po infračervené záření. V posledních letech se LED staly nezbytnou technologií pro fotodynamickou terapii, a to zejména pro ozařování snadno přístupných tkání na povrchu. Mezi hlavní výhody patří kompaktnost, nízká hmotnost, nízká pořizovací cena a cena za jeden watt. Další výhodou je velká ozařovací plocha a možnost jejího snadného a různého rozvržení (Mang, 2004; Nagata a kol., 2012; Breskey a kol., 2013). Významný pokrok v LED technologii umožnil vytvořit malé zdroje záření, které jsou vhodné pro ambulantní PDT. Navíc díky konstrukci optických vláken s difúzním koncem se světlo začalo velice snadno dodávat až do lumenu trávicího traktu nebo do močového měchýře (Firczuk a kol., 2011).

### c) LASERY

Laser je anglický akronym pro Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, což v překladu znamená „zesilování světla pomocí stimulované emise záření“. Jedná se o zdroj, který emituje fotony ve formě koherentního a monochromatického záření. Monochromaticnost záření umožňuje vybrat přesně takovou vlnovou délku, při které má fotosenzitizer své absorpční maximum. Navíc laserový paprsek je velice tenký, a tudíž nabízí velkou přesnost při ozařování a snižuje tak pravděpodobnost, že bude ozářena a poškozena i zdravá tkáň. Lasery lze obecně rozdělit podle časového režimu provozu nebo podle aktivního prostředí laseru.

Podle časového režimu rozlišujeme:

- KONTINUÁLNÍ LASERY – pracují kontinuálně
- PULZNÍ LASERY – pracují v pulzech
- KVAZIKONTINUÁLNÍ LASERY – nepracují kontinuálně, ale v pulzech delších než 200 ns.

Některé studie ukázaly, že pulzní záření v porovnání s LED může zmenšit intenzitu bolesti, a přitom dosáhnout stejné účinnosti. Předpokládá se, že krátké trvání pulzu snižuje lokální nárůst ROS, což může být ten hlavní důvod v rozdílném vnímání bolesti, než jak tomu je u LED PDT (Wang a kol., 2017).

Podle aktivního prostředí rozlišujeme lasery:

- PLYNOVÉ

Jejich aktivním prostředím je plyn, který je tvořen atomy, ionty nebo molekulami. K jejich vybuzení se používá například chemická reakce, elektrický výboj nebo fotodisociace. Typickým zástupcem je helium-neonový laser. Ten byl vytvořen v roce 1961 a jednalo se o první kontinuální a první plynový laser. He-Ne lasery se velice intenzivně používaly při bakteriální PDT, zejména na *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* (Calin a Parasca, 2009). Dalším příkladem může být například argonový nebo CO<sub>2</sub> laser.

- PEVNOLÁTKOVÉ

Aktivní prostředí pevnolátkových laserů tvoří pevné krystalické nebo amorfni látky s příměsí vhodných iontů. Typickým zástupcem je Nd:YAG laser. Jedná se o čtyřstupňový laserový systém, který obsahuje krystal yttrito-hlinitého granátu a využívá  $\text{Nd}^{3+}$  ionty (Liu a kol., 2017).

- KAPALINOVÉ

V případě kapalinových laserů je aktivní prostředí tvořeno vodným nebo alkoholovým roztokem organického barviva (např. rhodaminu nebo kumarinu), proto se často označují přímo jako barvivové. Jako zdroj pro vybuzení se nejčastěji používají jiné lasery - například argonový laser. Barvivové lasery mají již dlouho velice důležitou roli nejen ve fyzice jako takové, ale také v klinické medicíně. Velkým kladem těchto laserů je jejich charakteristická schopnost měnit vlnovou délku, která je umožněna volbou vhodného barviva, a to v rozsahu od 300 do 1100 nm (Fujimoto a kol., 2013). Argonem vybuzený barvivový laser se často spojuje s optickými vlákny pro léčbu rakoviny plic, rakoviny úst nebo tzv. „Barrettova jícnu“. V případě velkých lézí komplikuje jejich využití malý paprsek. Často se proto na konec optického vlákna umístí tzv. difuzor, který zajistí rovnoměrnou distribuci a ozáření (Master a kol., 2013).

- POLOVODIČOVÉ

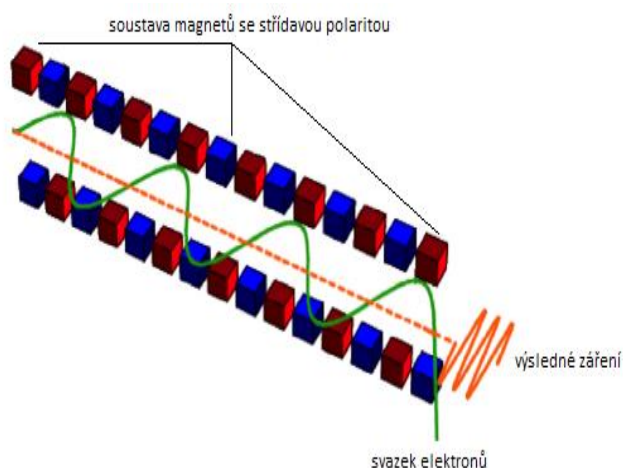
Aktivní prostředí tohoto typu laserů představuje polovodič (např. InGaAlP nebo GaAlAs). Nejznámějším zástupcem je diodový laser. Ten má několik vynikajících vlastností oproti jiným typům, jako jsou například kompaktnost, levnější pořizovací cena, nejsou tolik náročné na údržbu a jsou přenosné. Diodové lasery umožňují měnit vlnovou délku v určitém rozsahu v závislosti na polovodičích. A ačkoliv jsou dostatečně výkonné (630-1650 nm), komerčně prodávané diodové lasery jsou omezeny tak, aby spadaly do optického okna kůže. Nejčastější rozsahy vlnových délek jsou tedy 635-670 nm, 780-830 nm, 905-915 nm, 920-980 nm, 1064 nm, 1260 nm, a 1550 nm (Liu a kol. 2017). Předpokládá se, že pro fotodynamickou terapii jsou nejvíce vhodné diodové lasery s rozsahem vlnových délek od 630 do 740 nm (Nasim a Jamil, 2014).

- **PLAZMOVÉ**

Jedná se o moderní typ laserů, který umožňuje pracovat v rentgenové části spektra. Aktivním prostředím je v tomto případě plazma, která vzniká například ozařováním uhlíkové terčíku CO<sub>2</sub> laserem. Důvodem, proč se studie zabývají zkoumáním využití rentgenového záření pro aktivaci fotosensitivních látek, je snaha překonat relativně malou penetraci záření viditelného spektra (Cline a kol., 2019).

- **S VOLNÝMI ELEKTRONY**

Jedná se o zařízení, ve kterém je svazek vysoce energetických elektronů donucen k emisi záření, které má vlastnosti laseru. Ačkoliv se tento typ označuje jako laser s volnými elektrony, tak tyto elektrony zde nejsou zcela volné, ale jejich pohyb je ovlivňován magnetickým polem, které je vytvořeno pomocí soustavy magnetů se střídavou polaritou – tzv. undulátor (Datolli a Nguyen, 2018). Toto pole je usměrňuje do sinusoidy a při tomto pohybu vytváří záření (Obr. 10). Vlnovou délku, v rozsahu od ultrafialové po infračervenou, je možno měnit snížením nebo zvýšením energie elektronů a změnou periody magnetického pole.



**Obr. 10: Schéma undulátoru.** (převzato a upraveno od Datolli a Nguyen, 2018)

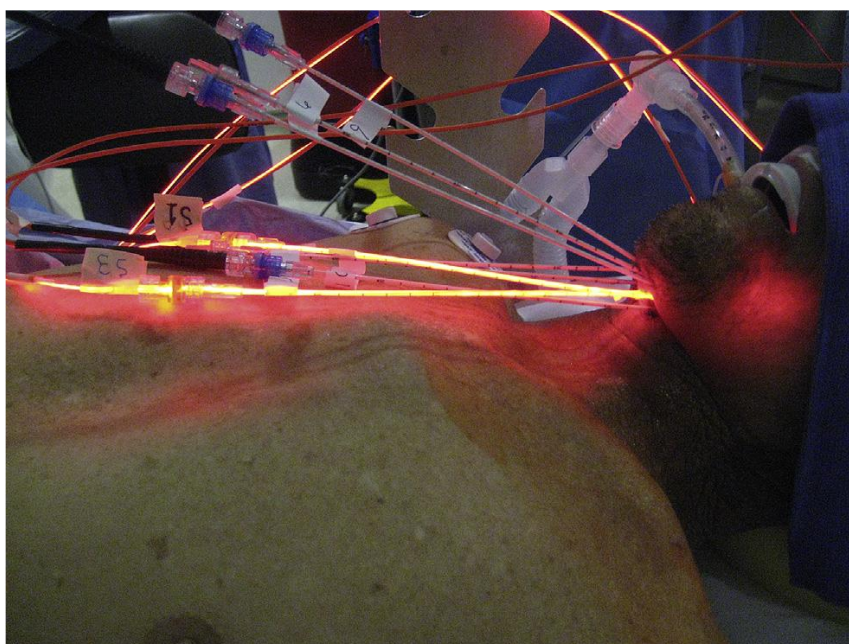
### 3.2.2.2 METODY OZAŘOVÁNÍ

Jednou z hlavních podmínek při léčbě tumorů pomocí PDT je přivedení homogenní a dozimetricky dostatečné plošné hustoty světelné energie přímo k danému

tumoru (Quirk a kol., 2015). Existují tři základní metody ozařování – superficiální, intersticiální a intra-operativní.

Superficiální metoda se využívá hlavně u snadno dostupných a povrchových nádorů. Zdrojem světla v tomto případě může být jakékoliv zařízení – LED, laser, lampa apod. Důležitou podmínkou však je, že nádor nesmí být širší než hloubka penetrace použitého světla.

Intersticiální způsob ozařování řeší problém u větších nádorů, kterými není světlo schopno proniknout. Tato metoda využívá optických vláken (Obr. 11). Ta se zavádí do tumoru přímou vizualizací nebo obrazovým naváděním (počítačovou tomografií nebo ultrazvukem) (Mimikos a kol., 2016). Součástí optického vlákna je jehla, která proniká do tumoru a tzv. difuzor, který umožňuje rozptýlit světlo do několika směrů (Shafirstein a kol., 2017). V závislosti na velikosti nádoru lze použít i více těchto optických vláken, aby došlo k ozáření a následné fotodynamické terapii v celém objemu nádoru. Tento způsob lze využít v případě, kdy se tumor nachází v takovém místě, kde by jeho odstranění resekci představovalo velmi velké riziko.



**Obr. 11: Intersticiální fotodynamická terapie** (převzato od Mimikos a kol., 2016)

Další možností je tzv. intra-operativní metoda. Ta kombinuje operativní odstranění tumoru a fotodynamickou terapii. Intra-operativní PDT byla navržena pro zničení nádorových ložisek po operativní resekci nádoru. Smyslem je zničení těch zbývajících nádorových buněk, které jsou zodpovědné za lokální recidivu tumoru (Kübler a kol., 2003). Nejčastěji se tato metoda volí při léčbě nádorů, které se nachází

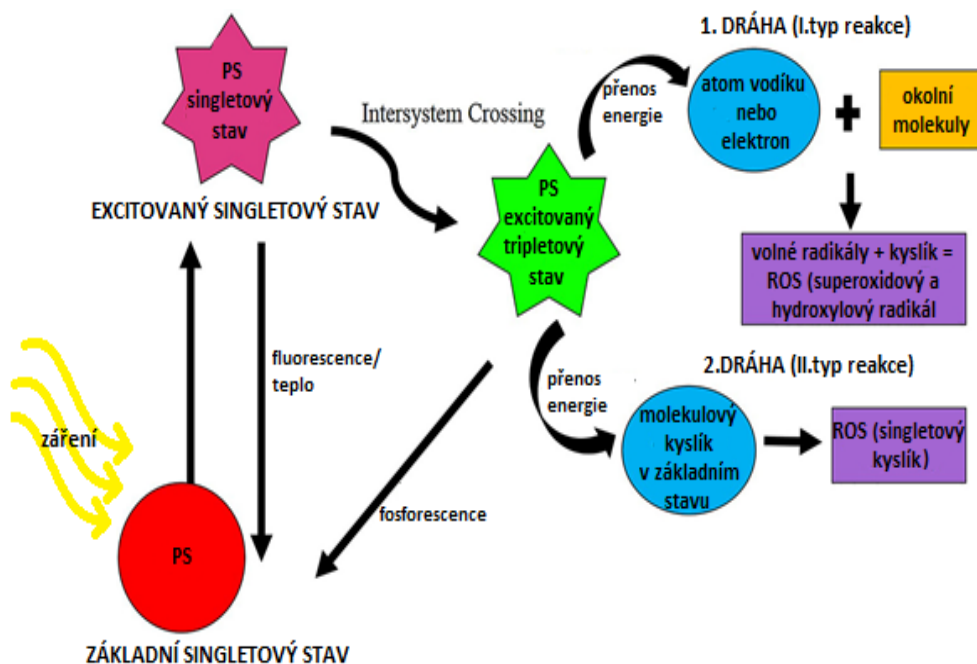


na problémových místech jako je oblast hlavy a krku nebo velké cévy. Pacientovi se nejprve aplikuje fotosenzitizer a po několika dnech následuje operace, při které dojde k resekci největší části tumoru. Po této resekci dojde k ozáření postiženého místa světlem s vhodnou vlnovou délkou a tím k fotodynamickému efektu. Při této metodě je potřeba dbát na osvětlení během operace a zvolit světlo s vhodnou vlnovou délkou, která předčasně nezpůsobí aktivaci fotosenzitizeru.

### 3.2.3 KYSLÍK

Pro fotodynamickou terapii je, kromě fotosenzitizeru a světla, klíčový také kyslík. Právě ten umožňuje vznik reaktivních forem kyslíku. Reaktivní formy kyslíku jsou velice nestabilní, a právě jejich snaha o stabilitu způsobuje jejich velkou reaktivitu, díky které mohou oxidativně poškozovat proteiny, lipidy nebo nukleové kyseliny (Zhou a kol., 2016). V závislosti na míře poškození buněk, množství ROS, opravných mechanismech a antioxidační obraně může dojít až k jejich usmrcení. Fotodynamická terapie se snaží využívat tohoto mechanismu a nadprodukcí reaktivních forem kyslíku léčit jak nádorová, tak i některá nenádorová onemocnění.

Pro správné pochopení vzniku ROS je potřeba pochopit úlohu jednotlivých složek fotodynamické terapie při přenosu energie, který je nezbytný pro vznik reaktivních forem kyslíku (Obr. 12).



**Obr. 12:** Schéma přenosu energie a vzniku ROS (převzato a upraveno od Mokwena a kol., 2018)

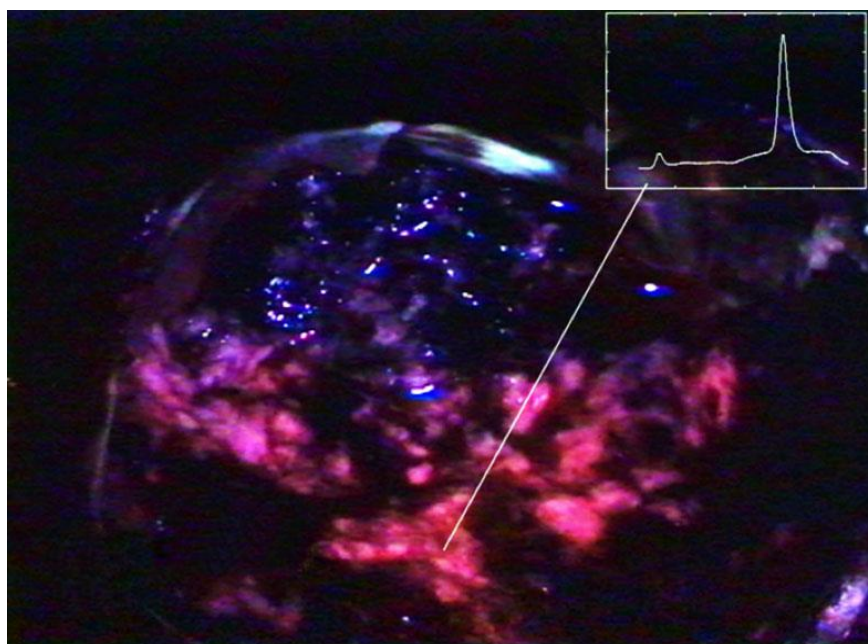
Zdroj záření je nezbytný pro aktivaci fotosensitizeru. Tato aktivace spočívá v tom, že po absorbování fotonů dojde k excitaci elektronu fotosensitizeru do vyšších energetických hladin (orbitalů). Díky tomu se PS dostane ze svého základního singletového stavu do excitovaného singletového stavu. Tento excitovaný singletový stav je velice nestabilní (trvá řádově nanosekundy) a může svou energii ztratit buď emisí světla (fluorescence) nebo produkcí tepla (vnitřní konverzí). Nicméně tento excitovaný singletový fotosensitizer může také podstoupit proces označovaný jako „intersystem crossing“, při kterém vzniká více stabilní excitovaný tripletový stav (Jiang a kol., 2017). Tento tripletový stav trvá dostatečně dlouho (řádově mikrosekundy) a může tak dojít k tzv. fotochemické reakci – I. nebo II. typu (Garcia-Diaz a kol., 2016; Spagnul a kol., 2015).

Excitované fotosensitizery v tripletovém stavu mohou produkovat ROS prostřednictvím dvou drah (Rajendran, 2016). První dráha zahrnuje fotochemickou reakci I. typu, kdy excitovaný fotosensitizer může přenést energii na biomolekuly ve svém okolí. V tomto případě dojde k přenosu vodíku nebo elektronu mezi fotosensitizerem a nádorovou tkání (substrátem), což vede ke vzniku volných radikálů a anionových radikálů fotosensitizeru a substrátu. Elektrony interagují s molekulami kyslíku, které zůstávají ve svém základním energetickém stavu. Tento proces vede k produkci reaktivních forem kyslíku – z počátku ve formě superoxidového anionového radikálu ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), který zapříčiní další tvorbu ROS uvnitř buněk. Tato kaskádovitá reakce vede k oxidativnímu stresu, který vyústí ve zničení nádorových buněk (Kwiatkowski a kol., 2018). Kromě superoxidových radikálů vznikají při I. typu reakce také hydroxylové radikály ( $\bullet\text{OH}$ ), a peroxidy vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Výhodou I. typu je také fakt, že reakcí se substrátem dokáže tvořit radikály i ve tkáni s nedostatkem kyslíku (Wang a kol., 2019).

Ve druhé dráze dochází k II. typu reakce, kdy se může energie (elektron) excitovaného fotosensitizeru přenést přímo na molekulu kyslíku  $^3\text{O}_2$  (v tripletovém stavu) za vzniku singletového kyslíku  $^1\text{O}_2$ , který má velmi silné oxidační vlastnosti (Brilkina a kol., 2019).

Je třeba zmínit, že I. a II. typ reakce může probíhat současně. Poměr mezi oběma reakcemi závisí na povaze fotosensitizeru a na koncentraci  $^3\text{O}_2$  a dalších substrátů. Nicméně většina experimentálních studií naznačuje, že hlavní roli v PDT hraje singletový kyslík, tedy II. typ reakce (Zhang a kol., 2018; Cerman a Cekic, 2015).

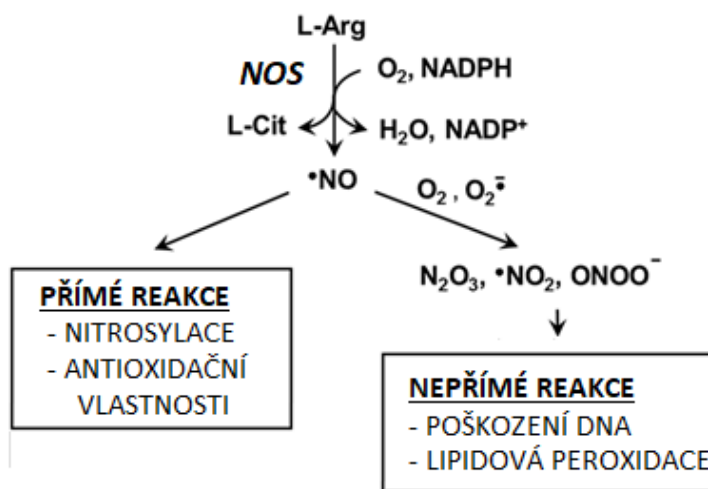
Ačkoliv by se mohlo zdát, že ve fotodynamické terapii má díky tvorbě ROS své uplatnění pouze déle trvající fotosensitizer v tripletovém stavu, lze velmi efektivně využívat také fluorescence, která vzniká při návratu excitovaného singletového fotosensitizeru do svého základního stavu. Podáním fotosensitivní látky před chirurgickou resekcí nádoru umožňuje mnohem snadnější identifikaci hranice nádorů, a to právě díky jejich mnohem silnější fluorescenci (Obr. 13) (Bown 2013). Tato kombinace se začala využívat, protože při snaze dosáhnout kompletní chirurgické resekce nádoru je nejvíce limitujícím faktorem neschopnost odlišit zdravou tkáň od nádorové. Jelikož nádor prostupuje zdravou tkání, nejsou zde patrné žádné hranice, kapsuly nebo jiné membránové struktury, které by jasně rozdělávaly neoplastickou gliovou tkáň od nervové. Z tohoto důvodu je např. při resekci v ohrožení mozek a jeho příslušné funkce. Poprvé byla fluorescence při PDT využita pro vizualizaci nádoru během resekce v roce 1998. Od té doby došlo k postupné optimalizaci a k vylepšování této kombinace – došlo ke spojení chirurgického mikroskopu, světelného zdroje, videokamery, spektrometru a barevných filtrů (Bechet a kol., 2014).



**Obr. 13: Využití fluorescence pro identifikaci oblastí nádorů při resekci gliomu (převzato od Bown 2013)**

Zvláštní úlohu má oxid dusnatý (NO). Jedná se o bioaktivní volný radikál s krátkou životností (Reeves a kol., 2009). Přirozeně se vyskytuje u savců a je vytvářen pomocí enzymu syntázy oxidu dusnatého. V nádorových buňkách má oxid dusnatý

dvě role, které se odvíjí od jeho koncentrace, respektive od jeho aktivity – přímé a nepřímé (Obr. 14).



**Obr. 14: Tvorba oxidu dusnatého (NO) pomocí enzymu syntázy (NOS) a charakteristické přímé a nepřímé reakce NO (převzato a upraveno od Girotti 2016)**

K přímým reakcím dochází při nízkých hladinách koncentrace (nM) a NO se v tomto případě chová jako antioxidant a může také přímo reagovat se železem v hemoglobinu a hemovými proteiny za vzniku nitrosylových derivátů (Girotti 2016). Tyto deriváty pak mohou aktivovat dráhy zajišťující přežití buněk. Studie také prokázaly, že mnoho nádorových buněk využívá nízké hladiny NO k redukcí apoptózy, ke stimulaci buněčné proliferace a k vývoji metastáz (Rapozi a kol., 2015). Ovšem kromě těchto cytoprotektivních vlastností vykazuje NO také cytotoxické účinky, ke kterým dochází při nepřímých reakcích, kdy je koncentrace NO vyšší ( $\mu\text{M}$ ). Tato cytotoxicita je způsobena konverzí na oxidované meziprodukty, které poškozují DNA nebo způsobují lipidovou peroxidaci na membráně (Rapozi a kol., 2015). Při fotodynamické terapii může dojít k reakci NO s reaktivními formami kyslíku za vzniku peroxynitritových aniontů ( $\text{ONOO}^-$ ) a dalších reaktivních forem dusíku, které vykazují výraznou biocidní aktivitu a mohou tak zvýšit celkové poškození (Deng a kol., 2018). Hypoxie znemožňuje dostatečnou tvorbu reaktivních forem kyslíku v některých nádorech a je tudíž velkou překážkou pro účinnou fotodynamickou terapii. Oxid dusnatý však může jako endogenní signální molekula navodit relaxaci buněk hladkého svalstva a zvýšit tak průtok krve. Díky tomu se v oblasti tumoru zvýší množství kyslíku a tím také ROS (Deng a kol., 2018). Tento fakt umožňuje provedení

fotodynamické terapie i u nádorů, u kterých by sama o sobě nebyla díky hypoxii efektivní.

### 3.2.4 MECHANISMY BUNĚČNÉ SMRTI

Způsob zničení tumoru pomocí PDT se označuje jako multifaktoriální (Kataoka a kol. 2017). Podílí se na něm spousta různých faktorů, jako je například typ fotosensitizeru, použité světlo, koncentrace, čas mezi podáním PS a jeho ozářením, typ tumoru nebo okysličenost tkáně (Liu a kol., 2019).

Při snaze o zničení nádorových buněk cílí fotodynamická terapie na jejich určité části, na určité buněčné organely a membrány (Crous a kol., 2019). Obecně lze říci, že v buňce dochází k primárnímu poškození tam, kde se lokalizuje fotosensitizer (Thompson a kol., 2018).

Prvním místem, kde přijde PS do kontaktu s buňkou, je plazmatická membrána. Na rozdíl od polárních fotosensitizerů, které jsou transportovány skrze plazmatickou membránu, lipofilní fotosensitizer se obvykle vkládají do oblasti acylového řetězce lipidové dvouvrstvy. Reaktivní formy kyslíku vzniklé při PDT pak mohou peroxidací zapříčinit ztrátu integrity membrány a vést až k nekrotické buněčné smrti.

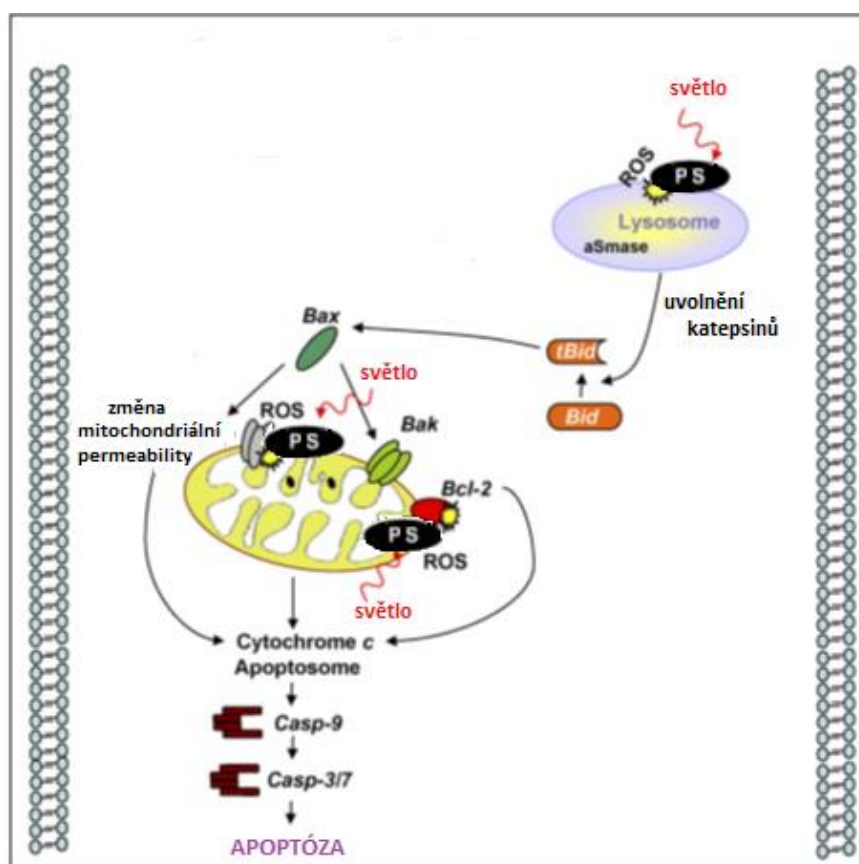
Dalším cílem PS mohou být lysozomy. Ty mohou prostřednictvím vzniklých ROS spustit buněčnou smrt dvěma dráhami:

1. Lipidovou oxidací dojde k narušení nebo ruptuře lysozómů, čímž se z nich uvolní katepsiny.
2. Může dojít k přemístění PS do jiných organel, kde následně dojde k oxidativnímu poškození (Weijer a kol., 2015).

Katepsiny jsou proteolytické enzymy, které lze rozdělit na cysteinové proteázy (CTSB, C, F, H, L, K, O, S, W a Z), serinové proteázy (CTSA a G) a aspartátové proteázy (CTSD a E). Obecně se má za to, že množství uvolněných proteáz ovlivňuje způsob buněčné smrti. Při částečné permeabilitě vedou spíše k apoptóze, kdežto při neregulovaném úniku dochází k nekróze. V současnosti probíhá mnoho studií, které zkoumají vliv katepsinů na vývoj rakoviny. Například u katepsinů CTSB/D/L bylo prokázáno, že po jejich vypuštění do cytosolu štěpí pro-apoptotický Bid a anti-apoptotické proteiny jako jsou například Bcl-2 a Bcl-X<sub>L</sub>, a tím spouštějí apoptózu (Khaket a kol., 2019). Bak a Bax jsou pro-apoptotické proteiny, které mohou být aktivovány dvěma způsoby:

1. Štěpením Bid proteinu vznikají jeho zkrácené formy, tzv. t-Bid. Ty jsou pak schopny změnit konformaci Bak a Bax proteinů a tím je aktivovat.
2. Štěpením anti-apoptotických Bcl-2 a Bcl-x<sub>L</sub> proteinů dojde k de-represi a uvolnění Bak a Bax proteinů.

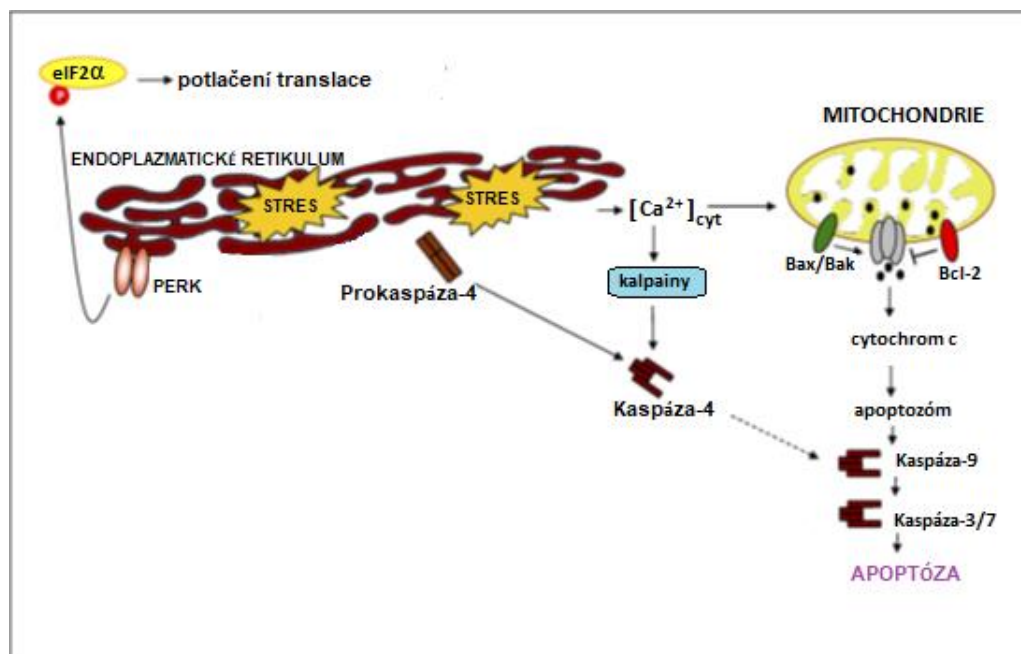
Po aktivaci pro-apoptotických Bak a Bax proteinů dochází poté k jejich reakci s mitochondriálními póry, ze kterých se uvolní cytochrom c. Ten se poté stává součástí tzv. apoptozómu. Jedná se o proteinový komplex, který aktivuje kaspázu-9, což vede k aktivaci kaspáz-3/7 a ke spuštění apoptózy (Obr.15). Tato mitochondriální dráha může být spuštěna i přímým poškozením mitochondrií fotodynamickou terapií.



**Obr. 15: Schéma signální dráhy vedoucí k apoptóze po poškození lysozómů a mitochondrií (převzato a upraveno od Buytaert a kol., 2007)**

Další cílovou organelou je endoplazmatické retikulum. Vlivem PDT dojde k lipidové peroxidaci a následné ruptuře, při které se uvolní vápenaté ionty do cytosolu. Tyto Ca<sup>2+</sup> ionty jsou poté vychytávány mitochondriemi, které v reakci na tento signál buď uvolní cytochrom c a ztratí svůj membránový potenciál, což vede k apoptóze, nebo dojde ke změně mitochondriální permeability. Tuto změnu v propustnosti následuje úbytek ATP, který vyústí nekrotickou buněčnou smrtí. Tyto

děje jsou společné i při zacílení PDT přímo na mitochondrie. Vápenaté ionty uvolněné z endoplazmatického retikula mohou také spustit apoptotickou dráhu, která není závislá na mitochondriích. V ní tyto ionty způsobí aktivaci kalpainů (cytosolových proteáz), které mohou poté aktivovat kaspázu-4. Ty poté kaskádovitě aktivují kaspázu-9, což vede k apoptotické buněčné smrti (Obr. 16).



**Obr. 16: Schéma apoptotické signální dráhy při poškození endoplazmatického retikula** (převzato a upraveno od Buytaert a kol., 2007)

Při působení PDT na Golgiho aparát byly popsány 3 dráhy vedoucí k usmrcení buňky. V prvním případě způsobí tvorba ROS oxidační modifikace a štěpení proteinů Golgiho aparátu, které vedou k apoptóze a rozpadu organel. Druhá dráha zahrnuje působení na vezikulární transport faktor p115. Vlivem PDT dojde k rozštěpení p115 kaspázou 3 a 8. Následně dojde k jeho přemístění do jádra, kde stimuluje apoptózu. Studie odhalily, že při použití určitých fotosensitizerů došlo k aktivaci třetí dráhy, která po ozáření navozovala apoptózu prostřednictvím vápenatých iontů bez zapojení mitochondrií (Weijer a kol., 2015).

Reaktivní formy kyslíku mohou také způsobit oxidativní poškození DNA přímo v jádře. Míra tohoto poškození však závisí nejen na množství ROS, ale také na opravných mechanismech. Díky nim toto poškození většinou nemusí být letální, a proto například v porovnání s poškozením DNA vlivem ionizujícího záření lze říci, že

v případě PDT dochází k usmrcení buňky převážně jinými způsoby než přímým poškozením DNA v jádře.

Nedávné studie se také zabývaly změnami v buněčném cyklu, které byly vyvolány fotodynamickou terapií, protože právě regulace buněčného cyklu hraje klíčovou roli při proliferaci jak zdravých, tak hlavně i nádorových buněk. Jedna ze studií popisuje, že po aktivaci protoporfyrinu IX světelným zářením došlo ke zvýšení exprese cyklinu D1, který způsobil narušení buněčného cyklu v rané a střední G1 fázi. Další studie prokázala, že ftalocyaninové fotosensitizéry mohou způsobit zastavení buněčného cyklu v G2/M fázi. Při jiném pokusu bylo zjištěno, že PDT pozastavuje syntézu DNA a inhibuje proliferaci plicního adenokarcinomu, což vyústí v zastavení S-fáze (Yu a kol., 2017).

Ačkoliv i některé další studie prokázaly, že dochází k zastavení buněčného cyklu a tím i proliferace po PDT, je zde stále spousta neznámých. Výsledky také prokázaly závislost na několika faktorech, jako je buněčná linie, typ fotosensitizéru nebo koncentrace fotosensitizéru, a proto je potřeba další výzkum, který by vysvětlil komplexní interakce mezi PDT a buněčným cyklem (Meng a kol., 2017).

