

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD

---

Studium nových fotosensitizerů ze  
skupiny ftalocyaninů a azaftalocyaninů pro  
fotodynamickou léčbu nádorových  
onemocnění

---

**Disertační práce**

Mgr. Miloslav Macháček

Vedoucí disertační práce:

doc. PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.

Odborný konzultant:

doc. PharmDr. Veronika Nováková, Ph.D.

Hradec Králové, 2016

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně pod vedením svého školitele. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové, 2016

Mgr. Miloslav Macháček

## Poděkování

V první řadě bych velice rád poděkoval svému školiteli **doc. PharmDr. Tomáši Šimůnkovi, Ph.D.** a své konzultantce **doc. PharmDr. Veronice Novákové, Ph.D.** za odborné vedení, cenné rady nejen při přípravě této disertační práce, ale i během celého mého doktorského studia a v neposlední řadě také za velmi přátelský přístup.

Dále bych rád poděkoval **doc. PharmDr. Petru Zimčíkovi, Ph.D.**, všem kolegům a přátelům z naší vědecké skupiny (především pak Mgr. Haně Jansové, Ph.D., PharmDr. Anně Jirkovské, Ph.D., RNDr. Pavlíně Haškové, Ph.D., Mgr. Petře Brázdové, Mgr. Adéle Jedličkové, Mgr. Kateřině Zvolánkové, Gabriele Podhorské a Martině Půlkrábkové), Aleně Pakostové, prof. PharmDr. Emilu Rudolfovi, Ph.D. a kolektivům Katedry biochemických věd, Katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv a Katedry biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové nejen za pomoc, ale také za vytvoření příjemné pracovní atmosféry. V neposlední řadě bych také rád poděkoval své rodině a přátelům za veškerou podporu v celém průběhu mého studia.

Děkuji grantovým agenturám za finanční podporu: GAUK 1916214, GAČR 13-27761-S, UNCE 204019, PRVOUK P40 a SVV 260 294.

# ABSTRAKT

**Univerzita Karlova**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra biochemických věd**

**Kandidát:** Mgr. Miloslav Macháček  
**Školitel:** doc. PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.  
**Konzultant:** doc. PharmDr. Veronika Nováková, Ph.D.

## **Název disertační práce:**

Studium nových fotosensitizerů ze skupiny ftalocyaninů a azaftalocyaninů pro fotodynamickou léčbu nádorových onemocnění

Fotodynamická terapie (PDT) nádorů je neinvazivní metoda určená k léčbě solidních nádorů. Jejími základními složkami jsou molekulární kyslík, světlo a fotosensitizer (PS) – komponenty samy o sobě netoxické, ale v kombinaci vedoucí k tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS; především singletového kyslíku), které poškozují buněčné struktury a vedou k buněčné smrti. Způsob, jakým je nádorová buňka zničena závisí především na typu PS, délce ozáření a lokalizaci léčiva, protože singletový kyslík je vysoce reaktivní a je schopen jen minimální difúze v biologických systémech. Kromě přímého cytotoxického působení PS se na eradikaci nádoru podílí také poškození cév (deprivace živin a kyslíku) a aktivace imunitního systému. V současné době se při návrhu struktur PS přistupuje buď vytvářením vhodné kombinace dostatečně aktivní látky a nosičového systému, tvorbou cílených konjugátů, nebo syntézou látek s vysokou aktivitou a minimální mírou tvorby agregátů ve vodném prostředí. V naší práci jsme se zaměřili především na hydrofilní ftalocyaniny (Pc) a azaftalocyaniny (AzaPc) s minimální toxicitou bez ozáření (u našich derivátů typicky v řádech  $10^2 - 10^3 \mu\text{M}$ ), a zároveň vysokou toxicitou po expozici aktivujícímu záření (řádově až  $10^{-3} \mu\text{M}$ ). Celou řadu takovýchto látek se podařilo připravit a charakterizovat jak z hlediska fotofyziky, tak z hlediska fotodynamické aktivity v *in vitro* podmínkách na buněčné linii lidského karcinomu děložního čípku (HaLa). U nejnadějnějších látek byla tato aktivita sledována i na dalších nádorových i nenádorových liniích. Vzhledem k tomu, že aktivita PS je mj. ovlivněna i jejich lokalizací, důležitou součástí této práce bylo také určení primárního cíle

