

Univerzita Palackého v Olomouci
Lékařská fakulta
Ústav lékařské biofyziky

**Role kyslíku v účinnosti fotodynamické terapie
na buněčných modelech v přítomnosti
senzitizerů**

Disertační práce

MUDr. RNDr. Martin Pola

Školitel: MUDr. Mgr. Robert Bajgar PhD.

Olomouc 2023

Děkuji svému školiteli MUDr. Mgr. Robertu Bajgarovi, PhD. za odborné vedení disertační práce a možnost s ním v průběhu studia pracovat. Děkuji také prof. RNDr. Haně Kolářové, CSc. a celému kolektivu Ústavu lékařské biofyziky za pomoc, cenné rady a přátelskou podporu.

Obsah:

Seznam zkratk a symbolů

1	Úvod.....	7
2	Fotodynamická terapie.....	12
2.1	Přehled.....	12
2.2	První generace fotosenzitizérů.....	12
2.3	Druhá generace fotosenzitizérů.....	15
2.4	Třetí generace fotosenzitizérů.....	33
2.5	Nanotechnologie v PDT.....	34
3	Cíle práce.....	35
4	Materiál a metodika.....	36
4.1	Fotosenzitizéry, hypoxie a hyperoxie.....	36
4.2	Fluorescenční spektroskopie.....	38
4.3	Měření singletového kyslíku.....	39
4.4	Buněčná linie, senzitizerů, hyperbarie a osvětlení.....	40
4.5	Fluorescenční mikroskopie.....	41
4.6	MTT test fototoxicity.....	42
4.7	Měření mitochondriálního membránového potenciálu.....	42
4.8	Respirometrie s vysokým rozlišením.....	43
5	Analýza dat.....	45
6	Výsledky.....	46
6.1	Fluorescenční spektroskopie.....	46
6.2	Měření produkce singletového kyslíku.....	51
6.3	Transmisní světelná a fluorescenční mikroskopie.....	55
6.4	MTT test fototoxicity.....	58
6.5	Měření singletového kyslíku.....	59
6.6	Měření mitochondriálního membránového potenciálu.....	60
6.7	Respirometrie s vysokým rozlišením.....	61
7	Diskuse.....	63
8	Závěr.....	67
9	Seznam obrázků.....	68

10	Seznam tabulek	70
11	Seznam literatury.....	71
12	Souhrn	85
13	Publikační činnost autora	87
13.1	Články v časopisech s IF:	87
13.2	Články v recenzovaných časopisech:.....	87
13.3	Publikovaná abstrakta:	87

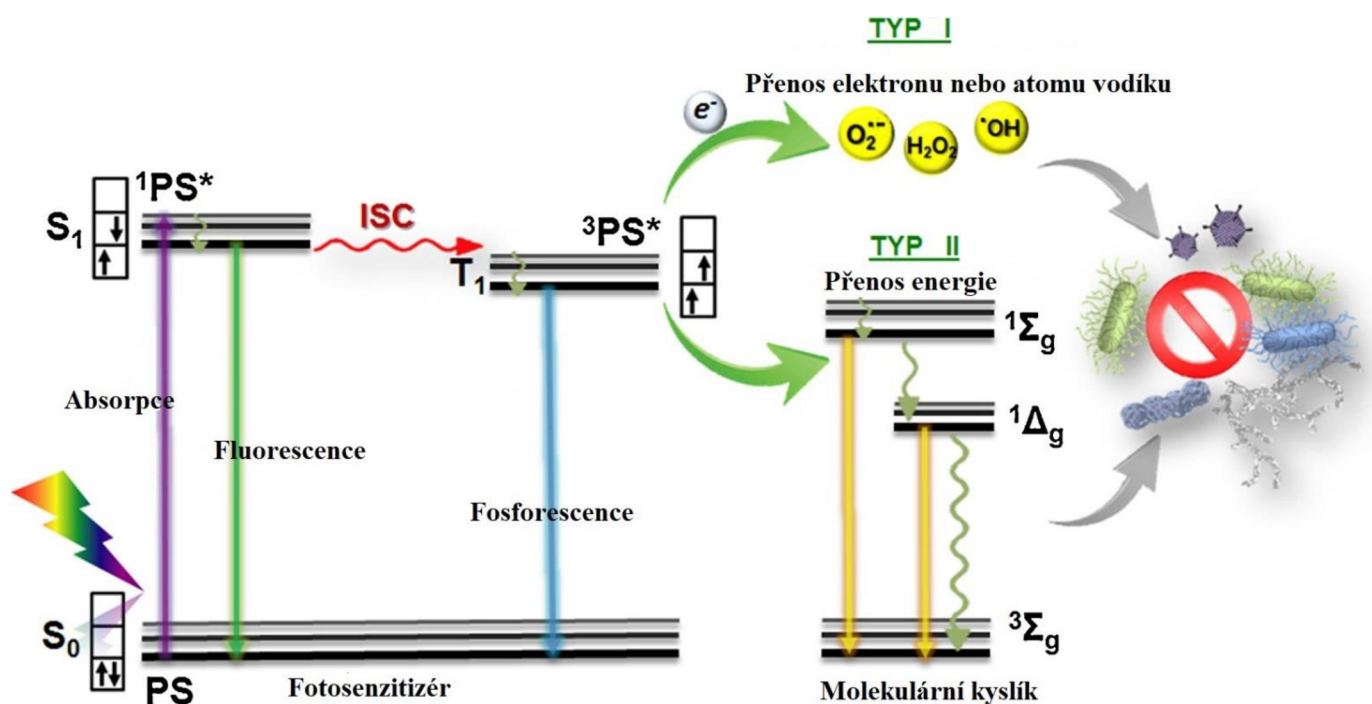
Seznam zkratek a symbolů

ANOVA	jednofaktorová analýza rozptylu
Antimycin A	antibiotikum s benzopyranovou strukturou, funguje jako mitochondriální inhibitor komplexu III, inhibitor přenosu elektronů z cytochromu b na cytochrom c1
CO ₂	oxid uhličitý
DMEM	kultivační medium (Dulbecco's modified Eagle's medium)
DMSO	dimethylsulfoxid (CH ₃) ₂ SO
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová
FCCP	karbonylkyanid-p-trifluormethoxyfenylhydrazon, protonofor
HeLa	buněčná linie lidského karcinomu děložního čípku
Hoechstova barviva	skupina modrých fluorescenčních barviv, která se vážou na DNA
JC-1	5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3' tetraethylbenzimidazolylkarbokyanin chlorid, fluorescenční sonda pro měření mitochondriálního membránového potenciálu
LED	light emitted diode, luminiscenční dioda
LDL	lipoprotein nízké denzity
LysoTracker	fluorescenční sonda označující lysosomy
MitoTracker	fluorescenční sonda označující mitochondrie
NAD(P)H	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát, koenzym oxidačně-redukčních reakcí
NUNC	96 – jamková kultivační mikrodestička firmy NUNC
O ₂	kyslík
¹ O ₂	singletový kyslík
O ₂ ^{•-}	superoxidový radikál
OH [•]	hydroxylový radikál
Oligomycin	inhibitor ATP
PBS	fosfátový pufr (phosphate-buffered saline)
PBS-G	fosfátový pufr (phosphate-buffered saline) s 5 mM D-glukózou
PDE	fotodynamický efekt
PDT	fotodynamická terapie
ROS	reaktivní formy kyslíku

SOSG	fluorescenční sonda pro singletový kyslík (singlet oxygen sensor)
Trypsin	trávicí enzym
Zn	zinek
Zn ²⁺	zinečnatý kationt
ZnPcS ₂	disulfonovaný zinečnatý ftalocyanin
ZnTPPS ₄	tetrasulfonovaný zinečnatý tetrafenylporfyrin

1 Úvod

Principem fotodynamického jevu (PDE) je absorpce světla specifickou sloučeninou známou jako fotosenzitizér. Po absorpci může excitovaný fotosenzitizér uvolnit přebytečnou energii fluorescencí nebo přejít do tripletového stavu. Těsný kontakt s okolními molekulami může následně vést k přenosu elektronů, což vede k tvorbě volných radikálů nebo radikálových iontů, které mohou dále interagovat s jinými molekulami produkujícími superoxidové aniontové radikály, peroxidy vodíku a hydroxylový radikál. Alternativně může excitovaný fotosenzitizér přenést energii na molekulu kyslíku za vzniku singletového kyslíku (Obrázek 1). I když obě reakce mohou probíhat současně, poměr mezi nimi závisí na chemické struktuře fotosenzitizérů a molekul substrátu, stejně jako na koncentraci kyslíku [1, 2].



Obrázek 1: Mechanismy fotodynamické inaktivace různých patogenů ilustrované Jablonského diagramem. S_0 – singletový základní stav, S_1 -první singletový excitovaný stav, PS fotosenzitizér v základním stavu, $1PS^*$ - fotosenzitizér v singletovém excitovaném stavu, $3PS^*$ - fotosenzitizér v tripletovém excitovaném stavu, ISC-mezisystémový přechod (intersystem crossing), $1\Delta_g$ -singletový molekulární kyslík. [3]

Produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) pomocí PDE je základem fotodynamické terapie (PDT), která se stává alternativní metodou při léčbě řady onkologických, kardiovaskulárních, kožních a očních onemocnění. PDT se také používá při léčbě chronického zánětu a bakteriálních infekcí rezistentních na léky [4].

Fotodynamická terapie (PDT) užívá lokálního nebo systémového podání fotosenzitivní sloučeniny (fotosenzitizéru), která je převážně absorbována a uložena v patologických tkáních nebo patogenních organismech. Energie světla je následně přenesena přes fotosenzitizér na kyslík nebo jiné molekuly, které vyvolají vážné změny vedoucí k selektivnímu poškození patologických buněk.

Popisovaná fotocytotoxická reakce proběhne pouze v patologické tkáni v oblasti distribuce fotosenzitizéru a umožňuje tak selektivní destrukci. Fotosenzitizér se koncentruje ve značně vyšší koncentraci v nádorových buňkách než v normálních buňkách. Důvodem takové biodistribuce může být tendence fotosenzitizéru se přednostně spojovat s lipoproteiny nízké denzity (LDL) společně s cholesterolem, který je nezbytný pro vytvoření membrán během buněčného dělení. Výrazně se dělicí nádorové buňky se vyznačují zvýšeným příjmem LDL lipoproteinů, které fungují jako přenašeče fotosenzitizéru do nádorové tkáně. Navíc tkáně se zvýšenou mitotickou aktivitou se vyznačují excesivním množstvím LDL receptorů na svém povrchu. Afinita senzitivizéru k sérovým lipoproteinům, zvláště k LDL, hraje důležitou roli k dodávání těchto látek do tumorózní tkáně.

V současnosti je známo, že PDT vede k systémové protinádorové reakci. Fotodynamická terapie má vliv na cévní systém nádoru a stimuluje imunitní systém. Proces destrukce nádorové tkáně je také navozen aktivací koagulačních procesů (okluzí cév tumoru) a lokálním nahromaděním buněk zánětu. Nádorové buňky, které unikly smrti způsobené přímým fototoxickým efektem PDT, stále mohou být zničeny cestou nepřímého poškození cév vyživující tumor. Reaktivní kyslíkové radikály ničí cévní endoteliální buňky aktivací trombotických procesů, agregací destiček a uzávěrů cév tromby. Jako výsledek uzávěru cév vzniká stálá hypoxie tumorózní tkáně vedoucí ke smrti buněk.

Dále efektivita PDT metod je spojena se systémovou protinádorovou imunitní odpovědí organismu. PDT ničí struktury tumoru a takto umožňuje přímou interakci mezi imunitními buňkami a buňkami nádoru. Přímá destrukce tumorózní tkáně vede k silné zánětlivé reakci a neoplazmatické infiltraci leukocytů. Fotodynamické zničení membrán vede k aktivaci fosfolipáz a cyklooxygenáz způsobujících masivní uvolnění mediátorů zánětu – produktů hydrolýzy lipidů a metabolitů kyseliny arachidonové. Fotopoškození stěn cév

přitahuje neutrofilů a makrofágy. Degradace neutrofilů stejně jako uvolnění lysosomálních enzymů a chemotaktických faktorů dále přispívá k destrukci tumorózní tkáně, zesilující destrukční proces počatý dřívějším ozářením [5].

Přímý cytotoxický efekt je výsledkem inkorporace senzitizeru do buňky a účinků následně produkovaných ROS. O tom, jaké buněčné struktury budou poškozeny při PDT, rozhoduje tedy lokalizace senzitizeru v buňce [6]. Lipofilní senzitizer (například hypericin, mTHPC a Photofrin) se váží na membrány a vykazují svůj efekt přímo fotoperoxidací a poškozením samotné membrány nebo inaktivací enzymů v ní vázaných. Na druhou stranu hydrofilní senzitizer (například ALPcS₄) se kumulují v lysosomech, kde poškození těchto organel vede k uvolnění hydrolytických enzymů a kaskádě následných dějů vedoucích ke smrti buňky [7]. Intracelulární umístění se však může změnit po ozáření, tak jako třeba u senzitizerů lokalizovaných v lysosomech následnou relokací do jiných organel a jejich poškozením [8].

Na subcelulární úrovni jsou hlavními cíly PDT buněčná i mitochondriální membrána, lysosomy a z části i DNA [9]. Změny v DNA patří k důležitým procesům spíše během pozdější aktivace apoptotické odpovědi.

Mnoho hydrofobních senzitizerů se inkorporuje do mitochondriální membrány a svůj primární účinek vykazuje zde. Vzhledem k tomu, že ATP potřebné k řadě energetických pochodů v buňce je produkováno právě v mitochondriích, bylo jejich poškození studováno a prokázána inhibice velkého množství enzymů v nich obsažených [10]. Inhibovány jsou především membránové enzymy. Cytosolové enzymy jsou méně náchylné k poškození. Tato pozorování souvisí s velice krátkou životností singletního kyslíku ve vodném prostředí oproti lipidové vrstvě.

Buněčná membrána je dalším místem, kde se hromadí hydrofobní senzitizer. Po ozáření senzitizeru dochází k fotoperoxidaci lipidů v ní obsažených a může dojít až k její ruptuře. Toto však bylo pozorováno až v pozdějších fázích, dávno po poškození mitochondriálních proteinů. Oxidované fosfolipidy slouží jako startovní signál pro buněčnou smrt.

Důležitou součástí při PDT je kyslík a způsob ozáření. Lokální nedostatek kyslíku může být způsoben jeho rychlým spotřebováním během fotodynamického procesu nebo u PDT in vivo snížením krevního zásobení po uzavěru cév. I když tento druhý efekt výrazně přispívá k dlouhodobé kontrole nádoru, může v první fázi omezovat biologickou odpověď na terapii. Jednou z metod, jak tyto problémy odstranit je snížit energii světla a umožnit tak

pomalejší spotřebovávání kyslíku, druhou je aplikace světla po frakcích, mezi nimiž je umožněno tkáni se opětovně okysličit [11].

Zánik buněk po PDT probíhá procesem apoptózy nebo nekrózy [12, 13]. Nekróza je forma buněčné smrti, která nastává po výrazném poškození buňky. Naproti tomu apoptóza je buňkou naprogramovaná smrt. Ta má tu vlastnost, že při ní nedochází k masivnímu uvolnění buněčného obsahu do okolí a nedojde tak k výrazné zánětlivé reakci [14].

Životaschopnost nádorových buněk závisí také na množství živin a kyslíku dodávaných cévami. Zásah do cévního zásobení je slibnou cestou k léčbě nádoru. PDT indukuje vazokonstrikci v ozářené oblasti a omezuje tím okysličení nádoru [15]. Jde o důsledek porušené rovnováhy mezi vazoaktivními a vazokonstrikčními faktory. Po několika hodinách dochází k druhé fázi cévního uzávěru charakterizované tvorbou trombu [1]. Do zasažené oblasti se nedostávají nutrimy a to je pak výrazným přínosem k dlouhodobé kontrole nádoru a k jeho destrukci.

U většiny senzitizerů se proto konečný tumoricidní efekt PDT připisuje spíše tomuto efektu než přímé cytotoxicitě. Relativní přínos obou efektů se ovšem liší v závislosti na použitém senzitizeru a intervalu mezi jeho podáním a ozářením. Pro krátké intervaly je většina senzitizerů ještě v celkovém oběhu a jeho koncentrace v nádoru je nízká. Proto je v těchto případech přímé působení poměrně malé a kontrolu nad nádorem zajišťuje především cévní uzávěr. Pro dlouhé intervaly, kdy je senzitizer již víceméně kumulován v cílové tkáni a jeho koncentrace je zde vysoká, většina buněk umírá přímo po ozářením. Ovšem i v tomto případě hraje vazokonstrikce a tvorba trombů důležitou roli. Právě z těchto důvodů může být často nutné, k dosažení kompletní odpovědi, ozářit také okraje zdravé tkáně obklopující nádor.

PDT ovlivňuje výrazným způsobem imunitní systém. Byly pozorovány jak aktivace, tak suprese imunitního systému [16]. Velice často ovšem byla v místech aplikace PDT pozorována aktivace imunitního systému a indukce silně zánětlivého procesu, jež se považují také za jeden z efektů vedoucích ke konečnému zničení nádorové tkáně [1]

Napadená tkáň uvolňuje velké množství buněčných residuí, cytokinů a dalších prozánětlivých signálů. Po několika minutách po ozářením lze pozorovat velké množství neutrofilů vnikajících do poškozeného místa. Ty vylučují enzymy a ROS, které ničí endotelové a nádorové buňky a dále zesilují zánětlivý proces. Po smrti neutrofilů se uvolní jejich buněčný obsah, který dále působí jako chemotaktický signál pro další zánětlivé buňky. Do poškozené tkáně se dostávají mastocyty a uvolňují granule obsahující vazoaktivní složky a

cytokiny. Dále se zde dostávají monocyty a makrofágy fygocytující zbytky buněk a vitální nádorové buňky. PDT také pravděpodobně aktivuje specifickou protinádorovou imunitu [17].

2 Fotodynamická terapie

2.1 Přehled

Fotosenzitizéry používané v PDT představují různé skupiny chemických sloučenin včetně porfyrinů, chlorofylů, bakteriochlorinů, ftalocyaninů, feoforbidů, purpurinů, kyseliny 5-aminolevulové (ALA), texafirinů atd. Porfyrinové deriváty patří k první generaci fotosenzitizérů. Tato skupina vykazuje vysokou absorpci v Soretově pásmu a špatnou rozpustnost v polárních rozpouštědlech, což znevýhodňuje jejich použití pro klinické účely [18]. Druhá generace fotosenzitizérů, jako jsou ftalocyaniny, chloriny a purpuriny, mají vyšší schopnost akumulace v cílových buňkách a absorbují světlo v červené oblasti, což umožňuje lepší pronikání tkání [19]. Zvýšení rozpustnosti hydrofobních fotosenzitizérů lze dosáhnout například sulfonací. Dále tvorba komplexu se zinkem, hliníkem zvyšuje výtěžek a životnost tripletového stavu fotosenzitizéru a tím může být zvýšena produkce singletového kyslíku [20, 21, 22, 23].

2.2 První generace fotosenzitizérů

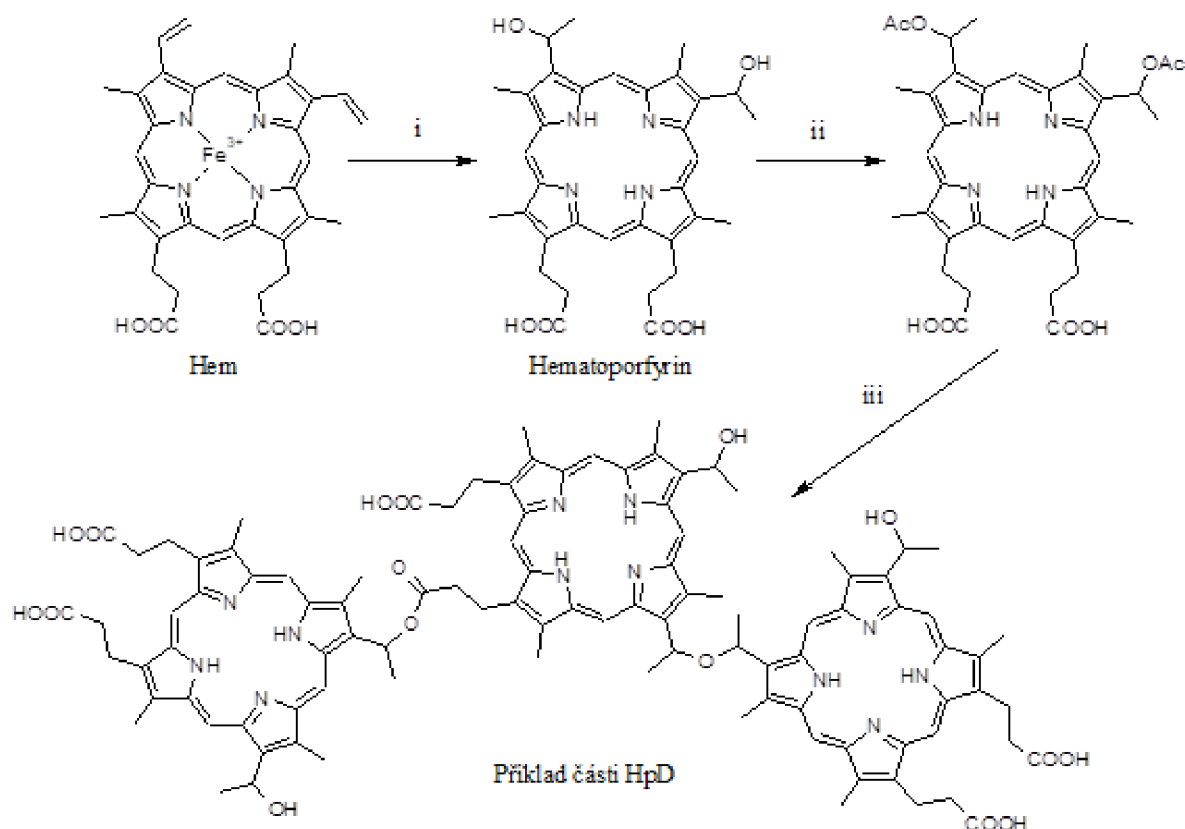
První aplikace fotosenzitizéru v kombinaci se světlem může být připsána studentovi lékařství z Mnichova Oscaru Raabovi. Během experimentu s akridinovým barvivem si Raab všimnul, že se u protozoí, které byly nejdříve ošetřeny barvivem a poté ozářeny, objevuje fluorescence. Tento fenomén byl spojen se spotřebou kyslíku a toxickým efektem, který vedl ke smrti protozoí. Raab prezentoval toto pozorování profesoru Von Tappeinerovi, který vysvětlil a popsal tento fenomén jako fotodynamický efekt v roce 1904. Brzy poté byl proveden v roce 1905 první úspěšný pokus léčby nádoru s použitím 5% roztoku eosinu avšak tato terapie nezískala širokou pozornost a byla po desetiletí zapomenuta.

Fotosenzitizéry byly představeny pro léčbu v komerčním měřítku poprvé v roce 1970 doktorem Thomase Doughertym a jeho kolegy. Testovali ve vodě rozpustnou směs porfyrinů nazvanou hematoporfyrinové deriváty (HpD). HpD byly získány čištěním a chemickou modifikací hematoporfirinů (Hp). HpD ve srovnání s Hp vykazovaly lepší tkáňovou selektivitu pro tumory a menší fotosenzitizující potenciál pro kůži. Následně směsi porfyrinových dimerů a oligomerů izolovaných z HpD byly dostupné pod obchodním názvem Photofrin. V

současnosti Photofrin, také známý jako porfimer sodný, zůstává nejvíce užívaným fotosenzitizerem. I přes širokou aplikaci v PDT jeho v klinické aplikaci užití má omezení, které ve výsledku vyplývá z následujících vlastností:

- nízká chemická čistota (je to směs více, než 60 molekul)
- špatná prostupnost světla do tkání pro absorpční maximum při relativně krátké vlnové délce 400nm
- navíc, po PDT, přetrvává po několik týdnů hypersenzitivita kůže, kvůli dlouhému poločasu fotosenzitizeru a jeho vysoké akumulaci v kůži.

HpD je směs produktů vzniklých acylací hematoporfyrinu izolovaného nejprve z hemu. Byl poprvé popsán Lipsonem v roce 1961. Hem se zbavuje centrálního atomu železa působením HBr v kyselině octové. Během tohoto procesu dochází k adici HBr na periferní dvojné vazby, avšak během dalšího kroku dochází ve vodném prostředí k hydrolyze bromidu za vzniku vlastního hematoporfyrinu. (Obrázek 2).



Obrázek 2: Syntéza HpD. Reakční podmínky: i) HBr, CH₃COOH, H₂O, ii) H₂SO₄, CH₃COOH, iii) NaOH.

Ten se ze začátku používal také jako senzitizer, avšak později bylo zjištěno, že ne samotný hematoporfyrin je odpovědný za vlastní PDT efekt, nýbrž že to jsou oligomerní frakce, které vznikají při izolaci z krve. Tyto frakce byly později obohaceny na úkor monomerů [24] působením kyseliny sírové v prostředí kyseliny octové a následnou neutralizací hydroxidem sodným. Toto vede ke složité směsi dimerů a oligomerů, jejichž jednotky jsou pospojovány buď esterovými nebo éterovými vazbami. Tato směs byla dále částečně vyčištěna pomocí gelové chromatografie a stala se základem Photofrinu®. Ten byl vyvinut firmou QLT PhotoTherapeutics (Vancouver, Kanada) a poprvé schválen k léčbě rakoviny močového měchýře v roce 1993 v Kanadě jako vůbec první látka v PDT. V roce 2000 byla práva k Photofrinu® prodána firmě AxcanPharma (Montreal, Kanada), která jej v současnosti prodává. Osvětlení je zpravidla provedeno po 48 hodinách po jeho aplikaci, kdy se akumulace senzitizeru v nádorové tkáni zdá být optimální.