Buněčná smrt *in vitro* zahrnuje apoptózu, nekrózu nebo autofagii. *In vivo* hraje důležitou roli navíc ještě i poškození cévního zásobení tumoru, reakce na zánět a imunitní odpověď (Liu a kol., 2019; Baldea a kol., 2015). Všeobecně lze usmrcení nádorových buněk rozdělit na přímé a nepřímé.

#### 3.2.4.1 PŘÍMÉ USMRCENÍ

Přímé usmrcení zahrnuje apoptózu, nekrózu a také autofagii. Obecně dochází k apoptóze a nekróze během PDT téměř současně. To, k jakému způsobu buněčné smrti dojde, záleží na mnoha faktorech, jako je například koncentrace PS, lokalizace PS a velikost plošné hustoty světelné energie (Fonda-Pascual a kol., 2016). Pokud se například PS lokalizuje v endoplazmatickém retikulu nebo mitochondrii, dochází převážně k usmrcení buňky prostřednictvím apoptotické dráhy. Pokud však dojde k lokalizaci PS v plazmatické membráně nebo v lysozómu, mohou buňky podlehnout jinému způsobu buněčné smrti, a to buď prostřednictvím nekrotické dráhy nebo autofagie. Podobný vliv má také vysoká hodnota plošné hustoty světelné energie, při které více buněk podléhá nekróze, zatímco při její nízké velikosti roste počet apoptotických buněk (Liu a kol., 2019).

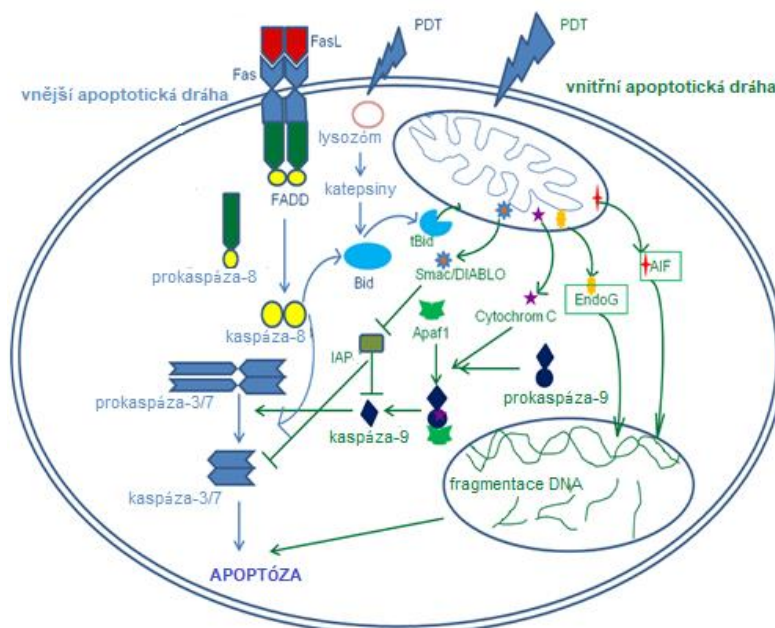


- APOPTÓZA

Jedná se o programovanou buněčnou smrt zahrnující až 30 reakcí a 40 molekul, které jsou součástí celkem dvou různých biochemických drah – vnitřní a vnější (López-Marín a kol., 2018) (Obr. 17).

Pro vnitřní dráhu je charakteristické, že jako hlavní mezičlánek obsahuje mitochondrie. Spouštěčem této dráhy může být například nárůst  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, nebo aktivace pro-apoptotických Bax a Bak proteinů. Ty mohou být aktivovány buď prostřednictvím t-Bid (vzniká štěpením Bid pomocí katepsinů) nebo štěpením anti-apoptotických Bcl-2 a Bcl-x<sub>L</sub> proteinů. Výsledkem je uvolnění pro-apoptotických proteinů z mitochondrií, které lze rozdělit do dvou skupin. První zahrnuje proteiny schopné aktivovat kaspázy – cytochrom c a Smac/DIABLO. Cytochrom c navozuje oligomerizaci Apaf-1, což vede k aktivaci kaspázy-9. Poté cytochrom c, Apaf-1 a kaspáza-9 vytvoří komplex, tzv. apoptozóm, který aktivuje efektorové kaspázy-3 a 7. Smac/DIABLO protein váže IAP (proteinové inhibitory apoptózy) a zapříčiní tak jejich deaktivaci (Indran a kol., 2011). Druhá skupina zahrnuje apoptózu indukující faktor (AIF) a endonukleázu G. Oba proteiny se přemístí do jádra, kde spouští fragmentaci DNA.

Vnější apoptotická dráha se spouští navázáním tzv. ligandu smrti (např. FasL, TNF, TRAIL) na příslušný receptor smrti v buněčné membráně (např. Fas, TNF-R1, TRAIL receptor). Výsledkem je vytvoření signálního komplexu, který váže prokaspázu-8. Její dimerizace a přeměna na kaspázu-8 vede k aktivaci efektorových prokaspáz-3 a 7 a k následné apoptóze (Chilakamarthi a Giribabu, 2017; Chico a kol., 2017).



**Obr. 17: Schéma vnitřní a vnější apoptotické dráhy** (převzato a upraveno od Chilakamarthi a Giribabu, 2017).

Pro apoptotické buňky jsou charakteristické některé morfologické znaky: smršťování, kondenzace a fragmentace chromatinu, vznik nepravidelných záhybů plazmatické membrány a vytváření apoptotických tělísek (Hoorelbeke a kol., 2018; Kaizhen a kol., 2018).

- **NEKRÓZA**

Nekróza se jinak také označuje jako pasivní buněčná smrt, jejímž typickým znakem je otok buňky s následným prasknutím plazmatické membrány. Obvykle se jedná o reakci na vážný buněčný, chemický nebo fyzikální stres (Gudipaty a kol., 2018). Příkladem může být extrémní hodnota pH nebo teploty, toxické látky, ionizující záření apod. V případě fotodynamické terapie lze za tyto extrémy vedoucí k nekróze považovat vysokou hodnotu plošné hustoty světelné energie a vysokou koncentraci fotosensitizeru.

Nekrózu lze rozlišit na primární a sekundární. Primární nekróza nastává v momentě, kdy dojde buď k silnému poškození buňky, nebo v případě, kdy poškození sice není tak vážné, ale dojde k otoku mitochondrií, ztrátě membránového potenciálu a narušení tvorby ATP, což způsobí zablokování

apoptózy kvůli energetickému selhání (Vakifahmetoglu-Norberg a kol., 2017). Sekundární nekroza se od primární liší tím, že je řízená specifickou biochemickou dráhou. Tato dráha zahrnuje kaspázu-3, která reguluje sekundární nekrozu štěpením DFNA5 (deafness-associated tumor suppressor). Ten se poté změní na nekrozu podporující DFNA5-N fragment, který se inkorporuje do plazmatické membrány a vytváří velký pór, kterým se uvolňuje obsah buňky (Gudipaty a kol., 2018).

Během nekrozy dochází postupně k rozpadu jádra, nabývání cytoplazmy na objemu (otok buňky), destrukce organel a uvolnění proteolytických enzymů z lysozómů, které postupně rozkládají buňku. Posledním bodem nekrozy je ruptura plazmatické membrány a vylití obsahu buňky do jejího okolí, což vyvolá tvorbu zánětu (Phillips 2016). Tento zánět vyvolá reakci neutrofilů a makrofágů, které migrují do dané oblasti – v případě PDT se jedná o oblast tumoru, která byla ozářena (Banerjee a kol., 2017).

- **AUTOFAGIE**

Další reakcí na fotopoškození, které vede k usmrcení buňky, je autofagie. Jedná se o proces, který je jinak také využíván při recyklaci buněčných komponent, obvykle jako reakce na nedostatek živin (Kessel, 2019) nebo na jiné faktory poškozující buňku. Ve snaze přežít dochází v buňce během autofagie k odstranění poškozených organel, toxických metabolitů nebo nitrobuněčných patogenů. Nicméně autofagie může také při nadměrném trávení sebe sama a při degradaci esenciálních buněčných složek vést až k usmrcení buňky (Buytaert a kol., 2007). Samotný proces zahrnuje obalení a uzavření (např. poškozených organel) do dvoumembránového váčku, který se označuje jako autofagozóm. Jeho následná fúze s lysozomy zahájí degradaci abnormálních proteinů nebo organel (Ouyang a kol., 2018).

Obecně může být autofagie indukována hypoxií nebo oxidativním stresem. V případě PDT je daným spouštěčem právě produkce reaktivních forem kyslíku. Ačkoliv ještě nebyl úplně pochopen molekulární mechanismus, kterým ROS řídí autofagii, na základě již provedených studií se předpokládá několik drah, které může PDT spouštět. FOTOSENSITIZÉRY, které se lokalizují v mitochondriích nebo endoplazmatickém retikulu, způsobují selektivní poškození určitých proteinů, které se podílí na procesu autofagie (např. Bcl-2,

Bcl-x<sub>L</sub>, mTOR). O pro-autofagickém proteinu Beclin 1 je známo, že se váže na Bcl-2. Při PDT poškozuje spousta fotosenzitizérů právě protein Bcl-2, který tak ztrácí svou funkci a dochází k uvolnění Beclinu 1, což vede k započatí autofagie. Bylo také prokázáno, že při PDT dochází k overexpresi HIF-1. HIF-1 má klíčovou roli v reakci na hypoxii a ovlivňuje transkripci stovek genů včetně dvou pro-autofagických BH3 proteinů - BNIP3 a BNIP3L. Tyto dva BH3 proteiny mohou poté uvolnit Beclin 1 z vazby s Bcl-2/ Bcl-x<sub>L</sub> a tím stimulovat autofagii (Sanabria a kol., 2013).

#### 3.2.4.2 NEPŘÍMÉ USMRCENÍ

Nepřímá forma poškození nepůsobí na nádorové buňky, ale ovlivňuje okolí tumoru takovým způsobem, který vede k jeho zničení. Mezi nepřímé formy destrukce nádoru řadíme působení na cévy v jeho blízkosti a imunitní reakci.

- POŠKOZENÍ CÉV

Je dobře prokázáno, že následkem PDT dochází mimo jiné i k významné změně permeability, vazokonstrikci a k tvorbě cévních okluzí. Výsledkem je tkáňová hypoxie, která se podílí na zničení nádoru (Senge a Radomski, 2013).

Nejvíce patrné poškození cév je v endoteliální a sub-endoteliální vrstvě buněk. Vlivem PDT dochází ke konformačním změnám cytoskeletálních komponentů spolu s depolarizací mikrotubulů v cytoplazmě. Tento fakt způsobí změny buňky ve formě otoku, smrštění nebo fragmentace, což má za následek rozrušení endoteliální vrstvy. Smršťování endoteliálních buněk způsobí ztrátu těsného spojení mezi jednotlivými buňkami, díky čemuž dojde k odhalení bazální membrány pro cirkulující krev. Následná interakce krevních destiček s obnaženou cévní stěnou spustí jejich agregaci, což vyústí v zúžení cévy a vytvoření trombu (Weiss a kol., 2012). Díky tomu dojde k hypoxii nádoru a k narušení krevního zásobení jak v samotném nádoru, tak i v jeho blízkém okolí.

Poškození cév může být také ovlivněno intervalem mezi podáním látky (fotosenzitizéru) a ozářením (Kawczyk-Krupka, 2015). Například u Fotofrinu dochází k jeho podání 2 dny před samotnou léčbou (48 hodinový interval mezi podáním a ozářením). Tato doba umožňuje vyloučení většiny fotosenzitizéru z krevního řečiště. Nicméně pokud by byl Fotofrin aktivovaný krátce po jeho

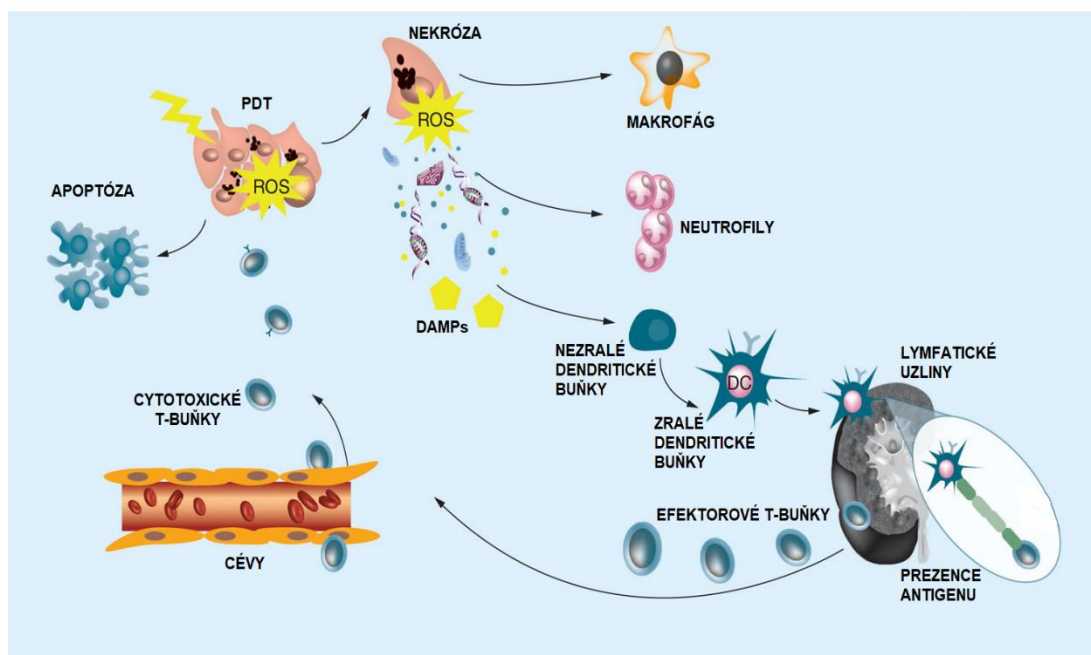
podání (2 hodiny), dojde právě k cévnímu poškození, z čehož vyplývá, že tento interval je důležitým klinickým nástrojem při léčbě nádorového onemocnění. Výsledky studií naznačují, že PDT s krátkým intervalem vede ke klinickému úspěchu zejména cévní ablací (cévně zaměřená PDT). V kontrastu s tím působí PDT s dlouhým intervalem hlavně na buněčné úrovni (buněčně zaměřená PDT) (Allison a Moghissi, 2013).

- **IMUNITNÍ REAKCE**

Fotodynamická terapie způsobuje v cílové nádorové tkáni rychlou zánětlivou reakci, která hraje důležitou roli při aktivaci imunitního systému (Almeida a kol., 2004). Tyto zánětlivé reakce jsou způsobeny jednak nekrózou nádorových buněk, a pak také stimulací prozánětlivých mediátorů. Během výzkumu byly objeveny molekuly spojené se stresem nebo poškozením tkáně, které se označují DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns). Tyto molekuly jsou obvykle intracelulární, ale u poškozených/umírajících buněk dojde k jejich odkrytí nebo sekreci, což zapříčiní stimulaci imunitního systému (Obr. 18) (Huang a kol., 2012). Nejčastějšími zaznamenanými příklady DAMPs, které se uvolní vlivem PDT, jsou kalretikulin a některé heat-shock proteiny – HSP60, HSP70 a HSP90.

Kalretikulin, který se objeví na buněčném povrchu, slouží jako signál pro dendritické buňky a makrofágy k fagocytóze poškozené buňky (Gellén a kol., 2018). Dendritické buňky jsou tzv. antigen-prezentující buňky, které jsou zodpovědné za aktivaci tzv. naivních T-buněk (T-lymfocytů, které se dosud nesetkaly s příslušným antigenem), což vede k proliferaci a diferenciaci efektorových T-buněk a následné antigen-specifické reakci (Radogna a Diederich, 2018), při které po rozpoznání cílové buňky uvolní do okolí serinové proteázy a perforiny, které způsobí lýzu cílových buněk.

Heat-shock proteiny aktivují jednak tzv. NK (Natural Killer) a dendritické buňky, ale také stimulují produkci cytokinů (např. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-6), které mimo jiné přitahují fagocytující neutrofile (Gellén a kol., 2018) pomocí chemotaxe nebo aktivují B-lymfocyty.



**Obr. 18: Stimulace imunitního systému fotodynamickou terapií (převzato a upraveno od Huang a kol., 2012)**

Velkým problémem při léčbě rakoviny je recidiva, která je spojena s přítomností reziduálních nádorových buněk, což následně vede k opětovnému růstu tumoru a metastází (Kaleta-Richter a kol., 2019). Jedním z důvodů, proč se rakovina dokáže vyhnout imunitní reakci je ten, že je málo imunogenní. Nádorové buňky jsou sice schopné exprese antigenů, ale ty jsou těžko odlišitelné od tolerovaných antigenů zdravé tkáně. Nádory mají navíc velice nízkou míru mutace a produkce nových antigenů. Příkladem jsou glioblastom a rakovina vaječníků, kterým nejenže chybí odlišitelné antigeny, ale také vytváří imunosupresivní prostředí pomocí protizánětlivých cytokinů (Showalter a kol., 2017). Fotodynamická terapie je však schopna díky svému vlivu na imunitní reakci narušit funkci některých těchto protizánětlivých cytokinů, které se také podílí na vývoji tumoru a metastází nebo na nádorové angiogenezi (Kaleta-Richter a kol., 2019).

## 4 MATERIÁL

### 4.1 BUNĚČNÉ LINIE

- NIH3T3 buněčná linie (myší fibroblasty)
- G361 buněčná linie (lidský kožní melanom)
- HeLa buněčná linie (karcinom děložního čípku)

Pokusy byly provedeny celkem na třech buněčných liniích – G361, NIH3T3 a HeLa. G361 buněčná linie kožního melanomu a HeLa buněčná linie karcinomu děložního čípku reprezentuje nádorové buněčné linie, NIH3T3 buněčná linie myších fibroblastů představuje zdravou nenádorovou buněčnou linii.

Všechny linie byly připraveny do 96-ti jamkové destičky v jedné vrstvě a hustota buněk na jednu jamku byla  $10^4$ . V případě měření na mikroskopu atomárních sil byly buňky připraveny do Petriho misky s hustotou buněk  $10^5$ . Inkubace probíhala vždy při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>.

### 4.2 FOTOSENSITIZÉRY

Jednotlivé fotosensitizéry (Obr. 19) byly získány z různých zdrojů:

Porfyrinové fotosensitizéry byly dodány prof. Mosingerem - Ústav Anorganické Chemie Univerzity Karlovy v Praze.

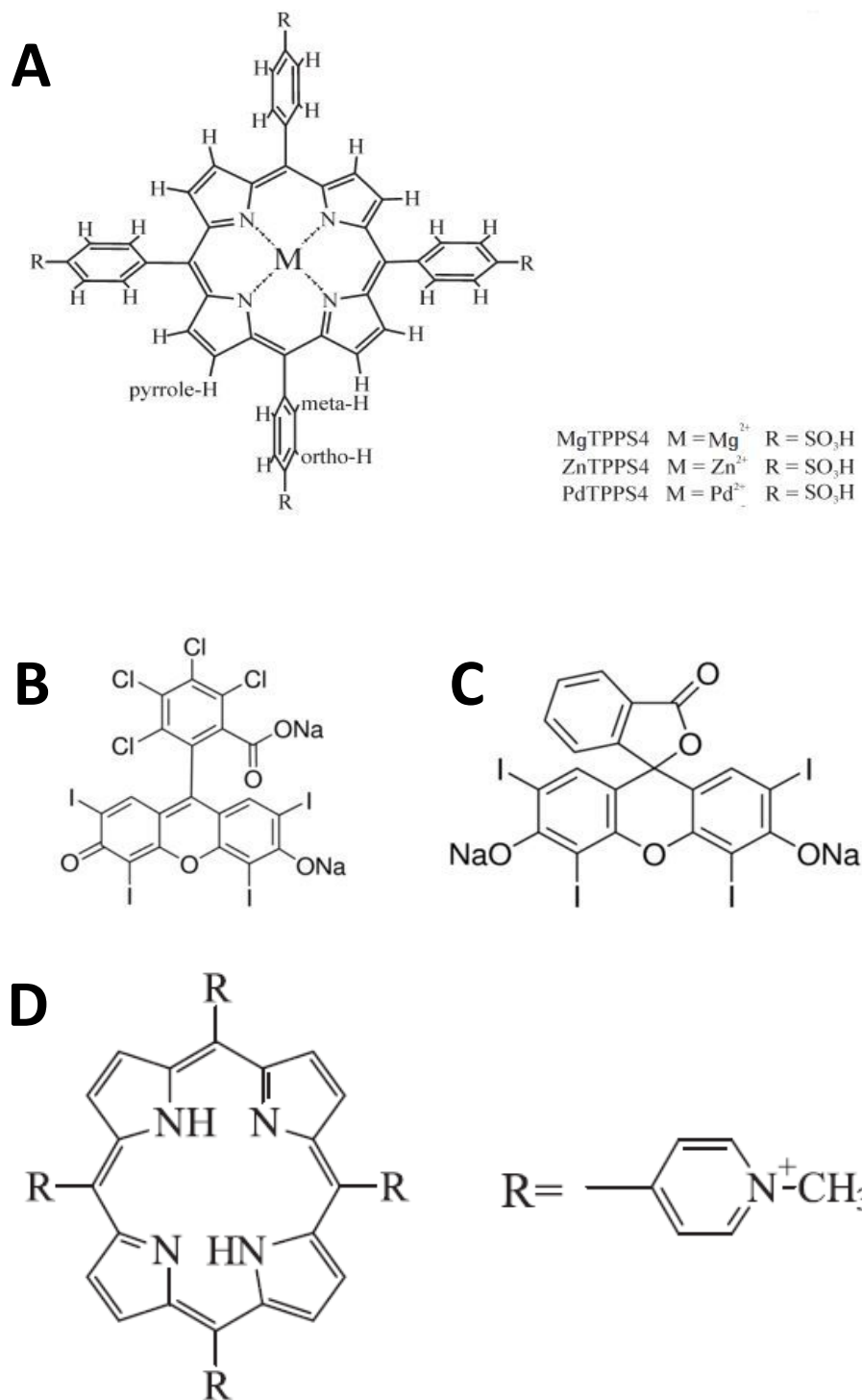
- TPPS<sub>4</sub> (*meso*-tetrakis(4-sulfonatophenyl) porphyrin)
- ZnTPPS<sub>4</sub> (zinečnatý derivát TPPS<sub>4</sub>)
- PdTPPS<sub>4</sub> (paladnatý derivát TPPS<sub>4</sub>)
- MgTPPS<sub>4</sub> (hořečnatý derivát TPPS<sub>4</sub>)

Xanthenová barviva byla zakoupena od firmy Sigma Aldrich.

- Rose Bengal (4,5,6,7-Tetrachloro-2',4',5',7'-tetraiodofluorescein disodium)
- erythrosin B (2',4',5',7'-Tetraiodofluorescein disodium)

Fotosensitizér 3. generace byl vytvořen a charakterizován na základě spolupráce s RCPTM pod vedením Mgr. Kateřiny Polákové, Ph.D.

- Kompozit TMPyPu a oxidu grafenu



**Obr. 19: Struktura fotosenzitizérů: A – TPPS<sub>4</sub>, Zn TPPS<sub>4</sub>, Pd TPPS<sub>4</sub>, Mg TPPS<sub>4</sub>; B – Rose Bengal; C – erythrosin B; D – TMPyP (převzato od Mosinger a kol., 2002; [https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/198269?lang=en&region=CZ&cm\\_sp=InsitecaSrpResults\\_srpRecs\\_srpModel\\_erythrosin%20b-\\_-srpRecs3-2](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/198269?lang=en&region=CZ&cm_sp=InsitecaSrpResults_srpRecs_srpModel_erythrosin%20b-_-srpRecs3-2), [https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/330000?lang=en&region=CZ&cm\\_sp=InsitecaSrpResults\\_srpRecs\\_srpModel\\_bengal%20rose-\\_-srpRecs3-1](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/330000?lang=en&region=CZ&cm_sp=InsitecaSrpResults_srpRecs_srpModel_bengal%20rose-_-srpRecs3-1), Borissevitch a kol., 2018)**



## 4.3 OSTATNÍ MATERIÁL

### a) ROZTOKY, MÉDIA A CHEMIKÁLIE

- aceton
- destilovaná voda
- DMSO (Dimethyl sulfoxid) (Sigma)
- EDTA (Lachema); 1,21 g Tris (Sigma) + NaOH (Sigma) k úpravě na pH 10
- elektroforetický roztok = 2 l destilované vody; 24 g NaOH (Sigma); 0,584 g
- etanol 70%
- FBS (fetal bovine serum, Sigma Aldrich)
- HMP agaróza (Serva)
- Hoechst
- kultivační DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) = práškové DMEM (Sigma); 500 ml 10% fetálního séra (Sigma); 100 ml 1% penicilin/streptomycin (Sigma); 100 ml 1% glutaminu (Sigma)
- LMP agaróza (Qbiogene)
- lyzační roztok = 1 litr destilované vody; 146,1 g NaCl (Tamda); 29,23 g
- metanol
- NaOH (Sigma)
- neutralizační roztok = 1 litr destilované vody; 48,46 g Tris (Sigma) + HCl (Lachema) k úpravě na pH 7,5
- PBS 10× (Phosphate Buffered Saline), pH 7,4 = 80 g NaCl (Tamda); 2 g KCl (Lachema); 14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Penta); 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Lach-Ner); destilovaná voda do 1 litru + HCl (Lachema) k úpravě pH
- propidium jodid (Sigma)
- Ribonukleáza A (Sigma)
- SYBR Green (Invitrogen)
- TrypLE (Invitrogen)
- Triton X-100 (Serva)

### b) KOMERČNÍ KITY

- Annexin FITC Apoptosis Detection Kit (Sigma)
- DCF (5-(a-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát, acetyl ester (CM-H<sub>2</sub>DCFDA)) (Invitrogen)

- JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (Sigma)
- MTT kit (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid) (Sigma)

#### 4.4 LABORATORNÍ ZAŘÍZENÍ A POUŽITÉ PROGRAMY

- 414 nm LED diody (Kingbright Corporation, Taiwan)
- 525 nm LED diody (Huiyuan Opto-Electronics Co., Čína)
- 740 nm LED diody (Kingbright Corporation, Taiwan)
- BD FACSDiva™ software (BD Biosciences, USA)
- CO<sub>2</sub> inkubátor (BioTek, USA)
- centrifuga
- Comet Score (TriTek Corp., USA)
- fluorescenční mikroskop Olympus IX81 (Olympus, Japonsko)
- fluorescenční spektrometr (Edinburg Instruments)
- horizontální elektroforéza Sub-Cell 192 (BIORAD, Česká republika)
- hrot DNP-10 (Bruker, USA)
- Infinite M200 Pro Multi-Mode Microplate Reader (Tecan, Švýcarsko)
- konfokální mikroskop Nikon Eclipse Ti2 (Japonsko)
- laboratorní váhy
- Microsoft Excel
- Mikroskop atomárních sil (Bruker, USA)
- program 3T3 NRU PT Phototox 2.0 (BfR, Německo)
- SPIP (Image Metrology, Denmark)
- Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (BioTek, USA)
- zdroj – 40 V, 3 A (Voltcraft, Česká republika)

## 5 METODY

### 5.1 PŘÍPRAVA FOTOSENSITIZÉRU A OZAŘOVÁNÍ

Porfyrinové fotosensitizéry a xanthenová barviva byly dodány ve formě prášku, proto bylo potřeba převést tyto fotosensitizéry z pevného stavu do roztoku. V případě kompozitu GO/TMPyP byl dodán již rozpuštěný fotosensitizér, který byl následně pouze podředen na požadované koncentrace v DMEM médiu.

Zvolené koncentrace se odvíjely od jednotlivých fotosensitizérů. Pro experimenty s porfyrinovými fotosensitizéry byla zvolena pouze koncentrace IC50 (Tab. 1), u xanthenových barviv a fotosensitizéru 3. generace bylo nejprve potřeba pomocí pokusů zvolit vhodnou koncentrační řadu (Tab. 2), ze které následně byly zjištěny hodnoty IC50.

**Tab. 1: Koncentrace IC50 porfyrinových fotosensitizérů použité při pokusech.**

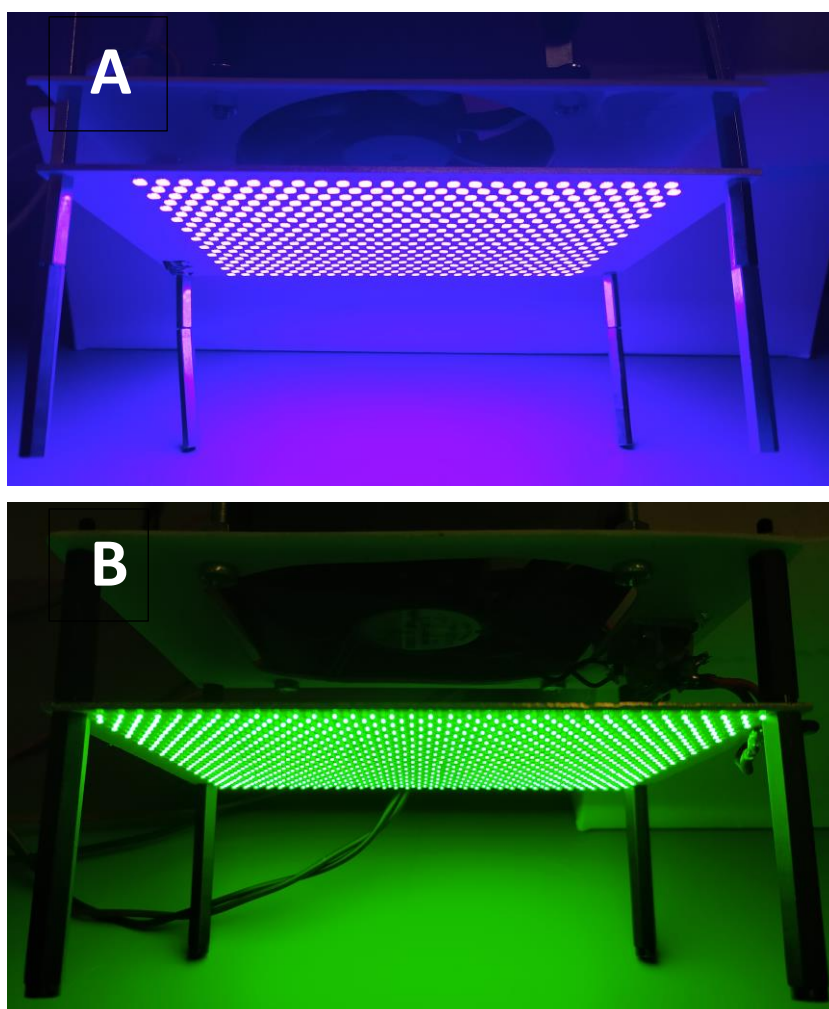
buněčná linie	fotosensitizér	1 J/cm <sup>2</sup>	5 J/cm <sup>2</sup>	10 J/cm <sup>2</sup>
		koncentrace [μM]	koncentrace [μM]	koncentrace [μM]
G361	TPPS <sub>4</sub>	4,239	1,209	0,667
G361	ZnTPPS <sub>4</sub>	2,467	0,617	0,253
G361	PdTPPS <sub>4</sub>	5,641	1,995	1,196
G361	MgTPPS <sub>4</sub>	4,122	1,021	0,257
NIH3T3	TPPS <sub>4</sub>	6,194	2,17	0,795
NIH3T3	ZnTPPS <sub>4</sub>	15,737	3,089	2,312
NIH3T3	PdTPPS <sub>4</sub>	8,236	2,797	2,047
NIH3T3	MgTPPS <sub>4</sub>	8,03	2,939	2,086

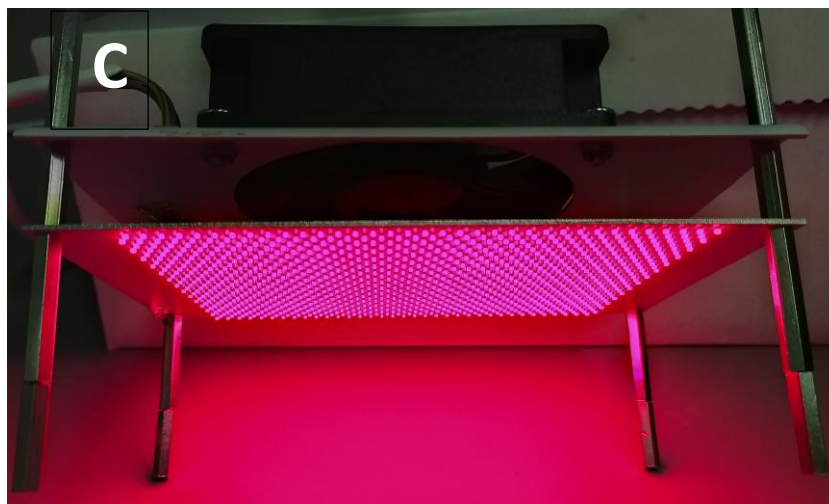
**Tab. 2: Rozsah koncentrační řady jednotlivých fotosensitizérů v závislosti na buněčné linii.**

	buněčná linie	fotosensitizér	koncentrace [μM]
xanthenová barviva	G361	Rose Bengal	0,5-5
	G361	erythrosin B	5-60
	NIH3T3	Rose Bengal	0,5-5
	NIH3T3	erythrosin B	30-90
fotosensitizér 3. generace	HeLa	TMPyP	3-25
	HeLa	GO/TMPyP	3-25

Po aplikaci fotosensitizéru v dané koncentraci byly buňky 24 hodin inkubovány v termoboxu při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>. Po této inkubaci následovalo ozáření buněk.

Při ozáření byl použit vhodný zářič (Obr. 20) a hodnota plošné hustoty světelné energie v závislosti na použité metodě a fotosensitizeru. Pro porfyrinové fotosensitizerů byly použity LED diody s vlnovou délkou 414 nm a hustotou výkonu 20 mW/cm<sup>2</sup>. Při ozáření fotosensitizerů Rose Bengal a erythrosin B byly použity LED diody s vyšší vlnovou délkou 525 nm a hustotou výkonu 14,7 mW/cm<sup>2</sup>. V případě kompozitu oxidu grafenu/TMPyP byly použity nejdříve LED diody s vlnovou délkou 740 nm o hustotě výkonu 33 mW/cm<sup>2</sup> a následně LED diody s vlnovou délkou 414 nm a hustotou výkonu 10 mW/cm<sup>2</sup>. Pro dosažení požadované hodnoty plošné hustoty světelné energie byly buňky vystaveny danému záření různou dobu (Tab. 3).





**Obr. 20:** Použité LED diodové zářiče s vlnovou délkou: **A** - 414 nm, **B** - 525 nm a **C** - 740 nm.

**Tab. 3:** Tabulka znázorňující čas potřebný pro dosažení požadované plošné hustoty světelné energie.

fotosensitizer	proud [A]	doba záření [s]	plošná hustota světelné energie [J/cm <sup>2</sup> ]
<b>TPPS<sub>4</sub></b>	0,18	50	1
<b>ZnTPPS<sub>4</sub></b>		250	5
<b>PdTPPS<sub>4</sub></b> <b>MgTPPS<sub>4</sub></b>		500	10
<b>Rose Bengal</b> <b>erythrosin B</b>	0,8	340	5
<b>oxid grafenu</b>	0,36 (740 nm)	900	30
+	0,7 (414 nm)	100	1
<b>TMPyP</b>			

Před samotným ozáření bylo DMEM médium vyměněno za 100  $\mu$ l PBS 1 $\times$  s 5 mM glukózou. Po ozáření bylo do mikrotitrační destičky na místo PBS 1 $\times$  opět přidáno 100  $\mu$ l DMEM média. Buňky byly poté inkubovány 24 hodin v termoboxu při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>. Výjimku představovaly buňky pro kinetické měření produkce

reaktivních forem kyslíku, kdy došlo k měření ihned po ozáření a nedošlo tudíž k žádné další inkubaci.