Photofrin® má ovšem několik nevýhodných vlastností. Je to velice nízký extinkční koeficient při 630nm ($1170 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), a proto je potřeba vysokých koncentrací senzitizeru a hustoty energie použitého světla. Další nevýhodou je malý výtěžek singletního kyslíku a případné použití krátkovlnného záření k excitaci [6]. Dále, i po vyčištění stále sestává ze směsi asi 60 látek, a tudíž je velice složité reprodukovat přesně jeho složení. Také vychytávání v nádorech není příliš selektivní a jeho vysoké koncentrace lze nalézt v játrech, ledvinách, slezině a zejména kůži [25]. V kůži pak přetrvává až 6 týdnů, což způsobuje dlouhodobou (2 měsíce) fotosensitivitu a pacienti nesmí přijít do kontaktu s ostrým světlem [23].

Photofriny i přes veškeré výše uvedené nežádoucí vlastnosti přesto stále zůstávají nejrozšířenějšími senzitizery a jsou používány v mnoha zemích k léčbě prekancerózních stavů (Barrettův jícen, cervikální dysplázie) i vlastních kancerózních stavů (karcinom cervixu dělohy, jícnu, plic, močového měchýře, žaludku, bronchiální karcinom, nádory žlučníku) [26]. Navíc je dále testován i pro léčbu dalších nádorových onemocnění jako jsou nádory oblasti hlavy a krku, střev, kůže, prsu a nekancerózní onemocnění jako je psoriáza nebo k prevenci arteriální restenózy.

Používají se také deriváty Photofrinu®. Např. v Rusku byl schválen Photohem® k léčbě rakoviny kůže, prsu, jícnu, plic, hrtanu a žaludku. Také se používá k léčbě psoriázy a jako profylaxe zákalu korneálního štěpu [27].

Nevýhody této první generace fotosenzitizerů si vyžádaly potřebu studování nových látek a vytvoření druhé generace fotosenzitizerů.

2.3 Druhá generace fotosenzitizérů

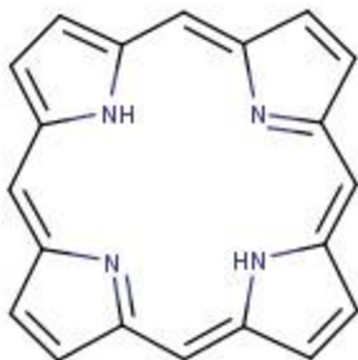
V počátcích roku 1980 začaly studie nové generace fotosenzitizérů. Bylo navrženo několik stovek substancí s potenciálem fotosenzitizace, pouze několik z nich bylo užito pro klinické pokusy. Počet látek oficiálně povolených pro klinické použití v protinádorové PDT je dokonce menší. Dnes skupina druhé generace fotosenzitizérů zahrnuje deriváty hematoporfirinů a syntetické fotosenzitizéry jako kyselina 5-aminolevulová, deriváty benzoporfyrinů, texafyriny, deriváty tchipurinů, chlorin, stejně jako analogy bakteriochlorinů a ftalocyaniny

Užití kyseliny 5-aminolevulové (ALA) se ukázalo jako důležitý . ALA je prekurzor protoporfirinu IX, který se stává aktivním fotosenzitizérem pouze, když je transformován na protoporfyrin. ALA nebo její estery jsou používány topicky nebo orálně v mnoha klinických aplikacích. Druhá generace fotosenzitizérů je charakterizována vyšší chemickou čistotou, vyšším výnosem singletového kyslíku a lepší prostupností světla do hlouběji uložených tkání pro jejich absorpční maximum v oblasti vlnových délek 650-800 nm. Navíc vykazují menší vedlejší účinky, které vyplývají z vyšší selektivity pro nádorovou tkáň a vyšší eliminace fotosenzitizéru z těla.

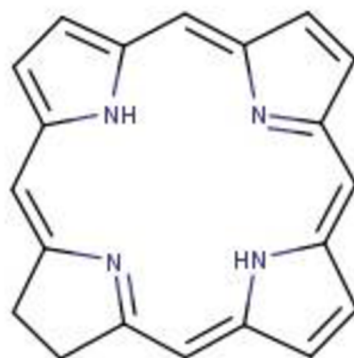
Hydrofilních vlastností lze dosáhnout vhodnou substitucí, například sulfonací jako u tetrafenylporfyrinů nebo ftalocyaninů. Na druhé straně ale zvýšená hydrofilie snižuje schopnost senzitivizérů proniknout přes buněčnou membránu. Pro tento negativní efekt vykazují nejlepší senzitivizéry amfifilní povahu [28].

Zvýšení výtěžku a doby života tripletového stavu je dosaženo tvorbou komplexu s některými kationty, například s Al^{3+} , Zn^{2+} . Některé senzitivizéry druhé generace byly již zavedeny do klinické praxe (kyselina aminolevulinová, verteporfín, temoporfín) a to nejen k léčbě nádorových onemocnění, ale i například v oftalmologii pro léčbu senilní makulární degenerace (AMD) [29].

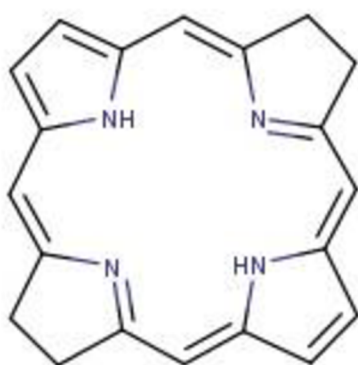
Chloriny vznikly hydrogenací jedné exopyrrolové dvojné vazby porfyriu, zatímco bakteriochloriny hydrogenací dvou exopyrrolových vazeb porfyriu (Obrázek 3). Výsledkem je silná absorpce při vlnových délkách nad 650 nm.



Porfyrin



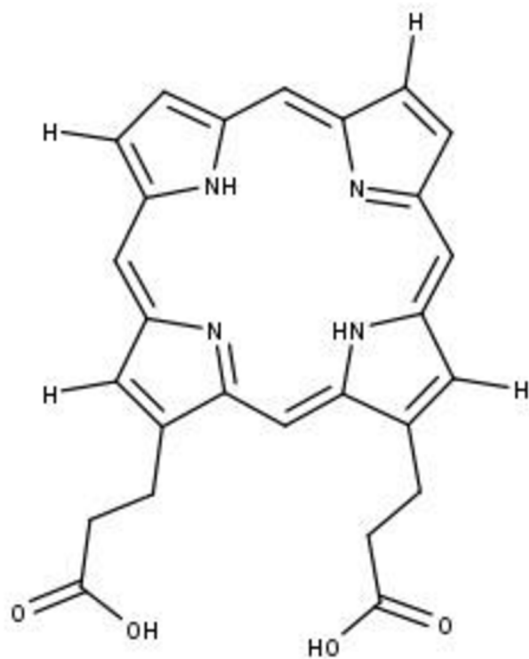
Chlorin



Bakteriochlorin

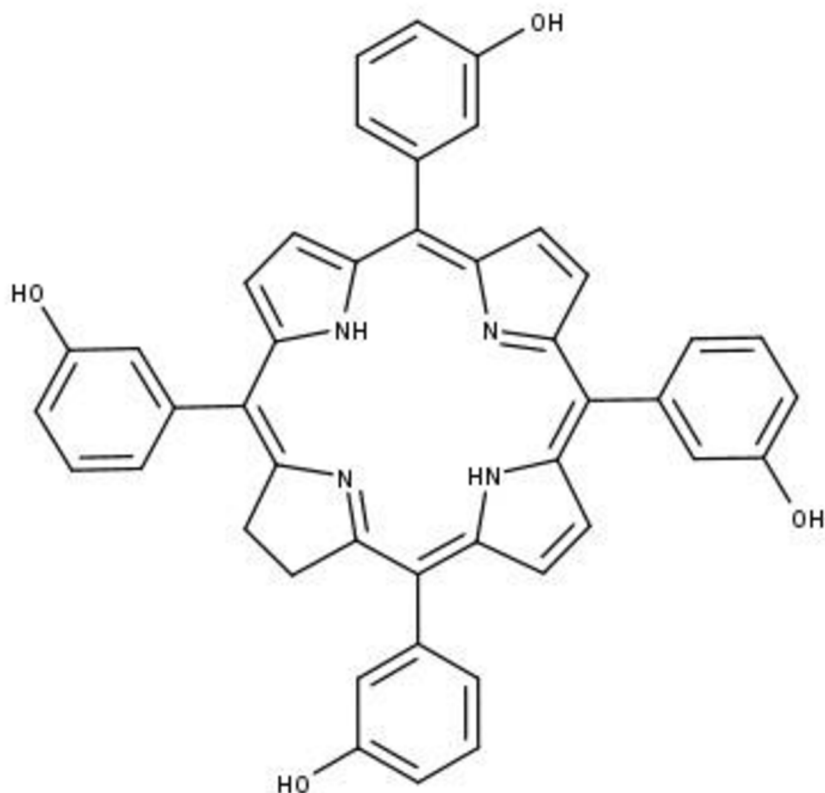
Obrázek 3: Rozdíl mezi porfyriny, chloriny a bakteriochloriny

Chloriny a bakteriochloriny mají výborné optické vlastnosti. Jejich výhodou tedy je, že mohou být použity k léčbě mnohem hlouběji uložených nádorů, než jaké jsou schopny léčit senzitizerý první generace. Nejhojněji se používá Bonellin (Obrázek 4) a Temoporfin.



Obrázek 4: Chemická struktura Bonellinu

Temoporfin (tetra(meta-hydroxyfenyl)chlorin, mTHPC, , Obrázek 5) je zástupce skupiny chlorinů, byl syntetizován již v roce 1989 jako součást série porfyrinů, ze které se později ukázal být neúčinnější [6]



Obrázek 5: Chemická struktura Temoporfinu

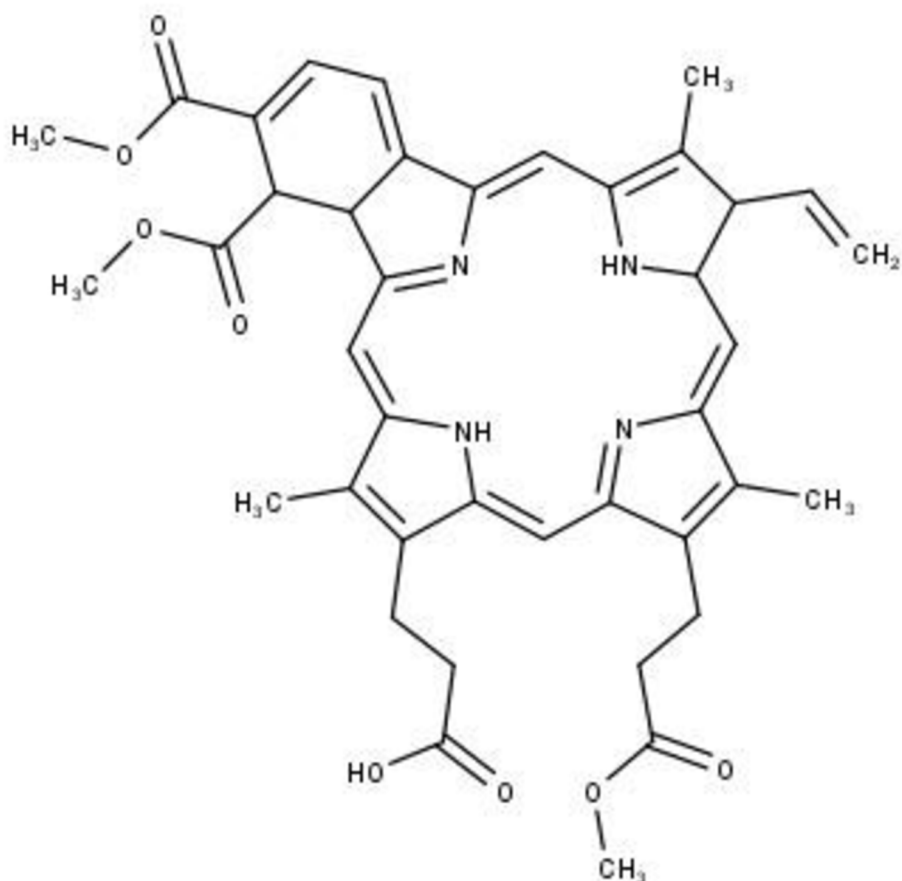
Jeho absorpční maximum sice není příliš posunuté k červené oblasti (652 nm), avšak extinkční koeficient je při tomto maximu asi 10krát vyšší než u Photofrinu® ($\epsilon_{652} = 22400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $1170 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ při 630 nm). Pro dostatečný účinek jsou potřebné velice malé koncentrace senzitizeru ($0,1 \text{ mg kg}^{-1}$) tak i energie světla, což ho činí přibližně 2000krát účinnějším, než je Photofrin®. Tato vlastnost se dá vysvětlit pravděpodobně vysokým extinkčním koeficientem, dobrou produkcí singletního kyslíku a vytvářením více druhů cytotoxických oxidů.

Díky hydrofobnímu chlorinovému jádru a hydroxyfenylové skupině v pozici meta má velkou fotosensitivitu.

Farmakokinetické parametry ovšem již nejsou tak pozitivní. Selektivita vychytávání mezi nádorovou a zdravou tkání je poměrně malá (poměr nádorová/zdravá tkáň asi 1,3 – 2,9) [30] a optimální čas mezi injekčním podáním a ozáření se v různých studiích liší, i když nejčastěji se uvádí čas 3–4 dny. Toto není pro pacienta příliš výhodné. Také poměrně dlouho přetrvávající kožní fotosensitivita (asi 2–3 týdny) pacienty omezuje.

I přes nepříznivé farmakokinetické parametry byl Foscan® (Biolitec Pharma, (Edinburgh, Velká Británie) v Evropě (EU, Norsko, Island) v říjnu roku 2001 zaveden k léčbě nádorů oblasti hlavy a krku rezistentních k jiným terapiím.

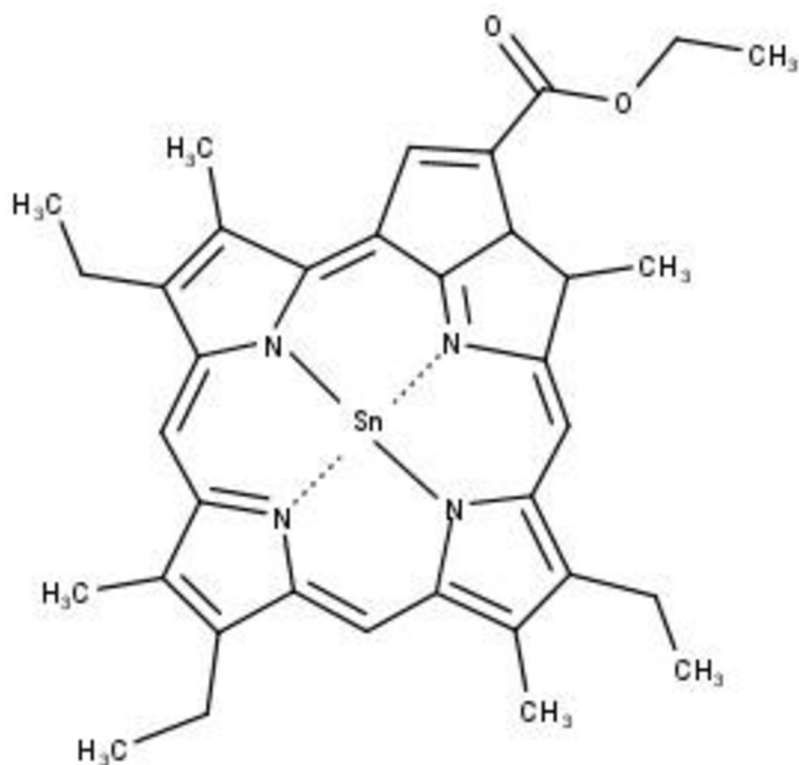
Verteporfin (BPD-MA, Visudyne™) je senzitizer chlorinového typu. Základní skelet verteporfinu (Obrázek 6) je blízký porfyrinům (zkratka BPD-MA z anglického názvu benzoporphyrin-derivative monoacid ring A). Byl vyvinut firmou Quadralogic Technologies. Tato hydrofobní látka je charakteristická tím, že má na třetí nebo na čtvrté pozici v porfyrinovém řetězci navázán monoacid.. Jeho absorpční maximum je posunuto až k vlnové délce 690 nm, při níž proniká světlo přibližně dvakrát hlouběji než při 630 nm, extinkční koeficient je $34000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Verteporfin je velice rychle absorbován nádorovou tkání, avšak také velice rychle vylučován jak z těchto tkání, tak z těla (kožní fotosensitivita tudíž přetrvává pouze několik dní). Nejlepší poměr mezi nádorovými a ostatními tkáněmi je dosažen přibližně po 30–150 minutách a pak koncentrace v tumorech opět velice rychle klesá [31]. I když lze adekvátní PDT odpověď získat přibližně po 2–3 hodinách po injekční aplikaci, selektivita není ideální vzhledem ke stále velkému množství cirkulující látky v krevním oběhu.



Obrázek 6: Chemická struktura Verteporfinu

Největších úspěchů ovšem firma QLT PhotoTherapeutics (společně s CIBA Vision Corporation, Duluth, GA, USA) dosáhla s tímto senzitizerem v oftalmologii. Od uvedení na trh v prosinci roku 1999 je dnes tato látka registrována v mnoha zemích (mimo jiné i v ČR) pod obchodním názvem Visudyne™. Používá se k terapii AMD. AMD má primární postavení v příčinách ztráty zraku u lidí západní civilizace starších padesáti let. Dochází při ní k rychlému růstu abnormálních cév pod retinou centrální oblasti. Takřka u 80–90 % pacientů nezabírá žádná léčba. Vzhledem k tomu, že PDT indukuje uzávěry cév, jsou látky jako verteporfin ideální pro léčbu této nemoci.

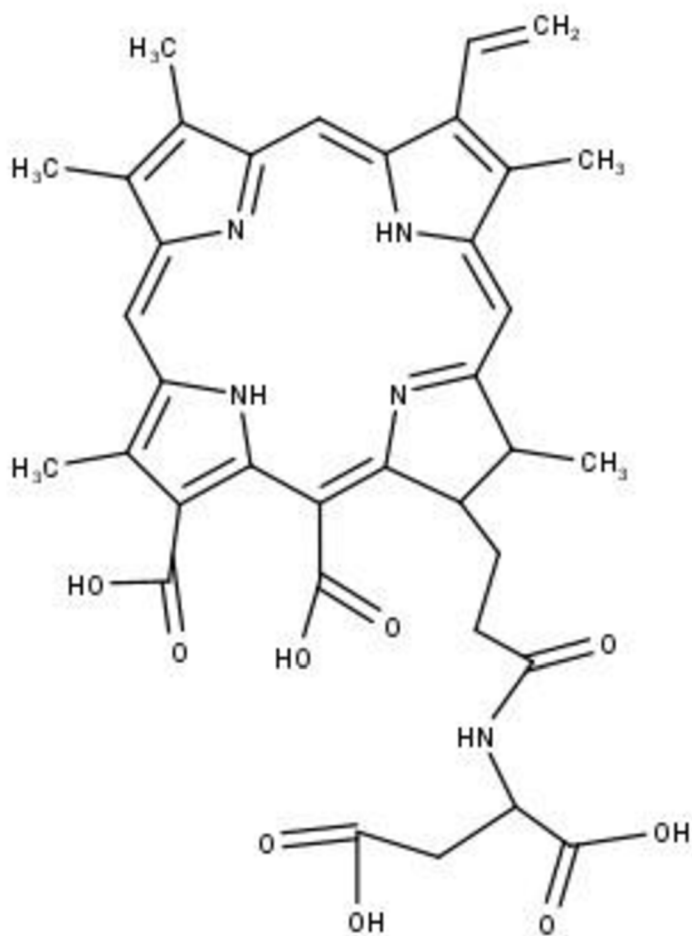
Etiopurpurin-komplex s cínem (SnET₂, Purlytin®, Obrázek 7) patřící do skupiny metalochlorinů (má uprostřed jádra chelatovaný kation cínu) má silné absorpční maximum při 660 nm, avšak i přesto pro účinnou terapii jsou potřebné vysoké hustoty energií světla (srovnatelné s Photofrinem®).



Obrázek 7: Chemická struktura SnET2

Také kožní fotosensitivita není oproti HpD výrazně snížena (přetrvává po dobu asi 10–14 dní po podání) [6]

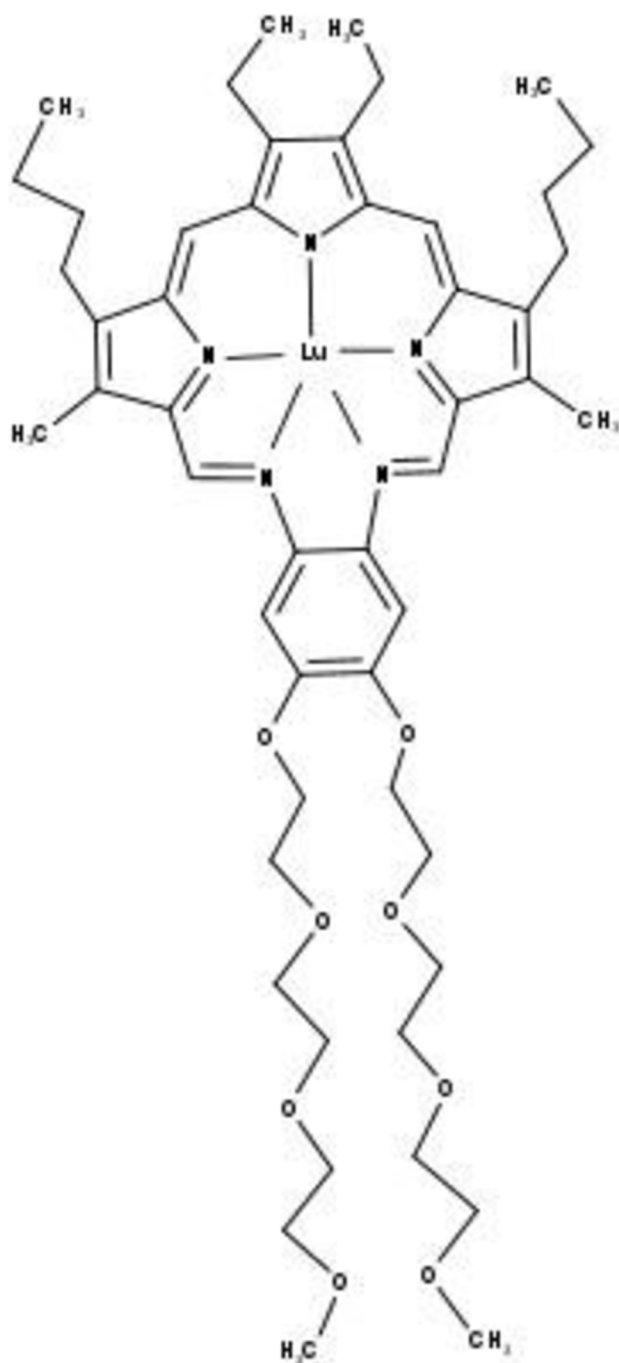
Talaporfin (Obrázek 8) je další ze syntetických chlorinů a také má silnou absorpci při vyšších vlnových délkách (664 nm, $\epsilon_{664} = 38000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).



Obrázek 8: Chemická struktura Talaporfinu

Podobně jako verteporfin se z tkání rychle vylučuje, a tak k ozáření dochází po 4 hodinách po intravenózní aplikaci [28]. V nízkých koncentracích senzitizeru se regrese nádoru projevuje pouze krátkodobě, při vyšších je regrese dlouhodobá, ovšem za cenu ztráty selektivity. Kožní fotosensitivita byla označena jako „dočasná“ [32].

Motexafin lutecium (Lutex, Optrin®, Antrin®, Lutrin®, Obrázek 9) patří do jiné chemické skupiny než předchozí látky příbuzné porfyrinům.



Obrázek 9: Chemická struktura Motexafin lutecium

Jedná se o derivát texafyrinu (s charakteristickým pětiusíkatým makrocyclickým jádrem) s centrálně chelatovaným atomem lutecia. Mezi jeho velké výhody patří silná absorpce při dlouhé vlnové délce 732 nm a dobrá selektivita pro maligní tkáň. Je také rychle vylučován z krevní plazmy. K ozáření dochází po 3 hodinách po aplikaci a vyvíjí se pouze slabá fotosensitivita . Velice rychlá clearance tohoto senzitizeru z krevní plazmy umožňuje

opakovanou PDT aplikaci, jež při pokusech na zvířatech vykazuje lepší odezvu než pouze jediná aplikace.