Je důležité také zmínit, že při předchozích pokusech bylo zjištěno, že neozářené porfyrinové fotosensitizery nemají žádnou toxicitu a samotné tedy nepůsobí destrukci buněk.

Při ozařování LED zdroj nevykazoval žádné výrazné tepelné ani jiné změny, které by mohly mít vliv na poškození buněk.

## 5.2 MTT TEST

Zásobní roztok MTT má koncentraci 10× a byl připraven rozpuštěním 20 mg Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromidu ve 4 ml PBS 1×. Následným desetinasobným zředěním pomocí PBS 1× vznikl výsledný MTT roztok, který byl přidán 24 hodin po terapii do každé jamky v objemu 50  $\mu$ l. Poté byla destička s buňkami inkubována 3 hodiny při 5 % CO<sub>2</sub> a 37 °C. U přeživších buněk poté došlo k přeměně ve vodě rozpustného 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromidu na nerozpustný formazan. Fialově zbarvené krystalky formazanu v jamkách byly následně rozpuštěny pomocí 100  $\mu$ l DMSO. Destička byla poté vložena do Synergy HT readeru a došlo ke změření absorbance při 570 a 690 nm.

Viabilita buněk byla poté vypočítána jako poměr buněk po PDT a kontroly vynásobený 100 %. Pomocí programu Phototox 2.0 byla výsledná data přepočítána na hodnoty IC50.

## 5.3 DETEKCE REAKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU

Možnost měřit reaktivní formy kyslíku je způsobena fluorescenční značkou CM-H<sub>2</sub>DCFDA, která se po vstupu do buňky přemění na nerozpustnou formu CM-H<sub>2</sub>DCF. Tato forma je poté schopna interagovat s reaktivními formami kyslíku, které vznikají vlivem záření během fotodynamické terapie. Tato interakce vede k přeměně CM-H<sub>2</sub>DCF na fluorescenční CM-DCF, kterou lze následně měřit pomocí fluorescenčního readeru.

Po uběhnutí 24 hodin od aplikace fotosensitizeru byly jamky řádně vypláchnuty pomocí PBS 1×. Následně bylo k buňkám přidáno 50  $\mu$ l DCF roztoku, který byl připraven smícháním 10  $\mu$ l 10  $\mu$ M DCF a 1 ml PBS 1×. Poté byly buňky s fluorescenční DCF značkou inkubovány 25 minut při 5 % CO<sub>2</sub> a 37 °C. Po skončení

inkubace byly buňky ozářeny vhodnou vlnovou délkou po daný čas, poté ihned vloženy do Synergy HT readeru a každou minutu podrobeny kinetickému měření po dobu 10 minut u xanthenových barviv a 30 minut v případě TMPyPu a GO/TMPyPu (excitační vlnová délka – 485 nm, emisní vlnová délka – 548 nm). Z výsledků kinetického měření byly vypočítány regresní koeficienty, které byly následně zpracovány do grafické podoby.

## 5.4 ZTRÁTA MITOCHONDRIÁLNÍHO MEMBRÁNOVÉHO POTENCIÁLU

Charakteristickým znakem rané fáze apoptózy je právě ztráta mitochondriálního membránového potenciálu. Tento fakt však neznamena, že v konečném důsledku dojde apoptóze. Raná fáze apoptózy je stav, který se může kdykoliv změnit a skončit nekrozou buňky. Zjištění, zda se buňky nachází či nenachází v rané fázi apoptózy, umožňuje také odhalit, zda daná látka poškozuje mitochondrie (způsobuje jejich dysfunkci) nebo působí úmrtí buňky jiným způsobem.

Pro detekci ztráty mitochondriálního membránového potenciálu se využívá fluorescenční sondy JC-1. V případě nepoškozených buněk se tato látka vlivem membránového potenciálu hromadí v mitochondriální matrix, kde vytváří dimery. Tyto dimery se jinak také označují jako J-agregáty, které se vyznačují červenou fluorescencí. Pokud však poškozená buňka ztratí svůj membránový potenciál, dojde k rozptýlení JC-1 do cytoplazmy, kde má svou monomerní formu, která vyzařuje zelenou fluorescencí. Díky tomu lze odlišit poškozené buňky v rané fázi apoptózy od zdravých a nepoškozených buněk.

Po PDT a následné inkubaci byly buňky promyty PBS 1×. Poté bylo do jamek přidáno 50 µl roztoku JC-1 (5 mg/ml v DMSO + 5 ml PBS 1×) a destička byla vložena na 20 minut do inkubátoru při 5 % CO<sub>2</sub> a 37 °C. Následně byly buňky dvakrát promyty pomocí PBS 1× a po vložení destičky do Synergy HT readeru se 100 µl PBS 1× byla změřena zelená fluorescence (excitační vlnová délka – 485 nm, emisní vlnová délka – 548 nm) a červená fluorescence (excitační vlnová délka – 520 nm, emisní vlnová délka – 590 nm).

Změna membránového potenciálu je určena poměrem zelené a červené fluorescence. Vyšší hodnota znamená více buněk s poškozenými mitochondriemi a více buněk v rané fázi apoptózy.

## 5.5 DETEKCE APOPTOTICKÝCH A NEKROTICKÝCH BUNĚK

K určení a rozlišení způsobu buněčné smrti slouží fluorescenční značky annexin a propidium jodid. Annexin je sonda, která se váže na fosfolipidy, jako je například fosfatidylserin, který v buňkách za normálních okolností tvoří vnitřní část lipidové dvojvrstvy. Pokud však u buňky propukne apoptóza, dochází k určitému přetvoření lipidové dvojvrstvy, během které se fosfatidylserin přesouvá do její vnější části a je tak přístupný pro fluorescenční annexinovou sondu, kterou je poté možno detekovat ve formě zelené fluorescence. Nekrotické buňky lze rozlišit pomocí propidium jodidu, který se váže na buněčnou DNA v jádře. K této vazbě však dochází pouze v případě, kdy nastane rozrušení buněčných membrán, které je typické pro nekrózu. Vazba této sondy s DNA je poté detekovatelná jako červená fluorescence.

Po uplynutí 24 hodin od ozáření bylo potřeba buňky propláchnout pomocí PBS 1×. Následně bylo k buňkám přidáno 50 µl roztoku, který se skládal z 1000 µl destilované vody, 100 µl 10× binding pufru, 10 µl propidium jodidu a 5 µl annexinu. Poté byly destičky s buňkami 10 minut inkubovány při 5 % CO<sub>2</sub> a 37 °C a následně analyzovány na fluorescenčním mikroskopu. Apoptotické a nekrotické buňky byly poté manuálně spočítány a převedeny na procenta.

## 5.6 KOMETOVÁ ANALÝZA

Kometová analýza je mikroeletroforetická metoda, která umožňuje určit míru fragmentace DNA. Pomocí toho pak lze sledovat, zda a do jaké míry daný fotosensitizer ve spojení s PDT poškozuje DNA buněk. Na základě výsledné míry fragmentace lze pak u jednotlivých fotosensitizerů určit, zda je jejich primárním cílem DNA, jejíž poškození poté vede k usmrcení buňky.

V rámci pokusů s porfyrinovými látkami byla v případě obou buněčných linií zvolena pro každý fotosensitizer koncentrace IC<sub>50</sub> s hodnotou plošné hustoty světelné energie 1 J/cm<sup>2</sup>, 5 J/cm<sup>2</sup> a 10 J/cm<sup>2</sup>.

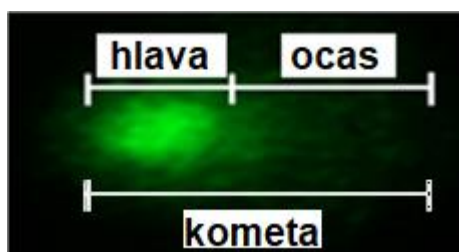
Důležitým bodem této metody je správná příprava podložních skel, na kterých bude probíhat elektroforéza. V první fázi je třeba řádně potáhnout celé sklo rovnoměrnou vrstvou horké 1% HMP agarózy v destilované vodě. Takto potažená skla se následně suší 30 minut při 60°C. Následně je třeba vytvořit na tomto skle políčko z 85 µl 1% HMP agarózy v PBS 1× a nechat cca 1 hodinu zatuhnout v lednici.



Buňky po PDT je potřeba řádně vypláchnout DMEM pomocí PBS 1×. Poté je k buňkám přidán trypsin, který zapříčiní jejich uvolnění od povrchu. Jakmile jsou všechny buňky uvolněny, je potřeba pomocí DMEM zastavit proces trypsinizace, aby nedošlo k jejich poškození. Obsah jamek je následně přepipetován do popsanych mikrozkuvek a centrifugován po dobu 2 minut při 1500 rpm, aby došlo k oddělení buněk, které vytvoří pelet, od zbytku kapalin. Z tohoto peletu se odeberou buňky v objemu 25  $\mu$ l a smíchají se s 85  $\mu$ l 1% LMP agarózy v PBS 1×, která je ohřátá na 37°C. Tato směs se poté napipetuje na připravené políčko s 1% HMP agarózou v PBS 1×, ihned se překryje krycím sklem a dá ztuhnout na 15 minut do lednice. Poté se skla vyskládají do kyvet, přidá se 100 ml lyzačního roztoku s 1 ml Tritonu X a nechají se 1 hodinu lyzovat.

Po lyzaci se skla vloží na 40 minut do elektroforetické vany s elektroforetickým roztokem, která musí být umístěna v lednici. Poté se nastaví a zapne elektroforéza na 20 V a 0,35 A po dobu 20 minut. Poté se skla přeskládají do kyvet, kde se promývají vychlazeným neutralizačním roztokem po dobu 2× 10 minut. Po promytí a uschnutí skel lze buňky nabarvit přidáním 20  $\mu$ l SYBR Green a vyhodnocovat pomocí fluorescenčního mikroskopu a programu Comet Score.

Díky elektroforéze dojde k oddělení fragmentované DNA od buňky za vzniku tzv. komety, která se skládá z „hlavy“ a „ocasů“ (Obr. 21).



**Obr. 21: Znárodnění komety vzniklé po elektroforéze v rámci kometové analýzy.**

## 5.7 URČENÍ FÁZE BUNĚČNÉHO CYKLU

Smyslem této metody bylo odhalit, zda má určitý fotosensitizer nebo plošná hustota světelné energie u G361 a NIH3T3 buněčných linií vliv na to, ve které fázi dojde k zastavení buněčného cyklu v porovnání s kontrolními buňkami.

V případě porfyrinových fotosensitizerů byla k jednotlivým buněčným liniím aplikována koncentrace IC<sub>50</sub>, která byla následně ozářena světlem s plošnou hustotou světelné energie 1 J/cm<sup>2</sup> a 5 J/cm<sup>2</sup>.

Pro správné měření k určení fáze buněčného cyklu je nezbytná složitá příprava a fixáž buněk. Po PDT jsou buňky promyty pomocí PBS 1×, aby došlo k odstranění zbytkového DMEM kvůli následnému přidání trypsinu, který uvolní přichycené buňky. Poté je třeba přidat DMEM pro zastavení trypsinizace. Uvolněné buňky jsou poté přeneseny do zkumavek a centrifugovány 5 minut při 1600 rpm. Supernatant je poté odstraněn, nahrazen PBS 1× a buňky jsou opět centrifugovány (5 minut, 1600 rpm). Poté, co dojde k odstranění supernatantu, je k buňkám na vortexu pomalu přikapáván ledový 70% ethanol. Takto zafixované buňky jsou poté centrifugovány (5 minut, 1600 rpm) a supernatant odstraněn. Ten je poté nahrazen roztokem PBS 1× a 1% FBS. Následuje další centrifugace (5 minut, 1600 rpm), odstranění supernatantu a přidání roztoku PBS 1× s Tritonem X-100, se kterým je potřeba buňky inkubovat 15 minut na ledu. Poté dojde opět k centrifugaci (5 minut, 1600 rpm), odstranění supernatantu a jeho nahrazení roztokem PBS 1× a 1% FBS. Po poslední centrifugaci (5 minut, 1600 rpm), odstranění supernatantu je k buňkám přidán propidium jodid a RNA-áza. Buňky musí být poté inkubovány ještě 30 minut ve tmě a při pokojové teplotě. Takto připravené buňky mohou být poté analyzovány pomocí průtokové cytometrie.

## 5.8 MĚŘENÍ YOUNGOVA MODULU PRUŽNOSTI

Pro měření Youngova modulu byl vybrán na základě výsledků předchozích pokusů fotosensitizer ZnTPPS<sub>4</sub>, který vykázal nejlepší vlastnosti. Celková hodnota plošné hustoty světelné energie byla v tomto případě 5 J/cm<sup>2</sup>. Jak kontrolní buňky, tak i buňky po terapii byly měřeny v DMEM médiu pomocí Bioscope Catalyst AFM systému nastaveného na Force Volume mód. Měření probíhalo v centrální části buněk a při pokojové teplotě. Analyzovaná oblast měla velikost 15×15 μm a skládala se z celkem 256×256 bodů. Vlastní měření probíhalo pomocí hrotu DNP-10 s rezonanční frekvencí v rozmezí 16-28 kHz a konstantou pružnosti 0,12 N/m.

V případě G361 buněčné linie bylo analyzováno 20 kontrolních buněk a 30 buněk po terapii. U NIH3T3 buněčné linie se jednalo o 26 kontrolních buněk a 18 buněk po fotodynamické terapii.

## 5.9 SPEKTROSKOPICKÉ URČENÍ ABSORPČNÍHO MAXIMA

Ke zjištění absorpčního maxima fotosensitizeru TMPyP a nanokompozitu GO/TMPyP byl použit fluorescenční spektrometr s R928P fotonásobičem a 450 W xenonovou lampou.

## 5.10 KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIE

Pomocí fluorescenčního konfokálního mikroskopu bylo detekováno, v jakých částech buňky dochází k akumulaci fotosensitizerů erythrosin B, Rose Bengal, TMPyP a kompozitu GO/TMPyP.

U xanthenových barviv byly buněčné linie G361 a NIH3T3 inkubovány 24 h při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub> v 35mm Petriho misce s vloženým krycím sklem. Poté bylo k buňkám přidáno 40 µl 1mM roztoku sensitizéru a následovala 24h inkubace za stejných podmínek. Po inkubaci, byly buňky 3x promyty PBS 1x. Následovala inkubace 15 minut s fluorescenční sondou Hoechst (excitační vlnová délka: 402 nm, emisní vlnová délka: 560 nm) ve tmě. Buňky byly opět 3x promyty PBS 1x a poté zafixovány ledovým roztokem metanol:aceton 1:1. Po 10 minutách fixace bylo krycí sklíčko vyjmuto a přiklopeno na podložní sklo. Při měření byl využit vodní objektiv se zvětšením 40x. Pro detekci xanthenových barviv byla nastavena excitační vlnová délka 450 nm a emisní vlnová délka 595 nm.

V případě TMPyPu a kompozitu GO/TMPyP došlo po 10 minutách fixace roztokem metanol:aceton 1:1 k promytí PBS 1x. Měření probíhalo po 60 minutách, 120 minutách a po 24 hodinách při koncentraci 25 µM. Excitační vlnová délka byla nastavena na 561 nm a 405 nm. Emise byla snížena použitím 404 nm, 465 nm a 617 nm filtrů.

## 5.11 STATISTICKÁ ANALÝZA

Naměřené výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí softwarového programu IBM SPSS Statistics Verze 22 a Statistica v. 13. Každý soubor dat z měření se skládá z tripletů a třech nezávislých opakování, tedy celkem z 9 hodnot. K porovnání naměřených hodnot s kontrolou u MTT bez ozáření byla použita ANOVA s Dunnett post-hoc testem. Pro vyhodnocení IC<sub>50</sub>, ROS, mitochondriálního membránového potenciálu a Youngova modulu byla použita ANOVA s Bonferroniho post hoc testem. Pro test na rozlišení apoptotických a nekrotických buněk byl použit

chi-kvadrát test a Bonferroniho korekce. Výsledky kometové analýzy byly porovnány s využitím Kruskal-Wallis testu a Mann-Whitney U-testu s Bonferroniho korekcí.

## 6 VÝSLEDKY

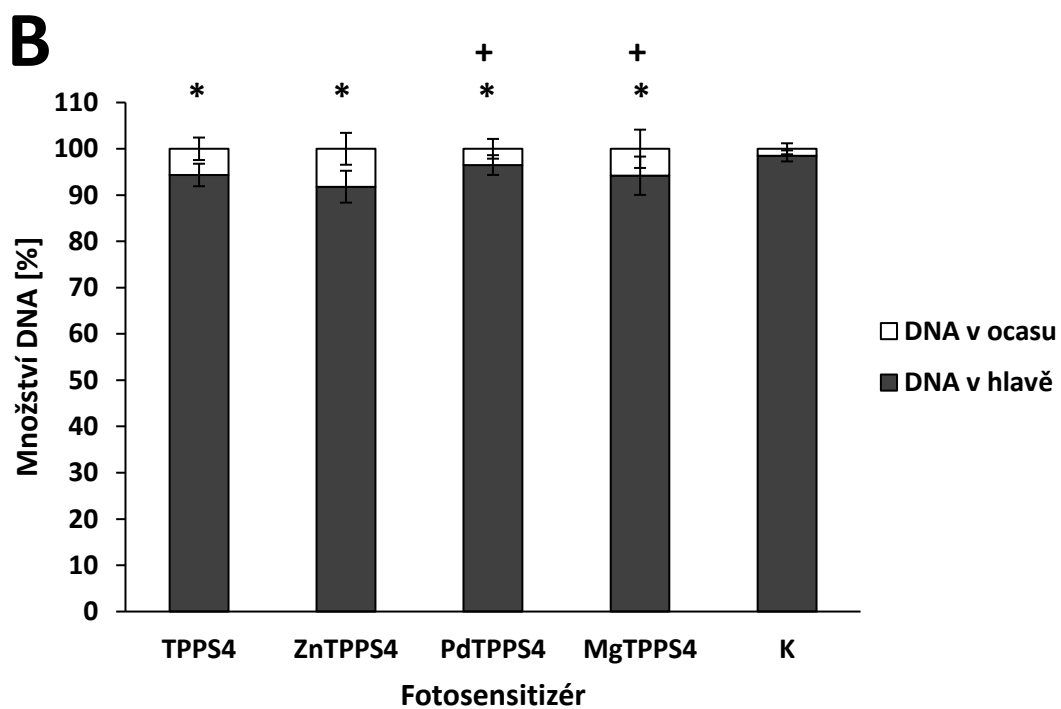
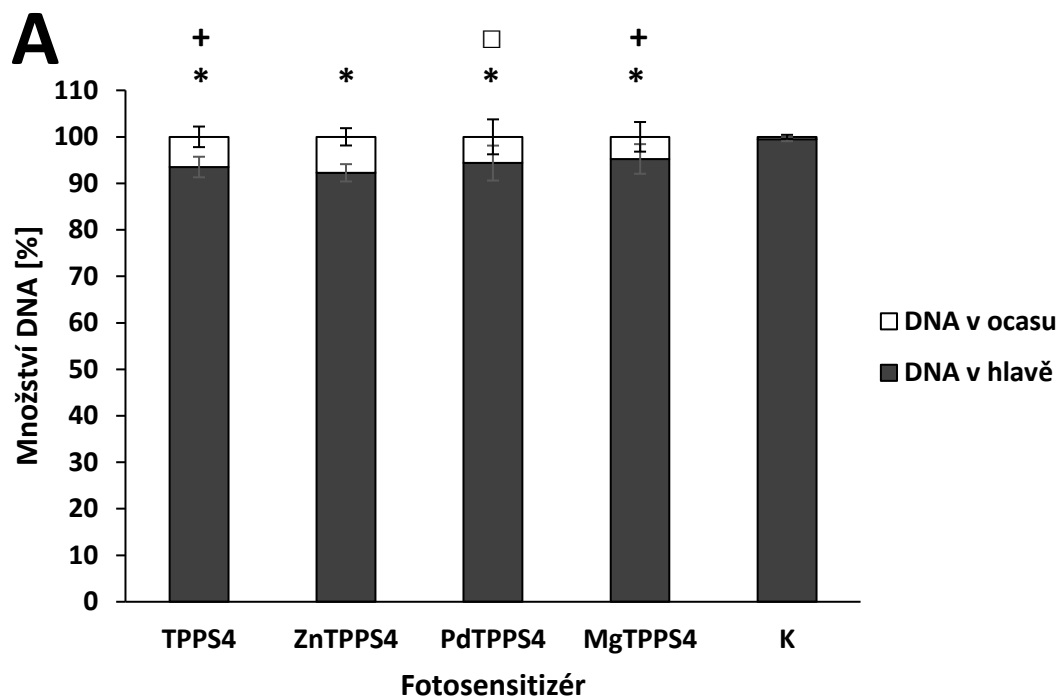
### 6.1 PORFYRINOVÉ FOTOSENSITIZÉRY

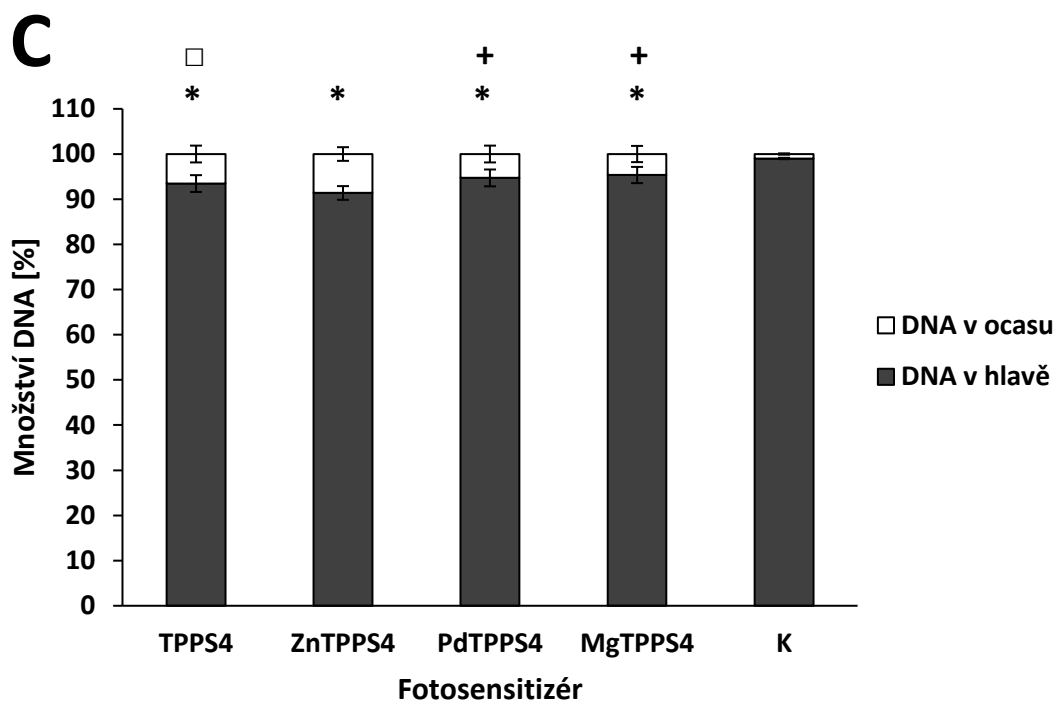
V návaznosti na měření provedené v rámci diplomové práce, byla u porfyrinových fotosensitizérů provedena kometová analýza, určení buněčného cyklu a měření Youngova modulu.

#### 6.1.1 KOMETOVÁ ANALÝZA

Výsledné grafy kometové analýzy pro G361 (Obr. 22) a NIH3T3 (Obr. 23) buněčné linie ukazují poměr mezi množstvím DNA v hlavě a v ocasu komety. Hlava komety představuje nefragmentovanou DNA, která zůstala v buňce, zatímco v ocasu komety se nachází DNA, u které vlivem fotodynamické terapie došlo k fragmentaci, a která se vlivem elektroforetické separace rozdělila podle velikosti jednotlivých fragmentů.

Porovnáním výsledků obou buněčných linií je patrná větší fragmentace DNA u G361 buněčné linie. Tento rozdíl byl viditelný v případě každého použitého fotosensitizéru a aplikované plošné hustoty světelné energie. Je však třeba konstatovat, že tento rozdíl byl velice malý a pohyboval se v jednotkách procent. Jelikož ve všech případech (buněčná linie, použitý fotosensitizér, plošná hustota světelné energie) bylo množství DNA v hlavě komety vždy přes 90 %, lze usoudit, že žádný z porfyrinových fotosensitizérů primárně nezpůsobuje fragmentaci DNA a k usmrcení buněk tedy dochází jiným způsobem.





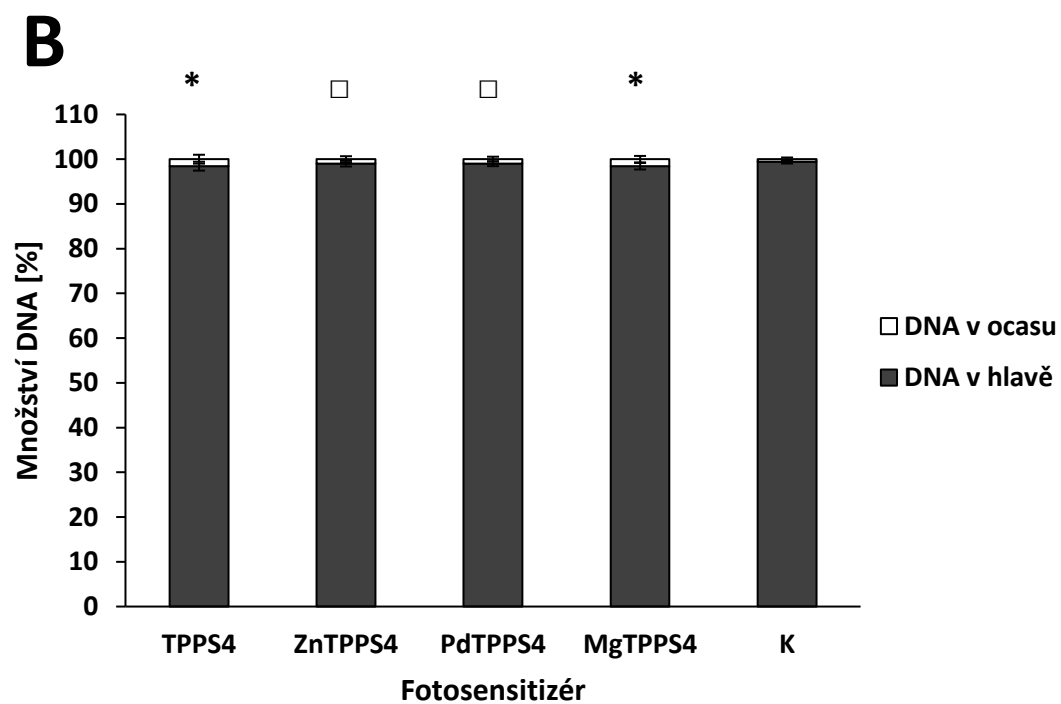
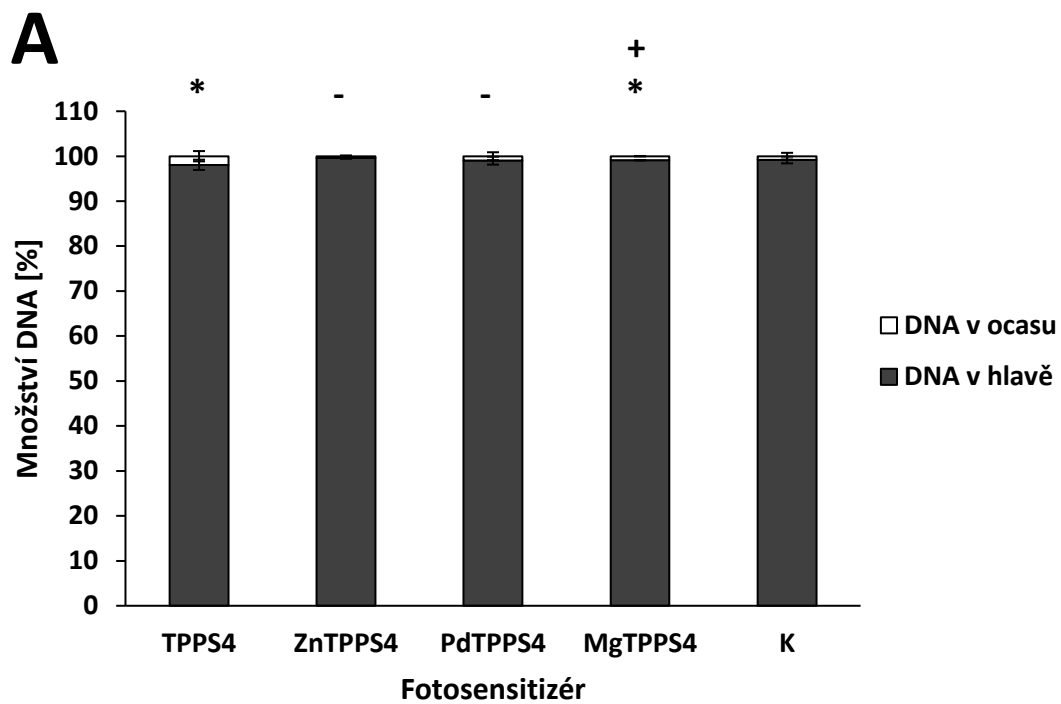
**Obr. 22: Množství DNA v hlavě a ocasu komety určené pomocí kometové analýzy u G361 buněčné linie při použití koncentrace IC<sub>50</sub> fotosensitizerů TPPS<sub>4</sub>, ZnTPPS<sub>4</sub>, PdTPPS<sub>4</sub> a MgTPPS<sub>4</sub>. A – 1 J/cm<sup>2</sup>, B – 5 J/cm<sup>2</sup>, C – 10 J/cm<sup>2</sup>.**

*Kontrola (K): ozářená, bez fotosensitizeru*

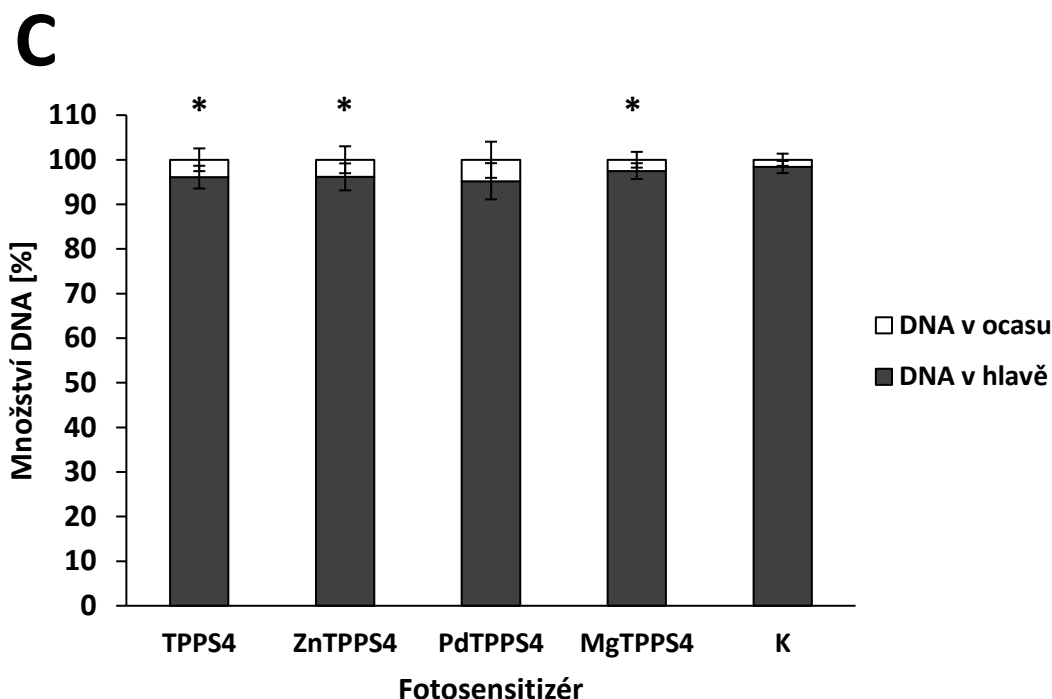
*\*:  $P < 0,05$  - statisticky rozdílné v porovnání s kontrolou (K)*

*+:  $P < 0,05$  - statisticky rozdílné v porovnání s ZnTPPS<sub>4</sub>*

*□:  $P < 0,05$  - statisticky rozdílné v porovnání s MgTPPS<sub>4</sub>*







**Obr. 23: Množství DNA v hlavě a ocasu komety určené pomocí kometové analýzy u NIH3T3 buněčné linie při použití koncentrace IC50 fotosenzitizérů TPPS<sub>4</sub>, ZnTPPS<sub>4</sub>, PdTPPS<sub>4</sub> a MgTPPS<sub>4</sub>. A – 1 J/cm<sup>2</sup>, B – 5 J/cm<sup>2</sup>, C – 10 J/cm<sup>2</sup>.**

Kontrola (K): ozářená, bez fotosenzitizéru

\*:  $p < 0,05$  - statisticky rozdílné v porovnání s kontrolou (K)

-:  $p < 0,05$  - statisticky rozdílné v porovnání s TPPS<sub>4</sub>

+:  $p < 0,05$  - statisticky rozdílné v porovnání s ZnTPPS<sub>4</sub>

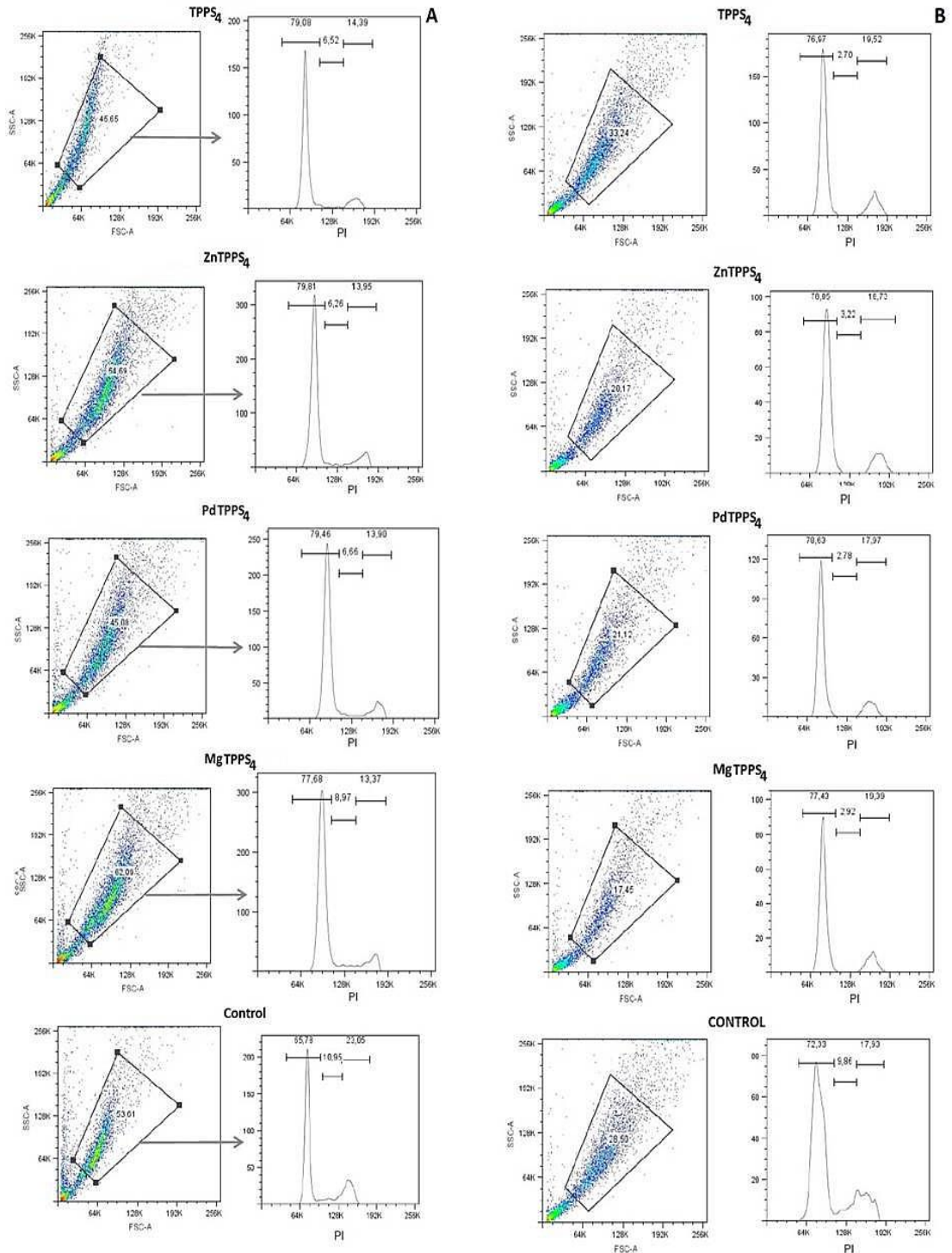
□:  $p < 0,05$  - statisticky rozdílné v porovnání s MgTPPS<sub>4</sub>

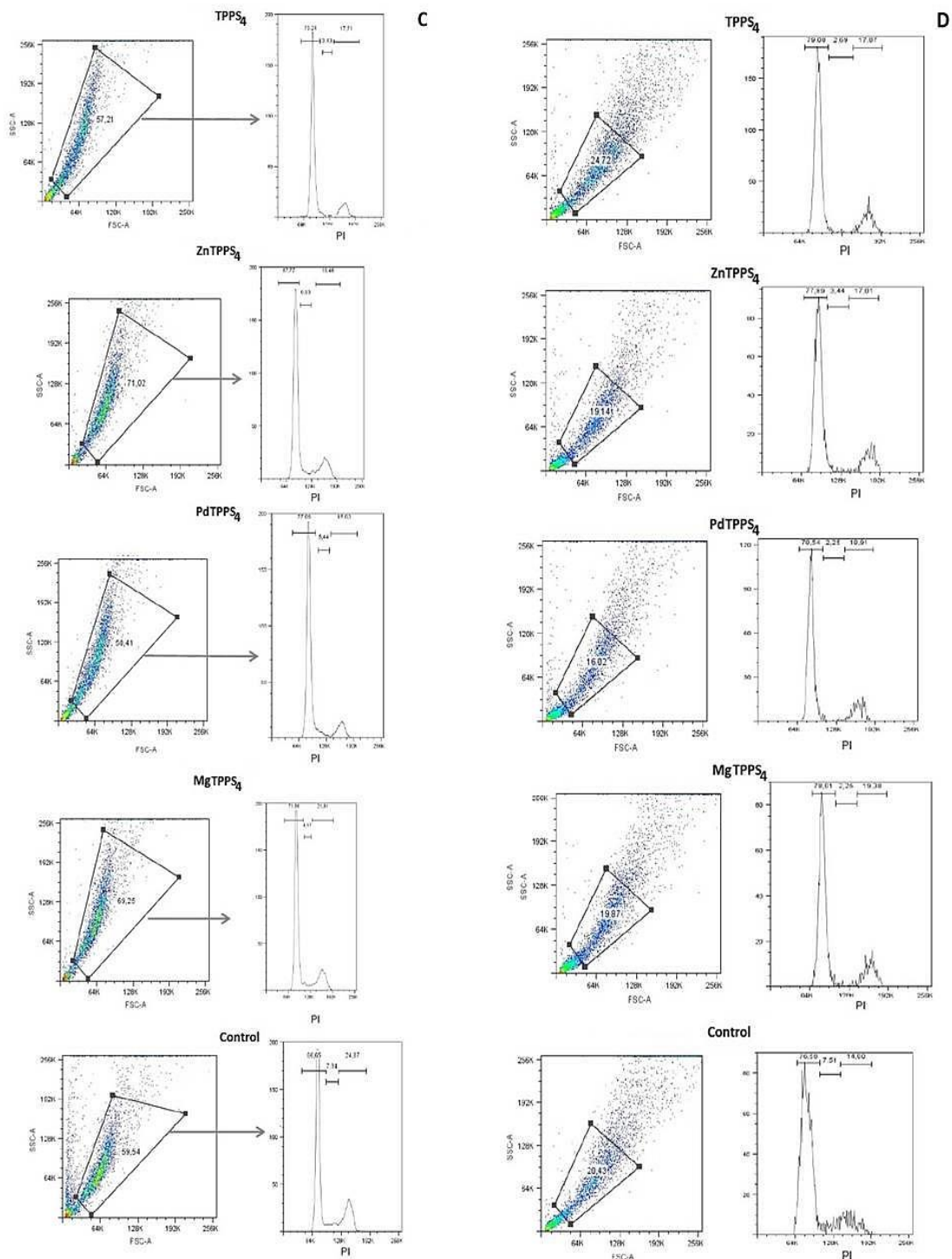
### 6.1.2 URČENÍ FÁZE BUNĚČNÉHO CYKLU

Působení vnějších vlivů na buňku může způsobit poškození určitých částí buňky (včetně regulačních proteinů), které zapříčiní zastavení buněčného cyklu v některém z kontrolních bodů. Ke zjištění jednotlivých fází byla použita průtoková cytometrie, jejíž výsledkem byly FACS histogramy (Fluorescent Activated Cell Sorting) (Obr. 24).

Smyslem bylo zjistit, zda za určitých podmínek fotodynamické terapie nedochází k selektivnímu zastavení v konkrétní fázi buněčného cyklu, a poté dále analyzovat konkrétní pochody v buňce, které k tomu vlivem PDT vedly. Výsledné grafy (Obr. 25 a Obr. 26), vytvořené na základě FACS histogramů, však bohužel

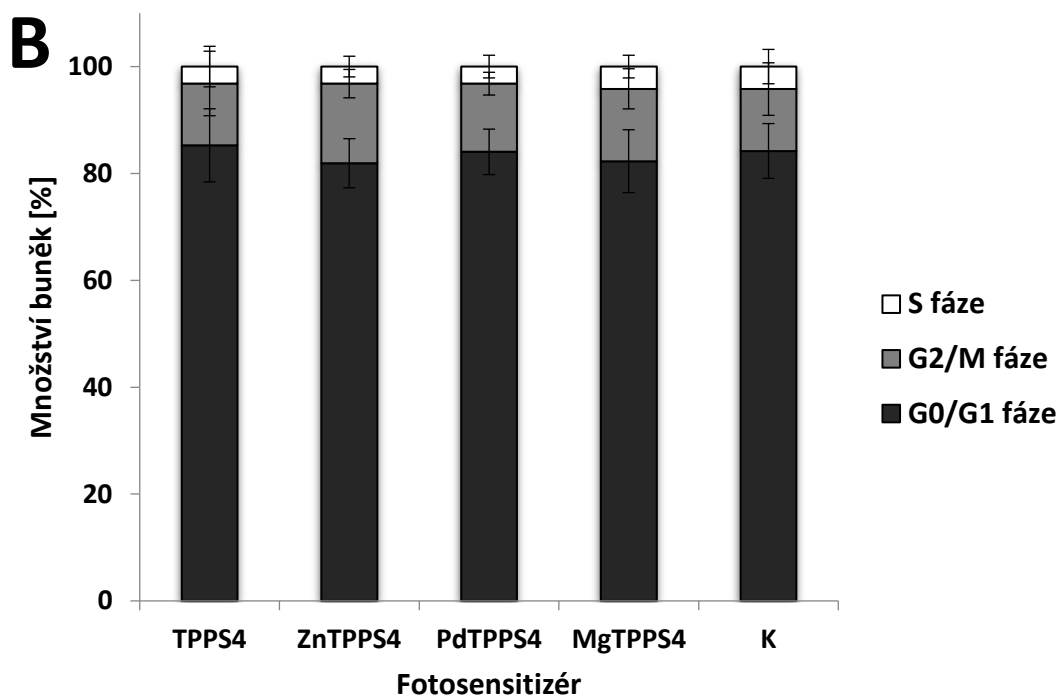
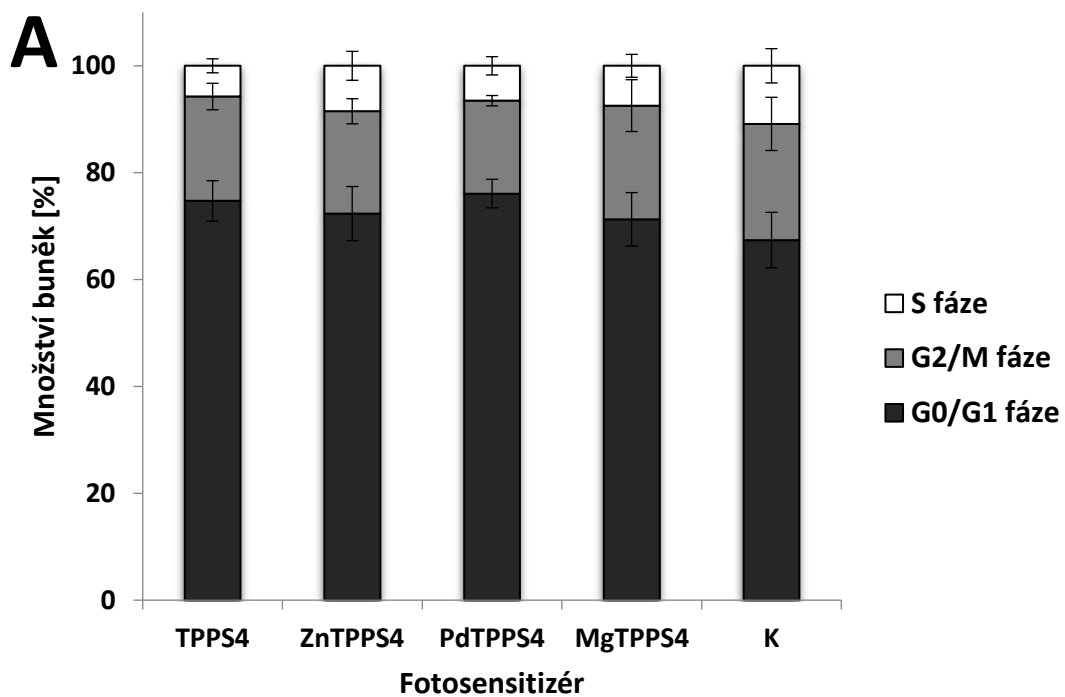
neprokázaly statisticky významné změny v jednotlivých fázích buněčného cyklu jak při porovnání s kontrolními buňkami. Výrazný rozdíl nebyl ani mezi jednotlivými fotosensitizéry, různými hodnotami plošné hustoty světelné energie nebo mezi oběma liniemi.





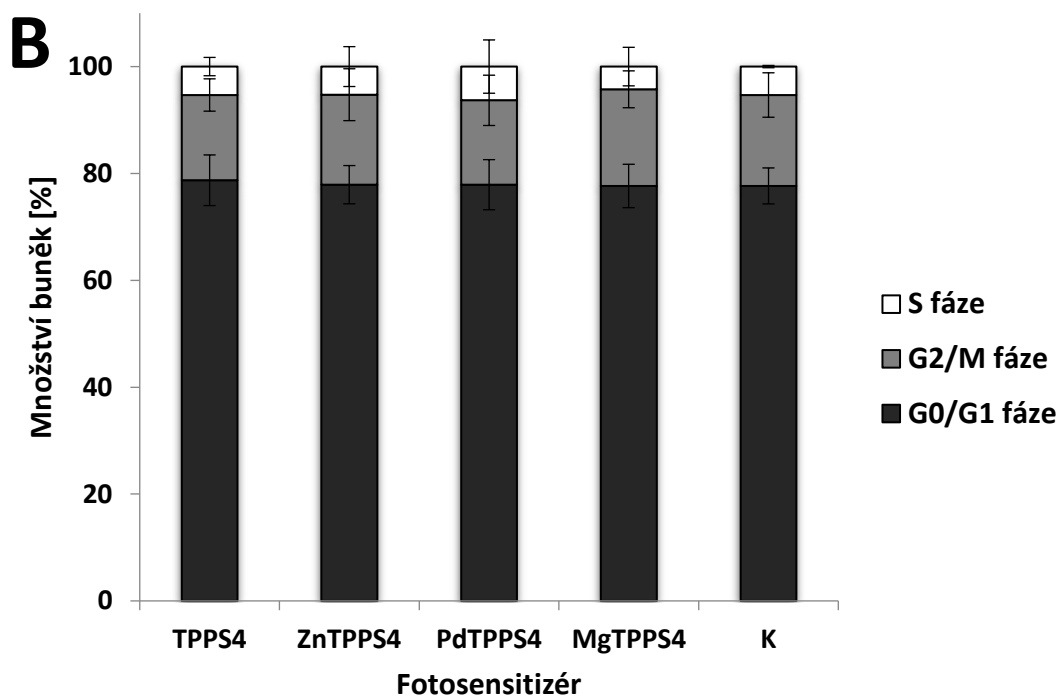
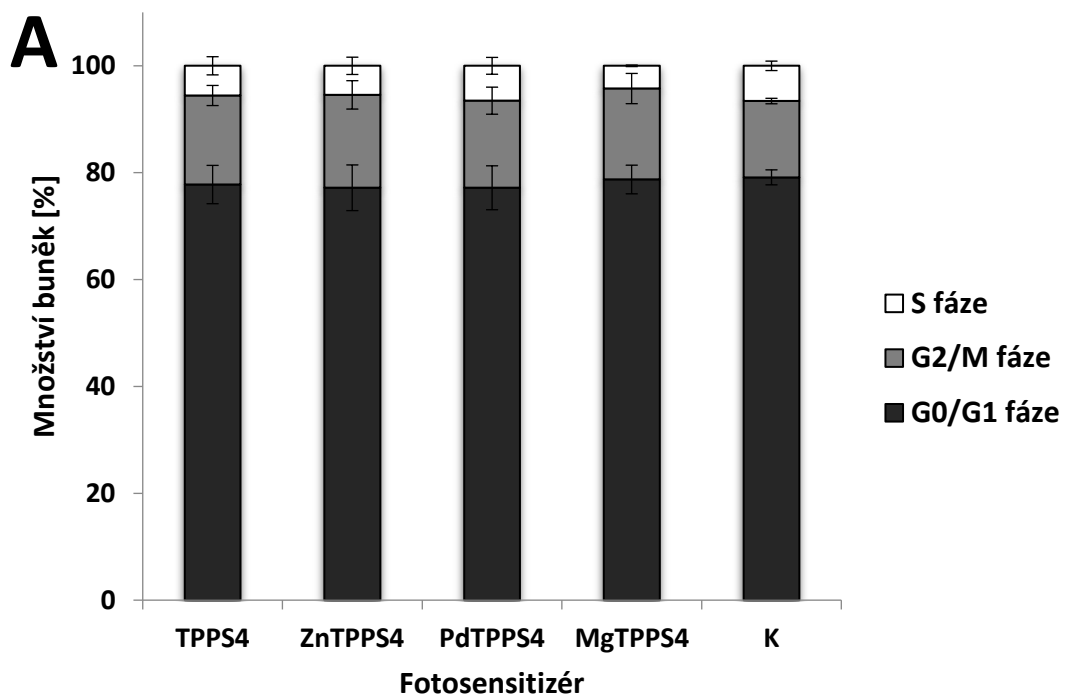
**Obr. 24: Výsledné FACS histogramey reprezentativních vzorků z průtokové cytometrie analyzující jednotlivé fáze buněčného cyklu při koncentraci IC<sub>50</sub>. A – G361 buněčná linie při 1 J/cm<sup>2</sup>, B – NIH3T3 buněčná linie při 1 J/cm<sup>2</sup>, C – G361 buněčná linie při 5 J/cm<sup>2</sup>, D – NIH3T3 buněčná linie při 5 J/cm<sup>2</sup>.**

*Kontrola (Control): ozářená, bez fotosenzitizéru*



**Obr. 25:** Grafy vyjadřující množství buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu analyzované pomocí průtokové flowcytometrie v koncentraci IC50 u G361 buněčné linie. **A** – 1 J/cm<sup>2</sup>, **B** – 5 J/cm<sup>2</sup>.

*Kontrola (K): ozářená, bez fotosensitizeru*



**Obr. 26:** Grafy vyjadřující množství buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu analyzované pomocí průtokové cytometrie v koncentraci IC50 u NIH3T3 buněčné linie. **A** – 1 J/cm<sup>2</sup>, **B** – 5 J/cm<sup>2</sup>.

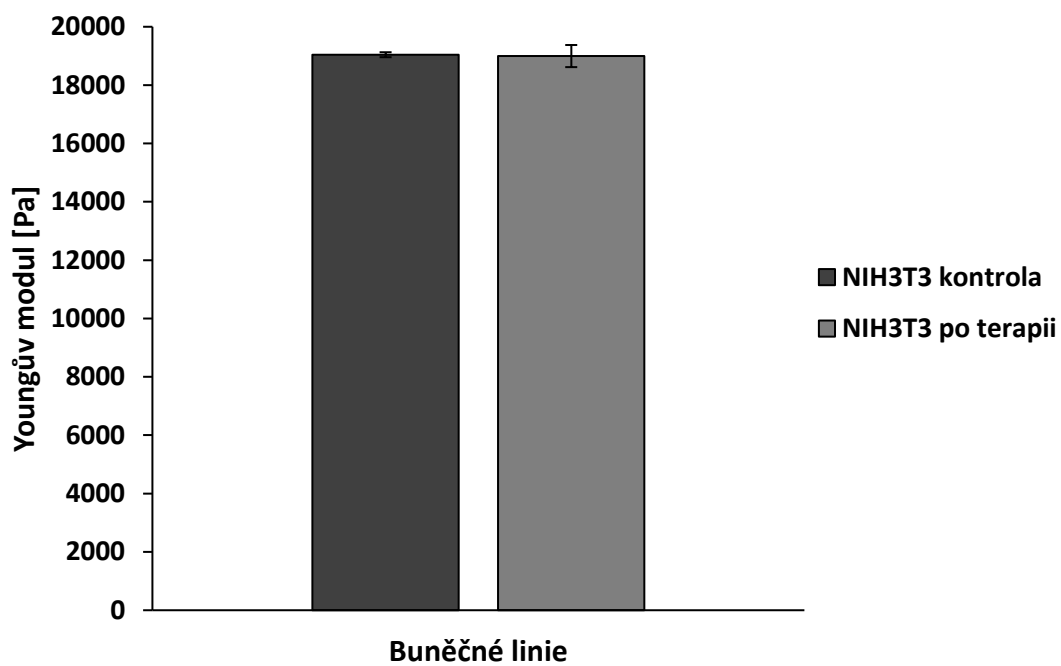
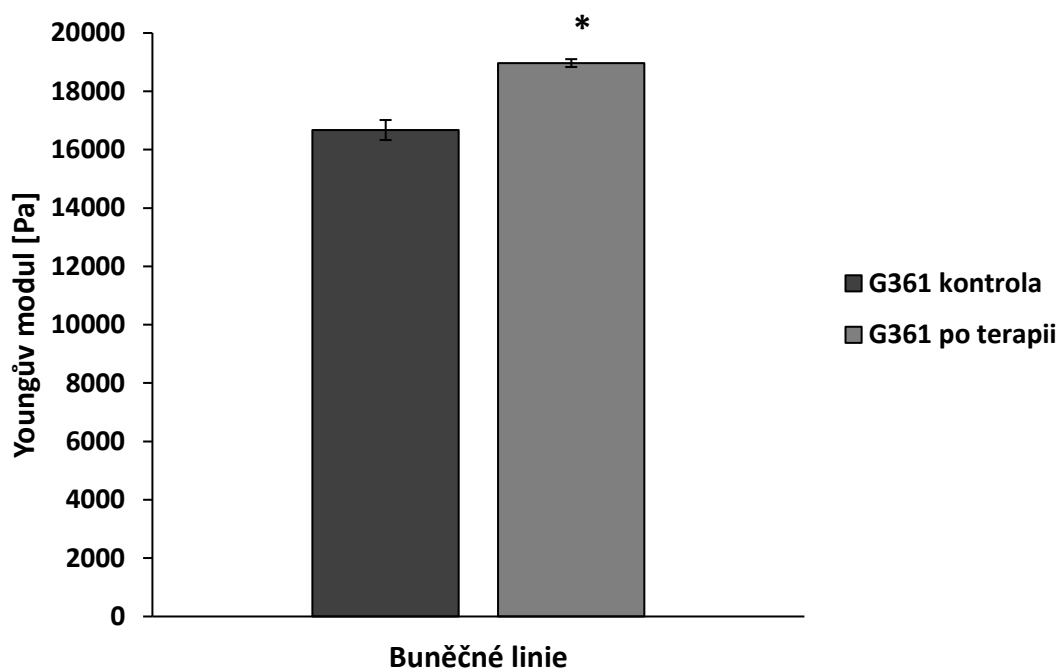
*Kontrola (K): ozářená, bez fotosensitizeru*

### 6.1.3 MĚŘENÍ YOUNGOVA MODULU PRUŽNOSTI

Cílem této metody bylo zjistit, zda a případně i do jaké míry, způsobuje fotodynamická terapie změny v cytoskeletu buněk. Této analýzy lze dosáhnout pomocí mikroskopu atomárních sil, který je mimo jiné schopný měřit elastickou deformaci (tuhost objektu), která je vyjádřena Youngovým modulem. Ten vyjadřuje schopnost materiálu odolávat dané deformaci. Cytoskeletální mikrofilamenta, která se nachází přímo pod cytoplazmatickou membránou, jsou velice pružná a díky tomu se i mimo jiné podílí na pružnosti (tuhosti) membrán. Z toho lze usoudit, že pokud dojde vlivem PDT k poškození těchto cytoskeletálních proteinových vláken, změní se i pružnost membrány. Čím vyšší je hodnota Youngova modulu v daném srovnání, tím k většímu poškození cytoskeletu došlo.

Pro měření byl vybrán na základě hodnoty IC50 ten nejúčinnější fotosensitizer - ZnTPPS<sub>4</sub>, který byl přidán ke G361 a NIH3T3 buněčné linii v koncentraci IC50 a aktivován byl pouze jedním zářením s plošnou hustotou světelné energie o velikosti 5 J/cm<sup>2</sup>.

Výsledné hodnoty Youngova modulu (Obr. 27) získané pomocí AFM ukazují, že pouze u nádorové buněčné linie G361 došlo k signifikantním rozdílům v pružnosti membrány. Statisticky vyšší hodnota Youngova modulu u G361 buněk po fotodynamické terapii v porovnání s kontrolními buňkami naznačuje, že došlo k poškození cytoskeletálních aktinových filament, což zapříčinilo snížení pružnosti buněčné membrány. V případě nenádorové NIH3T3 buněčné linie nebyly zaznamenány výraznější změny buněčné membrány.



**Obr. 27: Výsledný graf Youngova modulu srovnávající kontrolní buňky G361 a NIH3T3 buněčné linie s buňkami po fotodynamické terapii.**

*Kontrola: ozářená, bez fotosenzitizéru.*

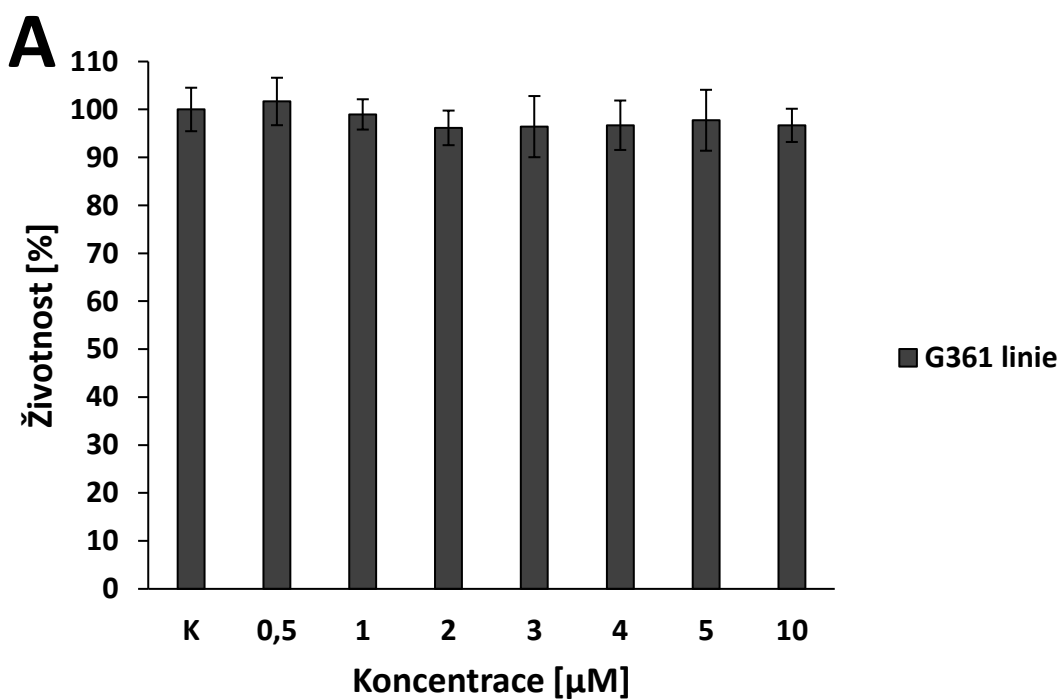
\*:  $p < 0,05$  - statisticky rozdílné v porovnání s kontrolou (K)

## 6.2 XANTHENOVÁ BARVIVA

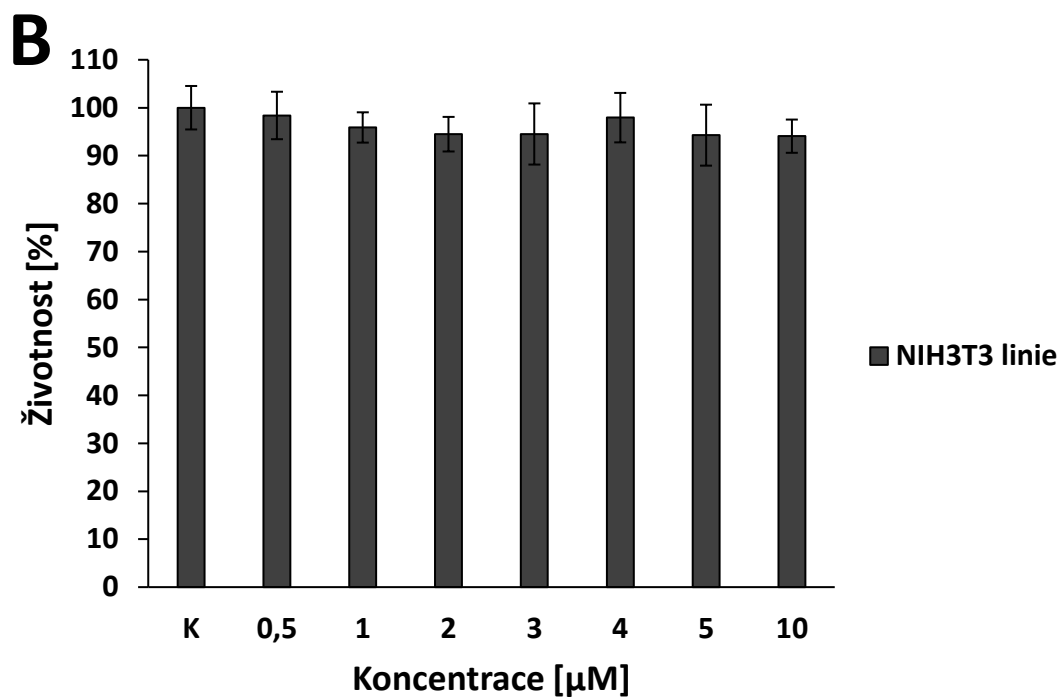
### 6.2.1 MTT TEST

Jelikož v případě xanthenových barviv nebyl známý jejich vliv na buňky, bylo potřeba provést nejdříve MTT test samotných látek Rose Bengal a erythrosin B ve tmě, aby se zjistilo, zda nejsou samy o sobě tyto látky cytotoxické. Kontrola představuje neozářené buňky bez přítomnosti fotosensitizeru a její hodnota byla nastavena jako 100 %.

Výsledky MTT testu pro Rose Bengal (Obr. 28) a erythrosinu B (Obr. 29) prokázaly, že nedošlo ke statisticky významnému poklesu životnosti u žádné z G361 a NIH3T3 buněčných linií v porovnání s kontrolními buňkami bez těchto fotosensitizerů.

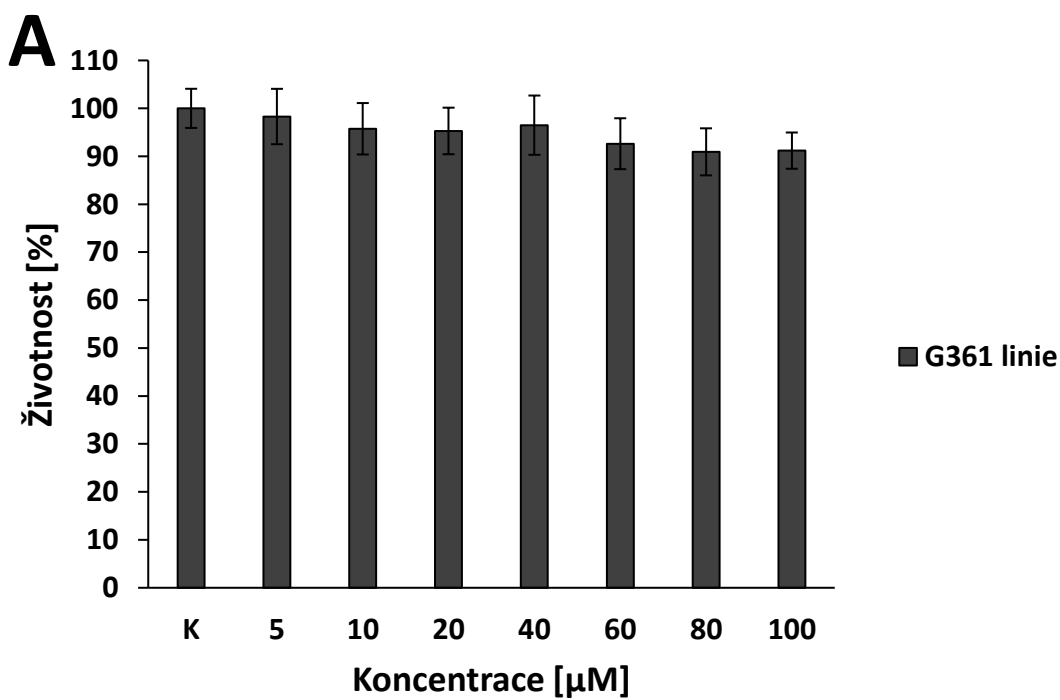


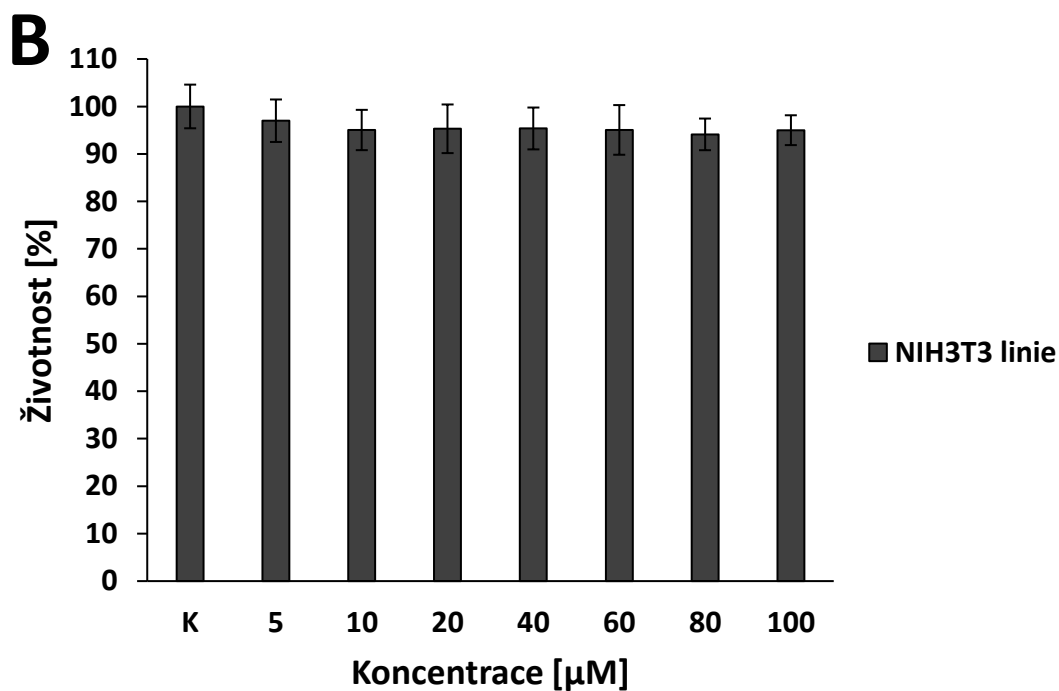




**Obr. 28: MTT test po aplikaci fotosenzitizéru Rose Bengal a bez následného ozáření. A – G361 buněčná linie, B – NIH3T3 buněčná linie.**

*Kontrola (K): neozářená, bez fotosenzitizéru*

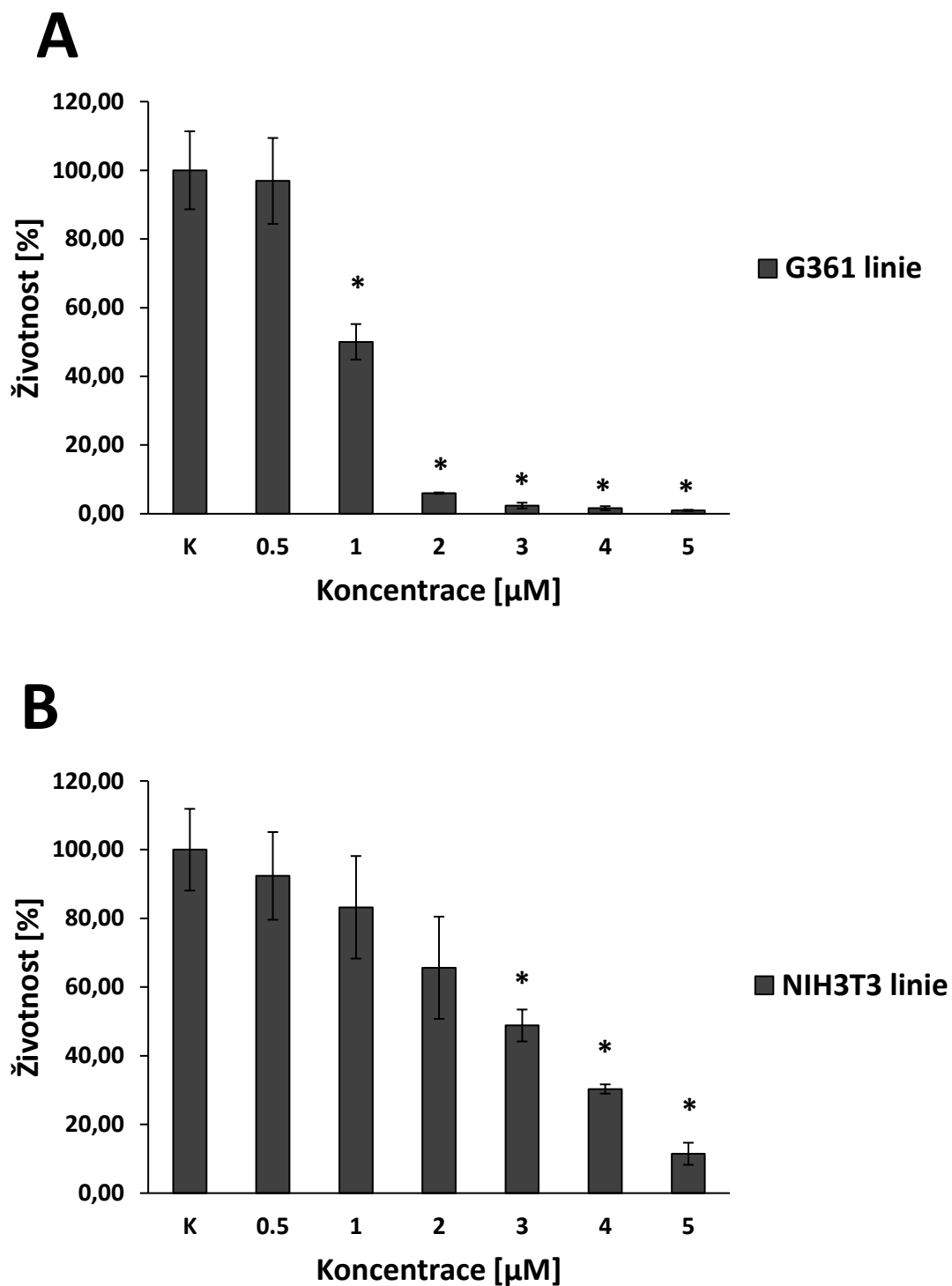




**Obr. 29: MTT test po aplikaci fotosensitizeru erythrosin B a bez následného ozáření. A – G361 buněčná linie, B – NIH3T3 buněčná linie.**