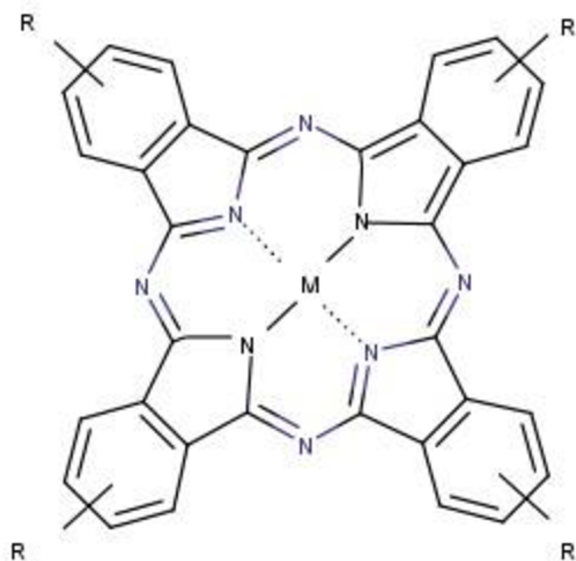
Vzhledem k absorpci při dlouhé vlnové délce světla lze motexafin lutecium používat i u silně pigmentovaných nádorů, například u maligního melanomu [33], skrze něž by světlo nižších vlnových délek (používaných k aktivaci předchozích senzitizerů) nepronikalo.

Lutrin® je obchodní název, pod nímž firma Pharmacyclics (Sunnyvale, CA, USA) testuje motexafin lutecium v onkologických aplikacích.

Antrin® je obchodní název pro motexafin lutecium sloužící k léčbě kardiovaskulárních onemocnění. Při metodě, jíž se říká fotoangioplastika se motexafin lutecium po intravenózní aplikaci kumuluje v aterosklerotických plátech. Cílová oblast se poté ozáří světlem přivedeným optickým vláknem. Po aktivaci senzitizeru může dojít k odstranění aterosklerotických plátů.

Optrin® je obchodní název pro motexafin lutecium, jež byl testován k léčbě AMD

Ftalocyaniny (Obrázek 10) jsou další velice nadějnou skupinou senzitizerů s širokým komerčním využitím. Ftalocyaniny mají pyrrolovou skupinu vázanu k benzenovému řetězci spíše aza nitrogenovou vazbou než metan karbonovou vazbou, což způsobuje, že absorpční aktivita se posune k delším vlnovým délkám. Tento posun v červené oblasti světla je výhodný pro lepší penetraci do tkáně. S posunutou maximální vlnovou délkou absorpce směrem k červené části spektra (670–700 nm) a zesílenou absorpcí při této vlnové délce (ϵ až $200000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) se stávají velice perspektivními.



Obrázek 10: Chemická struktura ftalocyaninů

Důležité pro vlastní PDT účinek je přítomnost chelatovaných centrálních kovů a polokovů, z nichž některé prodlužují trvání tripletového stavu senzitizeru a tím i zvyšují jeho účinnost v PDT (např. Zn, Al, Cl, Si v komplexech $ZnPcS_2$, $ClAlPcS_2$ nebo $SiPcS_2$). Tripletní stav ftalocyaninů bez kovu nebo s paramagnetickými kovy jako Cu, Co, Fe je méně stabilní, a navíc takto připravená látka vykazuje nízkou fototoxicitu.

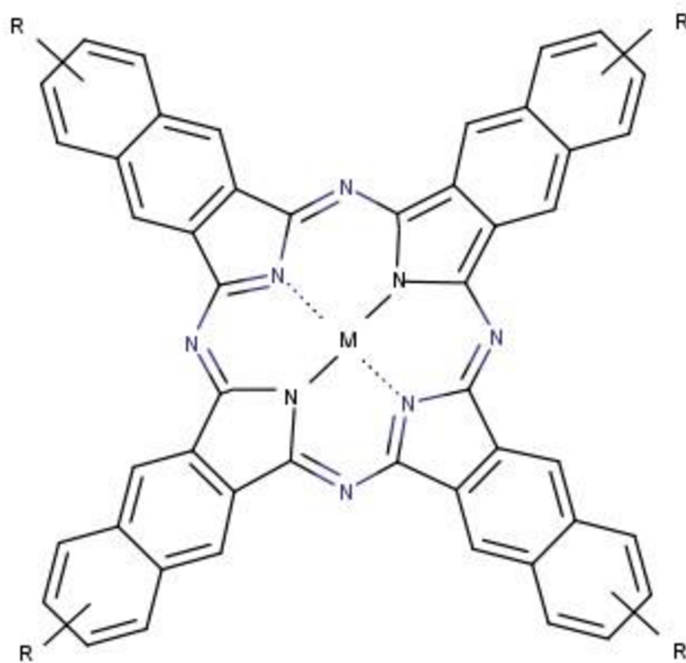
Nevýhodou některých ftalocyaninů je jejich velice špatná rozpustnost nejen ve vodě, ale i v organických rozpouštědlech a z toho poté vyplývající problémy s aplikací. Toto lze ovšem překlenout ať již modifikací na periférii, substitucí řetězce kyselinou sírovou, uhličitou nebo různými amino skupinami nebo inkorporací do liposomů. Purifikace těchto derivátů je problematická. Konečný produkt je totiž většinou směsí mono, di, tri a tetrasíratých derivátů. Mimoto, takovéto sloučeniny tvoří už při nízkých koncentracích agregáty, přičemž dojde k poklesu fotochemické aktivity [6].

Po získání jednotlivých frakcí u hlinitého komplexu ftalocyaninu byl sledován vliv počtu sulfonových skupin na jeho aktivitu. Bylo zjištěno, že disulfonované deriváty jsou nejúčinnější [28].

Hlavní předností ftalocyaninů je jejich minimální kožní fototoxicita a mají cytotoxický účinek na většinu nádorových buněk.

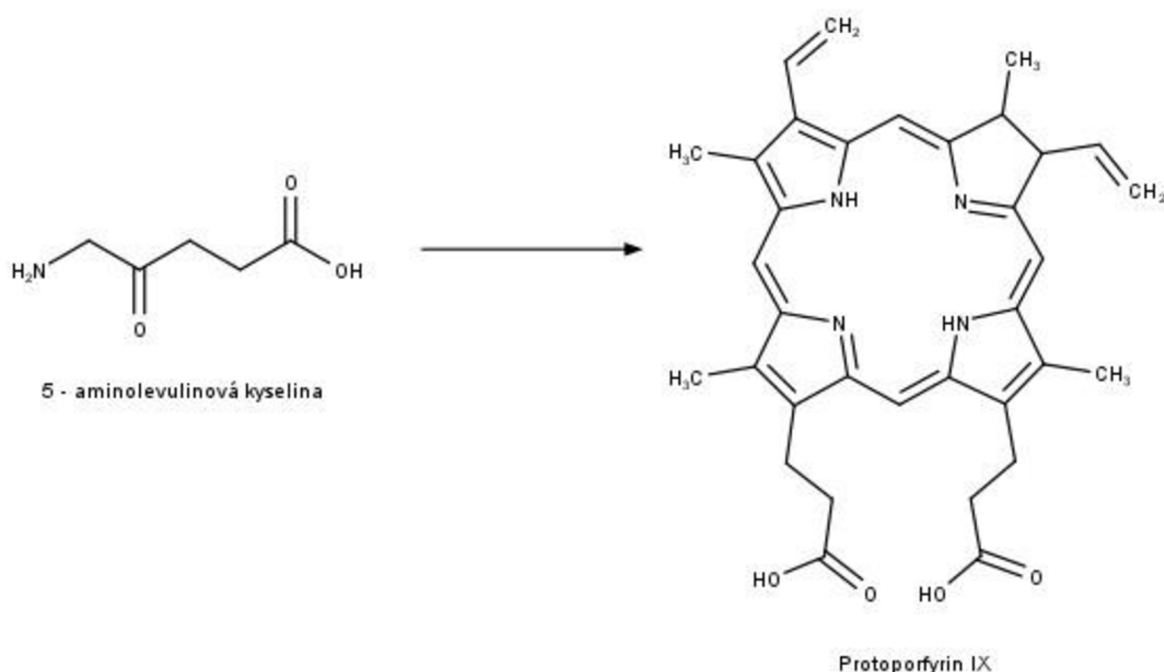
Pc4 je zkratka pro křemičitý komplex ftalocyaninu, jenž byl zkoušen ke sterilizaci krevních produktů (V. I. Technologies, Melville, NY, USA) Další potenciální aplikací je léčba kutánních a subkutánních lézí způsobených různými solidními nádory [1]. Při studiu na myších bylo také zjištěno potlačení buněčné imunity, což vede k možnostem využití této látky jako potenciálního imunosupresiva [16].

Přidání dalšího benzenového jádra na periferii ftalocyaninů vede k látkám typu naftalocyaninů (Obrázek 11). Tyto látky absorbují při velice dlouhých vlnových délkách (až 770 nm), čímž je zvýšena terapeutická hloubka, které může být dosaženo a lze tyto látky používat i pro vysoce pigmentované nádory jako například melanom.



Obrázek 11: Chemická struktura Naftalocyaninu

Aminolevulinová kyselina (ALA, Levulan®) je v současné době hojně užívaným senzitizerem pro PDT. Jedná se o endogenní látku, která je součástí biosyntetické cesty hemu. Tato cesta je kontrolována negativní zpětnou vazbou, při které vyšší koncentrace hemu inhibuje konverzi glycinu a sukcinylkoenzymu A na ALA. Exogenní dodání ALA umožňuje obejít tento kontrolní mechanismus a dochází k syntéze protoporphyrinu IX (PpIX, , Obrázek 12), který poté funguje jako účinný senzitizer.



Obrázek 12: Syntéza PpIX z kyseliny 5-aminolevulinové

Optimální poměr PpIX pro terapeutické účinky je dosažen po dvou až čtyřech hodinách po podání ALA. K vyčištění PpIX z organismu dojde již během 24 hodin, což eliminuje kožní fotosensitivitu, ale umožňuje opakování léčby po každých dalších 48 hodinách, a to bez rizika poškození zdravé tkáně. Fotosensitizace je totiž podmíněná porfyrinem, a proto také i PpIX má hlavní aktivační vlnovou délku v Soretově oblasti [34], což umožňuje jen malou tkáňovou penetraci.

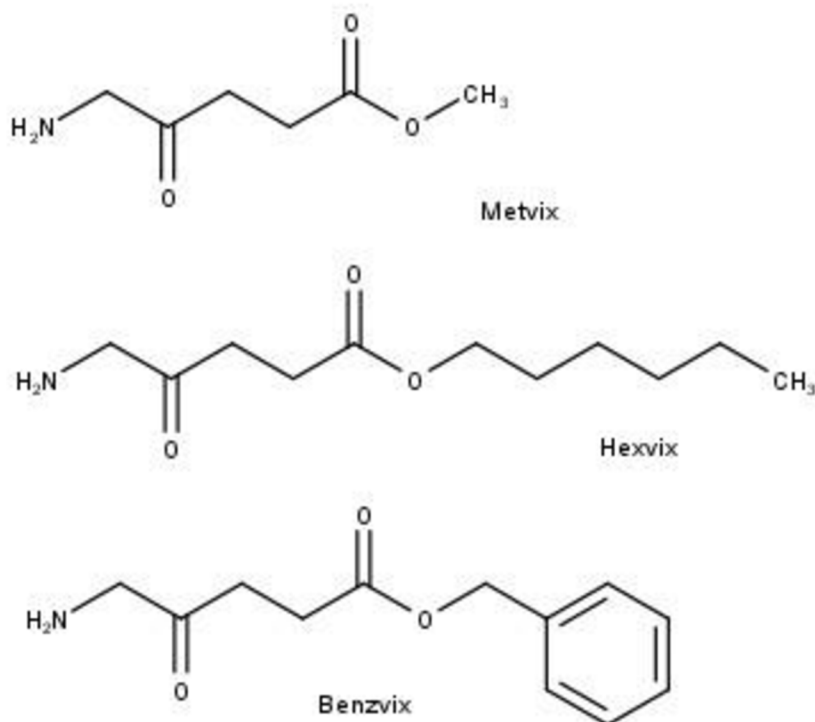
Inkorporací atomu železa enzymem ferrochelatazou vzniká přirozenou cestou z PpIX fotodynamicky neaktivní hem. Selektivita k nádorové tkáni a účinnost ALA je dána mnoha faktory, jež zahrnují například zvýšené hladiny porfobilinogendeaminázy, snížené koncentrace železa a sníženou aktivitu ferrochelatazy (to zaručuje, že se PpIX nemění dále na neaktivní hem). Tyto faktory poté vedou ke kumulaci PpIX v postižené tkáni.

ALA navíc jako hydrofilní látka jen slabě proniká přes keratiny zdravé tkáně. Řešením může být použití lipofilních esterů ALA (Obrázek 13) (firma PhotoCure, Oslo, Norsko), které lépe pronikají do tkáni (zejména při aplikaci na kůži) a po hydrolyze uvolňují volnou ALA.

Metvix® je methyl ester kyseliny 5-aminolevulinové. Byl zaveden v roce 2001 k léčbě aktinoidní keratózy a později také k léčbě karcinomu bazálních buněk kůže. Další možné oblasti aplikace jsou v léčbě karcinomu ze skvamózních buněk kůže (příprava na fázi III), fotodetekce karcinomu bazálních buněk kůže (fáze I/II), léčba akné a hojení ran.

Hexvix® je hexyl ester kyseliny 5-aminolevulinové. Do močového měchýře se přibližně 30–60 minut před vyprázdněním aplikuje katetrem roztok Hexvixu®, který přechází do stěn, a po hydrolyze na ALA se kumuluje v nádorových ložiscích. Po syntéze PpIX se močový měchýř ozáří modrým světlem, ložiska poté červeně fluoreskují. Ve vývoji jeho použití je nejen detekce nádorů močového měchýře, ale i jejich léčba. Další aplikace, které se připravují, jsou z oblasti gynekologie (detekce a léčba rakoviny cervixu a vulvy)

Benzvix® je benzyl ester kyseliny 5-aminolevulinové.

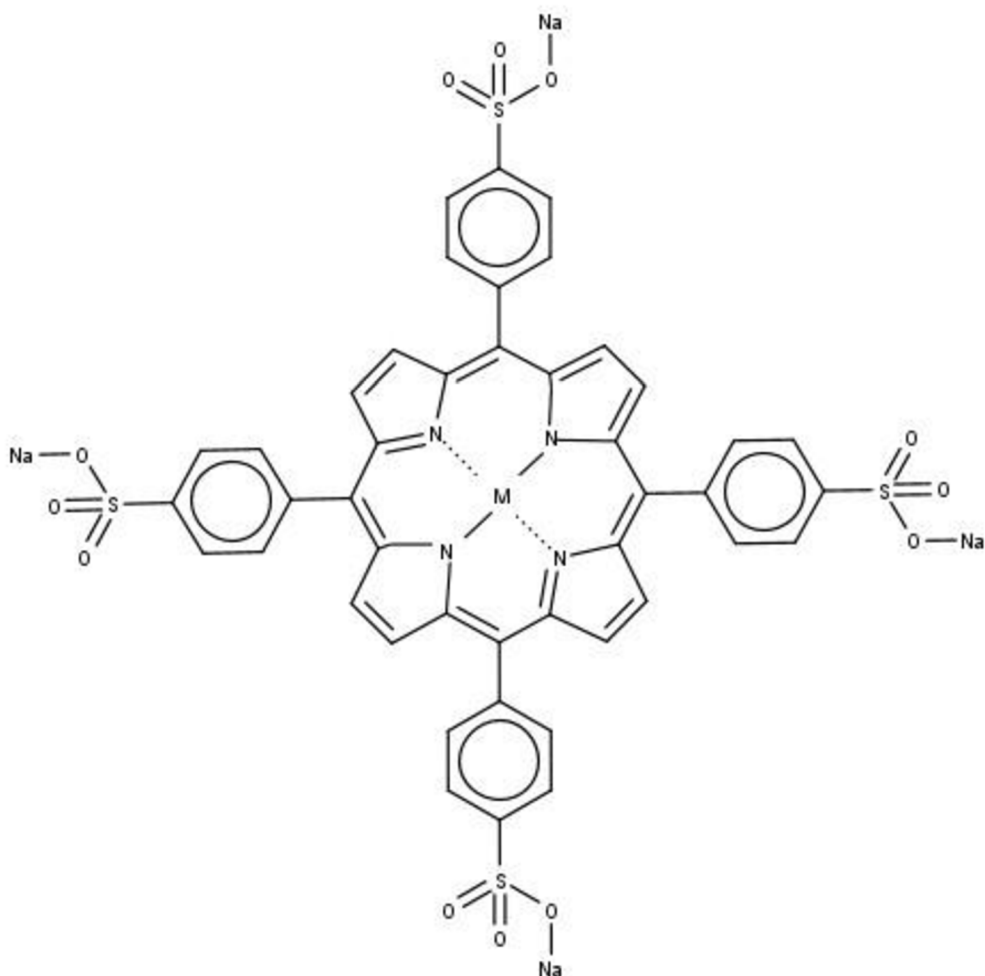


Obrázek 13: Chemické struktury esterů ALA

Meso-tetra(4-sulfofenyl) porfyrin a jeho metalokomplexy jsou porfyrinové deriváty (Obrázek 14), které se používají buď v čisté, nechelátované (TPPS₄) nebo chelátované formě (ZnTPPS₄, PdTPPS₄)

TPPS₄ (Mr = 1283,13) je hydrofilní látka, jejíž absorpční spektrum je tzv. etio-spektru (Soretův pás okolo 415 nm a 4 tzv. Q-pásky v dlouhovlnější oblasti). Kvantový výtěžek singletního kyslíku je 0,62.

ZnTPPS₄ (absorpční maximum při 413 nm) a PdTPPS₄ (absorpční maximum při 423 nm) jsou zinečnatý a paladnatý komplex TPPS₄. Častěji se užívá ZnTPPS₄ (zinek (II)-5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatofenyl) porfyrin; Mr = 1301,5). Chová se velmi podobně jako TPPS₄. Jedná se ale o lepší senzitizer, protože kvantový výtěžek singletního kyslíku je větší, asi 0,76. Jeho absorpční spektrum je metaloporfyrinové, tj. Soretův pás okolo 420 nm a 2 Q-pásky v dlouhovlnější oblasti [35]



Obrázek 14: Chemická struktura $TPPS_4(M=2H)$, $ZnTPPS_4(M=Zn)$ a $PdTPPS_4(M=Pd)$

$TPPS_4$ a jemu strukturálně podobné senzitizery se hromadí zejména v buněčných membránách a jejich okolí [36], především lysosomů a po ozáření může být přemístěn do okolí buněčného jádra [37]

Výše zmíněné látky patří mezi hlavní, ovšem ne jediné, jež se používají nebo jsou ve stadiu klinických zkoušek. Ve výzkumu je řada dalších látek, ať již přírodního charakteru nebo syntetických, jež se vědci pokoušejí testovat na PDT a případně modifikovat některé jejich vlastnosti, aby odpovídaly nebo se alespoň blížily požadavkům na ideální senzitizer. Patří sem mimo jiné i následující látky.

Purpuriny – senzitivizéry třídy porfyrinového makrocyklu. Jejich absorpční spektrum je od 630 nm do 715 nm. Patří sem například již zmíněný cínový etiopurpurin (SnET2).

Verdiny obsahují ve struktuře cyklohexanový řetězec, který je navázán na jeden z pyrrolů v porfyrinovém řetězci a jednoduše reagují s HpD a purpuriny.

Psoraleny a jejich deriváty – se používají už více než 3000 let k léčbě různých onemocnění kůže. Jejich cytotoxický účinek spočívá ve schopnosti příčně vázat biomolekuly v DNA. Jsou aktivovány ultrafialovým zářením.

Antracykliny – sloučeniny, které mají schopnost určité nádorové selekce. Hojně se například v chemoterapii používá Doxorubicin, který však má i hojně vedlejší účinky.

Methylenová modř – tento derivát fenothiazinu ($\lambda_{\max} = 668 \text{ nm}$, $\epsilon_{668} = 95000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) je používán k dekontaminaci čerstvě zmrazené plasmy [38]. Účinně inaktivuje extracelulárně přítomné viry a je prakticky netoxická pro člověka [27]. Její použití in vivo je ovšem limitováno redukcí enzymy přítomnými v buňkách na leukoformu, jež je fotodynamicky neaktivní.

Rhodaminy – Rhodaminy jsou v buňkách specificky vychytávány mitochondriemi a jsou používány jako fluorescenční barviva vzhledem k vysoké produkci fluorescence. Toto je ovšem z hlediska PDT nevýhodné, protože senzitivizér poté nepřechází účinně ze svého S1 do T1 stavu, který je základem pro vlastní fotodynamický účinek. Tento problém lze alespoň z části vyřešit substitucí těžkými atomy (například bromem), které zvyšují účinnost přechodu S1 do T1 a také posouvají absorpční maximum mírně směrem k červené oblasti.

Tento posun je pro rhodaminy, mající bez substituce maximum při asi 500 nm, velice důležitý. I přes tyto nevýhody bromovaný analog (absorpční maximum při 511 nm, $\epsilon_{511} = 20000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) byl úspěšně použit v testech pro autotransplantační léčbu myeloidní leukémie

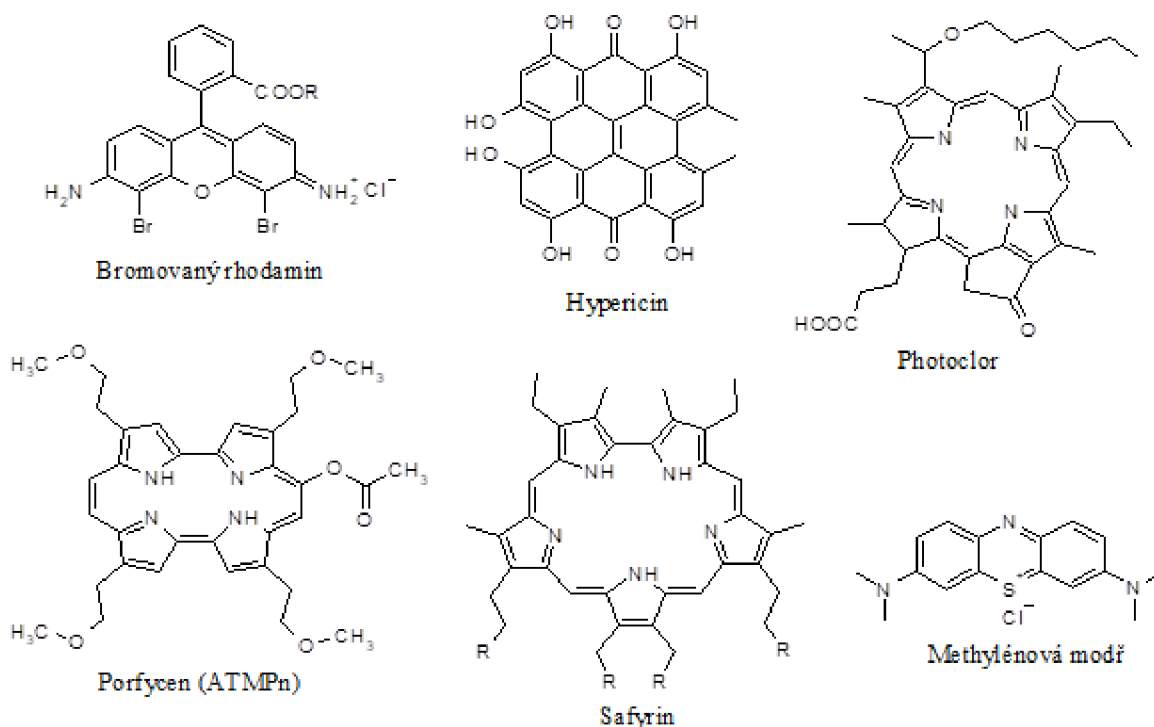
[39]. Při tomto procesu, dochází ke zničení blastů kostní dřevě, zdravé buňky přežívají a jsou poté použity k autotransplantaci.

Porfyceny – jejich absorpční maximum se pohybuje v oblasti 600–650 nm. Modifikací na periferii lze dosáhnout velice dobrých farmakokinetických vlastností a derivát se čtyřmi β methoxyethylovými skupinami, jež urychlují vstup do buňky, a jednou acetoxy skupinou zvyšující hydrofilii (9-acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(β methoxyethyl)-porfycen, ATMPn ($\lambda_{\max} = 630$ nm, $\epsilon_{630} = 52000$ M⁻¹ cm⁻¹) patří mezi nejrychleji vychytávané senzitizery v in vitro studiích vůbec. Látka se aplikuje pouze topicky, umožňující léčbu kožních nemocí (psoriáza, nemelanotický karcinom kůže) [40].

Hypericin – o této přírodní látce ($\lambda_{\max} = 590$ nm, $\epsilon_{590} = 44000$ M⁻¹ cm⁻¹) se ví, že funguje jako účinný senzitizer. Způsobuje však hypericismus (vede ke kožnímu dráždění a zvýšeným teplotám po ozáření) u zvířat konzumujících větší množství rostlin s obsahem této látky. Lze jej využít pro ex vivo fluorescenční cytologickou detekci buněk nádoru močového měchýře v moči [41].

Photoclor – patří opět do skupiny chlorinů, přesněji se jedná o derivát feoforbidu A. Analogy feoforbidu A jsou obecně aktivnější než podobné látky ze skupiny chlorinů-e6 (např. talaporfin). Photoclor je hexyleter feoforbidu A (HPPH, $\lambda_{\max} = 665$ nm, $\epsilon_{665} = 50000$ M⁻¹ cm⁻¹) a je vysoce selektivní k nádorové tkáni se současně nižší kožní fototoxicitou než Photofrin® [6].