*Kontrola (K): neozářená, bez fotosensitizeru*

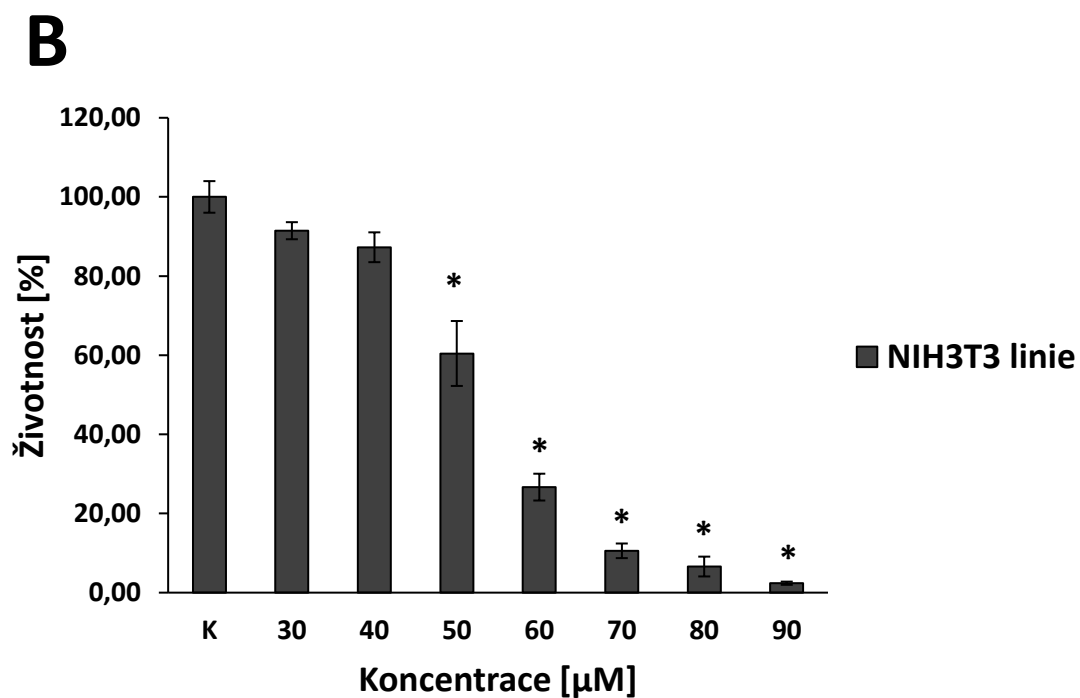
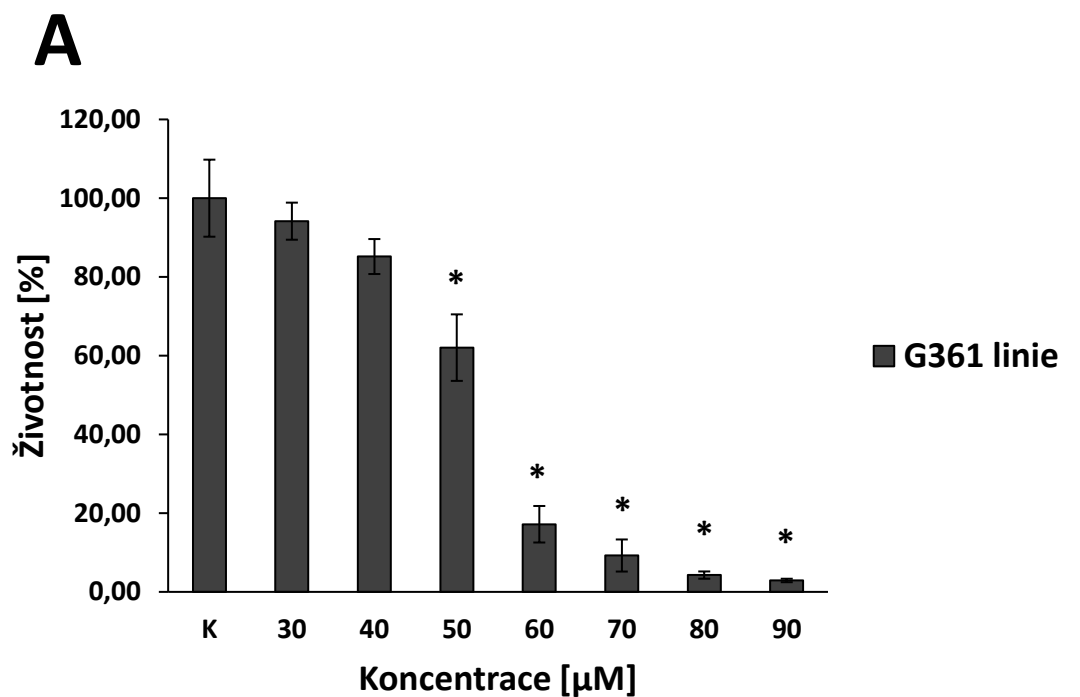
Další část experimentu zahrnovala zjištění fototoxicity obou fotosensitizerů u G361 a NIH3T3 buněčné linie po fotodynamické terapii při plošné hustotě světelné energie  $5 \text{ J/cm}^2$ . Z výsledných grafů pro Rose Bengal (Obr. 30) a erythrosin B (Obr. 31) je jasně patrná koncentrační závislost fotosensitizerů u obou buněčných linií, kdy s rostoucí koncentrací roste i fototoxicita a klesá životnost buněk.



**Obr. 30: MTT test fototoxicity fotosensitizeru Rose Bengal a jeho vliv na životnost G361 a NIH3T3 buněčné linie při plošné hustotě světelné energie 5 J/cm<sup>2</sup>. A - G361 buněčná linie, B – NIH3T3 buněčná linie.**

*Kontrola (K): ozářená, bez fotosensitizeru*

*\*:  $p < 0,014$  - statisticky rozdílné v porovnání s kontrolou (K)*



Obr. 31: MTT test fototoxicity fotosenzitizéru erythrosin B a jeho vliv na životnost G361 a NIH3T3 buněčné linie při plošné hustotě světelné energie 5 J/cm<sup>2</sup>.

Kontrola (K): ozářená, bez fotosenzitizéru

\*:  $p < 0,01$  - statisticky rozdílné v porovnání s kontrolou (K)

Výsledky MTT testu byly poté vloženy do programu Phototox Verze 2.0, který na jejich základě vypočítal hodnoty IC50 (Tab. 4) pro oba fotosensitizéry u obou buněčných linií.

**Tab. 4: Hodnoty IC50 pro Rose Bengal a erythrosin B u G361 a NIH3T3 buněčných linií.**

fotosensitizér	Rose Bengal		erythrosin B	
	G361	NIH3T3	G361	NIH3T3
IC50 [ $\mu\text{M}$ ]	* 1,01±0.03	* 2,90±0.15	+ 22,37±0.39	+ 53,92±0.66

Poznámka: IC50 byly zjištěny pomocí programu Phototox verze 2.0.

\*:  $p < 0,0001$  - hodnoty pro obě linie jsou vzájemně statisticky rozdílné

+:  $p < 0,0001$  - hodnoty pro obě linie jsou vzájemně statisticky rozdílné

Porovnáním obou linií pro Rose Bengal a erythrosin B je patrné, že koncentrace IC50 je pro každý fotosensitizér vždy minimálně 2× nižší u nádorové G361 buněčné linie. Tento fakt může naznačovat vyšší účinnost a větší akumulaci v nádorové G361 linii než v nenádorové NIH3T3 linii. Při vzájemném srovnání obou fotosensitizérů je viditelný rozdíl v koncentracích IC50. Hodnoty pro Rose Bengal jsou více jak 20× nižší než v případě erythrosinu B u každé buněčné linie. Nižší účinná koncentrace fotosensitizéru je velice žádoucí, jelikož tak snižuje pravděpodobnost některých nežádoucích účinků, jako je například fotosensitivita kůže.

Aby další experimenty mohly zahrnovat zjištěnou koncentraci IC50, bylo potřeba vytvořit novou koncentrační řadu. Ta byla odvozena z IC50 vždy jako její polovina a dvojnásobek (Tab. 5).

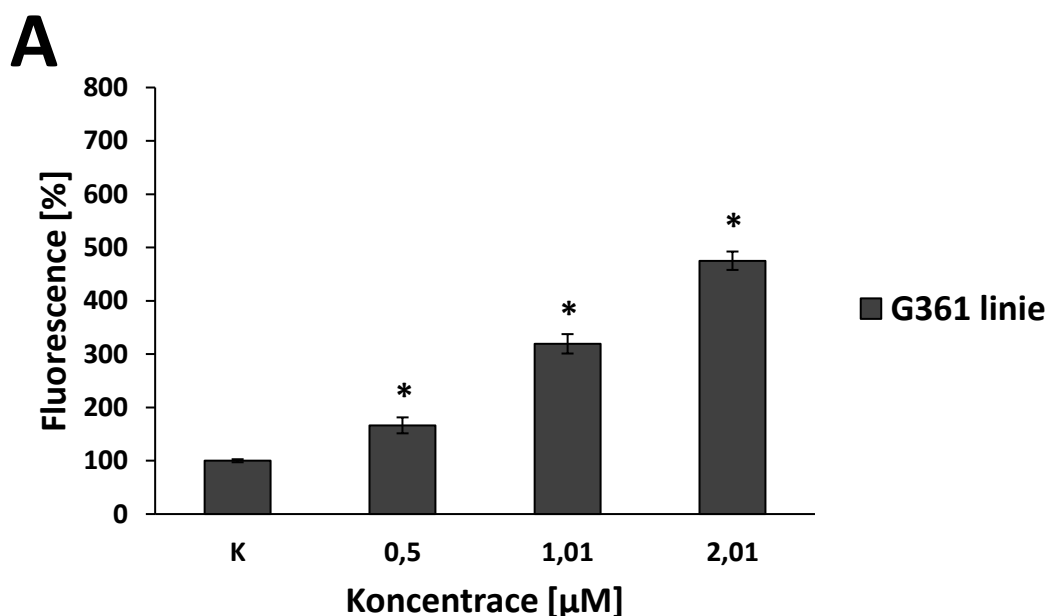
**Tab. 5: Hodnoty  $1/2$  IC50 a  $2\times$  IC50 odvozené z IC50 pro Rose Bengal a erythrosin B u G361 a NIH3T3 buněčných linií.**

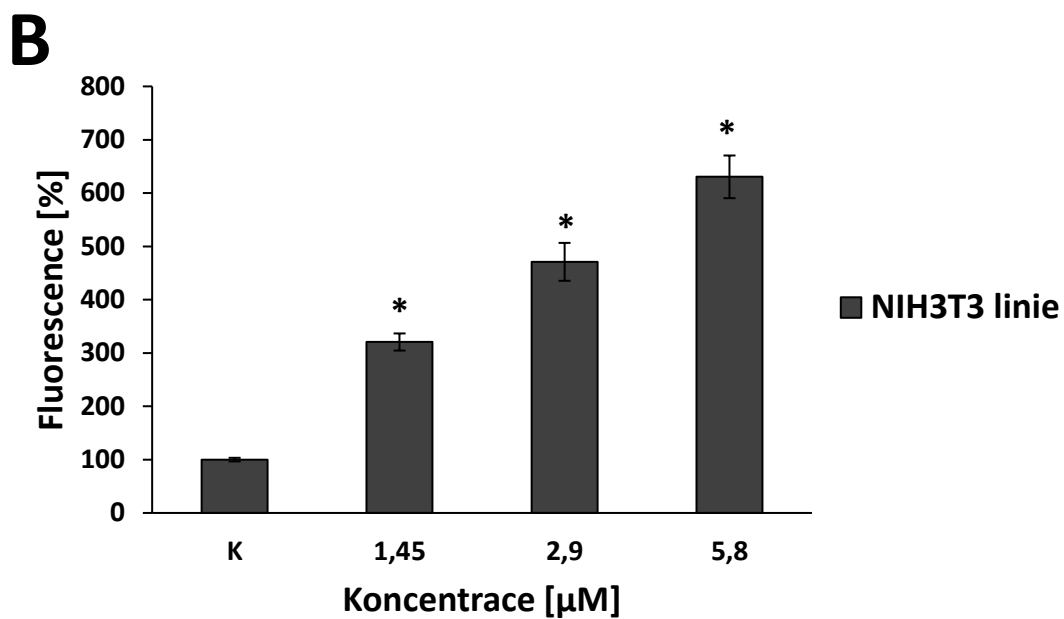
fotosensitizér	buněčná linie	$1/2$ IC50 [ $\mu\text{M}$ ]	IC50 [ $\mu\text{M}$ ]	$2\times$ IC50 [ $\mu\text{M}$ ]
Rose Bengal	G361	0,50	1,01±0.03	2,01
	NIH3T3	1,45	2,90±0.15	5,80
erythrosin B	G361	11,19	22,37±0.39	44,75
	NIH3T3	26,96	53,92±0.66	107,85

## 6.2.2 DETEKCE REAKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU

Výsledné grafy byly vytvořeny na základě lineárních regresních koeficientů z 10 minutového kinetického měření ihned po ozáření. Čím vyšší tento koeficient je, tím více reaktivních forem kyslíku bylo každou minutu detekováno. Výsledky jsou uvedeny jako procentuální vyjádření fluorescence, kdy kontrola představuje 100 %.

Jednotlivé grafy ukazují závislost množství ROS na koncentraci fotosensitizeru Rose Bengal (Obr. 32) nebo erythrosin B (Obr. 33). Na první pohled je patrná předpokládaná tendence, kdy s rostoucí koncentrací výrazně roste i množství produkovaných reaktivních forem kyslíku. Tento fakt jen potvrzuje potenciální využití těchto látek jako fotosensitizerů pro fotodynamickou terapii, protože jednou z důležitých vlastností je právě zvýšená produkce ROS. Dalším zajímavý pohled představuje srovnání obou fotosensitizerů. Ačkoliv se na první pohled může zdát, že hodnoty množství ROS jsou v případě erythrosinu B vždy větší, a že je tedy i účinnější, je nutné zohlednit i použitou koncentrační řadu. Koncentrace erythrosinu B jsou více jak 20× vyšší než v případě Rose Bengal. Tento fakt tedy značí, že ačkoliv je rozdíl v koncentracích obou látek mnohonásobný, rozdíl v množství ROS již tak markantní není, což stejně jako MTT test jen potvrzuje velkou účinnost fotosensitizeru Rose Bengal.

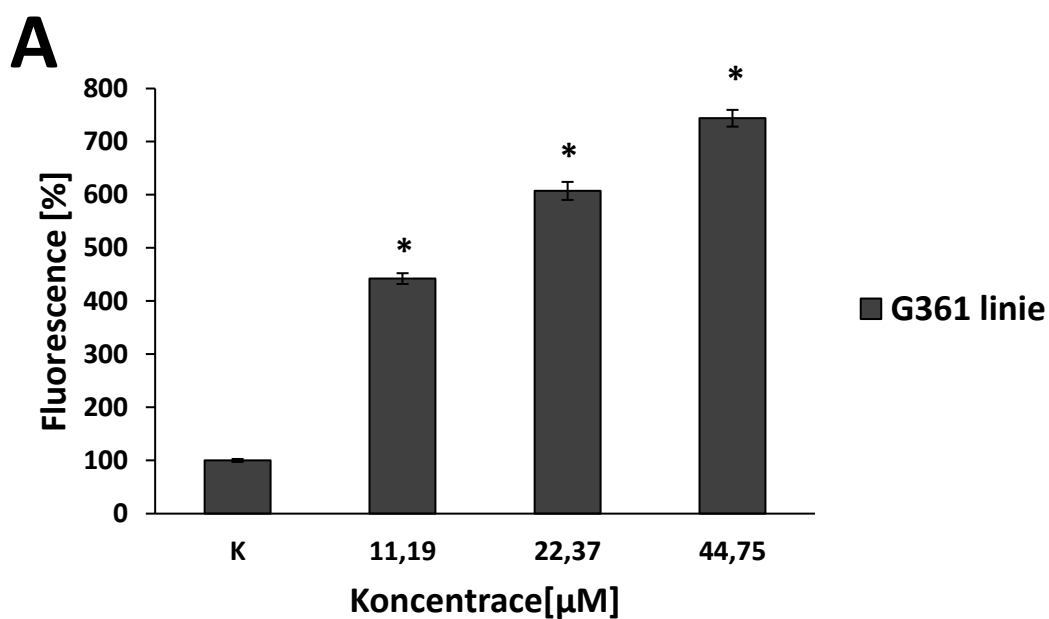


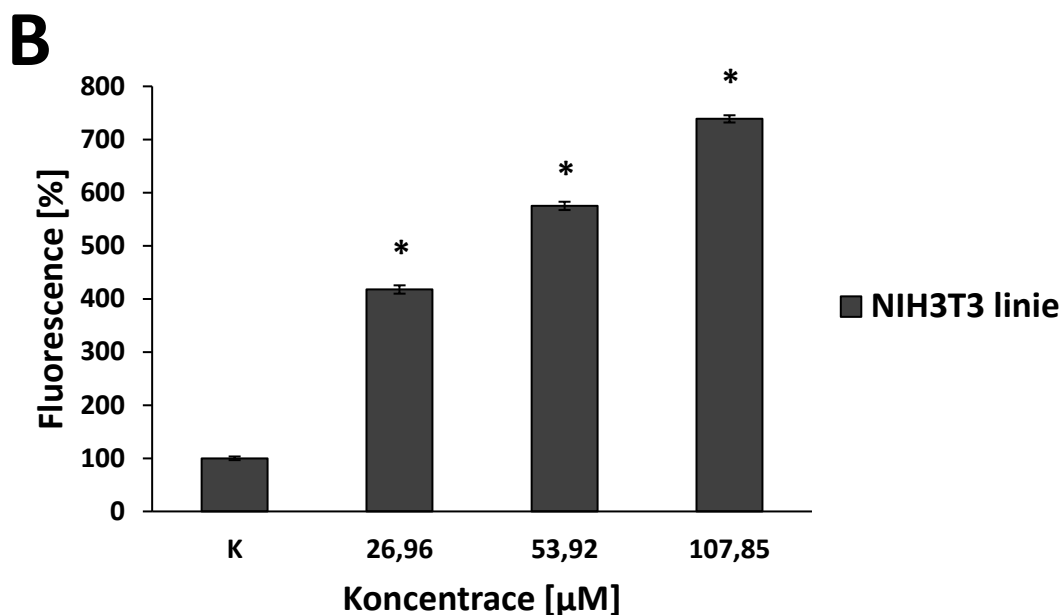


**Obr. 32:** Procentuální nárůst reaktivních forem kyslíku při použití fotosenzitizeru Rose Bengal a plošné hustotě světelné energie 5 J/cm<sup>2</sup> v porovnání s kontrolou, která byla nastavena jako 100 %. **A** – G361 buněčná linie, **B** – NIH3T3 buněčná linie.

*Kontrola (K): ozářená, bez fotosenzitizeru*

*\*:  $p < 0,0001$  - statisticky rozdílné v porovnání s kontrolou (K)*





**Obr. 33: Procentuální nárůst reaktivních forem kyslíku při použití fotosensitizeru erythrosin B a plošné hustotě světelné energie  $5 \text{ J/cm}^2$  v porovnání s kontrolou, která byla nastavena jako 100 %. A – G361 buněčná linie, B – NIH3T3 buněčná linie.**

*Kontrola (K): ozářená, bez fotosensitizeru*

*\*:  $p < 0,0001$  - statisticky rozdílné v porovnání s kontrolou (K)*

### 6.2.3 ZTRÁTA MITOCHONDRIÁLNÍHO MEMBRÁNOVÉHO POTENCIÁLU

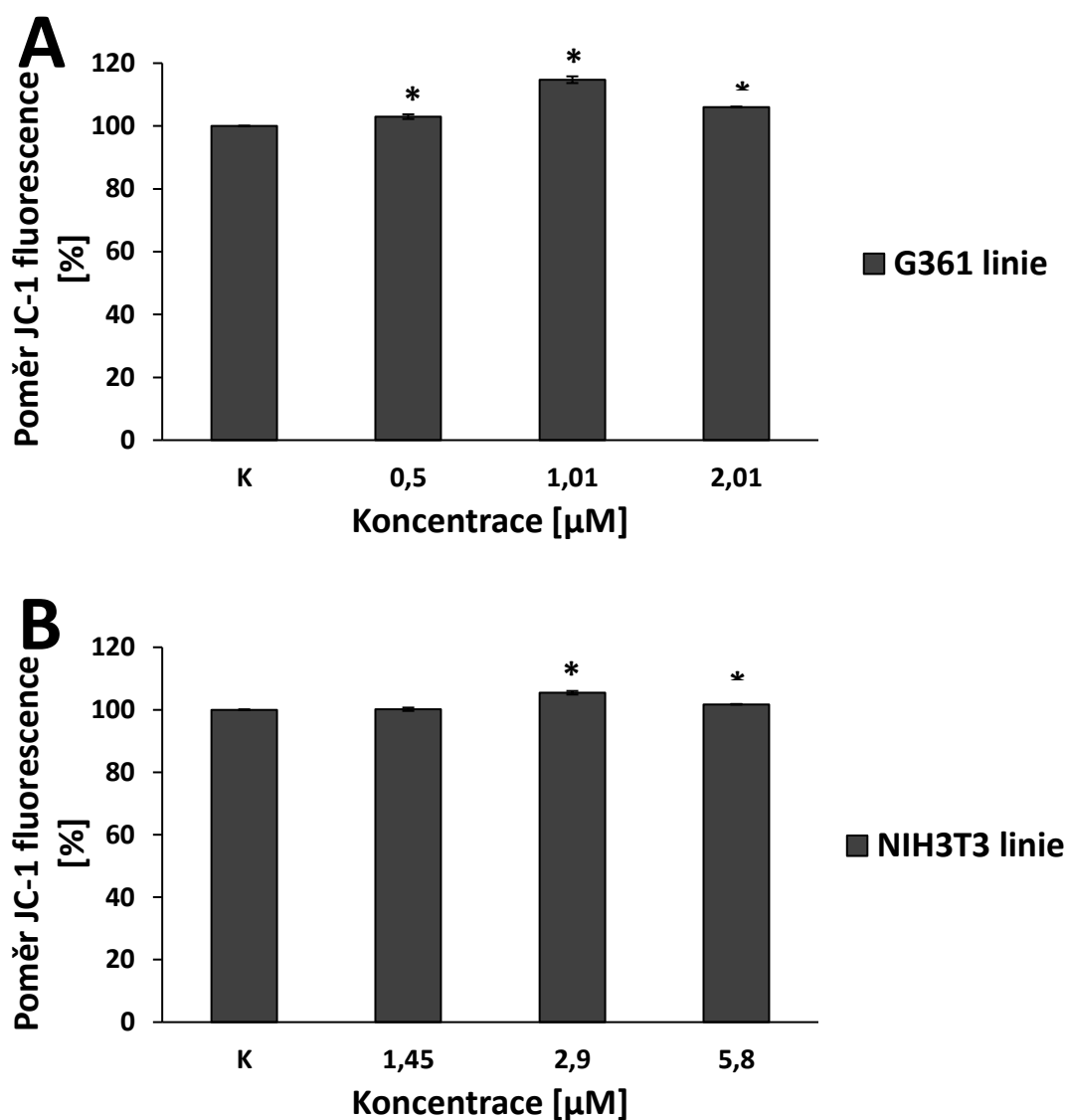
K vyhodnocení změny (ztráty) v mitochondriálním membránovém potenciálu slouží poměr zelené a červené fluorescence. Čím větší je tato výsledná hodnota, tím větší je četnost mitochondrií, které ztratily svůj membránový potenciál, a tím větší i počet buněk, u kterých tímto došlo k navození rané fázi apoptózy. Obecně lze říci, s jakou dochází k narušení mitochondriálního membránového potenciálu, použít i k určení, zda daný fotosensitizer poškozuje právě tuto buněčnou organelu vede k její dysfunkci.

Výsledky fotosensitizerů Rose Bengal (Obr. 34) a erythrosin B (Obr. 35) vykazují u obou linií obdobný trend, kdy s rostoucí koncentrací roste i počet buněk v rané fázi apoptózy. Výjimku představují vždy nejvyšší koncentrace fotosensitizerů, kdy došlo k náhlému poklesu. Tento pokles byl s největší pravděpodobností zapříčiněn velmi vysokou koncentrací látek, která byla příliš cytotoxická, a proto najednou začalo větší



množství buněk podléhat nekróze, čímž se podíl buněk v rané fázi apoptózy snížil. Celkově je však třeba konstatovat, že daný nárůst v porovnání s kontrolou není tak velký, jako u jiných látek, což ovšem pravděpodobně souvisí s vlastnostmi xanthenových barviv a s tím, na jaké struktury v buňce tyto fotosensitizéry cílí.

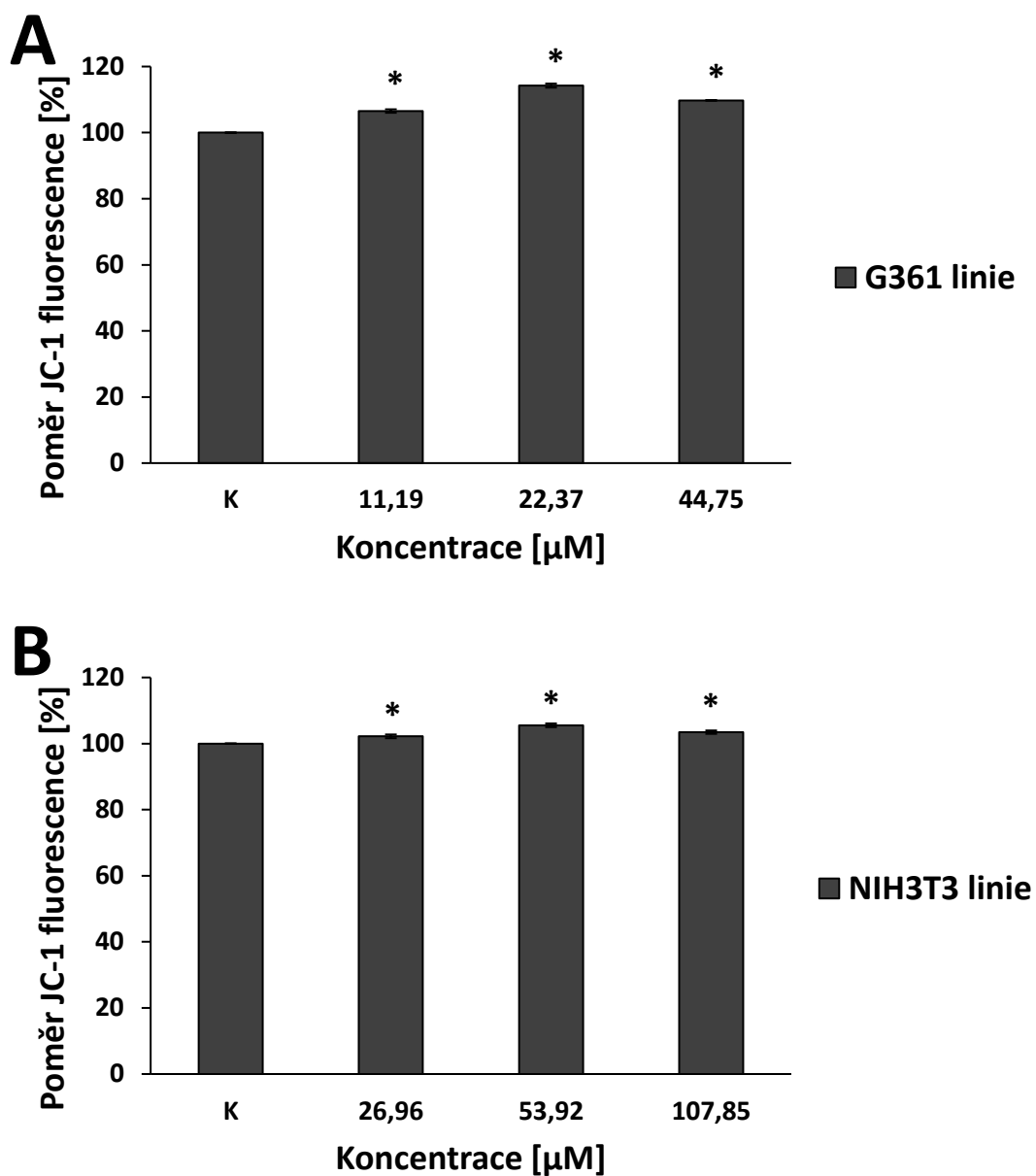
Naměřené poměry byly v grafech převedeny pro lepší vyjádření nárůstu fluorescence na procenta, kdy kontrola představuje 100 %.



**Obr. 34: Detekce ztráty mitochondriálního membránového potenciálu vlivem Rose Bengal a 5 J/cm<sup>2</sup> vyjadřující míru poškození mitochondrií a množství buněk v rané fázi apoptózy. A – G361 buněčná linie, B – NIH3T3 buněčná linie.**

*Kontrola (K): ozářená, bez fotosensitizéru*

*\*:  $p < 0,009$  - statisticky rozdílné v porovnání s kontrolou (K)*



**Obr. 35: Detekce ztráty mitochondriálního membránového potenciálu vlivem erythrosinu B a  $5 \text{ J/cm}^2$  vyjadřující míru poškození mitochondrií a množství buněk v rané fázi apoptózy. A – G361 buněčná linie, B – NIH3T3 buněčná linie.**

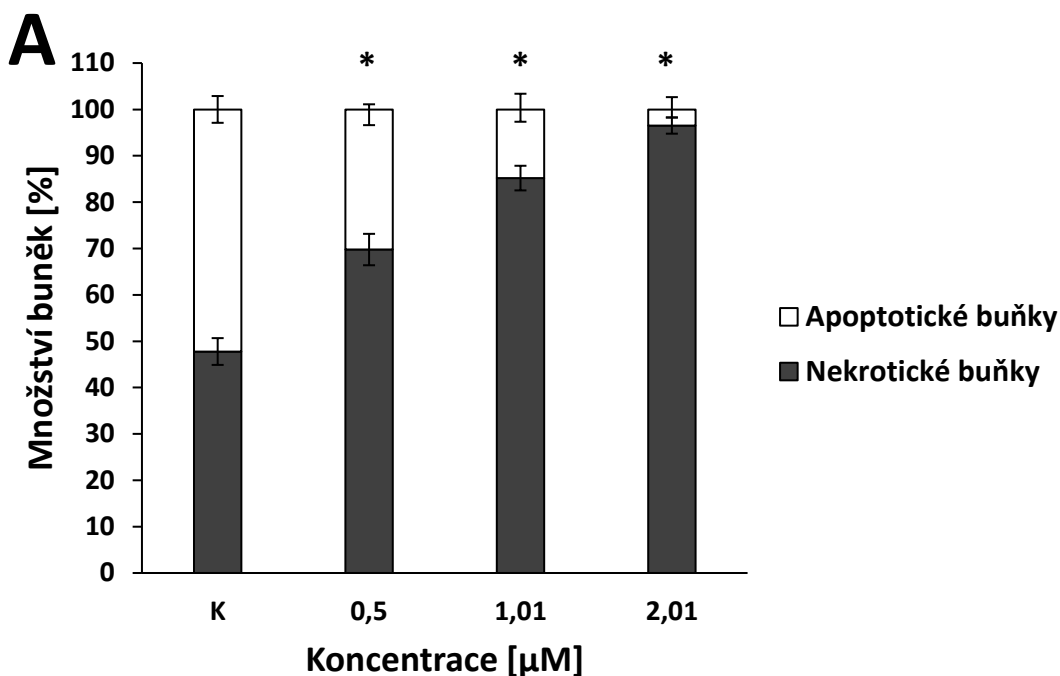
*Kontrola (K): ozářená, bez fotosensitizeru*

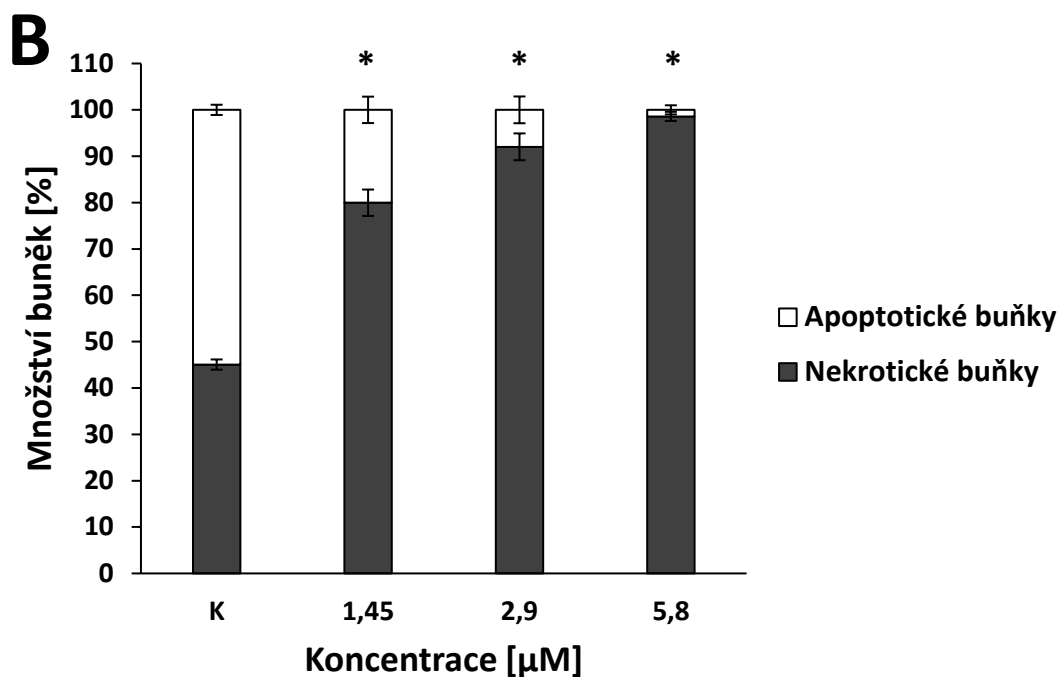
*\*:  $p < 0,009$  - statisticky rozdílné v porovnání s kontrolou (K)*

## 6.2.4 DETEKCE APOPTOTICKÝCH A NEKROTICKÝCH BUNĚK

S pomocí fluorescenčních značek a fluorescenčního mikroskopu byly identifikovány apoptotické a nekrotické buňky. Oba způsoby buněčné smrti byly poté převedeny na procenta a dány do poměru, aby bylo možné snadněji určit, který z daných způsobů smrti buňky převažuje.

Srovnáním výsledků fotosensitizeru Rose Bengal (Obr. 36) s výsledky erythrosinu B (Obr. 37) u obou buněčných linií je vidět, že i při té nejnižší koncentraci látky převažuje nekróza. Zaměřením se změnu tohoto poměru ve vztahu s koncentrací je patrné, že se tato převaha nekrotického způsobu smrti buňky dále zvětšuje.

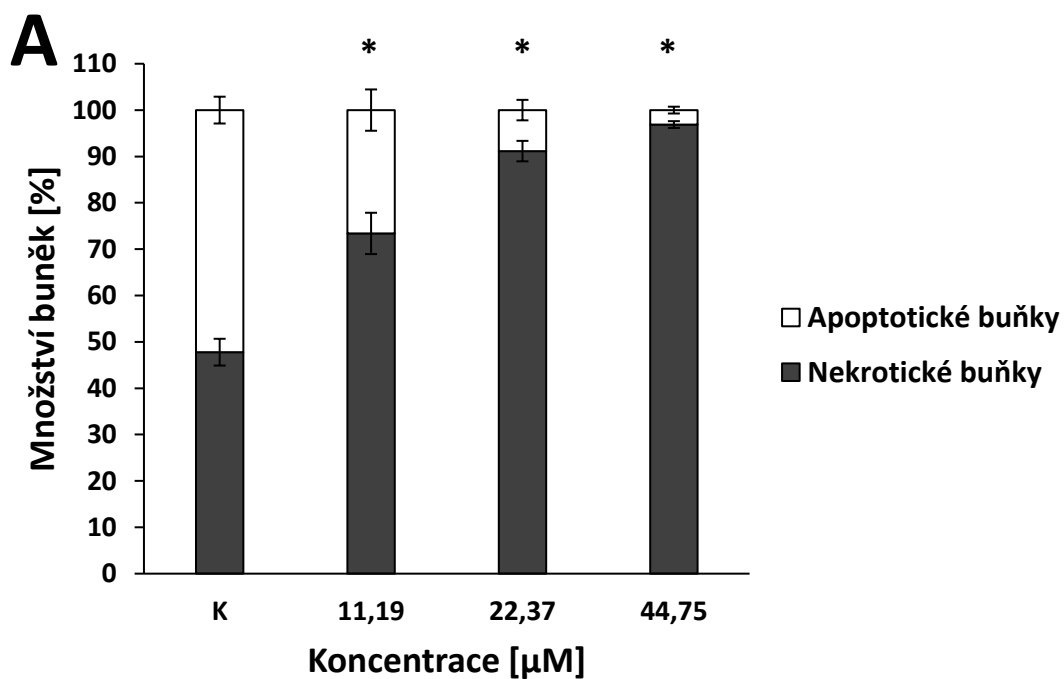


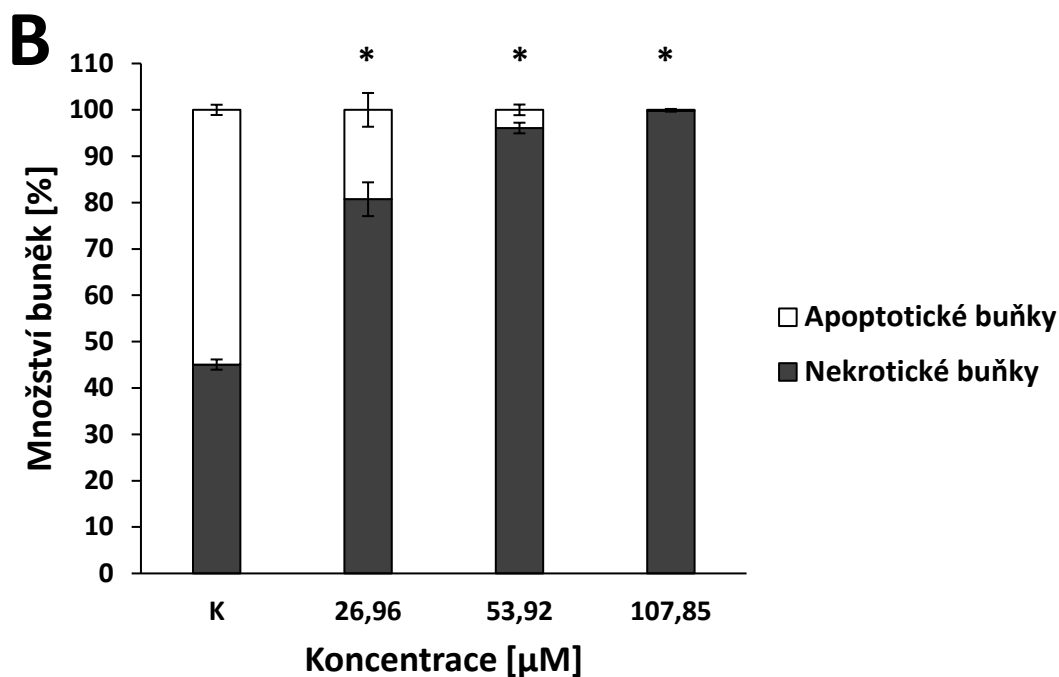


**Obr. 36:** Poměr apoptotických a nekrotických buněk po aplikaci fotosensitizeru **Rose Bengal** a  $5 \text{ J/cm}^2$ . **A** – G361 buněčná linie, **B** – NIH3T3 buněčná linie.

*Kontrola (K): ozářená, bez fotosensitizeru*

*\*:  $p < 0,0066$  - statisticky rozdílné v porovnání s kontrolou (K)*





**Obr. 37:** Poměr apoptotických a nekrotických buněk po aplikaci fotosensitizeru erythrosin B a 5 J/cm<sup>2</sup>. **A** – G361 buněčná linie, **B** – NIH3T3 buněčná linie.

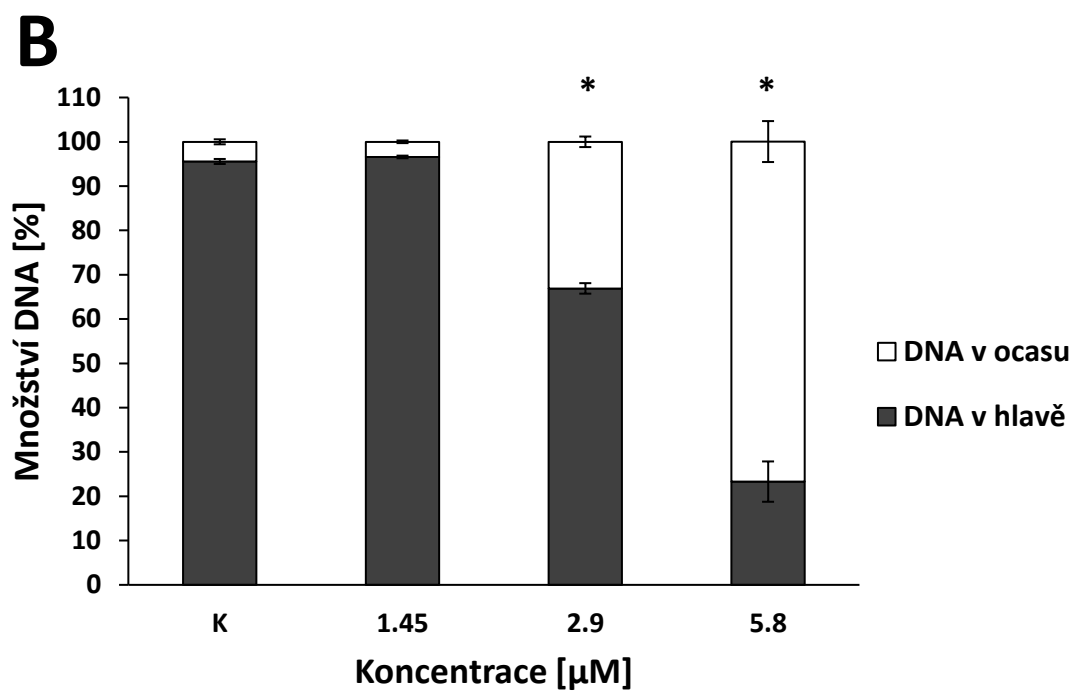
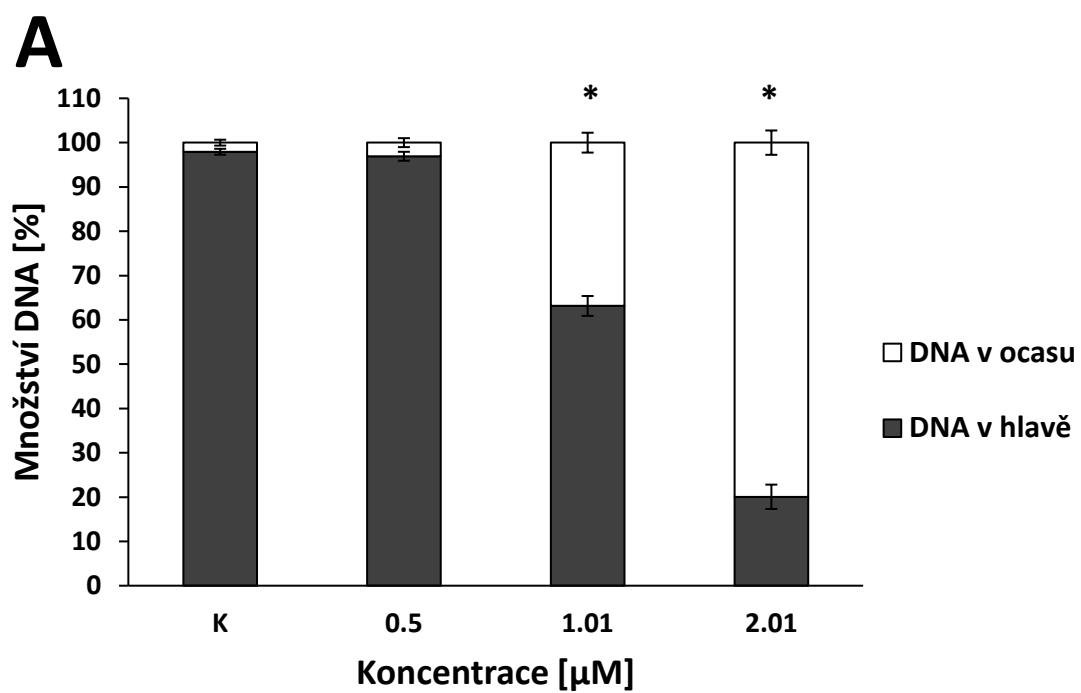
Kontrola (K): ozářená, bez fotosensitizeru

\*:  $p < 0,0066$  - statisticky rozdílné v porovnání s kontrolou (K)

### 6.2.5 KOMETOVÁ ANALÝZA

Výsledky získané prostřednictvím kometové analýzy poukazují jak v případě fotosensitivní látky Rose Bengal (Obr. 38) i v případě erythrosinu B (Obr. 39) na fragmentaci DNA u obou buněčných linií. Z grafů je patrné, že tato míra poškození DNA roste s vyšší koncentrací fotosensitizeru, kdy při té nejvyšší (2× IC<sub>50</sub>) je DNA již zhruba z 80 % fragmentovaná.

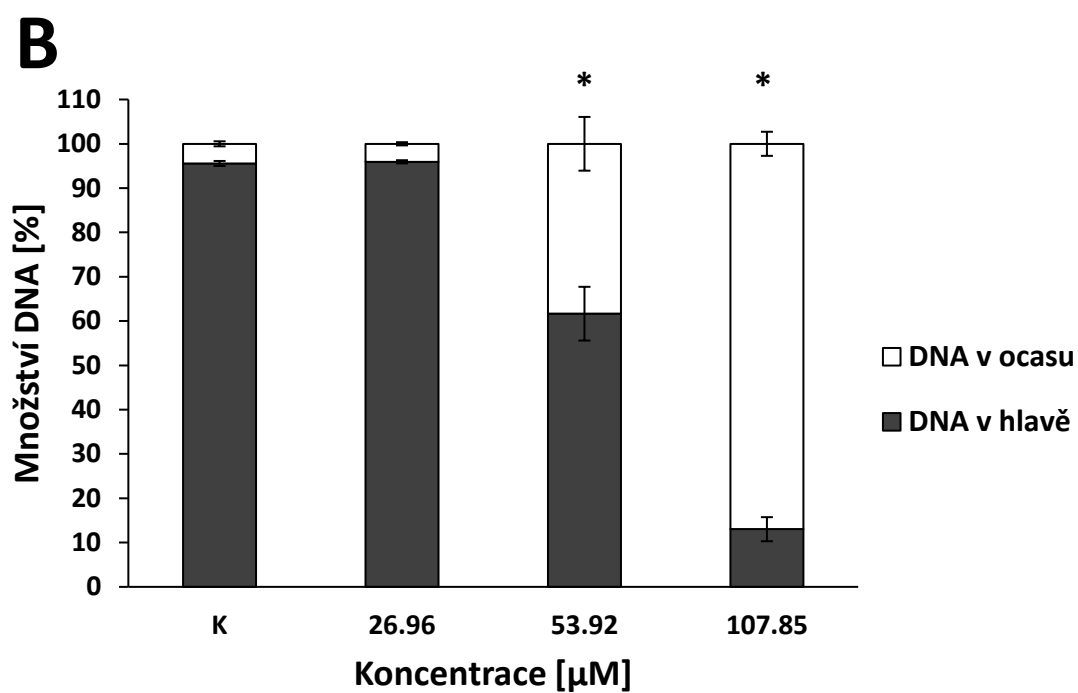
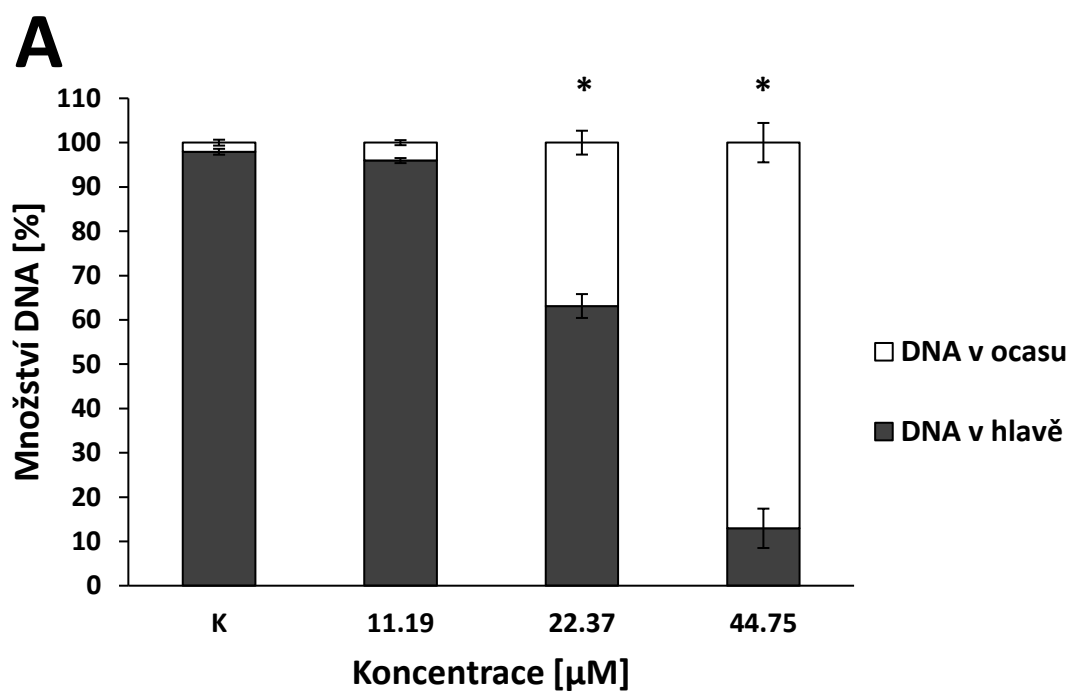
Na základě těchto a předchozích výsledků lze předpokládat, že právě jádro je jedna z prvních buněčných organel, které tyto fotosensitizery poškozují, což vede právě ke fragmentaci DNA. Druhou možností představuje fakt, že tyto xanthenové fotosensitizery účinně zapříčiňují celkové silné poškození buňky včetně jádra, které tak nevede ke kaskádovitě spuštěné apoptóze, ale k nekróze.



**Obr. 38: Množství DNA v hlavě a ocasu komety při použití fotosenzitizéru Rose Bengal a 5 J/cm<sup>2</sup>. A – G361 buněčná linie, B – NIH3T3 buněčná linie.**

*Kontrola (K): ozářená, bez fotosenzitizéru*

*\*:  $p < 0,004$  - statisticky rozdílné v porovnání s kontrolou (K)*



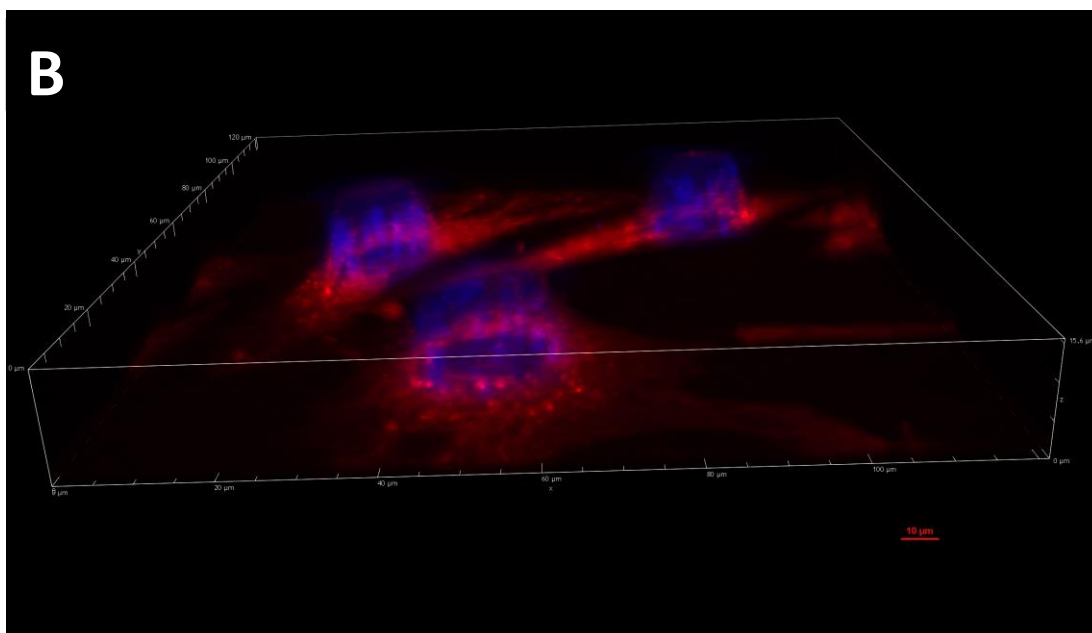
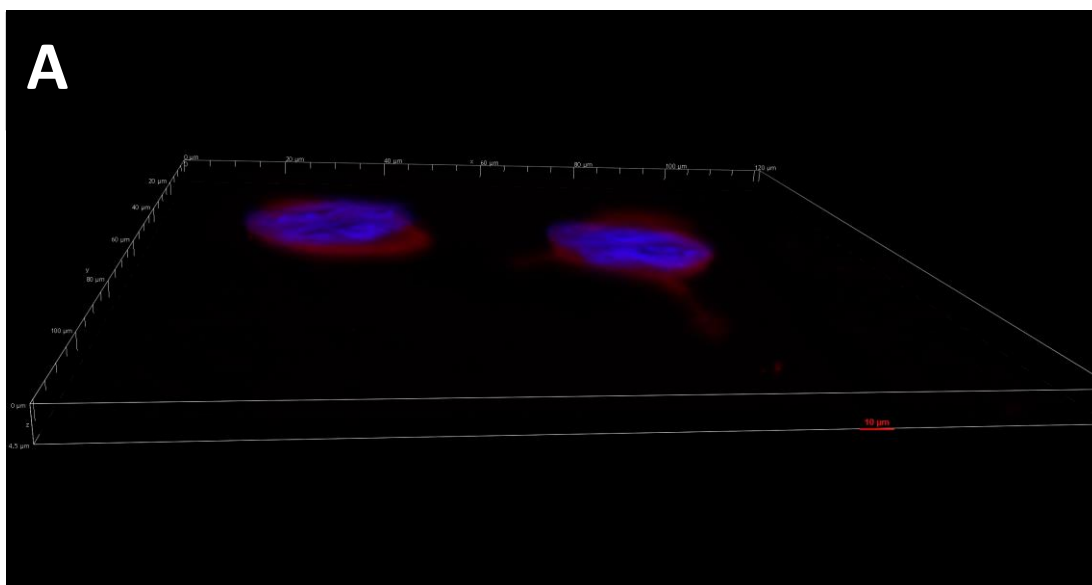
**Obr. 39:** Množství DNA v hlavě a ocasu komety při použití fotosenzitizéru erythrosin B a  $5 \text{ J/cm}^2$ . **A** – G361 buněčná linie, **B** – NIH3T3 buněčná linie.

Kontrola (K): ozářená, bez fotosenzitizéru

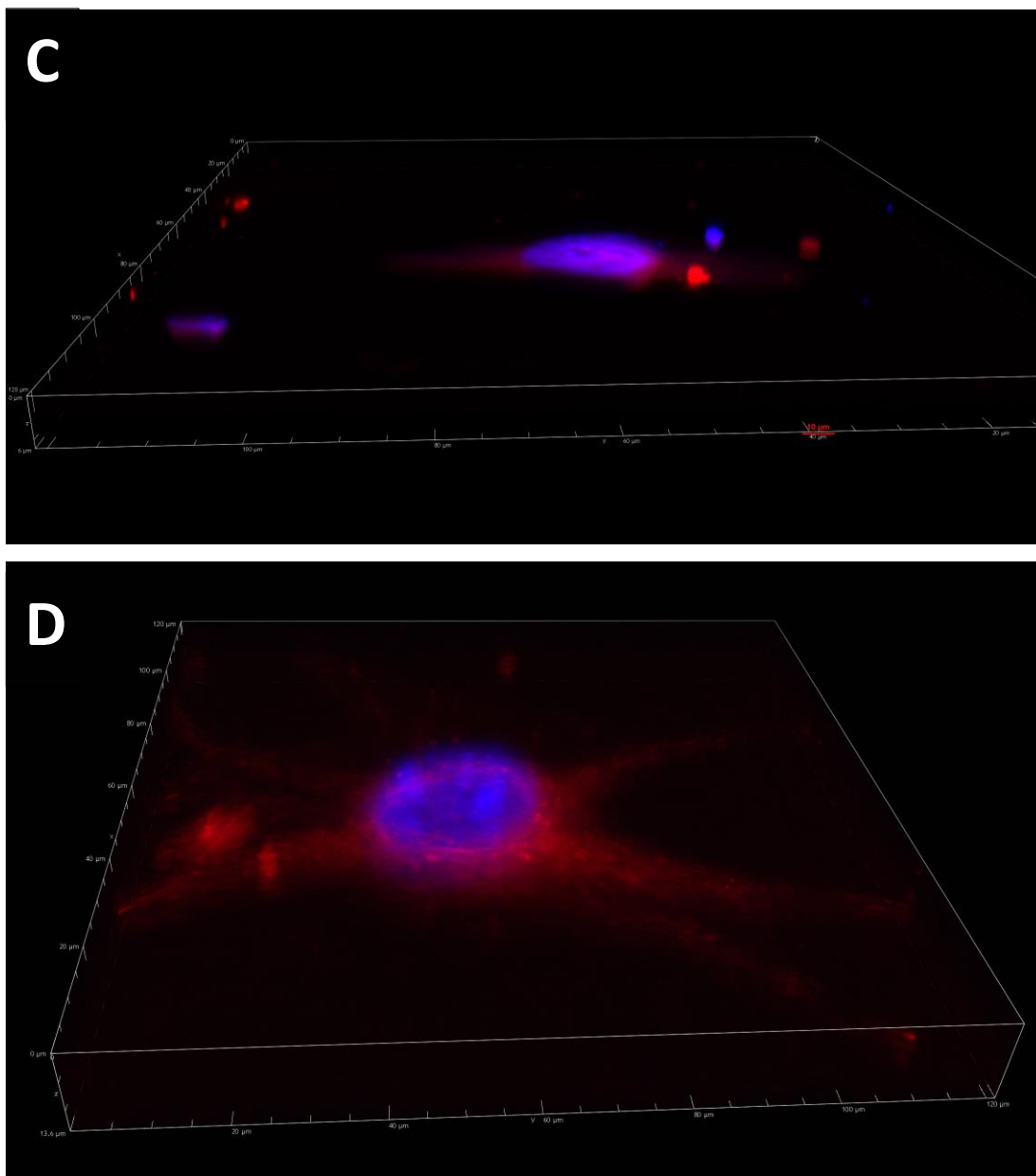
\*:  $p < 0,004$  - statisticky rozdílné v porovnání s kontrolou (K)

## 6.2.6 KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIE

S využitím fluorescenčního konfokálního mikroskopu byly získány 3D obrázky (Obr. 40) distribuce Rose Bengal a erythrosinu B uvnitř buněk G361 a NIH3T3 buněčné linie. Díky možnosti vytvořit 3D obrázek bylo možné určit, že nedochází k akumulaci červeně fluoreskujících fotosensitizerů uvnitř modře fluoreskujícího jádra. Toto zjištění prokazuje, že Rose Bengal a erythrosin B nezpůsobují primárně poškození jádra a fragmentaci DNA.







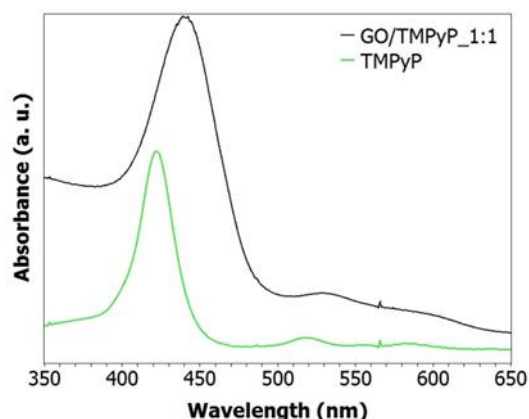
**Obr. 40: 3D znázornění distribuce xanthenových barviv pomocí konfokálního mikroskopu. A – Rose Bengal + G361 buněčná linie, B – Rose Bengal + NIH3T3 buněčná linie, C – erythrosin B + G361 buněčná linie, D – erythrosin B + NIH3T3 buněčná linie.**

### 6.3 FOTOSENSITIZÉR 3. GENERACE

#### 6.3.1 SPEKTROSKOPICKÉ URČENÍ ABSORPČNÍHO MAXIMA

UV-Vis spektroskopie byla provedena pro zjištění, zda nedošlo ke změně absorpčního maxima kompozitu, který vznikl spojením fotosensitizeru TmPyP a oxidu grafenu. Naměřené hodnoty (Obr. 41) ukázaly, že zatímco absorpční maximum

samotného TMPyP bylo 417 nm, po jeho navázání na přenašeč (oxid grafenu) došlo k posunutí absorpčního maxima na 437,5 nm. Toto zjištění je významné pro další budoucí pokusy a tvorbu fotosensitizerů 3. generace, jelikož posun absorpčního maxima směrem k červené oblasti umožňuje použití vlnové délky s větší penetrací. Tento posun ve vlnové délce sloužil zároveň také jako potvrzení úspěšného spojení oxidu grafenu a TMPyPu.



**Obr. 41: UV-Vis absorpční spektrum fotosensitizerů TMPyP a oxidu grafenu/TMPyP.**

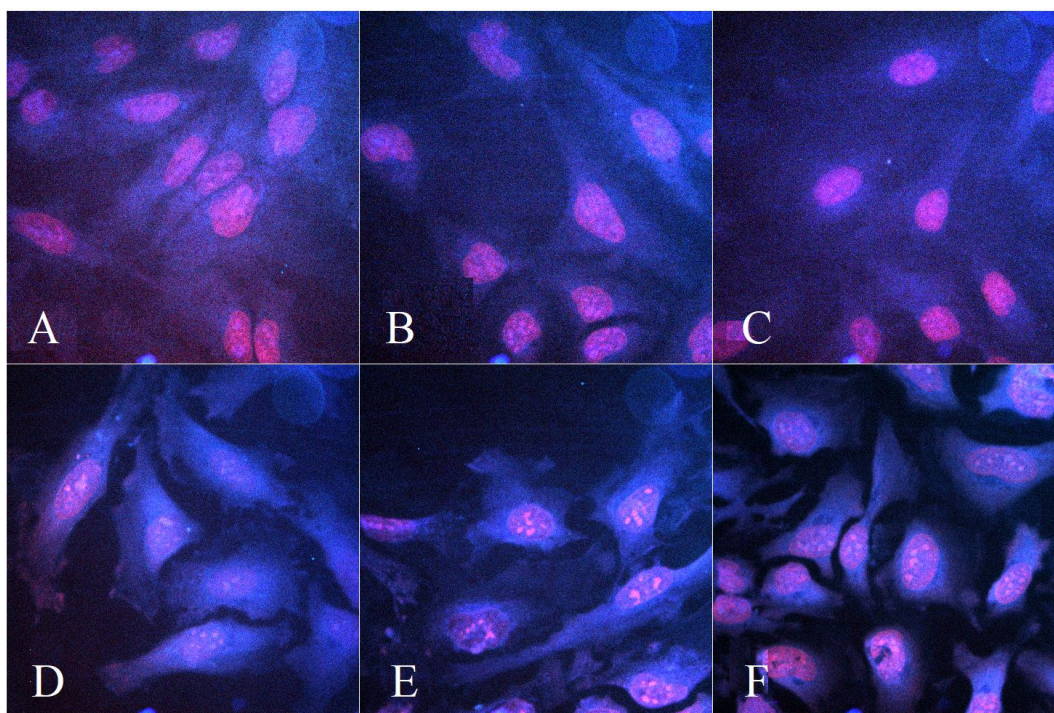
### 6.3.2 KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIE

Pomocí konfokální mikroskopie byla zjištěna distribuce samotného TMPyPu a kompozitu GO/TMPyP v HeLa buněčné linii (Obr. 42). Ačkoliv se mohou jevit jako nejvýznamnější hlavně výsledky po 24 hodinách, jelikož po právě takové době se většinou provádí toxikologické experimenty, sledovat distribuci těchto látek od začátku jejich průchodu do buňky je stejně tak důležité.

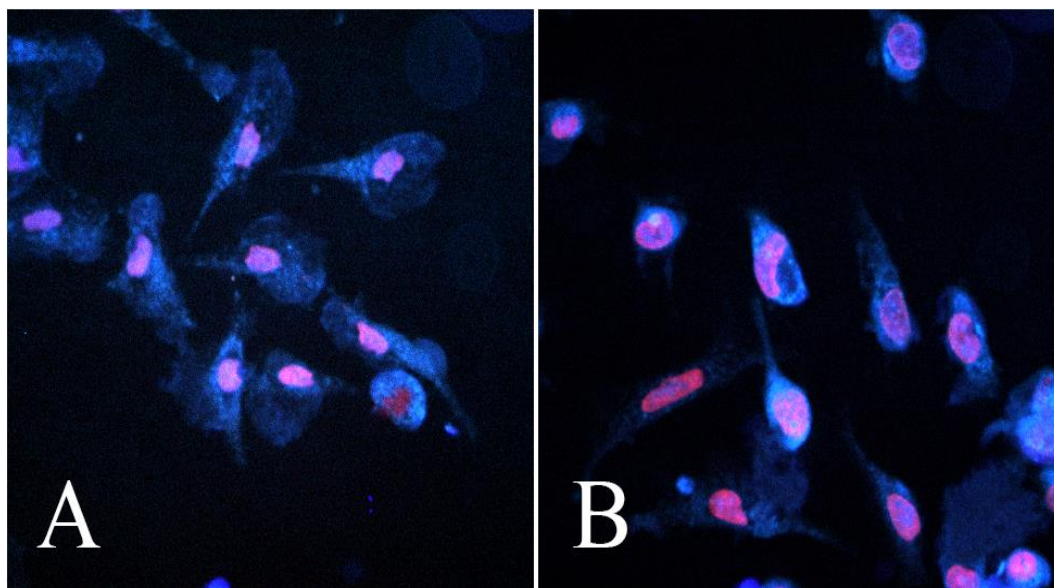
Výsledky ukazují, že po 60 minutách signál, který byl nalezen v cytoplasmě a v jádře, byl intenzivnější u samotného TMPyPu než u kompozitu GO/TMPyP (Obr. 42A, D), což mohlo být způsobeno zhasením fluorescence TMPyPu jeho vazbou na oxid grafenu. Nicméně po internalizaci kompozitu je TMPyP na oxidu grafenu viditelný. Nejvíce pravděpodobnou drahou, kterou dochází k průniku do buňky, je endocytóza. Kompozit GO/TMPyP se postupně rozděluje do organel v cytoplasmě (lysozomy), kde dojde k uvolnění TMPyPu, který následně přechází přímo do jádra (Obr. 42D, E). V případě samotného TMPyPu dochází k jeho internalizaci do jádra za méně než 60 minut (Obr. 42A). Zdá se také, že v případě samotného TMPyPu dochází

k jeho kompletnímu přesunu již po 120 minutách, a že je rozšířen rovnoměrně. Fluorescenční signál kompozitu GO/TMPyP v jádře je na druhou stranu odlišný, jelikož jsou viditelnější nukleozómy (Obr. 42B, E). Výsledky buněčné distribuce tedy potvrdily cílené přenesení TMPyPu pomocí oxidu grafenu a následnou internalizaci TMPyPu do jádra HeLa buňkami.

Součástí výzkumu byla také distribuce látek 24 hodin po PDT (Obr. 43). Je jasně patrné, že buňky s aplikovaným samotným TMPyPem jsou stále adherované k povrchu, zatímco po aplikaci kompozitu GO/TMPyP došlo ke smrštění buněk a z morfologického pohledu i k apoptotickým a nekrotickým změnám. K nahromadění v jádře poškozených buněk došlo jak v případě kompozitu GO/TMPyP, tak samotného TMPyPu. Na základě výsledku lze tedy předpokládat, že kompozit GO/TMPyP je více účinný při poškozování buněk.



**Obr. 42: Znázornění distribuce samotného TMPyPu a kompozitu GO/TMPyP při koncentraci 25  $\mu$ M u HeLa buněčné linie pomocí konfokálního mikroskopu. A – TMPyP po 60 min, B – TMPyP po 120 min, C – TMPyP po 24 hod, D – GO/TMPyP po 60 min, E – GO/TMPyP po 120 min, F – GO/TMPyP po 24 hod**



**Obr. 43: Znázornění distribuce samotného TMPyPu a kompozitu GO/TMPyP o koncentraci 25  $\mu\text{M}$  u HeLa buněčné linie 24 hod po fotodynamické terapii.**

A – TMPyP, B – GO/TMPyP

### 6.3.3 MTT TEST

Na základě MTT testu byly vypočítány hodnoty  $\text{IC}_{50}$  (Tab. 6) pro fotosensitizer TMPyP a GO/TMPyP na buněčné linii HeLa. Porovnáním těchto koncentrací bylo možné určit účinnost každé látky. Zatímco výsledky bez ozáření neprokázaly toxicitu látek, tak z naměřených hodnot po PDT jasně vyplývá, že konjugací TMPyPu k přenašeči (oxidu grafenu) došlo v porovnání se samotným TMPyPem ke snížení hodnoty  $\text{IC}_{50}$  z 8,224  $\mu\text{M}$  na 5,228  $\mu\text{M}$ . Nastavení ozařování bylo v tomto případě shodné – 740 nm 30  $\text{J}/\text{cm}^2$  + 414 nm 1  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Hodnota  $\text{IC}_{50}$  pro TMPyP a ozáření 414 nm 1  $\text{J}/\text{cm}^2$  byla 8,258  $\mu\text{M}$ .