Safyriny – patří do skupiny expandovaných porfyrinů (podobně jako texafyriny). Jejich základní pentapyrrolický makrocyklus s jedním přímým bipyrrolickým spojením absorbuje v oblastech okolo 675 nm. Při pokusech na myších vykazovaly některé látky vysoký poměr rozdělení mezi nádorovou a okolní svalovou tkání, ovšem hodnoty maximální koncentrace v tumorózní tkáni byly naměřeny až po 3–6 dnech po aplikaci [42].



Obrázek 15: Chemická struktura některých dalších senzitizerů

2.4 Třetí generace fotosenzitizerů

Vývoj třetí generace fotosenzitizerů je založen na syntéze látek s vyšší afinitou pro nádorovou tkáň, která snižuje poškození okolní zdravé tkáně. Problémem pro široké rozšíření klinických aplikací fotodynamické terapie v onkologii je také obtíž při přípravě farmaceutických postupů, které by umožnily parenterální aplikaci fotosenzitizerů.

Biologická dostupnost fotodynamických metod je zvyšována novými systémy dodávání léčiv. Aby se zvýšila selektivita léčiv, následující úpravy fotodynamické terapie jsou realizovány:

- kombinace druhé generace fotosenzitizerů s molekulami cílenými na receptory
- kombinace fotosenzitizerů s LDL lipoproteiny kvůli skutečnosti, že proliferující buňky tumoru potřebují více cholesterolu pro syntézu buněčné stěny

- spojení fotosyntetizéru s monoklonárními protilátkami cílenými na specifický antigen nádorové buňky

Tato řešení umožňují zlepšení selektivity a lepší akumulaci fotosenzitizéru v zasažených oblastech, a tedy dávají možnost redukce dávky léčiva, zatímco je zachován uspokojující léčebný efekt.

2.5 Nanotechnologie v PDT

Během posledního desetiletí byla pozorována značná akcelerace ve vývoji nanotechnologií. Takzvaná nanomedicína používá platformy nanomateriálů pro diagnostické a léčebné metody umožňující přesné dodávání léčiv do cílených tkání a zlepšující efektivitu protinádorové terapie. Kombinace fotosenzitizérů s nanomateriály může zlepšit efektivitu fotodynamické terapie, a také snižovat její vedlejší účinky. Užití nanočástic umožňuje dosáhnout zacílení na specifické receptory a jako výsledek zvyšuje selektivitu fotodynamické terapie. Fotosenzitizéry mohou být obaleny nebo znehybněny do nanoplatform kovalentními nebo nekovalentními vazbami. Většina fotosenzitizérů představuje hydrofobní látky, které agregují ve vodním prostředí. Agregací proces snižuje efektivitu fotodynamické terapie. Fotosenzitizéry musí zůstat v monomerické formě, aby byly fotoaktivní. Udržení této konfigurace je možné po konjugaci fotosenzitizérů s nanočásticemi. Biologická dostupnost hydrofobních porfyrinů je zvyšována vytvořením kovalentních vazeb k molekulám hydrofilního polymeru. Použití polymerických nanočástic (takzvaných micel) v PDT umožňuje cílené dodávání většího množství molekul fotosenzitizérů do tumoru a zabraňuje degradaci fotosenzitizérů předtím, než fotosenzitizér dosáhne cílovou tkáň. Dále použití polymeru umožňuje současné připojení dalších ligantů k molekule fotosenzitizéru, například kontrastních látek nebo fluorescentních značek umožňující klinické obrazové zkoumání.

3 Cíle práce

Existují dva hlavní typy fotodynamických reakcí [43], které jsou závislé na přítomnosti kyslíkových molekul v buňkách. V obou případech je fotosenzitizér vystaven světelné energii odpovídající absorpčnímu maximu fotosenzitizéru, který následně přechází ze základního energetického singletového stavu na excitovaný singletový stav, který může být dále převeden bez vyzáření energie do excitovaného tripletového stavu [44, 45].

U typu I fotodynamické reakce je vodík nebo elektron přenesen z fotosenzitizéru v excitovaném tripletovém stavu na některou okolní biomolekulu tkáně. Tento proces vede k produkci volných radikálů fotosenzitizéru a biomolekul tkáně, aniontových radikálů, superoxidu a jiných reaktivních forem kyslíku (ROS).

U typu II fotodynamické reakce je energie excitovaného tripletového stavu přímo převedena z fotosenzitizéru na molekulu kyslíku, při vytvoření singletového kyslíku, který je charakterizován extrémně silnými oxidačními vlastnostmi [45–48].

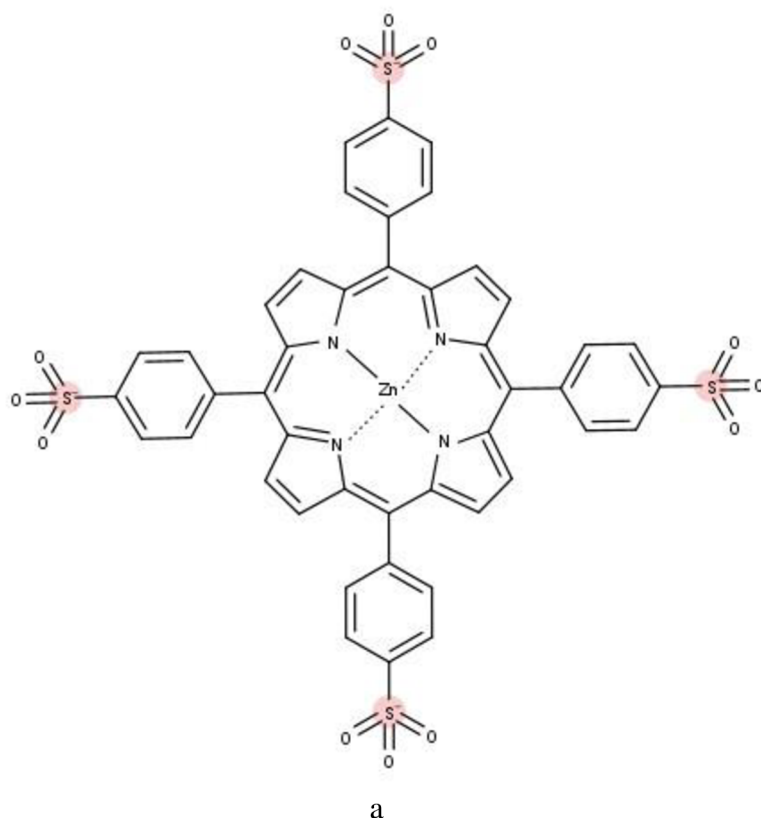
Třetí klíčovou složkou PDT (po fotosenzitizéru a světle) je molekula kyslíku. Obecně se předpokládá, že reakce typu II závislá na kyslíku je primárně zodpovědná za biologický účinek PDT [49]. Nejsou pochybnosti, že efektivita fotodynamické terapie závisí na molekulách kyslíku, které jsou rozpuštěné v cytoplasmě. Parciální tlak kyslíku (pO_2) v normálních tkáních se pohybuje od 30 do 60 mmHg (tj. 1,2 až 2,4 mg/l rozpuštěného kyslíku při 37 °C, 0,9% NaCl a normálním atmosférickém tlaku) [56,57]. Léčba hyperbarickým kyslíkem (HBO) způsobuje několikanásobné zvýšení pO_2 mozkové tkáně [84]. Nedávná studie zaměřená na okysličení tkání hlavy a končetin ukázala, že transkutánní pO_2 během HBO může být zvýšena dokonce 8 - 15krát [85]. Při dýchání HBO (100% oxygen při tlaku od 2 do 3 atm), je oxygenace kůže zvýšená více než 20krát [54]. Navíc bylo ukázáno že hyperoxygenace zlepšuje výsledek PDT in vitro [55] stejně jako při experimentech na zvířatech [56, 57].

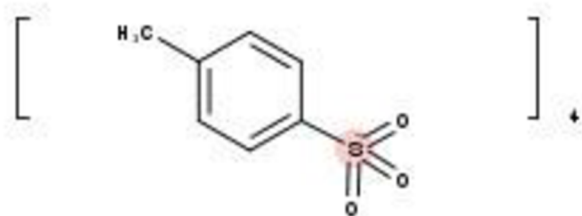
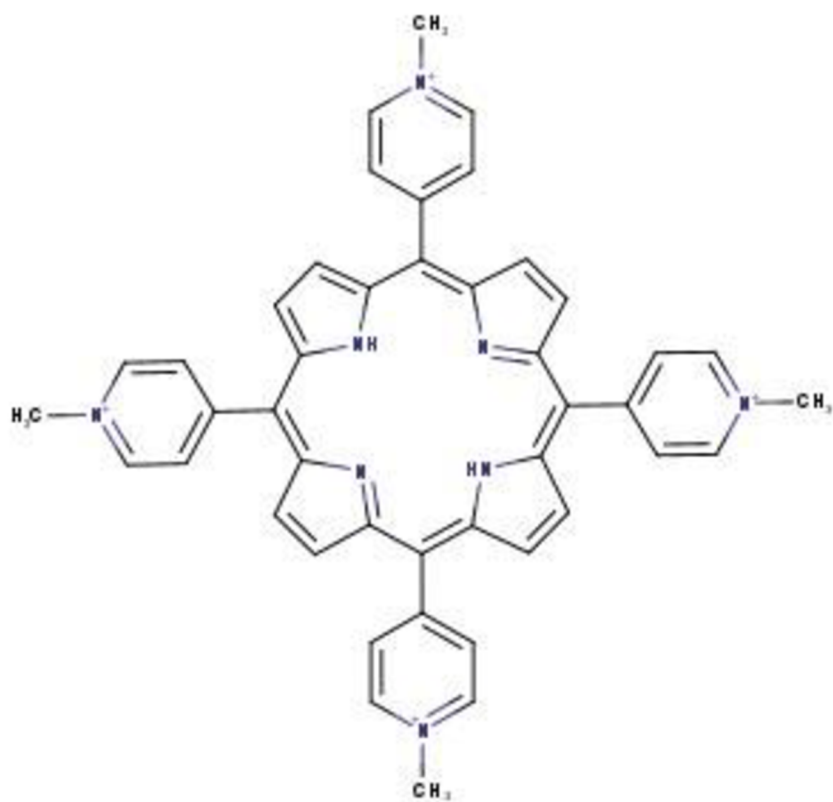
Cílem naší práce bylo studovat účinnost fotodynamické terapie v závislosti na parciálním tlaku kyslíku a druhu fotosenzitizéru, ověřit zvýšenou produkci singletového kyslíku při vyšších koncentracích kyslíku a ověřit zvýšený terapeutický účinek PDT na vybrané buněčné nádorové linii vystavené vyššímu pO_2 .

4 Materiál a metodika

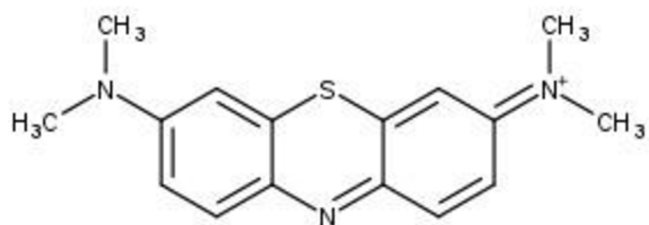
4.1 Fotosenzitizéry, hypoxie a hyperoxie

Zkoumali jsme čtyři různé fotosenzitizéry k určení výtěžku singletového kyslíku v PBS při různých parciálních tlacích kyslíku. 5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridinio)porfyrin tetra(p-toluenesulfonát) (TmPyP) a tetramethylthionin chlorid (methylenová modř, MB) byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, MO, USA), zatímco zinečnatý komplex 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatofenyl) porfyrinu (ZnTPPS₄) a zinečnatý komplex ftalocyanin disulfonátu (ZnPcS₂) byly syntetizovány a darovány Jiřím Mosingerem (Oddělení anorganické chemie, Karlova univerzita Praha) a Janem Rakušanem (Centrum pro organickou chemii s.r.o., Rybitví). Jejich syntézy byly dříve popsány [83, 84]. Chemická struktura těchto fotosenzitizérů je znázorněna na Obrázku 16. Různých parciálních tlaků kyslíku vztažených ke koncentraci rozpuštěného kyslíku 0.4 a 36 mg/l (měřeno oxymetrem Greisinger 3630, Německo) bylo dosaženo probubláváním čistého dusíku a čistého kyslíku přes injekční jehly do hermeticky uzavřených kyvet naplněných 3 ml PBS po dobu 20 minut.



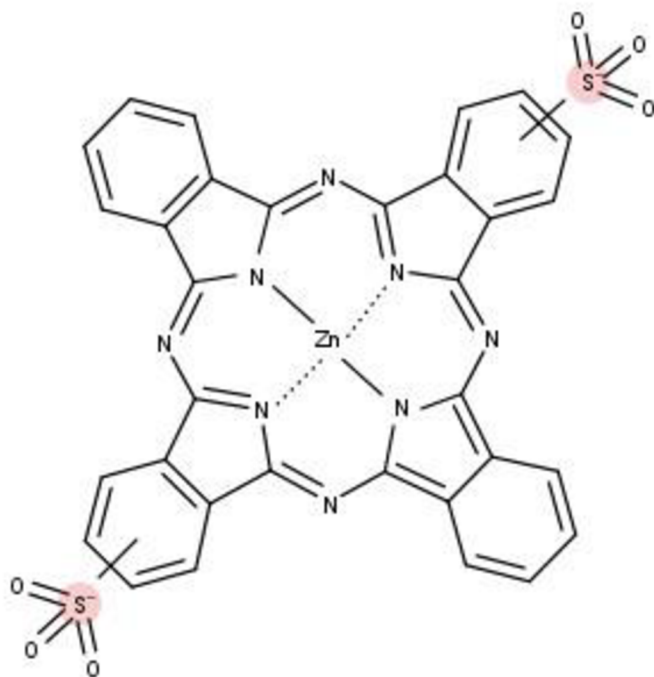


b



Cl⁻

c



d

Obrázek 16: Chemická struktura fotosenzitizérů: 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatofenyl) zinečnatý porfyrin (ZnTPPS₄, a), 5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridinio)porfyrin tetra(p-toluenesulfonát) (TmPyP, b), tetramethylthionin chlorid (methylenová modř, MB, c), a zinečnatý ftalocyanin disulfonát (ZnPcS₂, d).

4.2 Fluorescenční spektroskopie

Excitační a emisní spektra fotosenzitizérů byly měřeny fluorescenčním spektrofluorimetrem FLS980 (Edinburgh Instruments, Velká Británie). Výsledná koncentrace všech fotosenzitizérů v PBS byla 1 μM. Emisní spektra pro ZnTPPS₄ a TmPyP byly získány při excitaci 420 nm (při rozlišení pro excitaci i emisi 1 nm), zatímco MB a ZnPcS₂ byly

excitovány vlnovou délkou 663 nm (při rozlišení pro excitaci i emisi 1 nm). Excitační spektra fotosenzitizérů byly získána pro jejich emisní maxima tj. 607 nm pro ZnTPPS₄, 715 nm pro TmPyP, 689 nm pro MB a 681 nm pro ZnPcS₂.

4.3 Měření singletového kyslíku

Fluorescenční agens Singlet oxygen sensor green (SOSG, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) bylo použito k detekci produkce singletového kyslíku v PBS pufru při různých parciálních tlacích kyslíku.

Před umístěním kyvet do teplotně stabilizovaného držáku spektrofluorimetru byl do PBS pufru přidán SOSG tak aby výsledná koncentrace v každé kyvetě byla 3 μM. Produkce singletového kyslíku byla měřena jako vzrůst intenzity fluorescence při 530 nm. Externí zdroj vybavený rtuťovou lampou, optickým filtrem s pásmem propustnosti 460-480 nm a optickým vláknem připojeným k držáku kyvety byl použit pro excitaci SOSG. Produkce singletového kyslíku byla zahájena manuálním otevřením klapky lampy spektrofluorometru. ZnTPPS₄ a TmPyP byly aktivovány světlem s excitační vlnovou délkou 420±1,3 nm, zatímco MB a ZnPcS₂ byly aktivovány světlem s excitační vlnovou délkou 663±1,65 nm. Rozdílná šířka excitačního pásma byla vybrána tak, aby referenční detektor zaregistroval stejný počet fotonů (500000 cps). Odpovídající ozáření měřené radiometickým systémem IL 1705 doplněný o senzor SED033 (International Light Technologies, USA) bylo 4.1×10^{-4} W/cm² pro světlo o vlnové délce 420±1,3 nm a 2.1×10^{-4} W/cm² pro světlo o vlnové délce 663±1,65 nm. Kvantifikace produkce singletového kyslíku byla stanovena, jak rychlostí změny fluorescence během prvních 7 sekund, tak jako rozdíl hodnot fluorescence po 4 minutách ozářování vzorku.

Stejně tak bylo fluorescenční agens SOSG použito k detekci singletového kyslíku provázející v HeLa buňkách fotodynamickou terapii při různých fyzikálních podmínkách.

Před vložením mikrodestiček do hyperbarické komory byl do PBS-G pufru přidán SOSG tak aby výsledná koncentrace v jamkách mikrodestičky byla 2 μM. Po PDT terapii byla měřena intenzita fluorescence při emisi 530 nm a při excitaci 500 nm.

4.4 Buněčná linie, senzitivizéry, hyperbarie a osvětlení

Buňky HeLa buněčné linie lidského karcinomu děložního čípku (2×10^5 buněk v jamce mikrodestičky) byly kultivovány v médiu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), které obsahovalo 0 (kontrola); 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10 μM tetrasulfonovaného zinečnatého tetrafenylporfyrinu (ZnTPPS_4 , Obrázek 16a) nebo disulfonovaného zinečnatého ftalocyaninu (ZnPcS_2 , Obrázek 16d).

Mikrodestičky byly uloženy v inkubátoru při 37°C a 5 % CO_2 na 24 hodin. Po inkubaci bylo kultivační medium DMEM nahrazeno fosfátovým pufrům PBS (phosphate-buffered saline) s 5 mM D-glukosou (PBS-G) a mikrodestičky byly vloženy do malé laboratorní hyperbarické komory (Obrázek 17) pod světelný diodový zdroj (Obrázek 18). Po dvou hodinách inkubace za různých podmínek (atmosféra dusíku o tlaku 1 bar, vzduchu o tlaku 1 bar, kyslíku o tlaku 4 bary) byly buňky podrobeny fotodynamické terapii světelným diodovým zdrojem, který emitoval světlo vlnové délky 415 ± 10 nm (ZnTPPS_4) nebo 660 ± 15 nm (ZnPcS_2) po 10 minut s intenzitou vyzařování 7 mW/cm^2 (tj. celkové dávce ozáření 4.2 J/cm^2).



Obrázek 17: Hyperbarická komůrka



Obrázek 18: Světelný diodový zdroj

4.5 Fluorescenční mikroskopie

Intracelulární distribuce fotosenzitizérů po 24 hodinách inkubace buněk HeLa se senzitizerů o koncentraci 2 μM jako i ostatních fluorescenčních sond byla zobrazena inverzním fluorescenčním mikroskopem Olympus IX 70 pomocí CCD kamery (Olympus, Tokyo, Japonsko) a zobrazovacím softwarem Olympus CellM a CellR (Olympus Soft Imaging Solutions, Planegg, Německo). K označení mitochondrií, lysosomů a DNA v buněčných jádrech jsme použili odpovídající fluorescenční sondy: 200 nM MitoTracker Green (Life Technologies), 200 nM LysoTracker Green DND-26 (Life Technologies) nebo 1 μM Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) které byly inkubovány spolu s živými HeLa buňkami v PBS po 20 min. Před fluorescenční mikroskopií bylo nahrazeno extracelulární médium novým PBS bez sond.

4.6 MTT test fototoxicity

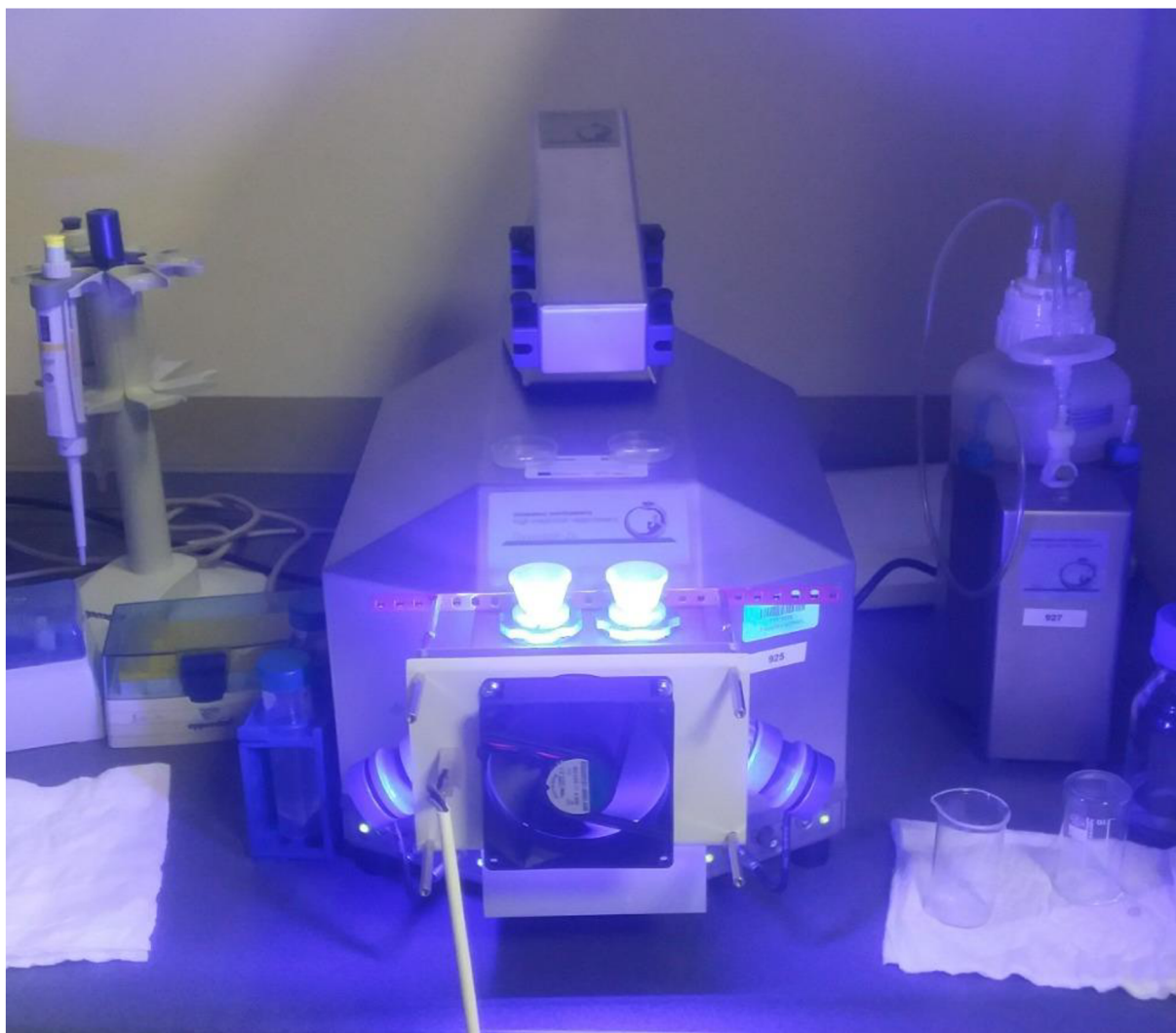
Senzitizované buňky, které vyrostly v jamkách mikrodestiček, byly vystaveny světlu při různých atmosférických podmínkách, jak bylo popsáno výše. Po této terapii byl PBS-G pufr nahrazen kultivačním médiem DMEM a buňky byly následně přes noc inkubovány v inkubátoru. Následující den bylo kultivační medium doplněno o 0,5 mg/ml methylthiazol tetrazolium bromidem (MTT, Sigma-Aldrich), a po dalších 4 hodinách, bylo médium kompletně nahrazeno 100 μ l DMSO pro rozpuštění MTT produktu (tj. formazanových krystalů) vytvořeného pomocí buněčných oxidoreduktáz. Absorbance výsledného fialového roztoku a pozadí mikrodestiček bylo měřeno spektrometricky při 570 nm, případně 690 nm. Fototoxicita buněk byla vztažena k poměru buněk s oxidoreduktázovou aktivitou ve vzorcích podrobených a nepodrobených terapii a vyjádřena v procentech.

4.7 Měření mitochondriálního membránového potenciálu

Potenciál mitochondriální membrány byl hodnocen užitím fluorescenční sondy 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3' tetraethylbenzimidazolylkarbonyanin chloridu (JC-1, Biotium). JC-1 je mitochondriální barvivo, které zabarví mitochondrie v živých buňkách v závislosti na membránovém potenciálu. Monomer JC-1 je v ekvilibriu s tak zvanými J-agregáty, které se vytváří při vyšších koncentracích barviva nebo vyšším membránovém potenciálu. J-agregáty jsou charakteristické červenou fluorescencí (emise při 590 nm). Nejdříve byly HeLa buňky podrobeny PDT terapii, jak bylo popsáno výše a následně uloženy v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO₂. Po 1 hodině bylo do média přidáno JC-1 o výsledné koncentraci 2 μ g/l a buňky byly inkubovány dalších 20 minut. Poté byla měřena intenzita fluorescence za použití čtečky destiček Tecan Infinite 200pro (Tecan, Männedorf, Švýcarsko) při excitační/emisní vlnové délce 490/590 nm.