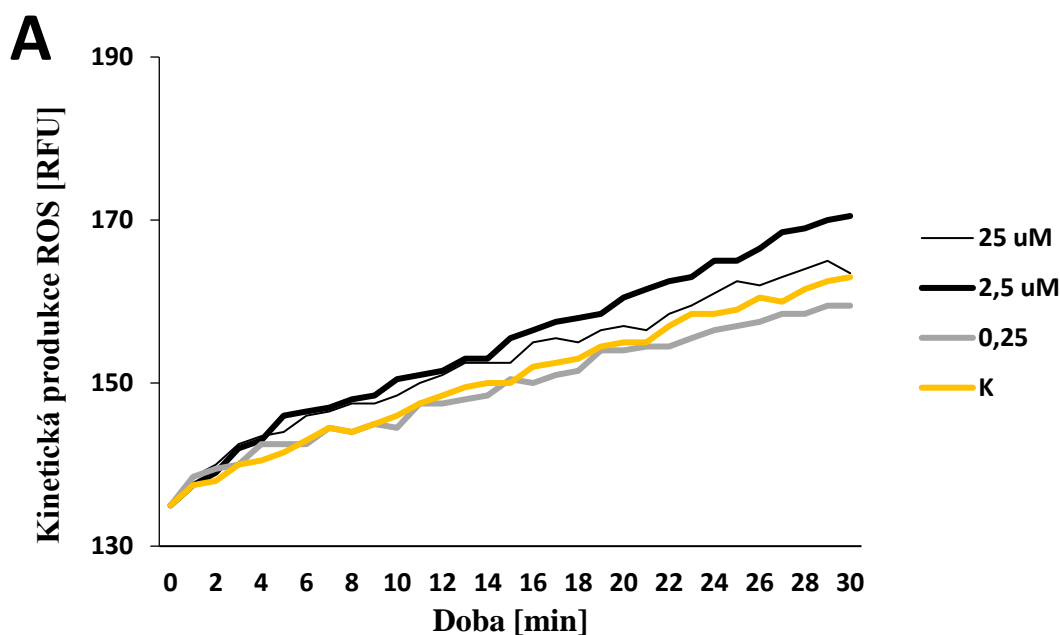
**Tab. 6: Hodnoty  $\text{IC}_{50}$  pro TMPyP a GO/TMPyP u buněčné linie HeLa.**

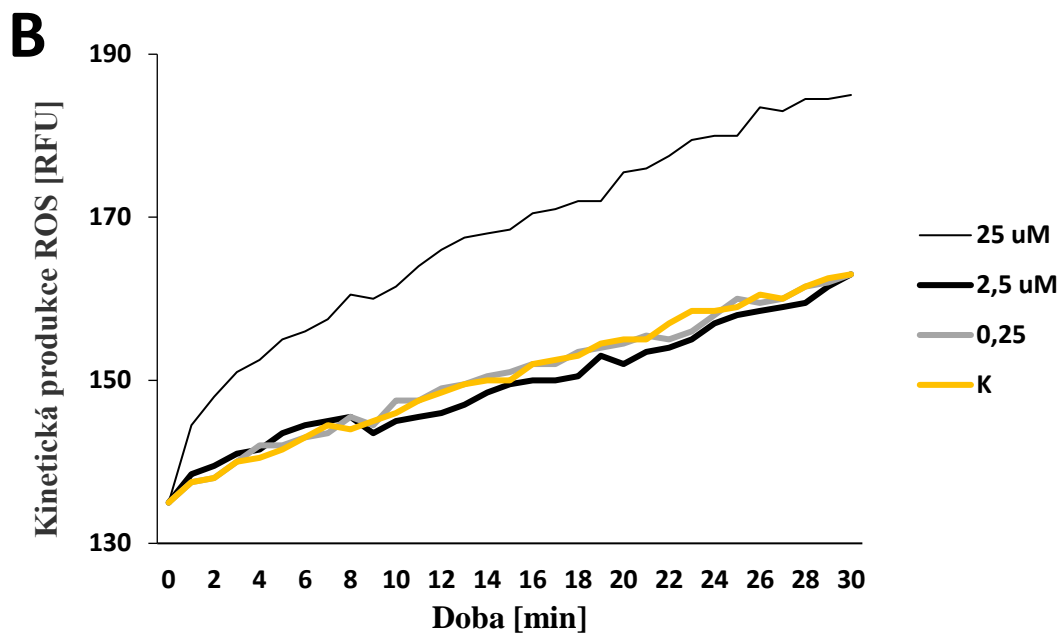
	$\text{IC}_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]	
	TMPyP	GO/TMPyP
bez ozáření	/	/
740 nm 30 $\text{J}/\text{cm}^2$ + 414 nm 1 $\text{J}/\text{cm}^2$	8,22±0,41	5,23±0,26
414 nm 1 $\text{J}/\text{cm}^2$	8,29±0,41	/

### 6.3.4 DETEKCE REAKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU

Výsledný graf byl vytvořen na základě lineárních regresních koeficientů z 30 minutového kinetického měření ihned po ozáření. Čím vyšší tento koeficient je, tím více reaktivních forem kyslíku bylo každou minutu detekováno. Testovány byly látky TMPyP a GO/TMPyP kompozit v rozmezí koncentrace 0,25-25  $\mu\text{M}$  u HeLa buněčné linie při ozáření 740 nm 30 J/cm<sup>2</sup> + 414 nm 1 J/cm<sup>2</sup>.

Výsledky (Obr. 44) prokazují zvýšenou produkci reaktivních forem kyslíku při koncentraci 25  $\mu\text{M}$  u kompozitu GO/TMPyP jednak v porovnání s kontrolou, ale také v porovnání se samotným TMPyPem. Opět se tedy prokázalo, že spojení fotosensitizeru TMPyP s vhodným nosičem mělo za následek zvýšení jeho efektivity, kdy došlo k nárůstu produkce ROS a tím také k většímu cytotoxickému účinku.





**Obr. 44:** Nárůst reaktivních forem kyslíku po dobu 30 minut při použití fotosensitizerů A - TMPyP a B - GO/TMPyP a plošné hustotě světelné energie  $30 \text{ J/cm}^2 + 1 \text{ J/cm}^2$  u HeLa buněčné linie.

## 7 DISKUZE

Jedním ze základních předpokladů a nezbytných vlastností potenciálního fotosensitizeru je, že nesmí být toxický bez ozáření, tedy před jeho aktivací (Mansoori a kol., 2019). Prvním krokem tedy bylo otestovat cytotoxicitu samotných xanthenových barviv (Rose Bengal a erythrosin B) na nádorových G361 a nenádorových NIH3T3 buněčných liniích bez ozáření (tzv. Dark toxicity test). Výsledky neprokázaly statisticky významný vliv obou fotosensitizerů na životnost buněk. Toto zjištění koresponduje také s výzkumem (Dabrzalska a kol, 2017), který se zabýval vlivem Rose Bengal na nádorové linie. Předchozí testy také neprokázaly žádný vliv světla, včetně zeleného spektra, na životnost buněk.

MTT test cytotoxicity prokázal na dané nádorové a nenádorové buněčné linii v porovnání s erythrosinem B větší účinnost fotosensitizeru Rose Bengal. Tyto výsledky jsou v souladu se studií, kterou provedl Buck a kol. (2017). Jejich výzkum byl zaměřen na fotodynamickou účinnost a fototoxicitu xanthenových barviv, včetně Rose Bengal a erythrosinu B, na nádorových liniích. Ačkoliv ve své studii použili odlišné nastavení pro fotodynamickou terapii, výsledky byly velice podobné a prokázaly také mnohonásobně větší účinnost fotosensitizeru Rose Bengal.

Srovnání hodnot IC50 mezi oběma fotosensitizerými ukázalo více jak 20 násobný rozdíl. Z těchto výsledků je jasně patrné, že Rose Bengal je mnohem účinnější než erythrosin B. Ačkoliv distribuce a akumulace fotosensitizeru v lidském těle je ovlivněna mnoha faktory, při aplikaci *in vitro* hraje hlavní úlohu průchod membránou. Ačkoliv se oba fotosensitizery do buňky dostávají převážně pomocí pinocytózy a přímo skrze membránu prochází ve srovnání s hydrofobními fotosensitizerými velice špatně, může se rozdílná schopnost těchto fotosensitizerů pronikat skrze buněčnou membránu podílet alespoň z malé části na celkovém množství fotosensitizeru, které se nakonec v buňce nahromadí. Calori a kol. (2016) studovali membránový průchod xanthenových barviv skrze membránu, aby vybrali vhodného kandidáta pro PDT. Na základě jejich výzkumu došli k závěru, že Rose Bengal proniká buněčnou membránou mnohem snadněji než erythrosin B, což potvrzuje i studie Pellosi a kol. (2013). Tento fakt může mít ve výsledku právě určitý vliv na to, proč byla pro usmrcení 50 % buněk potřeba větší koncentrace erythrosinu B než v případě látky Rose Bengal.

Výsledky měření produkce reaktivních forem kyslíku ukázaly přímou závislost na koncentraci fotosensitivní látky – čím vyšší byla tato koncentrace, tím vyšší byla

produkce reaktivních forem kyslíku. Tuto závislost na koncentraci fotosensitizeru pozorovali a popsali ve své studii také například Srivastav a kol. (2016). Ačkoliv byla koncentrace fotosensitizeru erythrosin B zhruba 20krát vyšší než koncentrace látky Rose Bengal, rozdíl v naměřeném množství vyprodukovaných reaktivních forem kyslíku tak výrazný, jak by se mohlo očekávat. Tento test pro detekci ROS ukázal, že i přes mnohonásobně menší koncentraci je fotosensitizer Rose Bengal schopný produkovat srovnatelné množství reaktivních forem kyslíku jako erythrosin B. Toto konstatování podporují i další studie, jako například Pellosi a kol. (2012), které obdobnými experimenty došli ke stejnému závěru.

Song a kol. (2015) zkoumali mimo jiné i produkci reaktivních forem kyslíku během fotodynamické terapie po aplikaci fotosensitizeru Rose Bengal. Jejich výsledky poukazovali až na trojnásobné zvýšení produkce ROS v porovnání s kontrolou. Takto velký nárůst je srovnatelný s výsledky měření ROS v této práci, což jen potvrzuje schopnost látky Rose Bengal několikanásobně zvýšit produkci cytotoxických ROS u nádorových linií.

McEwan a kol. (2016) se zabývali mimo jiné i studiem PDT ve spojení s Rose Bengal. Ve své práci také zmiňují, že tento fotosensitizer je výborným zdrojem reaktivních forem kyslíku, což potvrzují i výsledky produkce reaktivních forem kyslíku naměřené v této práci.

Lüpertz a kol. (2010) ve své práci uvádí, že hlavním smyslem PS je tvorba volných radikálů, které následně mohou interagovat s kyslíkem za vzniku reaktivních forem kyslíku. Výsledky této práce prokázaly zvýšení v produkci ROS u kompozitu v porovnání se samotným TMPyPem, což z něj činí potenciálně účinnější a vhodnější látku pro použití ve fotodynamické terapii

Podle toho, jaké složení a vlastnosti určitý fotosensitizer má, se odvíjí také to, na jaké struktury buňky daná látka cílí, a také jaké způsobuje poškození buňky, které vede k její destrukci. Hydrofobní fotosensitizery snadněji pronikají membránou a mohou tedy poškozovat organely v buňce (například mitochondrie) (Donohoe a kol., 2019). Naproti tomu hydrofilní látky, jako jsou xanthenová barviva, pronikají membránou hůře, a proto přímé poškození jednotlivých organel není tak rozsáhlé. Převážně se do buňky dostávají prostřednictvím pinocytózy ve formě váčků, které splývají s lysozomy obsahující proteolytické enzymy. Jejich následná aktivace způsobí rozrušení váčku a vylití proteolytických enzymů, které způsobí zničení buňky. Tento fakt potvrzují výsledky měření ztráty mitochondriálního membránového potenciálu v této práci, kdy



sice lze pozorovat jistou míru poškození mitochondrií a ztrátu membránového potenciálu, nicméně daný nárůst není v takovém rozsahu, jako u jiných fotosensitizerů. Lze tedy konstatovat, že buněčné organely jako jsou mitochondrie tedy nejsou primárním cílem těchto xanthenových fotosensitizerů. Důvodů, proč i při použití xanthenových barviv dojde k narušení mitochondriálního membránového potenciálu může být několik. První možnost představuje malé množství molekul fotosensitizeru, které projde skrze buněčnou membránu, naváže se na mitochondrii a po aktivaci světlem ji poškodí. Druhá možnost zahrnuje poškození mitochondrií proteolytickými enzymy. Ty se vylíjí do cytosolu po aktivaci fotosensitizeru, který poškodí lysozomální váček, se kterým splýnul po pinocytóze. U třetí možnosti dochází k tomu, že uvolněné proteolytické enzymy poškodí endoplazmatické retikulum, které je považováno za největší zásobárnu vápenatých iontů (Hoorelbeke a kol., 2018). Takto uvolněné  $\text{Ca}^{2+}$  ionty slouží jako signální molekuly pro tzv. mitochondriální permeabilní pór (mitochondrial permeability transition pore), který se tak aktivuje a zvýší propustnost mitochondriální membrány. Díky tomu poté dojde k vypuštění velkého množství molekul a k depolarizaci membrány (Bernardi 2013, Vorobjeva a kol., 2020). Tento proces tedy vede jednak k mitochondriální dysfunkci (Canton a kol. 2002), ale také k apoptóze, jelikož dojde mimo jiné i k uvolnění cytochromu c (Baines a Gutiérrez-Aguilar, 2018), který následně vede ke spuštění rané fáze apoptózy (Santucci a kol., 2019).

Výsledky mitochondriálního membránového potenciálu v této práci ukázaly jistou míru závislosti na koncentraci fotosensitizeru, kdy čím byla tato koncentrace vyšší, tím více mitochondrií ztratilo svůj membránový potenciál a dostalo se do rané fáze apoptózy. Tato závislost však neplatila pro nejvyšší koncentraci látky, kdy došlo k náhlému poklesu. Stejný trend, včetně náhlého poklesu, popisují ve své studii i Rabe a kol. (2014), kteří také analyzovali ranou fázi apoptózy u fotosensitizeru Rose Bengal. Vysvětlení pro tento náhlý pokles s největší pravděpodobností souvisí s tím, že daná koncentrace fotosensitizeru je již příliš cytotoxická. Ranou fázi apoptózy tak lze detekovat pouze u menšího množství buněk, protože větší část buněk rychleji podléhá nekróze.

Garg a kol. (2012) ve své studii konstatovali, že při použití vyšších dávek fotodynamické terapie obvykle převažuje nekróza, zatímco apoptózu lze častěji pozorovat při nízkých dávkách PDT. Důvodem je, že nekróza je častým vyústěním vlivu extrémních vnějších podmínek (např. extrémní teplota, tlak, osmolarita, pH)

nebo rozsáhlého buněčného poškození chemickými procesy, které byly způsobené např. letální dávkou ionizujícího záření, metabolickými inhibitory nebo různými toxickými látkami (Plaetzer a kol., 2003). V případě fotodynamické terapie představuje tyto extrémní podmínky záření s vysokou plošnou hustotou světelné energie a koncentrace fotosensitizeru. Z výsledků detekce apoptotických a nekrotických buněk je patrný vliv rostoucí koncentrace obou fotosensitizerů na změnu poměru jednotlivých typů buněčné smrti, kdy s rostoucí koncentrací čím dál více převažuje nekrotická smrt buňky. Převahu nekrózy v PDT u obou fotosensitizerů potvrzují také Calzavara-Pinton a kol. (2007), kteří ve své práci uvádí, že Rose Bengal a erythrosin B jsou hydrofilní barviva, která do buňky dostávají zejména prostřednictvím pinocytózy. Díky tomu se přednostně hromadí v mimojaderných strukturách, zejména v lysozomech. Tyto látky tedy převážně nespouští kaskády, které vedou k programované buněčné smrti, ale poškozením lysozomů fotodynamickou terapií způsobí uvolnění proteolytických enzymů, které zapříčiní nekrózu.

Liu a kol. (2019) konstatují, že ačkoliv v některých případech může velké množství reaktivních forem kyslíku způsobit oxidativní poškození DNA bází nebo zlomy DNA vláken, v porovnání s ionizujícím zářením se jedná v případě fotodynamické terapie spíše o neletální poškození. Buytaert a kol. (2007) uvádí obdobné tvrzení, podle kterého se většina látek nehromadí v buněčném jádře, a proto je velmi málo pravděpodobné, že dojde k poškození DNA nebo mutacím. Srovnání výsledků kometové analýzy mezi porfyrinovými fotosensitizerými a xanthenovými barvivy ukazuje zcela rozdílnou míru poškození DNA. Porfyrinové fotosensitizery jsou hydrofobní (lipofilní) látky, které snadněji prochází membránou a poškozují tedy přímo buněčné organely. V případě lipofilních látek dochází spíše ke hromadění v buněčných organelách, jako je mitochondrie, Golgiho aparát nebo endoplazmatické retikulum. V závislosti na velikosti celkového oxidativního stresu může poškozením nebo zničením těchto organel dojít k apoptóze nebo nekróze (Ding a kol., 2004). Výsledky kometové analýzy porfyrinových fotosensitizerů ukazují, že velká většina DNA zůstala v hlavě komety a nedošlo tedy k jejímu poškození/fragmentaci. Toto zjištění tedy potvrzuje předchozí výše zmíněné předpoklady. Naproti tomu výsledky xanthenových barviv poukazují na velkou míru fragmentace DNA. Důvodem, který na první pohled popírá výše zmíněná tvrzení, je struktura daných látek. V tomto případě se totiž jedná hydrofilní (lipofobní) látky, které velice špatně prochází skrze fosfolipidovou buněčnou membránu (Nowis a kol., 2005), místo toho využívají

pinocytózy. Po splynutí s lysozomem a jeho následném zničení mohou uvolněné proteolické enzymy narušit kromě dalších organel i jádro, a tím způsobit fragmentaci DNA. Tento fakt podporují i data získaná z konfokálního mikroskopu, ze kterých je patrné, že se fotosensitizer nehromadí v jádře a nemůže tedy přímo poškozovat DNA. Výsledky kometové analýzy tedy nepopírají výše zmíněné definice, ale naopak je potvrzují, protože primárním cílem zde není jádro a DNA, jejich destrukce je pouze důsledkem zničení lysozomu s proteolytickými enzymy.

Z výsledků kometové analýzy pro Rose Bengal a erythrosin B je také patrné, že s rostoucí koncentrací fotosensitizeru roste i míra poškození DNA. Tento trend je v souladu s mnoha dalšími studiemi, které se zabývaly výzkumem látek poškozující DNA během PDT (Rousset a kol., 2000; Guan a kol., 2006; Čížeková a kol., 2014; Srivastav a kol., 2016; Li a kol., 2019).

Youngův modul pružnosti charakterizuje mechanické vlastnosti membrány, kdy čím je tato hodnota vyšší, tím k většímu poškození cytoskeletu došlo. Z výsledků je patrné, že ke statisticky významné změně došlo pouze v případě nádorové buněčné linie. Tato změna v tuhosti membrány vlivem poškození cytoskeletu buňky u nádorových buněk po fotodynamické terapii byla zmíněna i v několika dalších studiích (Xiao a kol., 2019; Wang a Sun, 2012).

Ačkoliv není výzkum vlivu Rose Bengal a erythrosinu B v protinádorové fotodynamické terapii příliš prozkoumán, existuje mnoho studií, které se zabývají účinky těchto xanthenových barviv v antimikrobiální fotodynamické terapii (aPDT). Ačkoliv je cíl, na který se v aPDT působí, jiný než v PDT, na základě různých výzkumů se zdá, že výsledek porovnání účinnosti jednotlivých fotosensitizerů je obdobný. Rossoni a kol. (2010) porovnávali účinek fotosensitizerů Rose Bengal a erythrosin B v aPDT. Vyhodnocení jejich měření jednoznačně ukázalo, že Rose Bengal je mnohokrát účinnější než erythrosin B. Stejný výsledek je patrný i na základě experimentů, které byly provedeny v této práci. Výsledky obou studií tak poukazují na fakt, že ať už se jedná o fotodynamickou terapii antimikrobiální nebo protinádorovou, vlastnosti a účinky fotosensitizeru Rose Bengal zcela převyšují erythrosin B.

Výsledky z UV-Vis spektrometru prokázaly posun ve vlnové délce z 417 nm (TMPyP) na 437,5 nm (GO/TMPyP). Tento posun mimo jiné značí i úspěšné navázání molekul TMPyPu na oxid grafenu. Obdobné závěry zmiňuje ve své studii také Xu a kol. (2016).

Buněčný uptake a následná distribuce fotosensitizeru nádorovou buňkou jsou kritickými faktory, které ovlivňují účinnost léčby nebo zobrazování nádorové buňky. V této práci byl uptake TMPyP u HeLa buňkami studován pomocí konfokální fluorescenční mikroskopie. Během první fáze (60 min po přidání PS) byl TMPyP nebo kompozit GO/TMPyP lokalizován s různou hustotou v cytoplazmatických organelách (lysozomy a mitochondrie). Stejných výsledků dosáhli také Zhu a kol. (2015), kteří ve své práci studovali lokalizaci H<sub>2</sub>TMPyP v endoplazmatickém retikulu, Golgiho aparátu, lysozómech a mitochondriích u HK-1 buněk.

## 8 ZÁVĚR

Smyslem této disertační práce bylo zaměřit se na studium účinků fotodynamické terapie *in vitro*. Jedna část navazovala přímo na diplomovou práci a zahrnovala pokusy po aplikaci čtyř porfyrinových fotosensitizerů (TPPS<sub>4</sub>, ZnTPPS<sub>4</sub>, PdTPPS<sub>4</sub> a MgTPPS<sub>4</sub>) u nádorových G361 a nenádorových NIH3T3 buněčných linií při plošné hustotě světelné energie o velikosti 1 J/cm<sup>2</sup>, 5 J/cm<sup>2</sup> a 10 J/cm<sup>2</sup>. Druhá část obsahovala experimenty s dvěma xanthenovými barvivy (Rose Bengal, erythrosin B) u G361 a NIH3T3 buněčné linie a plošné hustotě světelné energie 5 J/cm<sup>2</sup>. Třetí část se zaměřovala na základní studium nově vytvořeného fotosensitizeru 3. generace a jeho porovnání s fotosensitizerem TMPyP, ze kterého byl odvozen.

První provedený MTT test bez ozáření odhalil, že samotná xanthenová barviva nejsou pro buňky toxická. Druhý MTT s ozářením (PDT) pak sloužil ke zjištění hodnot IC<sub>50</sub> jednotlivých látek. Na základě těchto výsledků pak lze konstatovat, že se u obou látek prokázala větší účinnost (nižší IC<sub>50</sub>) u nádorové G361 buněčné linie než u nenádorové NIH3T3 buněčné linie. Srovnání obou fotosensitizerů pak ukazuje více jak 20× větší účinnost Rose Bengal při srovnání s erythrosinem B.

Další testy, které měly odhalit důležité vlastnosti fotosensitizerů, zahrnovaly detekci produkce reaktivních forem kyslíku, detekci ztráty mitochondriálního membránového potenciálu, rozlišení apoptotických a nekrotických buněk a kometovou analýzu. Výsledky pro detekci produkce ROS zaznamenaly nárůst o stovky procent, což je velice důležité pro usmrcení nádorových buněk. Detekce ztráty mitochondriálního membránového potenciálu pak umožnila potvrdit předpoklad, který byl odvozený na základě hydrofilních vlastností xanthenových barviv, že tyto látky se nehromadí primárně v mitochondriích a nepůsobí tak usmrcení buňky jejich přímým poškozením. Zjištění poměru apoptotických a nekrotických buněk odhalilo převahu nekrotického způsobu buněčné smrti, kdy tato převaha navíc rostla se zvyšující se koncentrací fotosensitizerů. Kometová analýza ukázala zcela rozdílnou míru fragmentace DNA při porovnání porfyrinových a xanthenových fotosensitizerů. Zatímco u hydrofobních porfyrinových látek nebyla zaznamenána výraznější fragmentace, tak u hydrofilních xanthenových barviv byla tato fragmentace vcelku výrazná. Tento rozdíl je dán povahou látek a způsobem, jakým poškozují buňku.

U porfyrinových fotosensitizerů byl ještě proveden test k určení fáze buněčného cyklu a analýza poškození cytoskeletu pomocí AFM. Předpoklad, že v případě PDT

může docházet k zastavení buněčného cyklu v určité fázi, se bohužel nepotvrdil a nebyly zaznamenány signifikantní rozdíly mezi jednotlivými fázemi. Pomocí mikroskopie atomárních sil bylo prokázáno, že dochází v případě nádorové buněčné linie ke změně v pružnosti buněčné membrány, která je zapříčiněna poškozením cytoskeletu po fotodynamické terapii.

Výsledky fotosensitizeru 3. generace vytvořeného konjugací fotosensitizeru TMPyP s oxidem grafenu prokázaly, že toto spojení snížilo koncentraci IC50 a zvýšilo produkci reaktivních forem kyslíku, což mělo za následek celkové zvýšení účinnosti fotodynamické terapie.

Výsledky testů xanthenových fotosensitizerů a kompozitu GO/TMPyP prokázaly, že tyto látky mají vlastnosti, kterými by vhodné fotosensitizery měly disponovat. Z přímého porovnání v případě xanthenových barviv a TMPyPu s GO/TMPyPem se jako nejlepší jeví jednoznačně Rose Bengal a GO/TMPyP, jejichž IC50 byla prokazatelně menší než v případě erythrosinu B a samotného TMPyPu. Výzkum fotosensitizeru 3. generace GO/TMPyP zároveň představuje velký krok ke zlepšení distribuce a zacílení PS, a tím i ke větší efektivitě PDT, proto je v návaznosti na tuto práci plánováno v budoucnu větší zaměření na distribuci fotosensitizerů navázaných na nanomateriály.

Na základě provedených experimentů lze tedy konstatovat, že Rose Bengal spolu s GO/TMPyP kompozitem představují vhodné kandidáty pro další *in vitro* studie, které by následně mohly vést k *in vivo* studiím.

## 9 SEZNAM ZKRATEK

- **5-ALA** – aminolevulová kyselina
- **AFM** – mikroskop atomárních sil
- **GO** – oxid grafenu
- **HDL** – lipoprotein o vysoké hustotě
- **HMP** – „high melting point“ (vysokotuhnoucí) agaróza
- **Hp** – hematoporfyrin
- **HpD** – derivát hematoporfyrinu
- **IC50** – koncentrace, při které se životnost sníží o 50 %
- **IR** – infračervená oblast záření
- **LDL** – lipoprotein o nízké hustotě
- **LED** – světlo emitující diody
- **LMP** – „low melting point“ (nízkotuhnoucí) agaróza
- **MgTPPS<sub>4</sub>** – hořečnatý derivát TPPS<sub>4</sub>
- **NIR** – blízká infračervená oblast záření
- **NO** – oxid dusnatý
- **PNP** – polymerní nanočástice
- **PDT** – fotodynamická terapie
- **PdTPPS<sub>4</sub>** – paladnatý derivát TPPS<sub>4</sub>
- **PS** – fotosensitizer
- **ROS** – reaktivní formy kyslíku
- **TMPyP** – (5,10,15,20-tetrakis(1-metyl-4-pyridinio) porfyrin tetra(p-toluensulfonát))
- **TPPS<sub>4</sub>** – (*meso*-tetrakis(4-sulfonatofenyl) porfyrin)
- **ZnTPPS<sub>4</sub>** – zinečnatý derivát TPPS<sub>4</sub>

## 10 POUŽITÉ ZDROJE

1. Abrahamse, H. a Hamblin, M.R. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem J.* 2016;473(4):347-364.
2. Ahmad, S.I. Ultraviolet light in human health, diseases and environment. *Advances in experimental medicine and biology.* 2017;996.
3. Allen, M.J., Tung, V.C., Kaner, R.B. Honeycomb Carbon: A Review of Graphene. *Chem Rev.* 2010; 110:132-145.
4. Allijn, I.E., Schiffelers, R.M., Storm, G. Comparison of pharmaceutical nanoformulations for curcumin: Enhancement of aqueous solubility and carrier retention. *International Journal of Pharmaceutics.* 2016;506:407-413.
5. Allison, R.R a Moghissi, K. Oncologic photodynamic therapy: Clinical strategies that modulate mechanisms of action. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 2013;10:331-341.
6. Almeida, R.D., Manadas, B.J., Carvalho, A.P., Duarte, C.B. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochimica and Biophysica Acta.* 2004;1704:59-86.
7. Bacellar, I.O.L., Tsubone, T.M., Pavani, C., Baptista, M.S. Photodynamic efficiency: From molecular photochemistry to cell death. *International Journal of Molecular Sciences.* 2015;16:20523-20559.
8. Baines, C.P. a Gutiérrez-Aguilar, M. The still uncertain identity of the channel-forming unit(s) of the mitochondrial permeability transition pore. *Cell Calcium.* 2018;73:121-130.
9. Baldea, I., Ion, R-M., Olteanu, D.E., Nenu, I., Tudor, D., Filip, A.G. Photodynamic therapy of melanoma using new, synthetic porphyrins and phthalocyanines as photosensitizers – a comparative study. *Clujul Medical.* 2015;88(2):175-180.
10. Banerjee, S.M., MacRobert, A.J., Mosse, C.A., Periera, B., Bown, S.G. Photodynamic therapy: Inception to application in breast cancer. *The Breast.* 2017;31:105-113.
11. Bayona, A.M.D.P., Mroz, P., Thunshelle, C., Hamblin, M.R. Design features for optimization of tetrapyrrole macrocycles as antimicrobial and anticancer photosensitizers. *Chem Biol Drug Des.* 2017;89(2):192-206.



12. Bechet, D., Mordon, S.R., Guillemin, F., Barberi-Heyob, M.A. Photodynamic therapy of malignant brain tumors: A complementary approach to conventional therapies. *Cancer Treatment Reviews*. 2014;40:229-241.
13. Bernardi, P. Mitochondrial permeability transition pore. *Encyclopedia of Biological Chemistry*. 2013; 162-167.
14. Borissevitch, I.E., Ferreira, L.P., Goncalves, P.J., Amado, A.M., Schlothauer, J.C., Baptista, M.S. Quenching of meso-tetramethylpyridyl porphyrin excited triplet state by inorganic salts: Exciplex formation. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2018;367:156-161.
15. Bown, S.G. Photodynamic therapy for photochemists. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*. 2013;371(1995).
16. Breskey, J.D., Lacey, S.E., Vesper, B.J., Paradise, W.A., Radosevich, J.A., Colvard, M.D. Photodynamic therapy: Occupational hazards and preventive recommendations for clinical administration by healthcare providers. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2013;31(8):398-407.
17. Brilkina, A.A., Dubasova, L.V., Sergeeva, E.A., Pospelov, A.J., Shilyagina, N.Y., Shakhova, N.M., Balalaeva, I.V. Photobiological properties of phthalocyanine photosensitizers Photosens, Holosens and Phthalosens: A comparative in vitro analysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*. 2019;191:128-134.
18. Buck, S.T.G., Bettanin, F., Oresters, E., de Mello, P.H., Imasato, H., Viana, R.B., Perussi, J.R., da Silva, A.B.F. Photodynamic efficiency of xanthene dyes and their phototoxicity against a carcinoma cell line: A computational and experimental study. *Journal of Chemistry*. 2017.
19. Buytaert, E., Dewaele, M., Agostinis, P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007;1776:86-107.
20. Calin, M.A., Parasca, S.V. Light sources for photodynamic inactivation of bacteria. *Lasers Med Sci*. 2009;24:453-460.
21. Calori, I.R., Pellosi, D.S., Vanzin, D., Cesar, G.B., Pereira, P.C.S., Politi, M.J., Hioka, N., Caetano, W. Distribution of xanthene dyes in DPPC vesicles: Rationally accounting for drug partitioning using a membrane model. *J Braz Chem Soc*. 2016;27(11):1938-1948.

22. Calzavara-Pinton, P.G., Venturini, M., Sala, R. Photodynamic therapy: update 2006, Part 1: Photochemistry and photobiology. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2007;21(3):293-302.
23. Canton, M., Caffieri, S., Dall'Acqua, F., Lisa, F.D. PUVA-induced apoptosis involves mitochondrial dysfunction caused by the opening of the permeability transition pore. *FEBS Letters.* 2002;522:168-172.
24. Castano, A.P., Demidova, T.N., Hamblin, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 2004;1:279-293.
25. Cengel, K.A., Simone II, C.B., Glatstein, E. PDT: What's past is prologue. *Cancer Res.* 2016;76(9):2497-2499.
26. Cerman, E. a Cekic, O. Clinical use of photodynamic therapy. *Survey of Ophthalmology.* 2015;60:557-574.
27. Cline, B., Delahunty, I., Xie, J. Nanoparticles to mediate-X-ray-induced photodynamic therapy and Cherenkov radiation photodynamic therapy. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2019;11(2):1541.
28. Crous, A., Kumar, S.S.D., Abrahamse, H. Effect of dose responses of hydrophilic aluminium (III) phthalocyanine chloride tetrasulphonate based photosensitizer on lung cancer cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology.* 2019;194:96-106.
29. Čížeková, L., Grolmusová, A., Ipóthová, Z., Barbieriková, Z., Brezová, V., Hunáková, E., Imrich, J., Janovec, L., Dovinová, I, Paulíková, H. Novel 3,6-bis(imidazolidine)acridines as effective photosensitizers for photodynamic therapy. *Bioorganic and Medicinal Chemistry.* 2014;22:4684-4693.
30. Dabrzalska, M., Janaszewska, A., Zablocka, M., Mignani, S., Majoral, J.P., Klajnert-Maculewicz, B. Cationic phosphorus dendrimer enhances photodynamic activity of Rose Bengal against basal cell carcinoma cell lines. *Molecular Pharmaceutics.* 2017;14:1821-1830.
31. Dattoli, G. a Nguyen, F. Free electron laser and fundamental physics. *Progress in Particle and Nuclear Physics.* 2018;99:1-28.
32. Deng, K., Li, C., Huang, S., Xing, B., Jin, D., Zeng, Q., Hou, Z., Lin, J. Recent progress in near infrared light triggered photodynamic therapy. *Small.* 2017; 13(44).