4.8 Respirometrie s vysokým rozlišením

Lahve pro buněčné kultury byly osázeny HeLa buňkami v množství 5×10^5 na 75 cm^2 a ponechány růst v kultivačním mediu DMEM doplněného o 10% fetálního bovinního séra, v inkubátoru při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a 5% CO_2 . Po dvou dnech inkubace bylo růstové médium vyměněno za čerstvé. Ke dvěma skupinám vzorků byly přidány ZnTPPS_4 nebo ZnPcS_2 o koncentraci $2 \text{ } \mu\text{M}$. Po 24 hodinách inkubace adherované buňky byly trypsinizovány (PBS, 0,5% trypsin a 1 mM EDTA), resuspendovány v čerstvém růstovém mediu a centrifugovány ($300 \times g$ po dobu 5 minut). Buňky byly spočteny užitím Bürkerova hemocytometru. Následně v konečné koncentraci $1,5 \times 10^6$ v 1 ml, byly injektovány do respiračního média umístěného v respirační komůrce oxygrafu Oxygraph2k (Oroboros Instruments, Innsbruck, Rakousko) (Obrázek 19), a následně byla při teplotě $37 \text{ }^\circ\text{C}$ měřena jejich spotřeba kyslíku. Bylo užito respirační médium Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (RPMI-1640, Sigma-Aldrich). Počáteční respirační aktivita buněk byla hodnocena jako základní respirační stav R. Po dosažení ustáleného stavu byly buňky ozářeny výše uvedeným plochým LED zdrojem připevněným na přední transparentní okénka respiračních komůrek. Fotodynamická terapie byla aplikována ve dvou 10 minutových cyklech s 5 minutovou temnou periodou. Po prvním ozáření (tj. v temné periodě) byla rychlost spotřeby kyslíku hodnocena jako PDT1, po druhém ozáření byla rychlost spotřeby kyslíku hodnocena jako PDT2. Nefosforylační tok kyslíku vyvolaný inhibicí ATP syntázy přidáním oligomycinu ($2 \text{ } \mu\text{g/ml}$) byl spojený s poklesem rychlosti spotřeby kyslíku. Tok kyslíku měřený v tomto stavu „L“ hlavně reflektoval únik protonů skrz mitochondriální membránu. Následné trojí přidání protonoforu karbonylkyanid-p-trifluormethoxyfenylhydrazonu (FCCP, titrační krok $0,5 \text{ } \mu\text{mol/l}$) indukovalo stav maxima odpřažené respirace E. Tento protonofor rozruší mitochondriální membránový potenciál a maximálně aktivuje elektronový transportní systém. Po inhibici komplexu III antimycinem A ($2,5 \text{ } \mu\text{mol/l}$), byla měřena reziduální spotřeba kyslíku ROX, která je z větší části tvořena buněčnou nemitochondriální spotřebou kyslíku. Spotřeba kyslíku (respirační tok) byl analyzován softwarem DatLab (Oroboros Instruments, Innsbruck, Rakousko) jako negativní časová derivace koncentrace kyslíku v respirační komůrce vyjádřená v pmol O_2 za sekundu, na mililitr a 10^6 buněk ($\text{pmol O}_2/\text{s.ml.}10^6$ buněk).



Obrázek 19: Měření buněčné respirace pomocí oxygrafu Oxygraph2k

5 Analýza dat

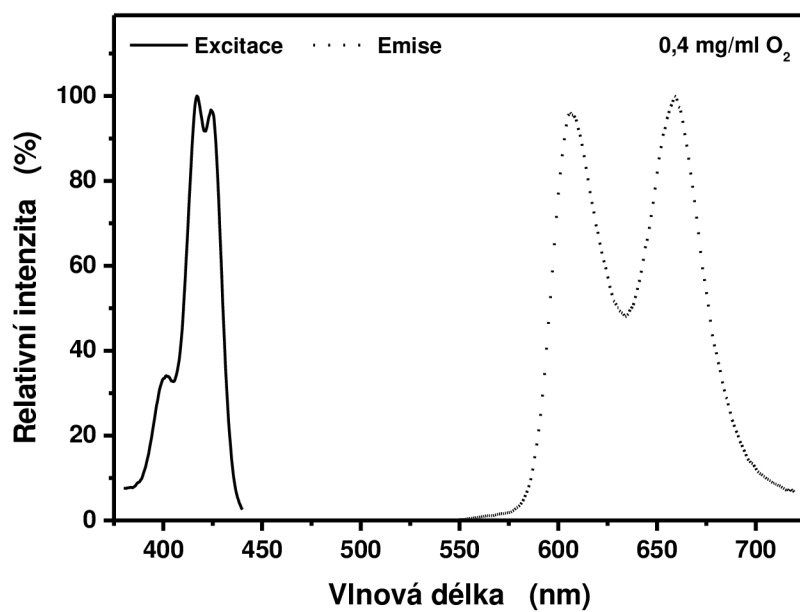
Měřená data jsou prezentována jako reprezentativní změny nebo průměry \pm standardní odchylky pro 4 nezávislá měření v případě hodnocení produkce singletového kyslíku a pro 3 nezávislá měření u zjišťování rozdílů v biologické odpovědi na fotodynamickou terapii při různých parciálních tlacích kyslíku u dvou vybraných fotosenzitizérů na HeLa buňkách.

Pro statistické hodnocení rozdílů mezi skupinami měření byla použita jednofaktorová analýza rozptylu (ANOVA), hladina významnosti byla nastavena na $p < 0.05$.

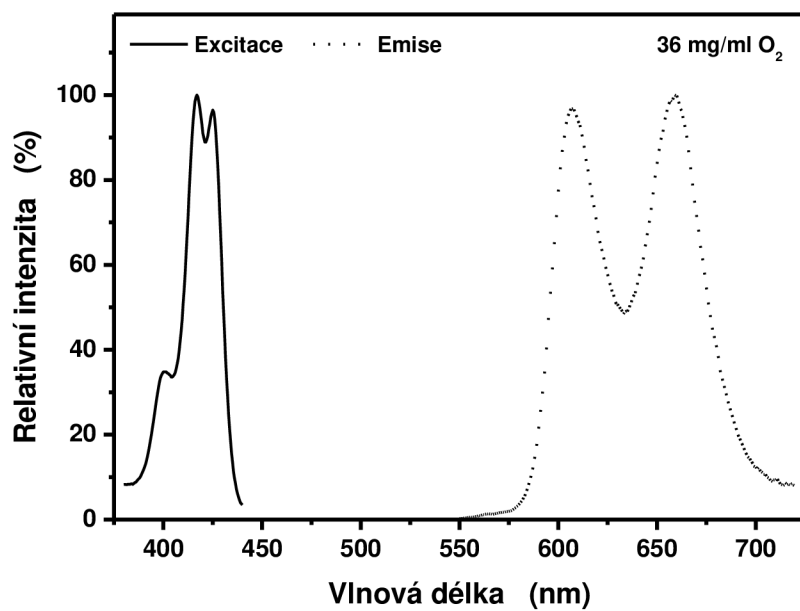
6 Výsledky

6.1 Fluorescenční spektroskopie

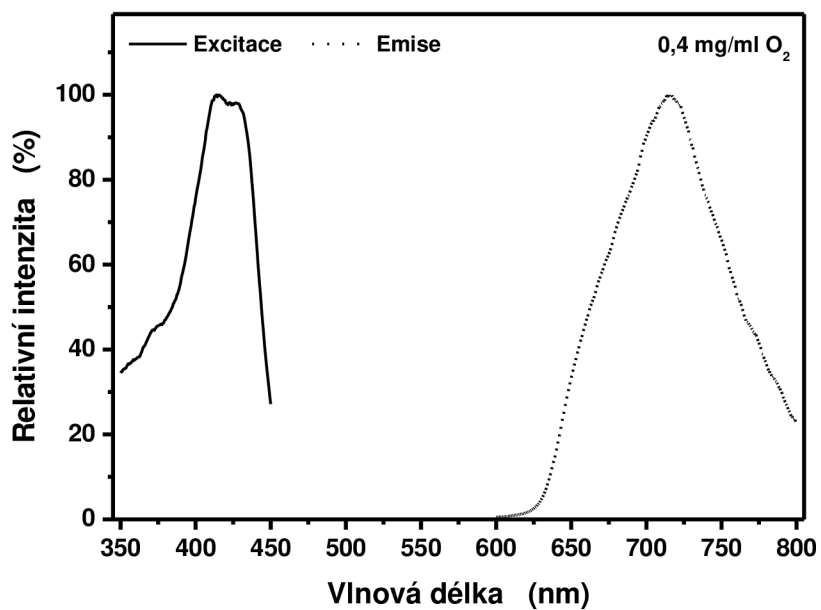
Pro porovnání výtěžku produkce singletového kyslíku pro různé fotosenzitizéry bylo nutné zjistit optimální podmínky, tedy jejich excitační maxima. Deriváty porfyriu jsou známé svými absorpčními maximy v Soretově pásmu. Excitační vrchol syntetizovaného zinečnatého komplexu porfyriu ZnTPPS₄ byl lokalizován na přibližně 420 nm se dvěma maximy při 417 a 425 nm a ramenem při 401 nm (Obrázek 20a-b). Komerčně dostupný derivát TmPyP vykazoval excitační vrchol na asi 2 nm kratší vlnové délce s maximem 414 nm a ramenem při 428 nm (Obrázek 20c-d). Mnohem významnější spektrální rozdíl pro tyto 2 porfyriiny byl nalezen v šířce píku. Zatímco šířka píku při polovičním maximu (FWHM) pro TmPyP byla 58 nm, excitační pík ZnTPPS₄ byl výrazně užší s FWHM 20 nm. MB a nekomerční derivát ftalocyaninu ZnPcS₂ mají svá excitační spektra v červené oblasti s dominancí kolem 660 nm (Obrázek 20e-f a 20g-h). Ve srovnání se ZnPcS₂ je excitační spektrum MB širší. Hodnoty excitačních a emisních maxim jsou shrnuty v Tabulce 1. Kromě toho nedošlo k žádným znatelným posunům ve spektrálních charakteristikách, pokud jde o rozdíl v koncentraci kyslíku v měřených roztocích senzitizerů.



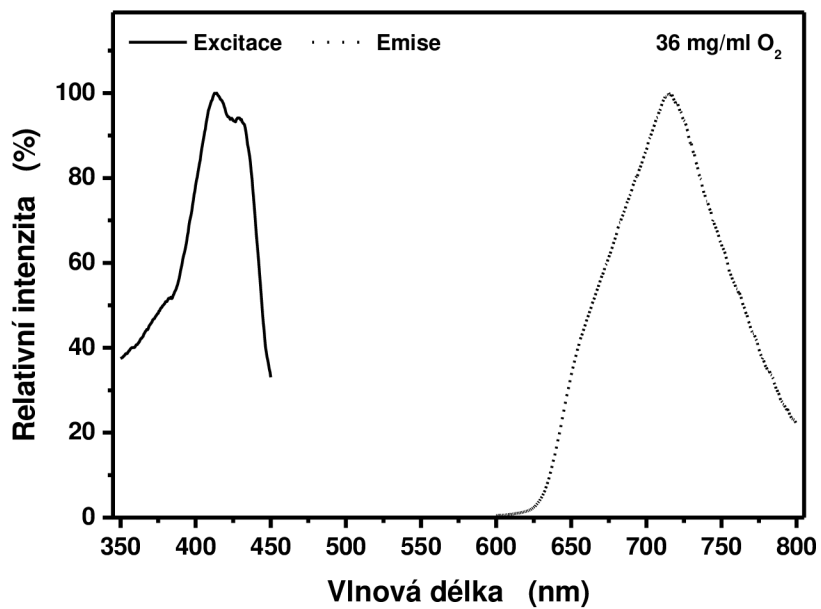
a



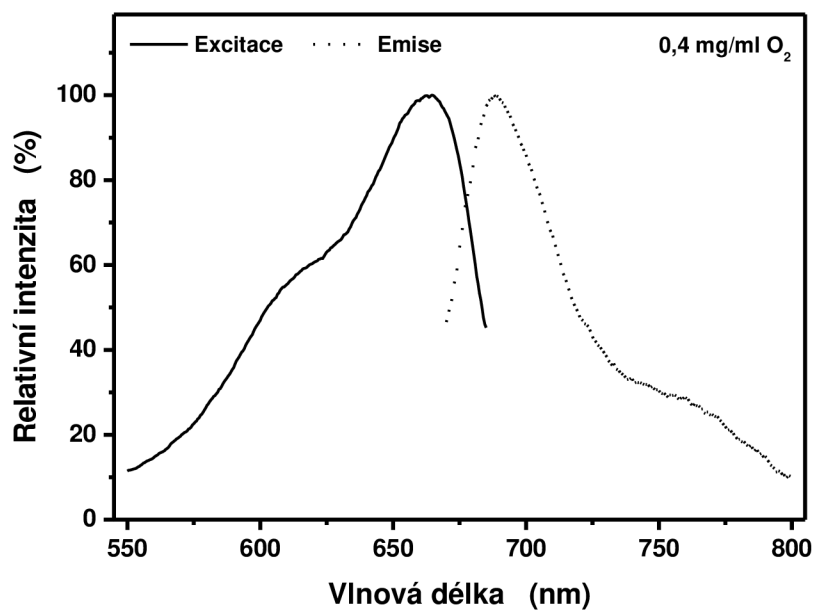
b



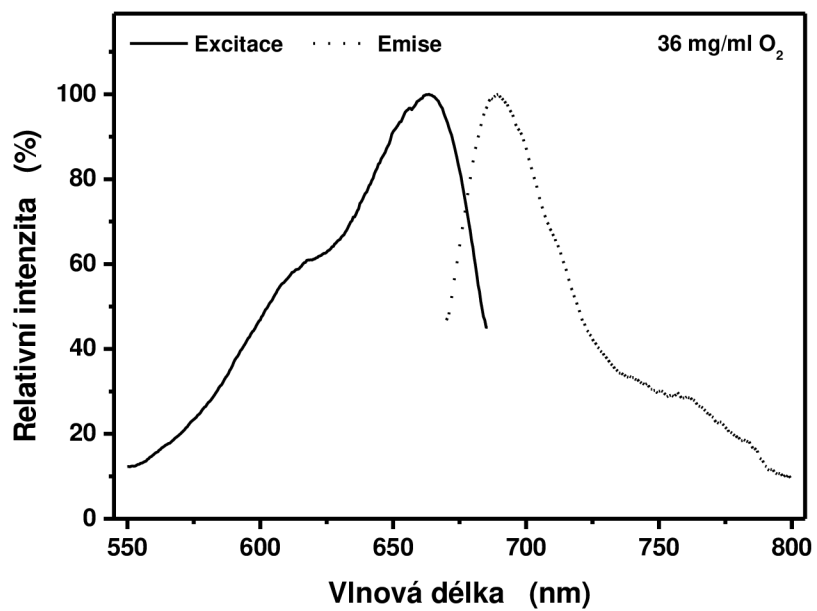
c



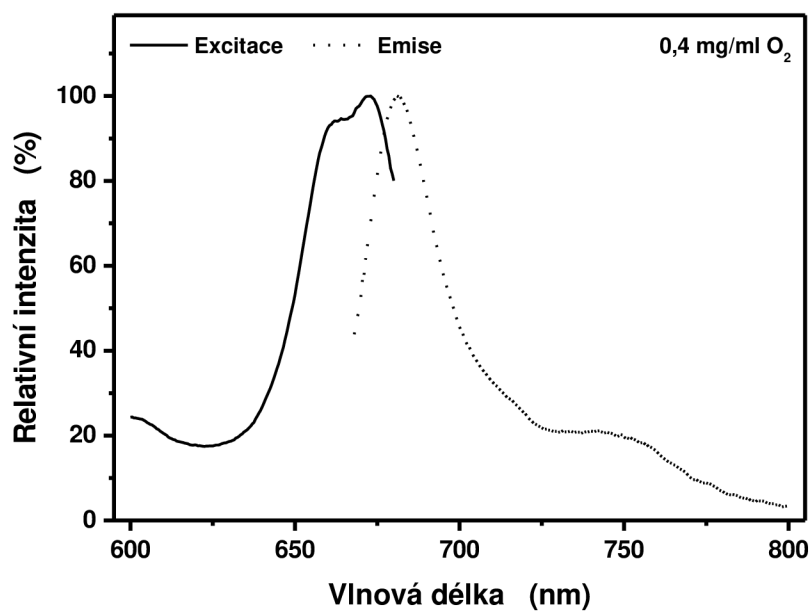
d



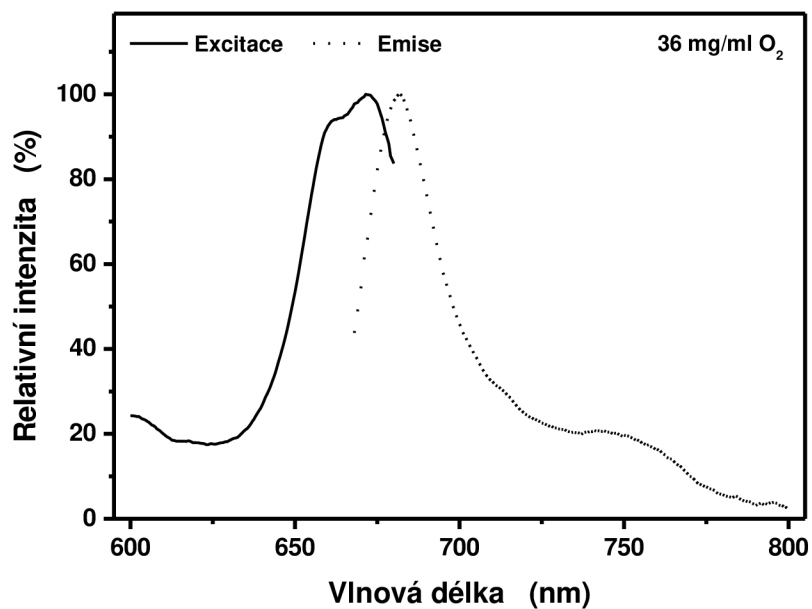
e



f



g



h

Obrázek 20: Normalizovaná fluorescenční spektra: ZnTPPS₄ (a, b); TmPyP (c, d); MB (e, f); ZnPcS₂ (g, h); při nízké (0,4 mg/ml, a, c, e, f) a vysoké (36 mg/ml, b, d, f, h) koncentraci kyslíku v PBS.

Fotosenzitizér	Koncentrace kyslíku	Excitace λ_{\max} (nm)	Emise λ_{\max} (nm)
ZnTPPS ₄	Nízká	401, 417, 425	607, 659
	Vysoká	401, 417, 425	607, 659
TmPyP	Nízká	414, 428	715
	Vysoká	414, 428	715
MB	Nízká	621, 663	689, 758
	Vysoká	621, 663	689, 758
ZnPcS ₂	Nízká	663, 672	681, 744
	Vysoká	663, 672	681, 744

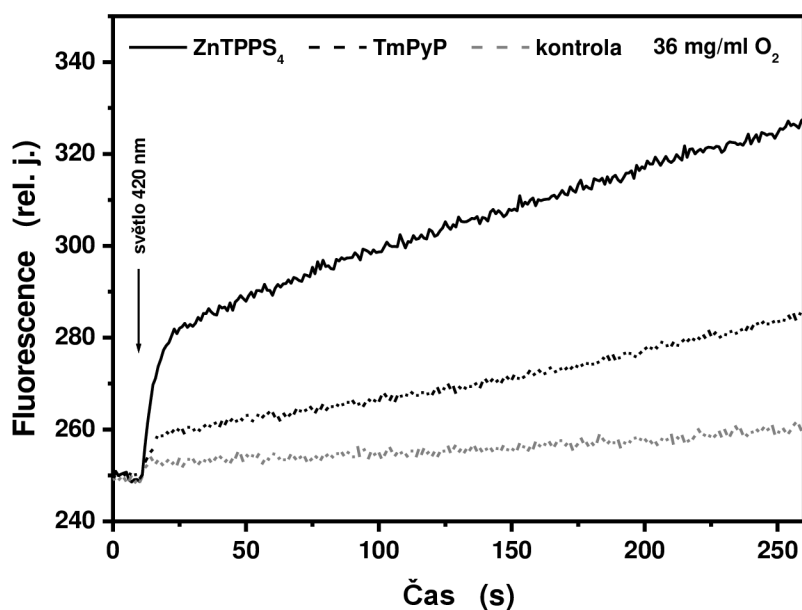
Tabulka 1. Excitační a emisní maxima fotosenzitizérů v PBS s nízkou (0,4 mg/ml) a vysokou (36 mg/ml) koncentrací kyslíku.

Ramena píků jsou zobrazena kurzívou.

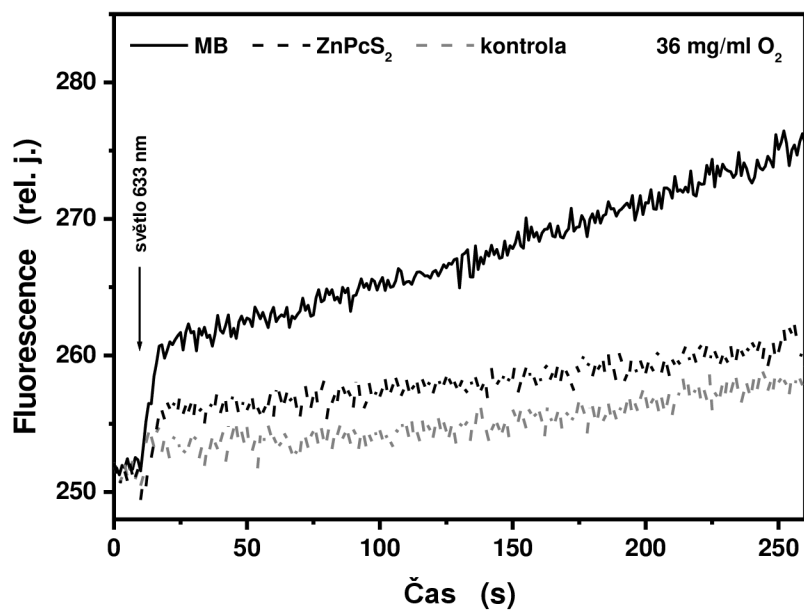
6.2 Měření produkce singletového kyslíku

Produkce singletového kyslíku fotodynamickým efektem s užitím různých fotosenzitizérů při dvou různých koncentracích kyslíku v pufru PBS byla měřena kontinuálně po dobu 4 minut od začátku ozáření roztoku (Obrázek 21). Deriváty porfyrinu byly excitovány vlnovou délkou světla 420 nm při ozáření $4,1 \times 10^{-4} \text{ W/cm}^2$, zatímco MB a ZnPcS₂ vlnovou délkou světla 663 nm při ozáření $2,1 \times 10^{-4} \text{ W/cm}^2$. SOSG byl přidán do pufru jako senzor produkce singletového kyslíku, který prochází změnou chemické struktury produkující

vysoce fluorescenční SOSG endoperoxid. Z kinetických měření jsme vyhodnotili rychlost růstu fluorescence během prvních 7 sekund a celkovou změnu intenzity fluorescence za 4 minuty (Tabulka 2). S ohledem na stejnou molární koncentraci fotosenzitizérů byla produkce singletového kyslíku nejvyšší u ZnTPPS₄, kde rychlost změny fluorescence byla více než 3krát vyšší než rychlost získaná pro TmPyP. Podobný výtěžek v produkci singletového kyslíku jako byl pozorován u TmPyP, byl dosažen pro MB, ale zde byla hodnota ozáření poloviční. Kromě toho byla rychlost produkce singletového kyslíku pro MB asi o 30 % vyšší, než jsme spočítali pro ZnPcS₂. Relativně podobných výsledků produkce singletového kyslíku bylo dosaženo, při hodnocení změny fluorescence po 4 minutách měření. Překvapivě jsme nepozorovali statisticky významné změny v produkci singletového kyslíku spojených s různými koncentracemi kyslíku v PBS 0,4 a 36 mg/l (Tabulka 2).



a



b

Obrázek 21: Reprezentativní záznam produkce singletového kyslíku reflektující tvorbu vysoce fluorescenčního SOSG endoperoxidu z SOSG v přítomnosti různých senzitizerů: ZnTPPS₄ a TmPyP při ozáření světlem vlnové délky 420 nm (a); MB a ZnPcS₂ při ozáření světlem vlnové délky 663 nm (b).

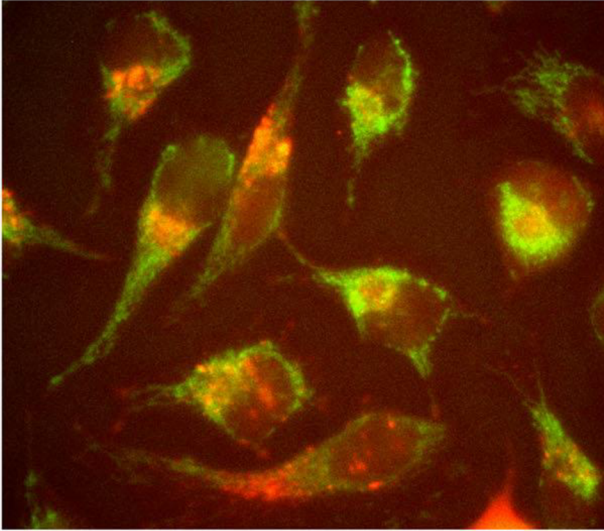
Fotosenzitizér	Koncentrace kyslíku	$\Delta F/\Delta t$ (RU·s ⁻¹) během prvních 7 sekund	ΔF (RU) po 4 minutách	
ZnTPPS ₄	Nízká	4.0±0.3	96±15	p=0.257
	Vysoká	3.9±0.2	83±15	
TmPyP	Nízká	1.2±0.2	42±5	p=0.734
	Vysoká	1.2±0.1	40±5	
MB	Nízká	1.0±0.1	32±5	p=0.847
	Vysoká	1.1±0.1	31±6	
ZnPcS ₂	Nízká	0.68±0.06	13±4	p=0.899
	Vysoká	0.75±0.09	12±2	

Tabulka 2. Kvantifikace produkce singletového kyslíku různými fotosenzitizéry v PBS s nízkou (0,4 mg/ml) a vysokou (36 mg/ml) koncentrací kyslíku. Vzhledem k významně odlišné odezvě SOSG fluorescence v průběhu času byla hodnocena změna intenzity fluorescence za jednotku času v prvních 7 sekundách ($\Delta F/\Delta t$) a celková změna intenzity fluorescence (ΔF) za 4 minuty ozařování. Jednofaktorová analýza rozptylu (ANOVA) byla použita k porovnání průměrů těchto dat lišících se koncentrací kyslíku a p-hodnota je hladina významnosti dané analýzy.

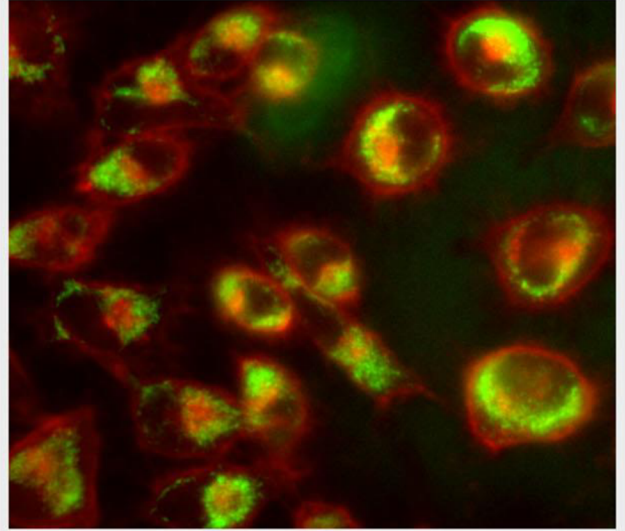
6.3 Transmisní světelná a fluorescenční mikroskopie

Ke zhodnocení intracelulární lokalizace akumulovaného fotosenzitizéru v HeLa buňkách po 24 hodinách fluorescenčním mikroskopem byly použity specifické fluorescenční sondy a příslušné excitační a emisní filtry (Obrázek 22). Oba fotosenzitizéry ZnTPPS₄ i ZnPcS₂ vykazují nehomogenní distribuci uvnitř buňky (červená fluorescence), avšak jsou zde jisté rozdíly. Dominantně je nalzáme v perinukleárních oblastech, v místech bohatých na mitochondrie a lysosomy, ZnTPPS₄ vytváří několik malých klastrů podobně jako zelená fluorescenční sonda označující lysosomy (LysoTracker), zatímco ZnPcS₂ vykazuje mnohem jemnější distribuci, a navíc mimo perinukleární oblast tento fotosenzitizér také vykazuje silnou afinitu k plasmatickým membránám. Ačkoli oba sensitizéry vykazují částečný překryv s oběma fluorescenčními sondami, zdá se, že ZnTPPS₄ je preferenčně umístěn v lysosomech, zatímco ZnPcS₂ upřednostňuje mitochondrie. Určitá nejednoznačnost vytvořena nekompletním překryvem fluorescenčních obrazů může být přičtena faktu, že LysoTracker a MitoTracker mají sklon zabarvit i jiné buněčné struktury, když je jejich koncentrace vysoká (dle dokumentace výrobce). V našich experimentech jsme použili nejvyšší doporučenou koncentraci. Některé oblasti vykazují saturaci v intenzitě fluorescence, ale to bylo hlavně způsobeno dlouhým expozičním časem (3–5 s), po který byly obrazy získávány. Hlavním důvodem delší expozice bylo více zviditelnit oblasti s menší akumulací fluorescenčních sond, než vykazovala perinukleární oblast. Nepředpokládáme, že by použití nižších koncentrací vedlo k odlišným fluorescenčním obrazům. Obarvení DNA Hoechstovým barvivem jasně ukázalo, že oba sensitizéry nevstupují do buněčného jádra.

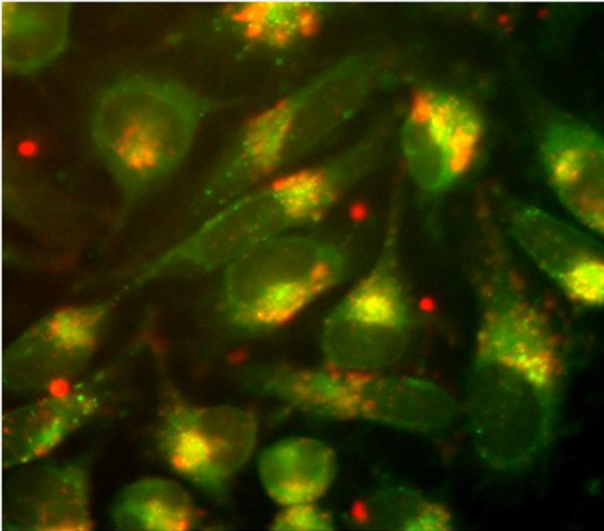
ZnTPPS₄+MitoTracker



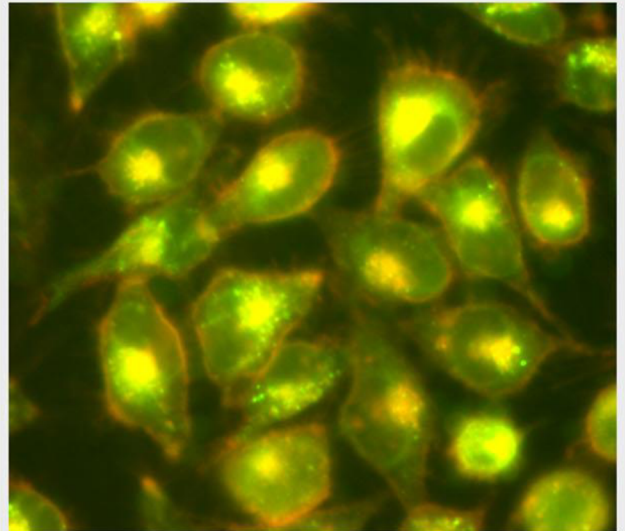
ZnPcS₂+MitoTracker



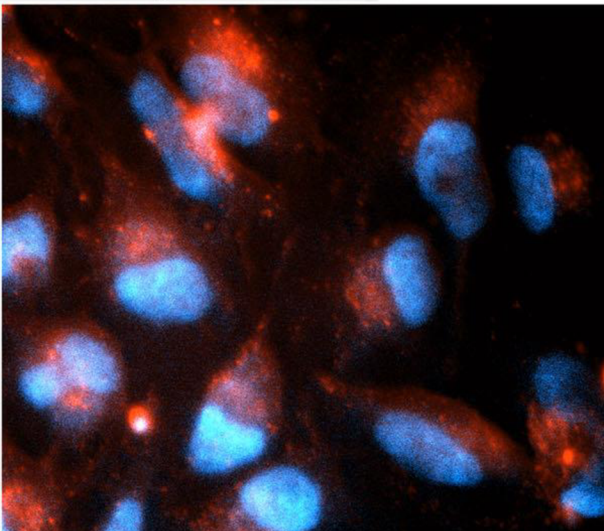
ZnTPPS₄+LysoTracker



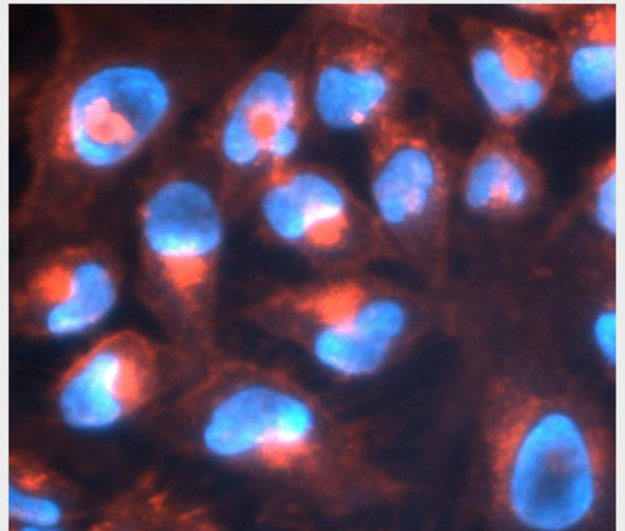
ZnPcS₂+LysoTracker



ZnTPPS₄+Hoechst



ZnPcS₂+Hoechst

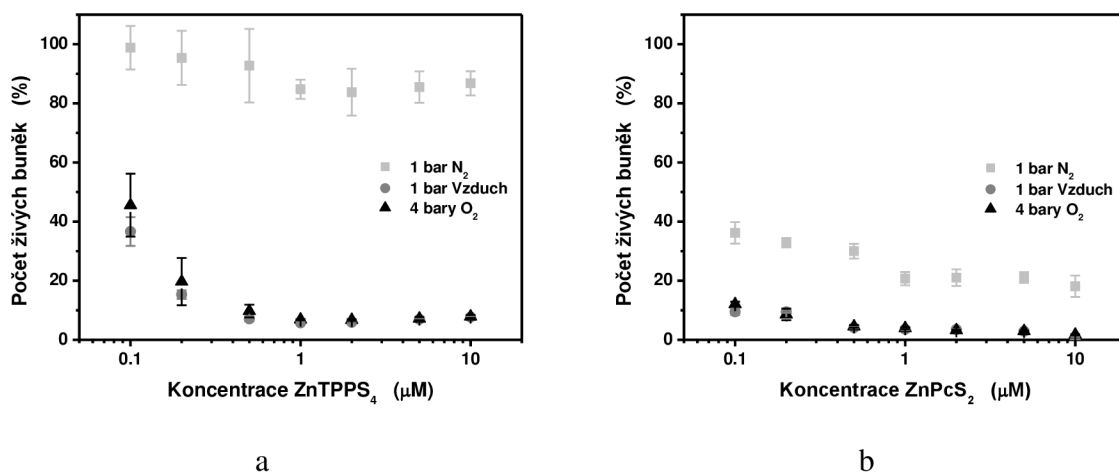


Obrázek 22: Mikroskopické obrazy živých HeLa buněk s ZnTPPS₄ (červený) a ZnPcS₂ (červený) ve fluorescenčním módu, které byly označeny jednou z fluorescenčních sond MitoTracker (zelená), LysoTracker (zelená) nebo Hoechstovým barvivem (modrá). Sloučené obrazy byly získány kombinací dílčích fluorescenčních obrazů (fotosenzitizeru a sondy) při užití zobrazovacího softwaru Olympus CellM a CellR. Obrazy byly získány při zvětšení 400x.

6.4 MTT test fototoxicity

Výsledky testu cytotoxicity MTT ukázaly, že přítomnost kyslíku měla signifikantní efekt na aktivitu NAD(P)H závislých buněčných oxidoreduktázových enzymů v HeLa buňkách, které byly fotodynamicky ošetřeny ZnTPPS₄ a ZnPcS₂ (Obrázek 23). Aktivita buněčných reduktázových enzymů odpovídá počtu viabilních buněk schopných proliferace. Zatímco ZnPcS₂ byl významně účinný dokonce v čistě dusíkové atmosféře a způsobil snížení počtu buněk s aktivními oxidoreduktázami na 20 %, efekt ZnTPPS₄ byl znatelně nižší.

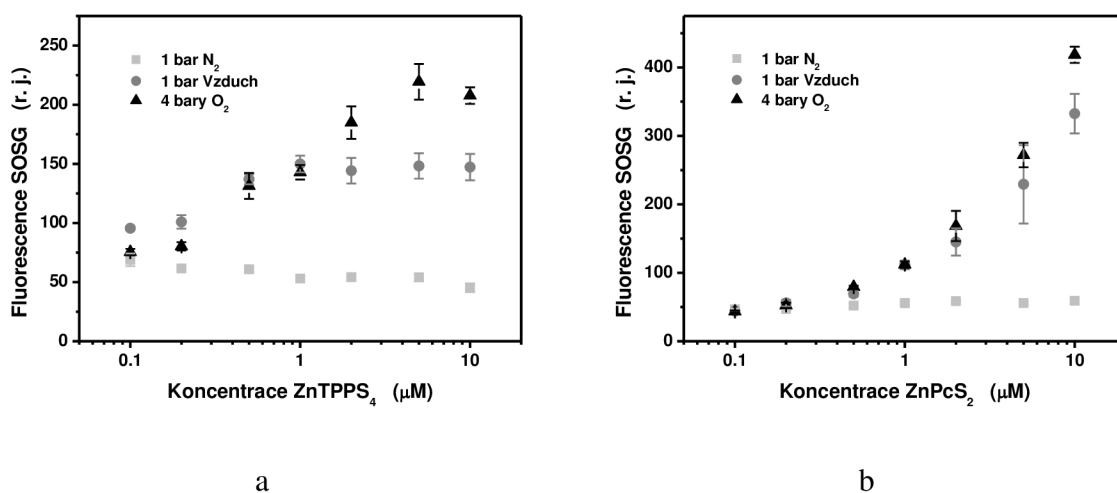
Bez kyslíku byla nejvyšší koncentrace ZnTPPS₄ schopna zredukovat enzymatickou aktivitu oxidoreduktáz jen přibližně o 10 %. Na druhé straně nebylo prokázáno, že by účinek hyperbarického kyslíku signifikantně ovlivnil účinnost fotodynamické terapie ani pro jeden z obou senzitizerů, i když nelze vyloučit určité posuny jejich hodnot IC₅₀. Při nejvyšších koncentracích fotosenzitizerů efekt normobarického vzduchu a 4 barového čistého kyslíku (tj. 20násobné zvýšení parciálního tlaku kyslíku) byl podobný.



Obrázek 23: Závislost oxidoreduktázové aktivity uvnitř HeLa buněk na PDT při použití různých koncentrací ZnTPPS₄ (a) a ZnPcS₂ (b) při různých parciálních tlacích kyslíku – v dusíkové atmosféře při 1 baru, na vzduchu při 1 baru a v kyslíkové atmosféře při 4 barech. Buněčná fototoxicita byla určena měřením enzymové aktivity živých buněk při užití MTT testu. Hodnota výtěžku MTT produktu v kontrolním vzorku (bez užití PDT) byla vzata za 100 %. Hodnoty představují průměr ± standartní odchylka z 3 nezávislých experimentů.

6.5 Měření singletového kyslíku

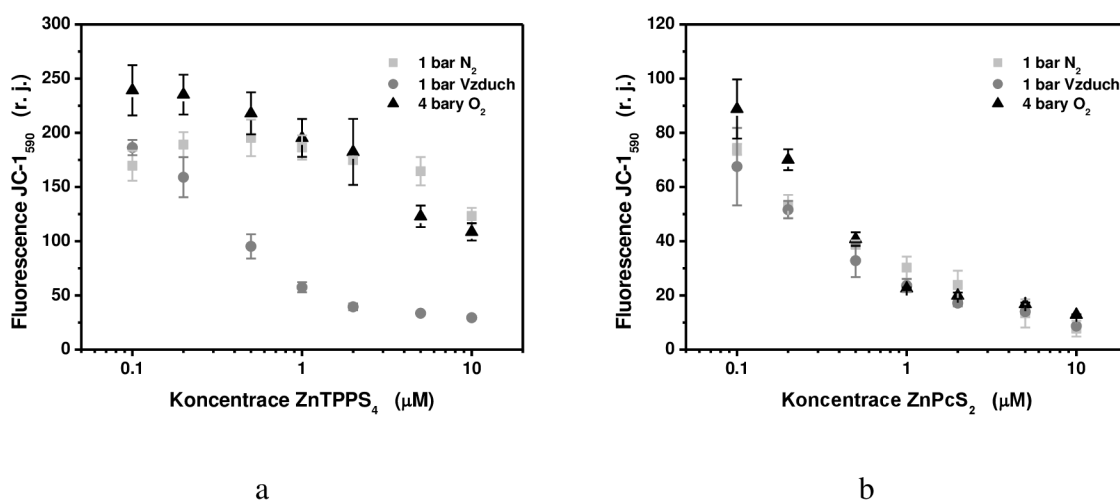
Jak bylo očekáváno v atmosféře čistého dusíku, byla produkce singletového kyslíku v přítomnosti ZnTPPS₄ stejně jako ZnPcS₂ limitována a nevykazovala žádný růst s rostoucí koncentrací fotosenzitizéru (Obrázek 24). Pokud byly HeLa buňky vystaveny kyslíku intenzita fluorescence SOSG rostla v závislosti na koncentraci pro oba fotosenzitizéry, ale byly zde minimálně dva rozdíly. ZnPcS₂ vykazoval nelineární krokový růst produkce singletového kyslíku s rostoucí koncentrací fotosenzitizéru, zatímco vyšší koncentrace (2, 5 and 10 μM) ZnTPPS₄ vykazovaly již saturaci. Dále při nižších koncentracích (0,1 a 0,2 μM) ZnPcS₂, na rozdíl od ZnTPPS₄, intenzita fluorescence SOSG nezávisela na přítomnosti kyslíku.



Obrázek 24: Závislost produkce singletového kyslíku v ozářených HeLa buňkách na koncentraci ZnTPPS₄ (a) a ZnPcS₂ (b) při různých parciálních tlacích kyslíku – v dusíkové atmosféře při 1 baru, na vzduchu při 1 baru a v kyslíkové atmosféře při 4 barech. Hodnoty představují průměr ± standardní odchylka z 3 nezávislých experimentů.

6.6 Měření mitochondriálního membránového potenciálu

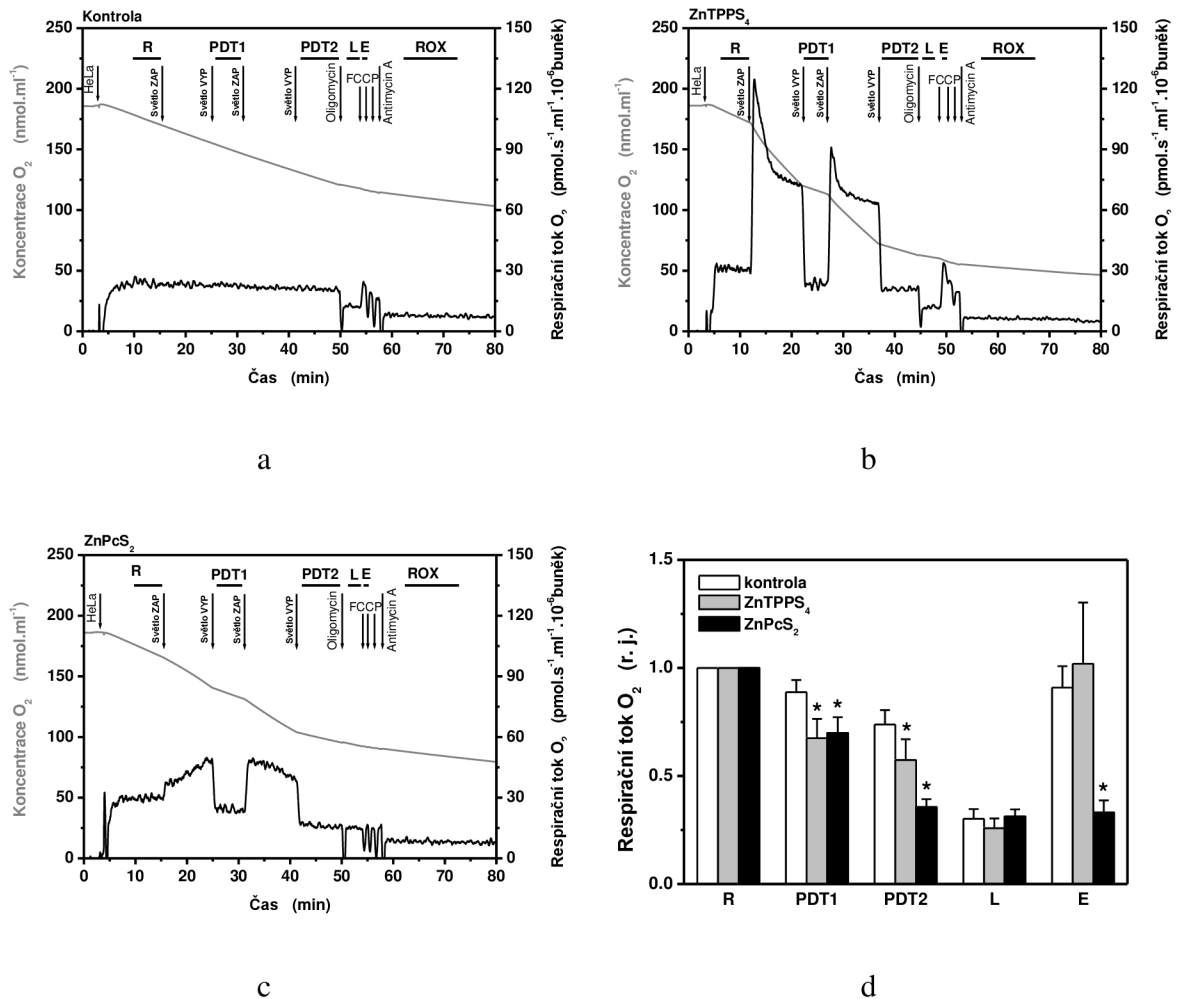
Pro oba zinečnaté fotosenzitizéry byl u fotodynamicky ošetřených HeLa buněk změřen pokles mitochondriálního membránového potenciálu, který byl úměrný koncentraci fotosenzitizérů (Obrázek 25). V případě ZnPcS_2 tento pokles nebyl ovlivněn rozdíly v koncentraci kyslíku, tj. podobné hodnoty poklesu byly u roztoku nasyceného kyslíkem při 4 barech čistého kyslíku a kyslíkem chudého roztoku vystaveného 1 baru čistého dusíku. Nicméně u HeLa buněk s ZnTPPS_4 (vyjma nejvyšší koncentrace), když byly buňky vystaveny čisté dusíkové atmosféře, nenastal signifikantní pokles mitochondriálního membránového potenciálu.



Obrázek 25: Efekt PDT při použití ZnTPPS_4 (a) a ZnPcS_2 (b) při různých parciálních tlacích kyslíku – v dusíkové atmosféře při 1 baru, na vzduchu při 1 baru a v kyslíkové atmosféře při 4 barech. Hodnoty představují průměr \pm standardní odchylka z 3 nezávislých experimentů.

6.7 Respirometrie s vysokým rozlišením

Reprezentativní záznamy spotřeby kyslíku HeLa buňkami s přidáním 2 μM ZnTPPS₄ nebo 2 μM ZnPcS₂, jsou znázorněny na obrázcích 26a, 26b a 26c. Po dosažení ustáleného stavu popsaného jako základní respirační stav R, byly buňky ozářeny odpovídajícím světelným zdrojem ve dvou 10minutových cyklech s 5minutovou temnou periodou. Po prvním ozáření byla rychlost spotřeby kyslíku označena jako PDT1, po druhém ozáření byla rychlost spotřeby kyslíku označena jako PDT2. Nový ustálený stav nefosforylačního toku po následné inhibici ATP syntázy byl označen L. Následné trojí přidání protonoforu FCCP indukovalo stav maxima odprážené respirace E. V intaktních HeLa buňkách spotřeba kyslíku nebyla ovlivněna ozářením a postupně v čase klesala. Avšak v HeLa buňkách s akumulovanými fotosenzitizéry zapnutí světla okamžitě vyvolalo rychlé změny v respiračních tocích, které odpovídaly akceleraci odčerpávání kyslíku z respiračního media. Rychlé odčerpání kyslíku bylo pozorováno v HeLa buňkách s přidáním ZnTPPS₄. Zdá se, že tyto rychlé změny, jsou spíše vyvolány interakcí světlem aktivovaných fotosenzitizérů s molekulami kyslíku nežli přímou odpovědí buněčné respirace. Pro jasnou identifikaci efektu na buněčnou respiraci byl respirační tok hodnocen v následné temné periodě. Oba fotosenzitizéry snížily repiraci HeLa buněk, ale ZnPcS₂ vykázal mnohem výraznější efekt po druhém ozařovacím cyklu (obrázek 26d). Navíc v případě ZnPcS₂, snížená spotřeba kyslíku pokračovala po přidání protonoforního odpráhovače, což bylo v kontrastu s ZnTPPS₄, u kterého po přidání FCCP se spotřeba kyslíku v mitochondriích bez fosforylace vrátila k hodnotám podobným s kontrolními buňkami bez senzitizeru. Navíc je potřeba zmínit jeden fenomén, který se objevil během měření. V odpovědi na světlo buňky s ZnTPPS₄ vykazovaly postupný a rychlý pokles spotřeby kyslíku po počátečním rychlém nárůstu, zatím co vzorky buněk s ZnPcS₂ pokračovaly s růstem spotřeby kyslíku během celého prvního ozařovacího cyklu a tendence snížené spotřeby kyslíku se projevila až během druhého ozařovacího cyklu.