33. Deng, Y., Jia, F., Chen, S., Shen, Z., Jin, Q., Fu, G., Ji, J. Nitric oxide as an all-rounder for enhanced photodynamic therapy: Hypoxia relief, glutathione depletion and reactive nitrogen species generation. *Biomaterials*. 2018;187:55-65.
34. Denis, T., Hamblin, M.R. Synthesis, bioanalysis and biodistribution of photosensitizer conjugates for photodynamic therapy. *Bioanalysis*. 2013;5(9):1099-1114.
35. DePry, J., J. Brescoll, L. Szczotka-Flynn, P. Rambhatla, H.W. Lim, K. Cooper. Phototherapy-related ophthalmologic disorders. *Clinics in Dermatology*. 2015; 33:247-255.
36. Dichiara, M., Prezzavento, O., Marrazzo, A., Pittala, V., Salerno, L., Rescifina, A., Amata, E. Recent advances in drug discovery of phototherapeutic non-porphyrinic anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017; 142:459-485.
37. Ding, X., Xu, Q., Liu, F., Zhou, P., Gu, Y., Zeng, J., An, J., Dai, W., Li, X. Hematoporphyrin monomethyl ether photodynamic damage on HeLa cells by means of reactive oxygen species production and cytosolic free calcium concentration elevation. *Cancer Letters*. 2004;216:43-54.
38. Dobson, J., de Queiroz, G.F., Golding, J.P. Photodynamic therapy and diagnosis: Principles and comparative aspects. *The Veterinary Journal*. 2018; 233:8-18.
39. Donohoe, C., Senge, M.O., Arnaut, L.G., Gomes-da-Silva, L.C. Cell death in photodynamic therapy: From oxidative stress to anti-tumor immunity. *BBA – Reviews on cancer*. 2019;1872:188308.
40. Fan, W., Huang, P., Chen, X. Overcoming the Achilles heel of photodynamic therapy. *Chem Soc Rev*. 2016; 45:6488-6519.
41. Figueira, J.A. a Veltrini, V.C. Photodynamic therapy in oral potentially malignant disorders – Critical literature review of existing protocols. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2017;20:125-129.
42. Firczuk, M., Winiarska, M., Szokalska, A., Jodlowska, M., Swiech, M., Bojarczuk, K., Salwa, P., Nowis, D. Approaches to improve photodynamic therapy of cancer. *Frontiers in Biosciences*. 2011;16:208-224.
43. Fonda-Pascual, P., Moreno-Arrones, O.M., Alegre-Sanchez, A., Saceda-Corralo, D., Buendia-Castano, D., Pindado-Ortega, C., Fernandez-Gonzalez, P., Velazquez-Kennedy, K., Calvo-Sánchez, M.I., Harto-Castano, A., Perez-Garcia, B., Bagazgoitia, L., Vano-Galvan, S., Espada, J., Jaen-Olasolo, P. In situ

- production of ROS in the skin by photodynamic therapy as a powerful tool in clinical dermatology. *Methods*. 2016;109:190-202.
44. Fujimoto, Y., Nakanishi, J., Yamada, T., Ishii, O., Yamazaki, M. Visible fiber lasers excited by GaN laser diodes. *Progress in Quantum Electronics*. 2013;37:185-214.
  45. Garcia-Diaz, M., Huang, Y-Y., Hamblin, M.R. Use of fluorescent probes for ROS to tease apart Type I and Type II photochemical pathways in photodynamic therapy. *Methods*. 2016;109:158-166.
  46. Garg, A.D., Bose, M., Ahmed, M.I., Bonass, W.A., Wood, S.R. In vitro studies on erythrosine-based photodynamic therapy of malignant and pre-malignant oral epithelial cells. *Plos ONE*. 2012;7(4).
  47. Gellén, E., Fidrus, E., Péter, M., Szegedi, A., Emri, G., Remenyik, E. Immunological effects of photodynamic therapy in the treatment of actinic keratosis and squamous cell carcinoma. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2018;24:342-348.
  48. Gheewala, T., Skwor, T., Munirathinam, G. Photosensitizers in prostate cancer therapy. *Oncotarget*. 2017; 8(18):30524-30538.
  49. Girotti, A.W. Modulation of the Anti-tumor efficacy of photodynamic therapy by nitric oxide. *Cancers*. 2016;8(10).
  50. Gomes, A.T.P.C., Neves, M.G.P.M.S., Cavaleiro, J.A.S. Cancer, photodynamic therapy and porphyrin-type derivatives. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. 2018;90:993-1026.
  51. Goncalves, P.J., Franzen, P.L., Correa, D.S., Almeida, L.M., Takara, M., Ito, A.S., Zílio, S.C., Borissevitch. Effects of environment on the photophysical characteristics of *mesotetrakis methylpyridiniumyl porphyrin* (TMPyP). *Spectrochimica Acta Part A*. 2011; 79:1532-1539.
  52. Grandi, V., Sessa, M., Pisano, L., Rossi, R., Galvan, A., Gattai, R., Mori, M., Tiradritti, L., Bacci, S., Zuccati, G., Cappugi, P. Photodynamic therapy with topical photosensitizers in mucosal and semimucosal areas: Review from a dermatologic perspective. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2018;23:119-131.
  53. Guan, H., Liu, X., Peng, W., Cao, R., Ma, Y., Chen, H., Xu, A.  $\beta$ -Carboline derivatives: Novel photosensitizers that intercalate into DNA to cause direct DNA

- damage in photodynamic therapy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006;342:894-901.
54. Gudipaty, S.A., Conner, C.M., Rosenblatt, J., Montell, D.J. Unconventional ways to live and die: Cell death and survival in development, homeostasis and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2018;34:311-332.
  55. Herzinger, T., Berneburg, M., Ghoreschi, K., Gollnick, H., Hölzle, E., Hönigsmann, H., Lehmann, P., Peters, T., Röcken, M., Scharffetter-Kochanek, K., Schwarz, T., Simon, J., Tanew, A., Weichenthal, M. S1-Guidelines on UV phototherapy and photochemotherapy. *Journal of the German Society of Dermatology*. 2016;14(8):853-876.
  56. Hong, E.J., Choi, D.G., Shim, M.S. Targeted and effective photodynamic therapy for cancer using functionalized nanomaterials. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2016;6(4):297-307.
  57. Hönigsmann, H. History of phototherapy in dermatology. *Photochemical and Photobiological Sciences*. 2013;12:16-21.
  58. Hoorelbeke, D., Decrock, E., Haver, V.V., Bock, M.D., Leybaert, L. Calcium, a pivotal player in photodynamic therapy?. *BBA – Molecular Cell Research*. 2018;1865:1805-1814.
  59. Houthoofd, S., Vuylsteke, M., Mordon, S., Fourneau, I. Photodynamic therapy for atherosclerosis. The potential of indocyanine green. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2020;29:101568.
  60. Huang, Y-Y., Tanaka, M., Vecchio, D., Garcia-Diaz, M., Chang, J., Morimoto, Y., Hamblin, M.R. Photodynamic therapy induces an immune response against a bacterial pathogen. *Expert Rev Clin Immunol*. 2012;8(5):479-494.
  61. Chico, J.F., Saggau, C., Adam, D. Proteolytic control of regulated necrosis. *BBA – Molecular Cell Research*. 2017;1864:2147-2161.
  62. Chilakamarthi, U. a Giribabu, L. Photodynamic therapy: Past, Present and Future. *Chemical Record*. 2017;17:775-802.
  63. Chudy, M., Tokarska, K., Jastrzebska, E., Bulka, M., Drozdek, S., Lamch, L., Wilk, K.A., Brzózka, Z. Lab-on-a-chip systems for photodynamic therapy investigations. *Biosensors and Bioelectronics*. 2018;101:37-51.
  64. Indran, I.R., Tufo, G., Pervaiz, S., Brenner, C. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011;1807:735-745.

65. Issa, M.C.A., Manela-Azulay, M. Photodynamic therapy: a review of the literature and image documentation. *Anais Brasileiro de Dermatologia*. 2010;85(4):501-511.
66. Jesus, V.P.S., Raniero, L., Lemes, G.M., Bhattacharjee, T.T., Caetano Júnior, P.C. Nanoparticles of methylene blue enhance photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2018;23:212-217.
67. Jiang, H.N., Li, Y., Cui, Z.J. Photodynamic physiology – Photonanomanipulations in cellular physiology with protein photosensitizers. *Frontiers in Physiology*. 2017;8:191.
68. Kaizhen, Y., Ting, N., Mengyu, L., Lihua, T., Ling, K. Enhanced cytotoxicity and apoptosis through inhibiting autophagy in metastatic potential colon cancer SW620 cells treated with Chlorin e6 photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2018;24:332-341.
69. Kaleta-Richter, M., Kawczyk-Krupka, A., Aebischer, D., Bartusik-Aebischer, D., Czuba, Z., Cieslar, G. The capability and potential of new forms of personalized colon cancer treatment: Immunotherapy and Photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2019;25:253-258.
70. Kataoka, H., Nishie, H., Hayashi, N., Tanaka, M., Nomoto, A., Yano, S., Joh, T. New photodynamic therapy with next-generation photosensitizers. *Annals of Translational Medicine*. 2017;5(8):183.
71. Kawczyk-Krupka, A., Bugaj, A.M., Potempa, M., Wasilewska, K., Latos, W., Sieron, A. Vascular-targeted photodynamic therapy in the treatment of neovascular age-related macular degeneration: clinical perspectives. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2015;12:161-175.
72. Kessel, D. Apoptosis, paraptosis and autophagy: Death and survival pathways associated with photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*. 2019;95(1):119-125.
73. Kessel, D. More adventures in photodynamic therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16:15188-15193.
74. Kessel, D. Photodynamic therapy: from the beginning. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2004;1:3-7.
75. Khaket, T.P., Kwon, T.K., Kang, S.C. Cathepsins: Potent regulators in carcinogenesis. *Pharmacology and Therapeutics*. 2019;198:1-19.

76. Kim, H., Lee, J., Oh, C., Park, J.-H. Cooperative tumour cell membrane targeted phototherapy. *Nature communications*. 2017;8.
77. Kim, M., Jung, H.Y., Park, H.J. Topical PDT in the treatment of benign skin diseases: Principles and new applications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015.;16:23259-23278.
78. Kou, J., Dou, D., Yang, L. Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications. *Oncotarget*. 2017;8(46):81591-81603.
79. Kucinska, M., Skupin-Mrugalska, P., Szczolko, W., Sobotta, L., Sciepora, M., Tykarska, E., Wierzchowski, M., Teubert, A., Fedoruk-Wyszomirska, A., Wyszko, E., Gdaniec, M., Kaczmarek, M., Goslinski, T., Mielcarek, J., Murias, M. Phthalocyanine derivatives possessing 2-(morpholin-4-yl)ethoxy groups as potential agents for photodynamic therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2015;58:2240-2255.
80. Kübler, A.C., Stenzel, W., Rühling, M., Meul, B., Fisher, J.H. Experimental evaluation of possible side effects of intra-operative photodynamic therapy on rabbit blood vessels and nerves. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2003;33:247-255.
81. Kwiatkowski, S., Knap, B., Przystupski, D., Saczko, J., Kedzierska, E., Knap-Czop, K., Kotlinska, J., Michel, O., Kotowski, K., Kulbacka, J. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2018;106:1098-1107.
82. Lakouas, D.K., Huglo, D., Mordon, S., Vermandel, M. Nuclear medicine for photodynamic therapy in cancer: Planning, monitoring and nuclear PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2017;18:236-243.
83. Lange, C., Lehmann, C., Mehler, M., Bednarski, P.J. Comparison of cellular death pathways after mTHPC-mediated photodynamic therapy (PDT) in five human cancer cell lines. *Cancers*. 2019;11:702.
84. Li, H., Wang, C., Li, L., Bu, W., Zhang, M., Wei, J., Tao, L., Qian, K., Ma, P. Adapalene suppressed the proliferation of melanoma cells by S-phase arrest and subsequent apoptosis via induction of DNA damage. *European Journal of Pharmacology*. 2019;851:174-185.
85. Li, X., Lee, S., Yoon, J. Supramolecular photosensitizers rejuvenate photodynamic therapy. *Chem Soc Rev*. 2018; 47(4):1174-1188.

86. Li, X., Peng, X-H., Zheng, B-D., Tang, J., Zhao, Y., Zheng, B-Y., Ke, M-R., Huang, J-D. New application of phthalocyanine molecules: from photodynamic therapy to photothermal therapy by means of structural regulation rather than formation of aggregates. *Chem Sci.* 2018; 9:2098-2104.
87. Liu, T-Z., Conde, J., Lipinski, T., Bednarkiewicz, A., Huang, C-C. Smart NIR linear and nonlinear optical nanomaterials for cancer theranostics: Prospects in photomedicine. *Progress in Materials Science.* 2017;88:89-135.
88. Liu, Y., Meng, X., Bu, W. Upconversion-based photodynamic cancer therapy. *Coordination Chemistry Reviews.* 2019;379:82-98.
89. López-Marín, N., Mulet, R., Rodríguez, R. Photodynamic therapy: Towards a systemic computational model. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology.* 2018;189:201-213.
90. Luo, L., Zhong, H., Liu, S., Deng, L., Luo, Y., Zhang, Q., Zhu, Y., Tian, Y., Sun, Y., Tian, X. Intracellular "activated" two-photon photodynamic therapy by fluorescent conveyor and photosensitizer co-encapsulating pH-responsive micelles against breast cancer. *International Journal of Nanomedicine.* 2017;12:5189-5201.
91. Lüpertz, R.; Wätjen, W.; Kahl, R.; Chovolou, Y. Dose- and time-dependent effects of doxorubicin on cytotoxicity, cell cycle and apoptotic cell death in human colon cancer cells. *Toxicology.* 2010; 271:115-121.
92. Maeda, H., Tsukigawa, K., Fang, J. A retrospective 30 years after discovery of the enhanced permeability and retention effect of solid tumors: Next-generation chemotherapeutics and photodynamic therapy – problems, solutions and prospects. *Microcirculation.* 2016;23:173-182.
93. Mahdi, Z., Habiboalh, G., Mahbobeh, N.N., Mina, Z.J., Majid, Z., Nooshin, A. Lethal effect of blue light-activated hydrogen peroxide, curcumin and erythrosine as potential oral photosensitizers on the viability of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. *Laser therapy.* 2015;24(2):103-111.
94. Mang, T.S. Lasers and light sources for PDT: past, present and future. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 2004;1:43-48.
95. Mansoori, B., Mohammadi, A., Doustvandi, M.A., Mohammadnejad, F., Kamari, F., Gjerstorff, M.F., Baradaran, Hamblin, M.R. Photodynamic therapy for cancer: Role of natural products. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 2019;26:395-404.



96. Master, A., Livingston, M., Gupta, A.S. Photodynamic nanomedicine in the treatment of solid tumors: Perspectives and challenges. *Journal of Controlled Release*. 2013;168:88-102.
97. Matoba, Y., Banno, K., Kisu, i., Aoki, D. Clinical application of photodynamic diagnosis and photodynamic therapy for gynecologic malignant diseases: A review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2018;24:52-57.
98. McEwan, C., Nesbitt, H., Nicholas, D., Kavanagh, O.N., McKenna, K., Loan, P., Jack, I.G., McHale, A.P., Callan, J.F. Comparing the efficacy of photodynamic and sonodynamic therapy in non-melanoma and melanoma skin cancer. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2016;24:3023-3028.
99. McFarland, S.A., Mandel, A., Dumoulin-White, R., Gasser, G. Metal-based photosensitizers for photodynamic therapy: the future of multimodal oncology? *Current Opinion in Chemical Biology*. 2020;56:23-27.
100. Meng, Z., Hou, W., Zhou, H, Zhou, L., Chen, H, Wu, C. Therapeutic considerations and conjugated polymer-based photosensitizers for photodynamic therapy. *Macromolecular Rapid Communications*. 2017;1700614.
101. Mesquita, M.Q., Dias, C.J., Gamelas, S., Fardilha, M., Neves, M., Faustino, M.A.F. An insight on the role of photosensitizer nanocarriers for photodynamic therapy. *Annals of the Brazilian Academy of Science*. 2018;90(2):1101-1130.
102. Mimikos, C., Shafirstein, G., Arshad, H. Current state and future of photodynamic therapy for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *World Journal of Otorhinolaryngology and Neck Surgery*. 2016;2:126-129.
103. Min, Y., Caster, J.M., Eblan, M.J., Wang, A.Z. Clinical Translation of Nanomedicine. *Chem Rev*. 2015;115(19):11147-11190.
104. Mitton, D. a Ackroyd, R. A brief overview of photodynamic therapy in Europe. *Photodiagnosis and Photodynamic therapy*. 2008;5:103-111.
105. Mokwena, M.G., Kruger, C.A., Ivan, M.T., Heidi, A. A review of nanoparticle photosensitizer drug delivery uptake systems for photodynamic treatment of lung cancer. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2018;22:147-154.
106. Mosinger, J., Kliment Jr., V., Sejbál, J., Kubát, P., Lang, K. Host-guest complexes of anionic porphyrin sensitizers with cyclodextrins. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. 2002;6:514-526.

107. Mousavi, S.H., Tavakkol-Afshari, J., Brook, A., Jafari-Anarkooli, I. Direct toxicity of Rose Bengal in MCF-7 cell line: Role of apoptosis. *Food and Chemical Toxicology*. 2009;47: 855-859.
108. Nagata, J.Y., Hioka, N., Kimura, E., Batistela, V.R., Terada, R.S.S., Graciano, A.X., Baesso, M.L., Hayacibara, M.F. Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: Evaluation of the photosensitizers used and light source properties. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2012;9:122-131.
109. Namikawa, T., Fujisawa, K., Munekage, E., Iwabu, J., Uemura, S., Tsujii, S., Maeda, H., Kitagawa, H., Fukuhara, H., Inoue, K., Sato, T., Kobayashi, M., Hanazaki, K. clinical application of photodynamic medicine technology using light-emitting fluorescence imaging based on a specialized luminous source. *Medical Molecular Morphology*. 2018;51:187-193.
110. Nasim, H., Jamil, Y. Diode lasers: From laboratory to industry. *Optics and Laser Technology*. 2014;56:211-222.
111. Nesi-Reis, V., Lera-Nonose, D.S.S.L., Oyama, J., Silva-Lalucci, M.P.de P., Demarchi, I.G., Aristides, S.M.A., Teixeira, J.J.V., Silveira, T.G.V., Lonardon, M.V.C. Contribution of photodynamic therapy in wound healing: A systematic review. *Photodiagnosis and Photodynamic therapy*. 2018;21:294-305.
112. Nowis, D., Stoklosa, T., Legat, M., Issat, T., Jakóbsiak, M., Golab, J. The influence of photodynamic therapy on the immune response. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2005;2:283-298.
113. Oniszczyk, A., Wojtunik-Kulesza, K.A., Oniszczyk, T., Kasprzak, K. The potential of photodynamic therapy (PDT)-Experimental investigations and clinical use. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2016;83:912-929.
114. Ouyang, G., Xiong, L., Liu, Z., Lam, B., Bui, B., Ma, L., Chen, X., Zhou, P., Wang, K., Zhang, Z., Huang, H., Miao, X., Chen, W., Wen, Y. Inhibition of autophagy potentiates the apoptosis-inducing effects of photodynamic therapy on human colon cancer cells. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2018;21:396-403.
115. Park, W., Cho, S., Han, J., Shin, H., Na, K., Lee, b., Kim, D-H. Advanced smart-photosensitizers for more effective cancer treatment, *Biomaterials Science*. 2018;6:79.

116. Paszko, E., Ehrhardt, C., Senge, M.O., Kelleher, D.P., Reynolds, J.V. Nanodrug applications in photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic therapy*. 2011;8(1):14-29.
117. Pellosi, D.S., Batistela, V.R., Souza, V.R.D., Scarminio, I.S., Caetano, W., Hioka, N. Evaluation of the photodynamic activity of xanthene dyes on *Artemia salina* described by chemometric approaches. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. 2013;85(4):1267-1274.
118. Pellosi, D.S., Estevao, B.M., Semensato, J., Severino, D., Baptista, M.S., Politi, M.J., Hioka, N., Caetano, W. Photophysical properties and interactions of xanthene dyes in aqueous micelles. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2012;247:8-15.
119. Phillips, D. A lifetime in photochemistry; some ultrafast measurements on singlet states. *Proc R Soc A*. 2016;472:20160102.
120. Plaetzer, K., Kiesslich, T., Verwanger, T., Krammer, B. The modes of cell death induced by PDT: An overview. *Medical Laser Application*. 2003;18:7-19.
121. Qiu, H., Tan, M., Ohulchansky, T.Y., Lovell, J.F., Chen, G. Recent progress in upconversion photodynamic therapy. *Nanomaterials*. 2018;8:344.
122. Quirk, B.J., Brandal, G., Donlon, S., Vera, J.C., Mang, T.S., Foy, A.B., Lew, S.M., Girotti, A.W., Jugal, S., LaViolette, P.S., Connelly, J.M., Whelan, H.T. Photodynamic therapy (PDT) for malignant brain tumors – Where do we stand. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2015;12:530-544.
123. Rabe, S.Z.T., Mousavi, S.H., Tabasi, N., Rastin, M., Rabe, S.Z.T., Siadat, Z., Mahmoudi, M. Rose Bengal suppresses gastric cancer cell proliferation via apoptosis and inhibits nitric oxide formation in macrophages. *Journal of Immunotoxicology*. 2014;11(4):367-375.
124. Radogna, F. a Diederich, M. Stress-induced cellular responses in immunogenic cell death: Implications for cancer immunotherapy. *Biochemical Pharmacology*. 2018;153:12-23.
125. Rajendran, M. Quinones as photosensitizer for photodynamic therapy: ROS generation, mechanism and detection methods. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2016;13:175-187.
126. Rapozzi, V., Pietra, E.D., Bonavida, B. Dual roles of nitric oxide in the regulation of tumor cell response and resistance to photodynamic therapy. *Redox Biology*. 2015;6:311-317.

127. Reeves, K.J., Reed, M.W.R., Brown, N.J. Is nitric oxide important in photodynamic therapy? *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2009;95:141-147.
128. Reis, A.C.M., Regis, W.F.M., Rodrigues, L.K.A. Scientific evidence in antimicrobial photodynamic therapy: An alternative approach for reducing cariogenic bacteria. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2019;26:179-189.
129. Roguin, L.P., Chiarante, N., Vior, M.C.G., Marino, J. Zinc(II) phthalocyanines as photosensitizers for antitumor photodynamic therapy. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2019;114:105575.
130. Rossoni, R.D., Junqueira, J.C., Santos, E.L.S., Costa, A.C.B., Jorge, A.O.C. Comparison of the efficacy of Rose Bengal and erythrosin in photodynamic therapy against Enterobacteriaceae. *Lasers Med Sci*. 2010;25:581-586.
131. Rousset, N., Kerninon, E., Eléouet, S., Néel, T.L., Auget, J-L., Vonarx, V., Carré, J., Lajat, Y., Patrice, T. Use of alkaline comet assay to assess DNA repair after m-THPC-PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2000, 56:118-131.
132. Sanabria, L.M., Rodríguez, M.E., Cogno, I.S., Vittar, N.B.R., Pansa, M.F., Lamberti, M.J., Rivarola, V.A. Direct and indirect photodynamic therapy effects on the cellular and molecular components of the tumor microenvironment. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013;1835:36-45.
133. Santucci, R., Sinibaldi, F., Cozza, P., Polticelli, F., Fiorucci, L. Cytochrome c: An extreme multifunctional protein with a key role in cell fate. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019;136:1237-1246.
134. Sener, S., Bayrac, A.T., Sener, B.B., Tozlu, C., Acar, N., Salih, B., Yüksel, M., Bekaroglu, Ö. Synthesis, characterization and DFT study of novel metallo phthalocyanines with four carboranyl clusters as photosensitizers for the photodynamic therapy of breast cancer cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019;129:124-131.
135. Senge, M.O. a Radomski, M.W. Platelets, photosensitizers and PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2013;10:1-16.
136. Shafirstein, G., Battoo, A., Harris, K., Baumann, H., Gollnick, S.O., Lindenmann, J., Nwogu, C.E. Photodynamic Therapy of Non-Small Cell Lung

- Cancer – Narrative Review and Future Directions. *Ann Am Thorac Soc.* 2016; 13(2):265-275.
137. Shafirstein, G., Bellnier, D., Oakley, E., Hamilton, S., Potasek, M., Beeson, K., Parilov, E. Interstitial photodynamic therapy – A focused review. *Cancers.* 2017;9:12.
138. Showalter, A., Limaye, A., Oyer, J.L., Igarashi, R., Kittipatarin, C., Copik, A.J., Khaled, A.R. Cytokines in immunogenic cell death: Applications for cancer immunotherapy. *Cytokine.* 2017;97:123-132.
139. Silva, A.P., Neves, C.L., Silva, E.D.A., Portela, T.C.L., Iunes, R.S., Cogliati, B., Severino, D., Baptista, M.D.S., Dagli, M.L.Z., Blazques, J.H., Silva, J.R.M.C.D. Effects of methylene blue-mediated photodynamic therapy on a mouse model of squamous cell carcinoma and normal skin. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 2018;23:154-164.
140. Song, L., Li, C., Zou, Y., Dai, F., Luo, X., Wang, B., Ni, J., Liu, Q. O<sub>2</sub> and Ca<sup>2+</sup> fluxes as indicators of apoptosis induced by Rose Bengal-mediated photodynamic therapy in human oral squamous carcinoma cells. *Photomedicine and Laser Surgery.* 2015;33(5):258-265.
141. Spagnul, C., Turner, L.C., Boyle, R.W. Immobilized photosensitizers for antimicrobial applications. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology.* 2015;150:11-30.
142. Srivastav, A.K., Mujtaba, S.F., Dwivedi, A., Amar, S.K., Goyal, S., Verma, A., Kushwaha, H.N., Chaturvedi, R.K., Ray, R.S. Photosensitized Rose Bengal-induced phototoxicity on human melanoma cell line under natural sunlight exposure. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology.* 2016;156:87-99.
143. Sternberg, E.D., D. Dolphin, C. Brückner. Porphyrin-based Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy. *Tetrahedron.* 1998;54:4151-4202.
144. Sulkowski, L., Pawelczak, B., Chudzik, M., Maciazek-Jurczyk, M. Characteristics of the Protoporphyrin IX binding sites on human serum albumin using molecular docking. *Molecules.* 2016;21(11).
145. Sunar, U. Monitoring photodynamic therapy of head and neck malignancies with optical spectroscopies. *World Journal of Clinical Cases.* 2013;1(3):96-105.
146. Thompson, S.A., Aggarwal, A., Singh, S., Adam, A.P., Tome, J.P.C., Drain, C.M. Compromising the plasma membrane as a secondary target in photodynamic

- therapy-induced necrosis. *Bioorganic and medicinal Chemistry*. 2018;26:5224-5228.
147. Vakifahmetoglu-Norberg, H., Ouchida, A.T., Norberg, E. The role of mitochondria in metabolism and cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017;482:426-431.
148. van Dongen, G.A.M.S., Visser, G.W.M., Vrouenraets. Photosensitizer-antibody conjugates for detection and therapy of cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2004;56:31-52.
149. Vorobjeva, N., Galkin, I., Pletjushkina, O., Golyshev, S., Zinovkin, R., Prikhodko, A., Pinegin, V., Kondratenko, I., Pinegin, B., Chernyak, B. Mitochondrial permeability transition pore is involved in oxidative burst and NETosis of human neutrophils. *BBA – Molecular Basis of Disease*. 2020;1866:165664.
150. Wang, B., Shi, L., Zhang, Y.F., Zhou, Q., Zheng, J., Szeimies, R.M., Wang, X.L. Gain with no pain? Pain management in dermatological photodynamic therapy. *British Journal of Dermatology*. 2017;177:656-665.
151. Wang, K. a Sun, D. Influence of semiflexible structural features of actin cytoskeleton on cell stiffness based on actin microstructural modeling. *Journal of Biomechanics*. 2012;45:1900-1908.
152. Wang, Y-Y., Liu, Y-C., Sun, H., Guo, D-S. Type I photodynamic therapy by organic-inorganic hybrid materials: From strategies to applications. *Coordination Chemistry Reviews*. 2019;395:46-62.
153. Weijer, R., Broekgaarden, M., Kos, M., van Vught, R., Rauws, E.A.J., Breukink, E., van Gulik, T.M., Storm, G. Enhancing photodynamic therapy of refractory solid cancers: Combining second-generation photosensitizers with multi-targeted liposomal delivery. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. 2015;23:103-131.
154. Weiss, A., van den Bergh, H., Griffioen, A.W., Nowak-Sliwinska, P. Angiogenesis inhibition for the improvement of photodynamic therapy: The revival of a promising idea. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012;1826:53-70.
155. Wen, X., Li, Y., Hamblin, M.R. Photodynamic therapy in dermatology beyond non-melanoma cancer: A update. *Photodiagnosis and Photodynamic therapy*. 2017; 19:140-152.

156. Xiao, H., Chen, Y., Alnaggar, M. Silver nanoparticles induce cell death of colon cancer cells through impairing cytoskeleton and membrane nanostructure. *Micron*. 2019;126:102750.
157. Xu, X.L.; Lin, F.W.; Du Y. et al. Graphene Oxide Nanofiltration Membranes Stabilized by Cationic Porphyrin for High Salt Rejection. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016; 8:12588-12593.
158. Xu, Y., Zhao, L., Bai, H., Hong, W., Li, C., Shi, G. Chemically Converted Graphene Induced Molecular Flattening of 5,10,15,20- tetrakis(1-methyl-4-pyridinio)porphyrin and Its Application for Optical Detection of Cadmium(II) Ions. *J Am.Chem Soc*. 2009; 131:13490-13497.
159. Xu, Z., Wang, S., Li, Y., Wang, M., Shi, P., Huang, X. Covalent functionalization of graphene oxide with biocompatible poly(ethylene glycol) for delivery of paclitaxel. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2014; 6:17268-17276.
160. Yoon, I., Li, J.Z., Shim, Y.K. Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. *Clinical endoscopy*. 2013;46(1):7-23.
161. Yu, W., Zhu, J., Wang, Y., Wang, J., Fang, W., Xia, K., Shao, J., Wu, M., Liu, B., Liang, C., Ye, C., Tao, H. A review and outlook in the treatment of osteosarcoma and other deep tumors with photodynamic therapy: from basic to deep. *Oncotarget*. 2017;8(24):39833-39848.
162. Zavadskaya, T.S. Photodynamic therapy in the treatment of glioma. *Experimental Oncology*. 2015;37(4):234-241.
163. Zhang, J., Jiang, C., Longo, J.P.F., Azevedo, R.B., Zhang, H., Muehlmann, L.A. An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2018;8(2):137-146.
164. Zhang, L., Yang, X., Zhang, F., Long, G., Zhang, T., Leng, K., Zhang, Y., Huang, Y., Ma, Y., Zhang, M., Chen, Y. Controlling the Effective Surface Area and Pore Size Distribution of sp<sup>2</sup> Carbon Materials and Their Impact on the Capacitance Performance of These Materials. *J Am Chem Soc*. 2013; 135:5921-5929.
165. Zhou, Z., Song, J., Nie, L., Chen, X. Reactive oxygen species generating systems meeting challenges of photodynamic cancer therapy. *Chem Soc rev*. 2016;45(23):6597-6626.
166. Zhu, S., Wu, F., Wang, K., Zheng, Y., Li, Z., Zhang, X., Wong, W.K. Photocytotoxicity, cellular uptake and subcellular localization of

amidinophenylporphyrins as potential photodynamic therapeutic agents: An in vitro cell study. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2015; 25:4513–4517.

167. Zimčák, P., M. Miletín. Fotodynamická terapie jako nová perspektivní metoda léčby nádorových onemocnění – I. Historie, základní princip. *Česká a slovenská farmacie.* 2004;5:219-224.

168. Zimčák, P., Miletín, M. Fotodynamická terapie jako nová perspektivní metoda léčby nádorových onemocnění – I. Přehled fotosensitizerů. *Česká a slovenská farmacie.* 2004;6: 271-279.

- <https://www.newport.com/f/xenon-arc-lamps>
- <https://eyelighting.com/hid-lamps/high-pressure-sodium>
- <https://www.clackamas.us/recycling/fluorescentlamps.html>
- [https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/198269?lang=en&region=CZ&cm\\_sp=Insite-\\_-caSrpResults\\_srpRecs\\_srpModel\\_erythrosin%20b-\\_-srpRecs3-2](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/198269?lang=en&region=CZ&cm_sp=Insite-_-caSrpResults_srpRecs_srpModel_erythrosin%20b-_-srpRecs3-2)
- [https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/330000?lang=en&region=CZ&cm\\_sp=Insite-\\_-caSrpResults\\_srpRecs\\_srpModel\\_bengal%20rose-\\_-srpRecs3-1](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/330000?lang=en&region=CZ&cm_sp=Insite-_-caSrpResults_srpRecs_srpModel_bengal%20rose-_-srpRecs3-1)



## 11 PUBLIKAČNÍ ČINNOST AUTORA

### Vědecké publikace uveřejněné v časopise s IF

Tomankova K., Kolarova H., Pizova K., Binder S., Konecny P., Kriegova E., **Malina L.**, Horakova J., Malohlava j., Kejlova k., Jirova D. Cytotoxicity and Antioxidative Effects of Herbal and Fruit Extracts In Vitro. *Food Biophysics* (9): 267-276, 2014, IF (2014) 1.551

Tomankova K., Polakova K., Pizova K., Binder S., Havrdova M., Kolarova M., Kriegova E., Zapletalova J., **Malina L.**, Horakova J., Malohlava J., Kolokithas-Ntoukas A., Bakandritsos A., Kolarova H., Zboril R. In vitro cytotoxicity analysis of doxorubicin loaded/superparamagnetic iron oxide colloidal nanoassemblies on MCF7 and NIH3T3 cell lines. *International Journal of Nanomedicine* (10): 949-961, 2015. IF (2015) 4.320

Tománková, K., J. Jiravová, M. Harvanová, **L. Malina**, J. Soukupová, S. Hradilová, K. Kejlová, J. Malohlava, L. Licman, M. Dvořáková, D. Jirová, H. Kolářová. Cytotoxicity, cell uptake and microscopic analysis of titanium dioxide and silver nanoparticles invitro. *Food and chemical toxicology* 20: 106-115, 2015. IF (2015): 3.584

Manišová, B., Binder S., **Malina L.**, Jiravová J., Langová K., Kolářová H. Phthalocyanine-mediated Photodynamic Treatment of Tumoural and Non-tumoural cell lines. *Anticancer Research* 35(7): 3943-3952, 2015. IF (2015): 1.895

**Malina L.**, Tomankova K.B., Malohlava J., Jiravova J., Manisova B., Zapletalova J., Kolarova H. The in vitro cytotoxicity of metal-complexes of porphyrin sensitizer intended for photodynamic therapy. *Toxicology in Vitro* 34: 246-256, 2016. IF (2016) 2.903

Malohlava J., Tomankova K., **Malina L.**, Jiravova J., Hanakova A., Pizova K., Zapletalova J., Kolarova H. Effect of Porphyrin Sensitizer MgTPPS<sub>4</sub> on Cytoskeletal System of HeLa Cell Line – Microscopic Study. *Cell Biochemistry and Biophysics* 74 (3): 419-425, 2016. IF (2016) 1.320

Jiravova J., Tomankova K.B., Harvanova M., **Malina L.**, Malohlava J., Luhova L., Panacek A., Manisova B., Kolarova H. The effect of silver nanoparticles and silver ions on mammalian and plant cells in vitro. *Food and Chemical Toxicology* 96: 50-61, 2016. IF (2016) 3.778

Tománková, K.B., Opletalová, A., Poláková, K., Kalytchuk, S., Jiravová, J., Malohlava, J., **Malina, L.**, Kolářová, H. Size-selected graphene oxide loaded with photosensitizer (TMPyP) for targeting photodynamic therapy *in vitro*. *Processes* 8 (2), 251, 2020. IF (2020) 1,963

Varvuolyté, G., **Malina, L.**, Bieliauskas, A., Hosiková, B., Simerská, H., Kolarova, H., Kleiziene, N., Kryštof, V., Sackus, A., Zukauskaite, A. Synthesis and photodynamic properties of pyrazole-indole hybrids in the human skin melanoma cell line G361. *Dyes and Pigments* 183, 2020. IF (2020) 4,613

### **Vědecké publikace uveřejněné v časopisech bez IF**

Hosikova B., Binder S., Lenobel R., Malohlava J., Hosik J., Jiravova J., **Malina L.**, Zapletalova J., Kolarova H. Effect of the zinc phthalocyanine mediated photodynamic therapy on cytoskeletal apparatus of HeLa cells. *Lékař a Technika*, 2019.

**Malina L.**, Barton Tomankova K., Hosikova B., Jiravova J., Hosik J., Zapletalova J., Kolarova H. Xanthene dyes-mediated *in vitro* photodynamic treatment of cancer and non-cancer cell lines. *Lékař a technika*.

### **Kapitoly v monografii**

J. Horakova, K. Tomankova, S. Harvanova, S. Hradilova, V. Masek, J. Malohlava, **L. Malina**, B. Manisova, K. Kejlova, D. Jirova and H. Kolarova: Study of the Penetration of Silver Nanoparticles into SVK14 Cells, *Microscopy: advances in scientific research and education*, 173-178, 2014

### **Publikace abstrakt ve sbornících**

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

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

**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

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