Obrázek 26: Reprezentativní záznamy respirometrie s vysokým rozlišením v intaktních (kontrola, a) ZnTPPS₄ (b) a ZnPcS₂ (c) ošetřenými HeLa buňkami jsou zobrazeny jako křivky koncentrace kyslíku a respiračního toku kyslíku, vypočítaného jako negativní časová derivace koncentrace kyslíku. Respirační tok v různých stavech (d) byl normalizován na základní respirační stav R po odečtení reziduální spotřeby kyslíku ROX. Respirační toky po ozáření respirační komůrky byly označeny jako PDT1 a PDT2 po prvním a po druhém ozáření. Nefosforylační tok po inhibici ATP syntázy, byl dán jako únik protonů skrz mitochondriální membránu - L respirace, maximum odpřažené respirace E, bylo dosaženo po prvním přidání protonoforu FCCP. V panelu d, každá hodnota reprezentuje průměr ± standartní odchylku z 3 nezávislých experimentů. Hvězdička označuje signifikantní rozdíl od kontroly ($p < 0.05$)

7 Diskuse

PDE je zprostředkována 2 typy reakcí. Závisí na mnoha faktorech, včetně chemické struktury fotosenzitizéru, vlnové délky a intenzity světla, koncentrace kyslíku, složení, dielektrické konstanty a pH použitého média [86]. Předpokládá se, že reakce typu II produkující singletový kyslík je významnějším procesem určujícím účinnost PDE v PDT [55].

Naše studie se proto zaměřila na to, zda je možné dosáhnout vyšší produkce singletového kyslíku zvýšením koncentrace kyslíku. Tímto hodnocením prošly čtyři různé senzitivizéry. Nyman a Hynninen uvedli, že vytvoření komplexu s diamagnetickým kationtem, například s Al^{3+} , Zn^{2+} a Ga^{3+} , zvyšuje produkci a délku života tripletového stavu fotosenzitizérů [19] a takto může být podpořena produkce singletového kyslíku. Proto jsme porovnali dva porfyrinové deriváty ZnTPPS_4 a komerčně dostupný TmPyP . Naše výsledky ukázaly, že produkce singletového kyslíku za podobných podmínek byla asi 3krát vyšší v případě zinečnatého komplexu. V případě porovnání dvou zástupců fotosenzitizérů s absorpčními maximy v červené oblasti viditelného elektromagnetického spektra vykazoval zinečnatý komplex syntetizovaného ftalocyaninu ZnPcS_2 výtěžek jen asi o 30 % vyšší než nekovový fotosenzitizér MB.

Normální hodnoty buněčného pO_2 jsou v rozmezí 9,9 - 19 mm Hg (tj. asi 0,4 - 0,8 mg/l) [87]. Během hyperbarické kyslíkové terapie se tyto hodnoty mohou několikrát zvýšit. Naše měření v PBS však neprokázala, že zvýšení koncentrace kyslíku z 0,4 na 36 mg/l by vedlo k vyšší produkci singletového kyslíku v přítomnosti různých fotosenzitizérů aktivovaných světlem. Řada experimentálních a klinických studií ukázala, že hyperbarický kyslík zvyšuje účinnost PDT u karcinomů [88, 50]. Na druhé straně prekurzory protoporfyrinu IX při vyšších koncentracích kyslíku nevyvolaly významné zvýšení fototoxicity pro buňky lidského spinocelulárního karcinomu [89]. Ve světle těchto výsledků se zdá, že produkce singletového kyslíku prostřednictvím PDT při normálních fyziologických hodnotách pO_2 již dosahuje svého maxima.

Při jistém zjednodušení se dá použít model, kdy by každá molekula kyslíku mohla být považována za krychli o velikosti, která se rovná velikosti molekuly (tj. přibližně 0,3 nm), pak celkový počet těchto krychlí v objemu 1 l je $3,7 \times 10^{25}$ ($1 / (0,3 \times 10^{-8})^3$). Při koncentraci kyslíku 0,4 mg / l je počet molekul kyslíku na 1 l $7,5 \times 10^{18}$ ($4 \times 10^{-7} / (32 \times 1,66 \times 10^{-27})$). Existuje tedy $4,9 \times 10^6$ ($3,7 \times 10^{25} / 7,5 \times 10^{18}$) krychlí na jednu molekulu kyslíku v prostoru, který

odpovídá vzájemné vzdálenosti mezi dvěma sousedními molekulami kyslíku přibližně 50 nm ($(4,9 \times 10^6)^{1/3} \times 0,3$). Při koncentraci fotosenzitizéru 1 μM je vzájemná vzdálenost mezi dvěma sousedními molekulami fotosenzitizéru v průměru delší. Vezmeme-li v úvahu homogenní rozložení fotosenzitizéru a molekul kyslíku, pak se maximální vzájemná vzdálenost mezi fotosenzitizérem a molekulou kyslíku sníží na polovinu (tj. 25 nm) a průměrná vzdálenost se tedy rovná 12,5 nm. V případě koncentrace kyslíku 36 mg/l dávají podobné výpočty průměrnou vzájemnou vzdálenost 2,5 nm. Excitovaný tripletový stav fotosenzitizéru může jednoduše přenášet energii do tripletového stavu molekuly kyslíku, protože oba elektrony zapojené do procesu přenosu energie mají stejný spin. Vzájemná vzdálenost proto zůstává klíčovým faktorem. Podle Försterovy teorie [90] je přenos rezonanční energie nepřímo úměrný šesté mocnině vzdálenosti. V závislosti na interagujících molekulách však může být tento typ přenosu energie maximálně účinný při vzájemných vzdálenostech do 5 nebo více nanometrů [91]. Při našem zjednodušení jsme vynechali skutečnost, že molekula kyslíku rozpuštěná ve vodě tvoří indukovaný dipól, který může elektrostaticky interagovat s nabitým fotosenzitizérem a tím výrazně zkrátit jejich vzájemnou vzdálenost. Ke zkrácení vzdálenosti může přispět i relativně dlouhá doba života tripletového stavu fotosenzitizéru spolu s vysokou rychlostí difúze kyslíku. Tripletové stavy TMPyP a MB zanikají s dobou života asi 2 μs ve vzduchu nasyceném vodním roztoku [92, 93]. Sulfonované zinečnaté deriváty ftalocyaninů jsou známé svou dlouhou dobou života tripletových stavů a vysokým kvantovým výtěžkem singletového kyslíku [94]. Ve vodě může tato doba života dosáhnout až 190 μs [95]. Průměrná vzdálenost, kterou urazí molekula difúzí za čas t , je dána vztahem $(2 \times D \times t)^{1/2}$, kde D je difúzní koeficient molekuly v médiu [96]. Vzhledem k tomu, že typické difúzní koeficienty ve vodě při 298 K jsou asi $2 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ [97], pak každá rozpuštěná molekula kyslíku může za 2 μs urazit dráhu 90 nm.

Podle výše uvedených skutečností se zdá, že zvýšení efektivity PDT za normoxických podmínek lze spíše dosáhnout výběrem fotosenzitizéru. Komplex s kovovými ionty, jako je Zn^{2+} , může vést ke zvýšené produkci singletového kyslíku. MB je tricyklický fenothiazin a používá se v lékařské praxi především k léčbě methemoglobinémie, otravy oxidem uhelnatým nebo kyanidem a malárie [98, 99]. Naše výsledky navíc potvrdily, že MB může být také slibným fotosenzitizérem vyvolávající vyšší produkci singletového kyslíku. MB byl již použit v PDT pro protinádorovou léčbu [100] a byl hlášen jako ideální fotosenzitizér pro svou adekvátní hydrofilní/lipofilní rovnováhu, vysokou čistotu, stabilní složení, nízkou cenu a silnou absorpci v červené oblasti spektra [101].

Dále jsme hodnotili efekt PDT na modelu karcinomu děložního čípku vystaveného různým parciálním tlakům kyslíku. Fotodynamický efekt na HeLa buňky byl studován při užití dvou různých fotosenzitizérů ZnTPPS₄ a ZnPcS₂. Všeobecně se přijímá fakt, že lokalizace senzitizerů odpovídá místu primárního fotopoškození z důvodu velmi krátké délky života a omezené difúze reaktivních forem kyslíku (ROS) v biologických systémech [52, 53, 58]. Fotosenzitizéry lokalizované v mitochondriích nebo endoplasmatickém retikulu vyvolávají apoptózu, zatím co fotosenzitizéry lokalizované v lysosomech nebo plasmatických membránách navozují nekrózu [59]. Pomocí fluorescenční mikroskopie jsme ukázali, že oba senzitizery vykazují akumulaci v cytoplazmě a perinukleárních oblastech. Zatím co ZnTPPS₄ preferuje lysosomy, ZnPcS₂ spíše upřednostňuje mitochondrie spolu s vysokou afinitou k plasmatickým membránám. Toto je v souladu s dřívějšími výsledky jiných výzkumných týmů. Bylo zjištěno, že některé fotosenzitizéry na bázi porfyriu jsou lokalizovány v cytosolu, lysosomech, a plasmatických membránách [60-64], zatím co ftalocyaninové fotosenzitizéry hlavně cílily na mitochondrie [65- 68]. Avšak v případě zinečnatých komplexů ftalocyaninu se uvádějí i jiná místa akumulace jako je Golgiho aparát a lysosomy [69- 71]. Předpokládá se, že mechanismus typu II je důležitější proces, který ovlivňuje efektivitu PDT. Tento mechanismus je dominantní ve tkáních z důvodu vysokého obsahu kyslíku [72]. Avšak pokud dojde k vyčerpání kyslíku, začne převažovat mechanismus typu I [53], a obecně, je tak snížena fotodynamická toxicita [73–76]. Také jsme zkoumali význam kyslíku při PDT s ZnTPPS₄ a ZnPcS₂, jelikož hypoxie je charakteristická pro většinu karcinomatózních tumorů [77]. Abychom zvýšili množství kyslíku, vystavili jsme buňky 4 barové kyslíkové atmosféře. Podle výsledků MTT testu fototoxicity jsme zjistili, že ZnTPPS₄ vykazuje mnohem větší citlivost ke kyslíku nežli ZnPcS₂. V čistě dusíkové atmosféře přibližně 80 % HeLa buněk bylo usmrceno, pokud byly senzitivizovány ZnPcS₂. Avšak většina z HeLa buněk (přibližně 90 %) přežila v čistě dusíkové atmosféře, pokud byly ošetřeny druhým senzitizerem ZnTPPS₄. Další experimenty na monovrstvách buněčných kultur odhalily, že nedochází k žádným významným změnám v efektivitě PDT, pokud je tato užitá v normobarických a hyperbarických podmínkách. Proto se zdá, že množství kyslíku při normobarické atmosféře je dostatečné k vyvolání maximální fotodynamické odpovědi in vitro, i kdyby vyšší parciální tlak kyslíku vedl ke zvýšené produkci singletového kyslíku v buňkách. Avšak toto bylo pouze pozorováno, když byly koncentrace fotosenzitizérů znatelně vyšší nežli jejich hodnoty IC₅₀. Při studiu vlivu hladiny kyslíku na potenciál mitochondriální membrány fotodynamicky ošetřených HeLa buněk jsme obdrželi podobné výsledky jako u MTT testu fototoxicity. Tedy v případě ZnPcS₂ se mitochondriální

membránový potenciál snížil v závislosti na koncentraci nezávisle na hladině kyslíku, zatím co ZnTPPS₄ byl schopen významně depolarizovat mitochondriální membránový potenciál pouze v přítomnosti kyslíkové atmosféry. Proto je evidentní, že oba senzitizery mají určitou afinitu k mitochondriím a jsou schopny ovlivnit jejich funkci. Kolaps mitochondriálního membránového potenciálu je spojen s permeabilitou mitochondriální membrány a s uvolněním apoptogenních proteinů do cytozolu buněk [78–80]. Toto je také míněno jako bod bez návratu v mnoha mitochondriemi mediovanými cestami buněčné smrti [81, 82]. Zkoumali jsme stupeň vlivu na mitochondriální respiraci užitím respirometrie s vysokým rozlišením. Ačkoli oba senzitizery byly schopny signifikantně snížit respiraci v HeLa buňkách ZnPcS₂ ukázal mnohem vyšší efekt, a navíc na rozdíl od ZnTPPS₄, respirace pokračovala na nízké úrovni i po odpražení mitochondriální membrány protonoforem. Toto pokračování indikuje, že světlem aktivovaný ZnPcS₂ dokáže vyvolat významné změny v mitochondriálním respiračním řetězci a toto může být klíčový faktor k vyvolání buněčné smrti.

8 Závěr

Nejčastějším typem gynekologické malignity je karcinom děložního čípku. U žen je druhým nejčastějším důvodem úmrtí pro karcinom. Časná fáze karcinomu děložního čípku může být léčena radikální hysterektomií. Léčebnou strategií pro lokálně pokročilý karcinom je souběh chemoterapie a radioterapie. Ačkoli jsou tyto postupy slibné, vykazují nepříznivé vedlejší efekty. K minimalizaci těchto efektů stejně jako ke snížení rizika rekurence karcinomu jsou zkoumány nové léčebné metody [102].

PDT je jednou ze slibných léčebných modalit. Data, která jsou v současnosti k dispozici, ukazují, že PDT je mediována skrz silně na kyslíku závislým mechanismu typu II pro většinu známých fotosenzitizérů. Hypoxie je charakteristickým znakem většiny solidních karcinomů, a proto může být efektivita PDT na hypoxické tumory limitována. Zjištění z *in vitro* experimentů a experimentů na zvířatech naznačují, že současná aplikace HBO a PDT má silnější efekt než PDT.

Lze říci, že PDT představuje alternativní léčebnou modalitu, která může být velmi účinná, pokud se vypořádá s otázkami, jako je výběr fotosenzitizéru, dávkování světla, a především s tkáňovou hypoxií [103].

Zvýšení hladiny kyslíku v tkáni lze dosáhnout použitím nosičů kyslíku, zlepšením průtoku krve, aplikací hyperbarické kyslíkové terapie, kombinací dalších terapií s PDT a frakcionací světla snižující spotřebu kyslíku [103, 104]. Tyto přístupy budou účinné, pokud je léčba zaměřena na hypoxickou tkáň, např. rozvinutý (solidní) nádor.

Naše měření však ukázala, že toto není nutné, pokud se PDT používá za normoxických podmínek, kdy hladina kyslíku je již dostatečná k vyvolání maximální produkce singletového kyslíku. Ukazuje se, že nižší dostupnost kyslíku může být kompenzována i delší interakcí excitovaného fotosenzitizéru s molekulou kyslíku, např. díky delší době života tripletového stavu fotosenzitizéru. Avšak toto možná nebude nezbytné, pokud PDT využije mechanismus typu I, jak se to jeví pro fotosenzitizér ZnPcS₂.

9 Seznam obrázků

Obrázek 1: Mechanismy fotodynamické inaktivace různých patogenů ilustrované Jablonského diagramem. S0 – singletový základní stav, S1-první singletový excitovaný stav, PS fotosenzitizér v základním stavu, 1PS*- fotosenzitizér v singletovém excitovaném stavu, 3PS*- fotosenzitizér v tripletovém excitovaném stavu, ISC-mezisystémový přechod (intersystem crossing), 1Δg-singletový molekulární kyslík. [3]	7
Obrázek 2: Syntéza HpD. Reakční podmínky: i) HBr, CH ₃ COOH, H ₂ O, ii) H ₂ SO ₄ , CH ₃ COOH, iii) NaOH.....	13
Obrázek 3: Rozdíl mezi porfyriny, chloriny a bakteriochloriny	16
Obrázek 4: Chemická struktura Bonellinu	17
Obrázek 5: Chemická struktura Temoporfinu	18
Obrázek 6: Chemická struktura Verteporfinu	20
Obrázek 7: Chemická struktura SnET2.....	21
Obrázek 8: Chemická struktura Talaporfinu	22
Obrázek 9: Chemická struktura Motexafin lutecium	23
Obrázek 10: Chemická struktura ftalocyaninů.....	25
Obrázek 11: Chemická struktura Naftalocyaninu	26
Obrázek 12: Syntéza PpIX z kyseliny 5-aminolevulinové.....	27
Obrázek 13: Chemické struktury esterů ALA.....	29
Obrázek 14: Chemická struktura TPPS ₄ (M=2H), ZnTPPS ₄ (M=Zn) a PdTPPS ₄ (M=Pd)	30
Obrázek 15: Chemická struktura některých dalších senzitizerů	33
Obrázek 16: Chemická struktura fotosenzitizerů: 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatofenyl) zinečnatý porfyrin (ZnTPPS ₄ , a), 5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridinio)porfyrin tetra(p-toluenesulfonát) (TmPyP, b), tetramethylthionin chlorid (methylenová modř, MB, c), a zinečnatý ftalocyanin disulfonát (ZnPcS ₂ , d).....	38
Obrázek 17: Hyperbarická komůrka	40
Obrázek 18: Světelný diodový zdroj	41
Obrázek 19: Měření buněčné respirace pomocí oxygrafu Oxygraph2k.....	44
Obrázek 20: Normalizovaná fluorescenční spektra: ZnTPPS ₄ (a, b); TmPyP (c, d); MB (e, f); ZnPcS ₂ (g, h); při nízké (0,4 mg/ml, a, c, e, f) a vysoké (36 mg/ml, b, d, f, h) koncentraci kyslíku v PBS.	50

Obrázek 21: Reprezentativní záznam produkce singletového kyslíku reflektující tvorbu vysoce fluorescenčního SOSG endoperoxidu z SOSG v přítomnosti různých senzitizerů: ZnTPPS ₄ a TmPyP při ozáření světlem vlnové délky 420 nm (a); MB a ZnPcS ₂ při ozáření světlem vlnové délky 663 nm (b).	53
Obrázek 22: Mikroskopické obrazy živých HeLa buněk s ZnTPPS ₄ (červený) a ZnPcS ₂ (červený) ve fluorescenčním módu, které byly označeny jednou z fluorescenčních sond MitoTracker (zelená), LysoTracker (zelená) nebo Hoechstovým barvivem (modrá). Sloučené obrazy byly získány kombinací dílčích fluorescenčních obrazů (fotosenzitizeru a sondy) při užití zobrazovacího softwaru Olympus CellM a CellR. Obrazy byly získány při zvětšení 400x.	57
Obrázek 23: Závislost oxidoreduktázové aktivity uvnitř HeLa buněk na PDT při použití různých koncentrací ZnTPPS ₄ (a) a ZnPcS ₂ (b) při různých parciálních tlacích kyslíku – v dusíkové atmosféře při 1 baru, na vzduchu při 1 baru a v kyslíkové atmosféře při 4 barech. Buněčná fototoxicita byla určena měřením enzymové aktivity živých buněk při užití MTT testu. Hodnota výtěžku MTT produktu v kontrolním vzorku (bez užití PDT) byla vzata za 100 %. Hodnoty představují průměr ± standardní odchylka z 3 nezávislých experimentů.	58
Obrázek 24: Závislost produkce singletového kyslíku v ozářených HeLa buňkách na koncentraci ZnTPPS ₄ (a) a ZnPcS ₂ (b) při různých parciálních tlacích kyslíku – v dusíkové atmosféře při 1 baru, na vzduchu při 1 baru a v kyslíkové atmosféře při 4 barech. Hodnoty představují průměr ± standardní odchylka z 3 nezávislých experimentů.	59
Obrázek 25: Efekt PDT při použití ZnTPPS ₄ (a) a ZnPcS ₂ (b) při různých parciálních tlacích kyslíku – v dusíkové atmosféře při 1 baru, na vzduchu při 1 baru a v kyslíkové atmosféře při 4 barech. Hodnoty představují průměr ± standardní odchylka z 3 nezávislých experimentů.	60
Obrázek 26: Reprezentativní záznamy respirometrie s vysokým rozlišením v intaktních (kontrola, a) ZnTPPS ₄ (b) a ZnPcS ₂ (c) ošetřenými HeLa buňkami jsou zobrazeny jako křivky koncentrace kyslíku a respiračního toku kyslíku, vypočítaného jako negativní časová derivace koncentrace kyslíku. Respirační tok v různých stavech (d) byl normalizován na základní respirační stav R po odečtení reziduální spotřeby kyslíku ROX. Respirační toky po ozáření respirační komůrky byly označeny jako PDT1 a PDT2 po prvním a po druhém ozáření. Nefosforylační tok po inhibici ATP syntázy, byl dán jako únik protonů skrz mitochondriální membránu - L respirace, maximum odprážené respirace E, bylo dosaženo po prvním přidání protonoforu FCCP. V panelu d, každá hodnota reprezentuje průměr ± standardní odchylku z 3 nezávislých experimentů. Hvězdička označuje signifikantní rozdíl od kontroly (p < 0.05).	62

10 Seznam tabulek

Tabulka 1. Excitační a emisní maxima fotosenzitizérů v PBS s nízkou (0,4 mg/ml) a vysokou (36 mg/ml) koncentrací kyslíku 51

Tabulka 2. Kvantifikace produkce singletového kyslíku různými fotosenzitizéry v PBS s nízkou (0,4 mg/ml) a vysokou (36 mg/ml) koncentrací kyslíku. Vzhledem k významně odlišné odezvě SOSG fluorescence v průběhu času byla hodnocena změna intenzity fluorescence za jednotku času v prvních 7 sekundách ($\Delta F/\Delta t$) a celková změna intenzity fluorescence (ΔF) za 4 minuty ozařování. Jednofaktorová analýza rozptylu (ANOVA), hladina významnosti byla použita k porovnání průměrů těchto dat lišících se koncentrací kyslíku a p-hodnota je hladina významnosti analýzy 54

11 Seznam literatury

1. Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003 May;3(5):380-7. doi: 10.1038/nrc1071. PMID: 12724736.
2. Berg K, Selbo PK, Weyergang A, Dietze A, Prasmickaite L, Bonsted A, Engesaeter BØ, Angell-Petersen E, Warloe T, Frandsen N, Høgset A. Porphyrin-related photosensitizers for cancer imaging and therapeutic applications. *J Microsc*. 2005 May;218(Pt 2):133-47. doi: 10.1111/j.1365-2818.2005.01471.x. PMID: 15857375.
3. Kawczyk-Krupka A., Pucelik B., Międzybrodzkaa,A., Sieroń A.R. , Dąbrowski J.M. Photodynamic therapy as an alternative to antibiotic therapy for the treatment of infected leg ulcers, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 23 (2018) 132–143
4. Kharkwal GB, Sharma SK, Huang YY, Dai T, Hamblin MR. Photodynamic therapy for infections: clinical applications. *Lasers Surg Med*. 2011 Sep;43(7):755-67. doi: 10.1002/lsm.21080. PMID: 22057503; PMCID: PMC3449167.
5. Kwiatkowski S, Knap B, Przystupski D, Saczko J, Kędzierska E, Knap-Czop K, Kotlińska J, Michel O, Kotowski K, Kulbacka J(2018) Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed Pharmacother* 106:1098–1107
6. Zimčík P, Miletín M. Fotodynamická terapie jako nová perspektivní metoda léčby nádorových onemocnění I. Přehled fotosensitizerů. *Česká a Slovenská farmacie* 2004. 53(6): 271 – 279.
7. Stewart F, Baas P, Star W. What does photodynamic therapy have to offer radiation oncologists (or their cancer patients)? *Radiother Oncol* 1998; 48(3): 233 – 248.

8. Moan J, Berg K. Photochemotherapy of cancer: experimental research. *Photochem Photobiol* 1992; 55(6): 931 – 948.
9. Lang K, Mosinger J, Wagnerová DM. Pokroky ve fotochemii singletního kyslíku. *Chemické listy* 2005; 99: 211 – 221.
10. Hilf R, Warne NW, Smail DB, Smail SL, Gibson SL. Photodynamic inactivation of selected intracellular enzymes by hematoporphyrin derivative and their relationship to tumor cell viability in vitro. *Cancer Lett* 1984; 24(2): 165 – 172.
11. Dolmans DE. Vascular accumulation of a novel photosensitizer, MV6401, causes selective thrombosis in tumor vessels after photodynamic therapy. *Cancer Res* 2002; 62: 2151 – 2156.
12. Dougherty TJ. Photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 1993; 58(6): 895-900.
13. Hsi RA, Rosenthal DI, Glatstein E. Photodynamic therapy in the treatment of cancer: current state of the art. *Drugs* 1999; 57(5): 725 – 734.
14. Sternberg ED, Dolphin D. Second generation photodynamic agents: a review. *J Clin Laser Med Surg* 1993; 11(5): 233 – 241.
15. Henderson BW, Fingar VH. Oxygen limitation of direct tumor cell kill during photodynamic treatment of a murine tumor model. *Photochem. Photobiol* 1989; 49(3): 299 – 304.
16. Reddan JC, Anderson CY, Xiu H, Hrabovsky S, Freye K, Fairchild R, Tubesing KA, Elmets CA. Immunosuppressive effects of silicon phthalocyanine photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 1999; 70(1): 72 – 77.
17. Gollnick SO, Vaughan L, Henderson BW. Generation of effective antitumor vaccines using photodynamic therapy. *Cancer Res* 2002; 62(6):1604 – 1608.

18. Gomes ATPC, Neves MGPMS, Cavaleiro JAS. Cancer, Photodynamic Therapy and Porphyrin-Type Derivatives. *An Acad Bras Cienc.* 2018;90(1 Suppl 2):993-1026. doi: 10.1590/0001-3765201820170811. PMID: 29873666.
19. Roguin LP, Chiarante N, García Vior MC, Marino J. Zinc(II) phthalocyanines as photosensitizers for antitumor photodynamic therapy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2019 Sep;114:105575. doi: 10.1016/j.biocel.2019.105575. Epub 2019 Jul 27. PMID: 31362060.
20. Paquette B, Boyle RW, Ali H, MacLennan AH, Truscott TG, van Lier JE. Sulfonated phthalimidomethyl aluminum phthalocyanine: the effect of hydrophobic substituents on the in vitro phototoxicity of phthalocyanines. *Photochem Photobiol.* 1991 Mar;53(3):323-7. doi: 10.1111/j.1751-1097.1991.tb03635.x. PMID: 2062879.
21. Margaron P, Grégoire MJ, Scasnár V, Ali H, van Lier JE. Structure-photodynamic activity relationships of a series of 4-substituted zinc phthalocyanines. *Photochem Photobiol.* 1996 Feb;63(2):217-23. doi: 10.1111/j.1751-1097.1996.tb03017.x. PMID: 8657735.
22. Colussi VC, Feyes DK, Mulvihill JW, Li YS, Kenney ME, Elmets CA, Oleinick NL, Mukhtar H. Phthalocyanine 4 (Pc 4) photodynamic therapy of human OVCAR-3 tumor xenografts. *Photochem Photobiol.* 1999 Feb;69(2):236-41. PMID: 10048316.
23. Nyman ES, Hynninen PH. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B.* 2004 Jan;73(1-2):1-28. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2003.10.002. PMID: 14732247.
24. Wiedmann MW, Caca K. General Principles of Photodynamic Therapy (PDT) and Gastrointestinal Applications. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2004; 5(4): 397 – 408.
25. Brown SB, Brown JE, Vernon DI. Photosensitising drugs – their potential in oncology. *Expert Opin Investig Drugs* 1999; 8(12):1967-1979.
26. Dougherty T J, Gomer C J, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbélik M, Moan J, Peng Q. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90(12): 889 – 905.

27. Sharman WM, Allen CM, van Lier, JE. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discov Today* 1999; 4(11): 507 – 517.
28. Boyle RW, Dolphin D. Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers. *Photochem Photobiol* 1996; 64(3): 469 – 485
29. Nyman ES, Hynninen PH. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 2004; 73(1 – 2), 1 – 28.
30. Ronn AM, Nouri M, Lofgren LA, Steinberg BM, Westerborn A, Windahl T, Shikowitz MJ, Abramson AL. Human tissue levels and plasma pharmacokinetics of Temoporfin (Foscan, mTHPC). *Laser Med. Sci.* 1996; 11: 267 – 272
31. Richter AM, Erruti-Sola S, Sternberg ED, Dolphin D, Levy JG. Biodistribution of tritiated benzoporphyrin derivative (3H-BPD-MA), a new potent photosensitizer, in normal and tumor-bearing mice. *J Photochem Photobiol B* 1990; 5(2): 231 – 244.
32. Taber SW, Fingar VH, Coots CT, Wieman TJ. Photodynamic therapy using mono-L-aspartyl chlorin e6 (Npe6) for the treatment of cutaneous disease: a Phase I clinical study. *Clin Cancer Res* 1998; 4(11): 2741 – 2746.
33. Woodburn KW, Fan Q, Kessel D. Photodynamic therapy of B16F10 murine melanoma with lutetium texaphyrin. *J Invest Dermatol* 1998; 110(5): 746 – 751
34. Kolářová H, Ditrichová D, Wagner J. Penetration of the laser light into the skin in vitro. *Lasers in Surgery and Medicine* 1999; 24(3): 231 – 235

35. Mosinger J, Deumié M, Lang K, Kubát P, Wagnerová DM. Supramolecular sensitizer: complexation of meso-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin with 2 hydroxypropyl-cyclodextrins. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2000; 130: 13 – 20
36. Berg K, Anholt H, Moan J, Ronnestad A, Rimington C. Photobiological properties of hematoporphyrin diesters: evaluation for possible application in photochemotherapy of cancer. *J Photochem Photobiol B* 1993; 20(1): 37 – 45.
37. Strauss WS, Gschwend MH, Sailer R, Schneckenburger H, Steiner R, Ruck A. Intracellular fluorescence behaviour of meso – tetra (4 – sulphonatophenyl) porphyrin during photodynamic treatment at various growth phases of cultured cells. *J Photochem Photobiol B* 1995; 28: 155 – 161.
38. Mohr H, Lambrecht B, Schmitt H. Photodynamic virus inactivation of blood components. *Immunol Invest* 1995; 24(1-2): 73 – 85
39. Brasseur N, Menard I, Forget A, el Jastimi R, Hamel R, Molfino NA, van Lier J E. Eradication of multiple myeloma and breast cancer cells by TH9402-mediated photodynamic therapy: implication for clinical ex vivo purging of autologous stem cell transplants. *Photochem Photobiol* 2000; 72(6):780 – 787
40. Szeimies RM, Karrer S, Abels Ch, Steinbach P, Fickweiler S, Messmann H, Bäumlér W, Landthaler M. 9-Acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(beta-methoxyethyl)-porphycene (ATMPn), a novel photosensitizer for photodynamic therapy: uptake kinetics and intracellular localization. *J Photochem Photobiol B* 1996; 34(1): 67 – 72
41. Olivo M, Lau W, Manivasager V, Bhuvaneshvari R, Wei Z, Soo KC, Cheng C, Tan PH. Novel photodynamic diagnosis of bladder cancer: ex vivo fluorescence cytology using hypericin. *Int J Oncol* 2003; 23(6): 1501 – 1504.

42. Král V, Davis J, Andrievski A, Králová J, Synytsya A, Poučková P, Sessler JL. Synthesis and biolocalization of water-soluble sapphyrins. *J Med Chem* 2002; 45(5): 1073 – 1078
43. van den Bergh H (1986) Light and porphyrins in cancer therapy. *Chem Br* 22:430–439
44. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR (2005) Mechanisms in photodynamic therapy: part two – cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagn Photodyn Ther* 2:1–23
45. Robertson CA, Evans DH, Abrahamse H (2009) Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J Photochem Photobiol B Biol* 96:1–8
46. Luksiene Z (2003) Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. *Med (Kaunas)* 39:1137–1150
47. Juzeniene A, Moan J (2007) The history of PDT in Norway. *Photodiagn Photodyn Ther* 4:3–11
48. Nowak-Stepniowska A, Pergoń P, Padzik-Graczyk A (2013) Photodynamic method of cancer diagnosis and therapy – mechanisms and applications. *Postepy Biochem* 59:53–63
49. Bajgar R, Kolarova H, Bolek L, Binder S, Pizova K, Hanakova A (2014) High oxygen partial pressure increases photodynamic effect on HeLa cell lines in the presence of chloraluminium phthalocyanine. *Anticancer Res* 34:4095–4099

50. Jirsa M Jr, Pouckova P, Dolezal J, Pospisil J, Jirsa M (1991) Hyperbaric oxygen and photodynamic therapy in tumor bearing nude mice. *Eur J Cancer* 27:109
51. Fuchs J, Thiele J (1998) The role of oxygen in cutaneous photodynamic therapy. *Free Radic Biol Med* 24:835-847
52. Moan J, Berg K (1991) The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem Photobiol* 53:549-553
53. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR (2004) Mechanisms in photo-dynamic therapy: part one: photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagn Photodyn Ther* 1:279-293
54. Fischer SM, Jain KK, Braun E, Lehr S (1988) *Handbook of hyperbaric oxygen therapy*. Springer, Berlin
55. Pineiro M, Pereira MM, Gonsalves A, Arnaut LG, Formosinho SJ. Singlet oxygen quantum yields from halogenated chlorins. *J Photochem Photobiol A*. 2001 Jan;38(2):147-57. doi: 10.1016/S1010-6030(00)00382-8.
56. Daruwalla J, Christophi C. Hyperbaric oxygen therapy for malignancy: a review. *World J Surg*. 2006 Dec;30(12):2112-31. doi: 10.1007/s00268-006-0190-6. PMID: 17102915.
57. Kizaka-Kondoh S, Inoue M, Harada H, Hiraoka M. Tumor hypoxia: a target for selective cancer therapy. *Cancer Sci*. 2003 Dec;94(12):1021-8. doi: 10.1111/j.1349-7006.2003.tb01395.x. PMID: 14662015.

58. Krestyn E, Kolarova H, Bajgar R, Tomankova K (2010) Photodynamic properties of ZnTPPS4, ClAlPcS2 and ALA in human melanoma G361 cells. *Toxicol in Vitro* 24:286-291
59. Wilson BC, Patterson MS (2008) The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys Med Biol* 53:61-109
60. Kriska T, Korytowski W, Girotti AW (2002) Hyperresistance to photosensitized lipid peroxidation and apoptotic killing in 5- aminolevulinate-treated tumor cells overexpressing mitochondrial GPX4. *Free Radic Biol Med* 33:1389-1402
61. Kessel D (2002) Relocalization of cationic porphyrins during photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci* 1:837-840
62. Furre IE, Shahzidi S, Luksiene Z, MollerMT, Borgen E, Morgan J, Tkacz-Stachowska K, Nesland JM, Peng Q (2005) Targeting PBR by hexaminolevulinate-mediated photodynamic therapy induces apoptosis through translocation of apoptosis-inducing factor in human leukemia cells. *Cancer Res* 65:11051-11060
63. Ichinose S, Usuda J, Hirata T, Inoue T, Ohtani K, Maehara S, Kubota M, Imai K, Tsunoda Y, Kuroiwa Y, Yamada K, Tsutsui H, Furukawa K, Okunaka T, Oleinick NL, Kato H (2006) Lysosomal cathepsin initiates apoptosis, which is regulated by photodamage to Bcl-2 at mitochondria in photodynamic therapy using a novel photosensitizer, ATX-s10 (Na). *Int J Oncol* 29:349- 355
64. Ji Z, Yang G, Vasovic V, Cunderlikova B, Suo Z, Nesland JM, Peng Q (2006) Subcellular localization pattern of protoporphyrin IX is an important determinant for its photodynamic efficiency of human carcinoma and normal cell lines. *J Photochem Photobiol B Biol* 84:213-220

65. Kessel D, Castelli M (2001) Evidence that bcl-2 is the target of three photosensitizers that induce a rapid apoptotic response. *Photochem Photobiol* 74:318-322
66. Lam M, Oleinick NL, Nieminen AL (2001) Photodynamic therapy induced apoptosis in epidermoid carcinoma cells. Reactive oxygen species and mitochondrial inner membrane permeabilization. *J Biol Chem* 276:47379-47386
67. Usuda J, Chiu SM, Murphy ES, Lam M, Nieminen AL, Oleinick NL (2003) Domain-dependent photodamage to Bcl-2. A membrane anchorage region is needed to form the target of phthalocyanine photo-sensitization. *J Biol Chem* 278:2021-2029
68. Xue LY, Chiu SM, Fiebig A, Andrews DW, Oleinick NL (2003) Photodamage to multiple Bcl-xL isoforms by photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer pc 4. *Oncogene* 22: 9197-9204
69. Wood SR, Holroyd JA, Brown SB (1997) The subcellular localization of Zn (II) phthalocyanines and their redistribution on exposure to light. *J Photochem Photobiol B* 65:397-402
70. Fabrics C, Valduga G, Miotto G, Borsetto L, Jori G, Garbisa S, Reddi E (2001) Photosensitization with zinc(II) phthalocyanine as switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Cancer Res* 61:7495-7502
71. Tynga IM, Houreld NN, Abrahamse H (2013) The primary subcellular localization of zinc phthalocyanine and its cellular impact on viability, proliferation and structure of breast cancer cells (MCF-7). *J Photochem Photobiol B* 120:171-176

72. Oniszczyk A, Wojtunik-Kulesza KA, Oniszczyk T, Kasprzak K (2016) The potential of photodynamic therapy (PDT)-experimental investigations and clinical use. *Biomed Pharmacother* 83:912-929
73. Lee SK, Forbes IJ, Betts WH (1984) Oxygen dependency of photocytotoxicity with hematoporphyrin derivative. *Photochem Photobiol* 39:631-634
74. Moan J, Sommer S (1985) Oxygen dependence of the photosensitizing effect of hematoporphyrin derivative in NHIK-3025 cells. *Cancer Res* 45:1608-1610
75. Henderson BW, Fingar VH (1987) Relationship of tumor hypoxia and response to photodynamic treatment in an experimental mouse tumor. *Cancer Res* 47:3110-3114
76. Chapman JD, Stobbe CC, Arnfield MR (1991) Oxygen dependency of tumor cell killing in vitro by light activated Photofrin II. *Radiat Res* 126:73-79
77. Daruwalla J, Christophi C (2006) Hyperbaric oxygen therapy for malignancy: a review. *World J Surg* 30:2112-2131
78. Ricci JE (2003) Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis. *J Cell Biol* 160:65-75
79. Cosentino K, García-Sáez AJ (2014) Mitochondrial alterations in apoptosis. *Chem Phys Lipids* 181:62-75

80. Zorova LD, Popkov VA, Plotnikov EY, Silachev DN, Pevzner IB, Jankauskas SS, Babenko VA, Zorov SD, Balakireva AV, Juhaszova M, Sollott SJ, Zorov DB (2018) Mitochondrial membrane potential. *Anal Biochem* 552:50-59
81. Ly JD, Grubb DR, Lawen A (2003) The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis; an update. *Apoptosis* 8:115- 128
82. Izyumov DS, Avetisyan AV, Pletjushkina OY, Sakharov DV, Wirtz KW, Chernyak BV, Skulachev VP (2004) “Wages of fear” : transient threefold decrease in intracellular ATP level imposes apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1658:141-147
83. Kubat P, Mosinger J. Photophysical properties of metal complexes of meso-tetrakis(4-sulphonatophenyl)porphyrin. *J Photochem Photobiol A*. 1996 May;96(1-3):93-97. [https://doi.org/10.1016/1010-6030\(95\)04279-2](https://doi.org/10.1016/1010-6030(95)04279-2).
84. Griffiths J, Schofield J, Wainwright M, Brown SB. Some observations on the synthesis of polysubstituted zinc phthalocyanine sensitizers for photodynamic therapy. *Dyes Pigm*. 1997 33:65-78.
84. Niklas A, Brock D, Schober R, Schulz A, Schneider D. Continuous measurements of cerebral tissue oxygen pressure during hyperbaric oxygenation - HBO effects on brain edema and necrosis after severe brain trauma in rabbits. *J Neurol Sci*. 2004 Apr;219(1-2):77-82. doi: 10.1016/j.jns.2003.12.013. PMID: 15050441.
85. Yamamoto N, Takada R, Maeda T, Yoshii T, Okawa A, Yagishita K. Microcirculation and tissue oxygenation in the head and limbs during hyperbaric oxygen treatment. *Diving Hyperb Med*. 2021 Dec 20;51(4):338-344. doi: 10.28920/dhm51.4.338-344. PMID: 34897598; PMCID: PMC8920905.

86. Kwiatkowski S, Knap B, Przystupski D, Saczko J, Kędzierska E, Knap-Czop K, Kotlińska J, Michel O, Kotowski K, Kulbacka J. Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed Pharmacother.* 2018 Oct;106:1098-1107. doi: 10.1016/j.biopha.2018.07.049. Epub 2018 Jul 17. PMID: 30119176.
87. Gleadle J, Ratcliffe PJ. Hypoxia. In: Wiley J, editor. *Encyclopedia of life sciences.* Chichester: John Wiley & Sons; 2001.
88. Maier A, Tomaselli F, Anegg U, Rehak P, Fell B, Luznik S, Pinter H, Smolle-Jüttner FM. Combined photodynamic therapy and hyperbaric oxygenation in carcinoma of the esophagus and the esophago-gastric junction. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2000 Dec;18(6):649-54; discussion 654-5. doi: 10.1016/s1010-7940(00)00592-3. PMID: 11113670.
89. Blake E, Allen J, Curnow A. The effects of protoporphyrin IX-induced photodynamic therapy with and without iron chelation on human squamous carcinoma cells cultured under normoxic, hypoxic and hyperoxic conditions. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2013 Dec;10(4):575-82. doi: 10.1016/j.pdpdt.2013.06.006. Epub 2013 Aug 8. PMID: 24284114.
90. Förster T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann Phys.* 1948, 437, 55-75.
91. Hu W, Yang F, Pietraszak N, Gu J, Huang J. Distance dependent energy transfer dynamics from a molecular donor to a zeolitic imidazolate framework acceptor. *Phys Chem Chem Phys.* 2020, 22, 25445-9.
92. Lang K, Mosinger J, Wagnerová DM. Photophysical properties of porphyrinoid sensitizers non-covalently bound to host molecules; models for photodynamic therapy. *Coord Chem Rev.* 2004 Feb;248(3-4):321-50. doi: 10.1016/j.ccr.2004.02.004.

93. Ashkenazi S. Photoacoustic lifetime imaging of dissolved oxygen using methylene blue. *J Biomed Opt.* 2010 Jul-Aug;15(4):040501. doi: 10.1117/1.3465548. PMID: 20799768.
94. Beeby A, FitzGerald S, Stanley CF. A photophysical study of protonated (tetra-tert-butylphthalocyaninato)zinc. *J Chem Soc Perkin Trans.* 2001 Aug;2:1978-82.
95. Ogunsipe A, Chen JY, Nyokong T. Photophysical and photochemical studies of zinc(ii) phthalocyanine derivatives - effects of substituents and solvents. *New J Chem.* 2004 Jun;28:822-7.
96. Alwattar AH, Lumb MD, Birks, JB. Diffusion-controlled rate processes. In: Birks JB, editor. *Organic Molecular Photophysics.* New York: John Wiley & Sons; 1973. p. 403-454.
97. Quina FH, Silva GTM. The photophysics of photosensitization: A brief overview. *J Photochem Photobiol.* 2021 Sep;7:100042. doi: 10.1016/j.jpap.2021.100042.
98. Haouzi P, Gueguinou M, Sonobe T, Judenherc-Haouzi A, Tubbs N, Trebak M, Cheung J, Bouillaud F. Revisiting the physiological effects of methylene blue as a treatment of cyanide intoxication. *Clin Toxicol (Phila).* 2018 Sep;56(9):828-840. doi: 10.1080/15563650.2018.1429615. Epub 2018 Feb 16. PMID: 29451035; PMCID: PMC6086742.
99. Lu G, Nagbanshi M, Goldau N, Mendes Jorge M, Meissner P, Jahn A, Mockenhaupt FP, Müller O. Efficacy and safety of methylene blue in the treatment of malaria: a systematic review. *BMC Med.* 2018 Apr;16(1):59. doi: 10.1186/s12916-018-1045-3. PMID: 29690878; PMCID: PMC5979000.

100. Zhang LZ, Tang GQ. The binding properties of photosensitizer methylene blue to herring sperm DNA: a spectroscopic study. *J Photochem Photobiol B*. 2004 May;74(2-3):119-25. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2004.03.005. PMID: 15157907.
101. Klosowski EM, de Souza BTL, Mito MS, Constantin RP, Mantovanelli GC, Mewes JM, Bizerra PFV, Menezes PVMDC, Gilglioni EH, Utsunomiya KS, Marchiosi R, Dos Santos WD, Filho OF, Caetano W, Pereira PCS, Gonçalves RS, Constantin J, Ishii-Iwamoto EL, Constantin RP. The photodynamic and direct actions of methylene blue on mitochondrial energy metabolism: A balance of the useful and harmful effects of this photosensitizer. *Free Radic Biol Med*. 2020 Jun;153:34-53. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.04.015. Epub 2020 Apr 18. PMID: 32315767.
102. Hodgkinson N, Kruger CA, Mokwena M, Abrahamse H (2017) Cervical cancer cells (HeLa) response to photodynamic therapy using a zinc phthalocyanine photosensitizer. *Photochem Photobiol B* 177:32-38
103. Pucelik B, Sułek A, Barzowska A, Dąbrowski JM. Recent advances in strategies for overcoming hypoxia in photodynamic therapy of cancer. *Cancer Lett*. 2020 Nov;492:116-135. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.07.007>.
104. Larue L, Myrzakhmetov B, Ben-Mihoub A, Moussaron A, Thomas N, Arnoux P, Baros F, Vanderesse R, Acherar S, Frochot C. Fighting Hypoxia to Improve PDT. *Pharmaceuticals*. 2019; 12(4):163. <https://doi.org/10.3390/ph12040163>.

12 Souhrn

Princip fotodynamického efektu (PDE) je založen na kombinovaném působení fotosenzitizéru, molekulárního kyslíku a světla, při kterém vznikají různé reaktivní formy kyslíku, které jsou spojeny s významným buněčným poškozením. Fotodynamická terapie (PDT) založená na fotodynamickém efektu (PDE) se postupně stává alternativní metodou léčby mnoha onemocnění.

Zkoumali jsme roli kyslíku v buňkách karcinomu děložního čípku (HeLa) podrobených fotodynamické terapii (PDT).

Posuzovali jsme efekt PDT na HeLa buňky vystavením buněčných kultur disulfonovanému zinečnatému ftalocyaninu ($ZnPcS_2$) a tetrasulfonovanému zinečnatému tetrafenylporfyrinu ($ZnTPPS_4$). Fluorescenční mikroskopie znázornila jejich rozdílnou lokalizaci uvnitř buňky. $ZnTPPS_4$ se zdá být většinou omezen na cytosol a lysosomy, zatím co $ZnPcS_2$ je většinou převážně připojen k membránovým strukturám plasmalemě a mitochondriální membráně. Testy fototoxicity u PDT ošetřených buněk při různých parciálních tlacích kyslíku ukázaly účinek závislý na dávce. Je zajímavé, že $ZnPcS_2$ byl také fotodynamicky účinný při minimálním parciálním tlaku kyslíku, v atmosféře čistého dusíku. Ačkoli oba senzitizery způsobují signifikantní pokles mitochondriálního membránového potenciálu, $ZnPcS_2$ má znatelně vyšší vliv na mitochondriální respiraci, která byla úplně zablokována po dvou krátkých světelných cyklech.

Naše pozorování naznačují, že PDT může být účinná dokonce i v hypoxických podmínkách, pokud je vybrán vhodný senzitizer jako $ZnPcS_2$, který je schopen inhibovat mitochondriální respiraci. Na druhé straně kyslíková hyperbarie nevedla k vyšší účinnosti fotosenzitizérů.

Literární zdroje ukazují, že souběžná léčba hyperbarickým kyslíkem může efekt fotodynamické terapie (PDT) podpořit. Jedním z nejzávažnějších zástupců reaktivních forem kyslíku vznikajících při fotodynamickém efektu (PDE) je singletový kyslík, který se vyznačuje extrémně silnými oxidačními vlastnostmi. Proto v druhé části naší práce naším cílem bylo porovnat produkci singletového kyslíku pro čtyři různé fotosenzitizéry v závislosti na koncentraci kyslíku.

Čtyři různé fotosenzitizéry 5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridinio) porfyrin tetra(p-toluensulfonát), tetramethylthioninchlorid, 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonofenyl) zinečnatý porfyrin a zinečnatý disulfonát byly zkoumány s cílem stanovení produkce singletového kyslíku v PBS fluorescenčním agentu pro singletový kyslík (singlet oxygen sensor green, SOSG) při různých koncentracích kyslíku (0,4 a 36 mg/l).

Nebyly zaznamenány žádné znatelné posuny v excitačním a emisním spektru ve vazbě na koncentraci kyslíku. S ohledem na stejnou molární koncentraci fotosenzitizérů byla produkce singletového kyslíku nejvyšší u 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonofenyl) zinečnatého porfyrinu, kde rychlost změny fluorescence byla více než 3krát vyšší než rychlost získaná pro 5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridinio) porfyrin tetra(p-toluensulfonát). Na druhé straně zinečnatý disulfonát vykazoval nejnižší produkci singletového kyslíku.

Ukazuje se, že produkce singletového kyslíku v rozmezí koncentrací kyslíku dosažitelných v tkáních při normoxii nebo hyperoxii nezávisí na těchto koncentracích. Tvorba singletového kyslíku je však významně ovlivněna typem fotosenzitizéru, přičemž nejvyšší výtěžek patří 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonofenyl) zinečnatému porfyrinu

13 Publikační činnost autora

13.1 Články v časopisech s IF:

Pola M., Kolarova H., Ruzicka J., Zholobenko A., Modriansky M., Mosinger J. & Bajgar R. Effects of zinc porphyrin and zinc phthalocyanine derivatives in photodynamic anticancer therapy under different partial pressures of oxygen in vitro, *Investigational New Drugs* (2021) 39, 89-97

Bajgar R., Pola M., Hosik J., Turjanica P., Cengery J. & Kolarova H. New planar light source for the induction and monitoring of photodynamic processes in vitro, *Journal of Biological Physics* (2020) 46, 121-131

13.2 Články v recenzovaných časopisech:

Pola M, Kolarova H, Bajgar R. Generation of singlet oxygen by porphyrin and phthalocyanine derivatives regarding the oxygen level. *Journal of Medical Science*. 2022;91(4);e752. doi:10.20883/medical.e752

13.3 Publikovaná abstrakta:

Pola M., Mosinger J., Kolářová H., Bajgar R. Význam kyslíku ve fotodynamické terapii ovariálního karcinomu in vitro, *Sborník abstrakt, XLII Dny lékařské biofyziky, Kolín, 29.-31.5.2019*, s. 35, ISBN 978-80-88199-06-9

Pola M., Kolářová H., Bajgar R. Produkce singletového kyslíku s použitím fotodynamického efektu při rozdílných parciálních tlacích kyslíku, *Sborník abstrakt XLIII. Dnů lékařské biofyziky, Bořetice, hotel Kraví Hora 25. – 27.5.2022*, s. 41–43, ISBN 978-80-7392-383-9