po ozáření. Ve všech případech byl tento určen jako endo-lyzosomální kompartment. PS po aktivaci poškozují membránu těchto organel a redistribuují se do cytoplazmy, kde během ozařování způsobují poškození dalších buněčných komponent. U kationických derivátů byla také pozorována následná redistribuce do jádra díky jejich vazbě na záporně nabitou strukturu DNA; tato redistribuce však probíhá až po ozáření, a to jen díky poškození jaderné membrány. Nedá se tedy očekávat mutagenní účinek těchto nových derivátů, což je také jedna z obecných kladných charakteristik léčiv tohoto typu oproti klasické chemoterapii. Masivní tvorba ROS po aktivaci vedla u námi studovaných lyzosomálně lokalizovaných derivátů k buněčné smrti nekrotického typu doprovázené neúplnou retrakcí buněk, tvorbou velkých membránových blebů, zkrácením a zakulacením mitochondrií a reorganizací aktinového a tubulinového cytoskeletu. U anionického AzaPc se nám také podařilo popsat mechanismus, který stojí za obecně nižší aktivitou záporně nabitých fotosensitizerů i přes absenci agregace. Anionické PS se váží na sérové bílkoviny (především albumin), kde dochází ke zhášení tripletového stavu a snížené tvorbě singletového kyslíku. Tato vazba však zároveň částečně chrání PS před negativním vlivem kyselého pH v lumen lyzosomů, kde by jinak karboxylátové skupiny ztrácely náboj a PS by agregoval. Výsledky našeho výzkumu ukazují, že i lyzosomálně lokalizované (Aza)Pc jsou účinnými PS indukující rychle a efektivně oxidativní poškození vedoucí k buněčné smrti.

# ABSTRACT

**Charles University**

**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Biochemical Sciences**

**Candidate:** Mgr. Miloslav Macháček  
**Supervisor:** doc. PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.  
**Consultant:** doc. PharmDr. Veronika Nováková, Ph.D.

**Title of dissertation thesis:**

Study of novel phthalocyanine and azaphthalocyanine photosensitizers for the photodynamic therapy of cancer.

Photodynamic therapy (PDT) of cancer is non-invasive treatment modality for solid tumour treatment using three basic components – molecular oxygen, light and photosensitizer (PS). These elements are essentially non-toxic on their own, but in the combination they induce reactive oxygen species (ROS; singlet oxygen mainly) production, causing damage to cellular components and subsequent cell death. Type of cell demise is dependent mainly on the type of PS, length of irradiation and subcellular localization of the drug. Singlet oxygen is highly reactive and is capable of limited diffusion in biological environment. Apart from direct cytotoxic effect, vascular shutdown (oxygen and nutrition deprivation) and activation of immune system are involved in tumour eradication. Combination of effective compound with delivery system, conjugation with targeting substances or synthesis of highly-effective non-aggregating water-soluble compounds are the main pathways in design of modern PSs. In our project we focused mainly on hydrophilic phthalocyanines (Pc) and azaphthalocyanines (AzaPc) with minimal dark toxicity (for our derivatives typically  $10^2 - 10^3 \mu\text{M}$ ) and high photodynamic activity (up to  $10^{-3} \mu\text{M}$ ). Series of compounds were synthesized, photophysically and *in vitro* characterized on human cervical carcinoma cell line (HeLa) and for most promising compounds also on several other malignant and non-malignant cell lines. Considering the importance of subcellular localization in the context of PS activity, we also focused on evaluation of primary target for our original compounds. In all cases, we observed endo-lysosomal compartment out as the place of PS localization. After irradiation, the PSs

damage membrane of those organelles and redistribute into cytoplasm, where they cause damage to other cellular components (still in the time-course of irradiation). Cationic derivatives subsequently redistribute also to the nucleus as the consequence of compromised nuclear membranes; their cationic nature allow them to bind negatively charged DNA. Redistribution to nucleus proceeds after irradiation and so no mutagenic effect of these novel PS is anticipated, which is general property of this type of drugs in the contrast to conventional chemotherapeutics. Extensive ROS production during photodynamic treatment leads, in the case of our lysosomal-localized derivatives, to necrotic-type of cell death accompanied with incomplete cell retraction, formation of large membrane blebs and blisters, shortening and rounding of mitochondria and reorganisation of actin and tubulin cytoskeleton. In the case of anionic AzaPc we were also able to describe the mechanism causing lower activity of negatively charged PS even in the absence of aggregation. Anionic PSs are bound to serum proteins (predominantly albumin) and triplet state quenching is taking place, which leads to the considerable decrease of singlet oxygen production. On the other hand, binding to the proteins also partly protects PS against negative influence of acidic lysosomal pH. In this environment the carboxylate groups lose charges and PS aggregate. Results of our research demonstrate that lysosomally localized (Aza)Pcs are potent PSs able to induce fast and effective oxidative damage leading to the cell death.

# OBSAH

Obsah.....	7
1 Úvod.....	10
2 Teoretická část .....	13
2.1 Fotodynamická terapie .....	14
2.1.1 Historie fotodynamické terapie.....	14
2.1.2 Koncept optického okna tkáně.....	16
2.1.3 Princip fotodynamické terapie .....	18
2.2 Fotosensitizéry.....	20
2.2.1 První generace fotosensitizérů .....	20
2.2.2 Ideální fotosensitizér.....	21
2.2.3 Druhá generace fotosensitizérů – porfyrinoidy .....	22
2.2.3.1 Porfyriny .....	23
2.2.3.2 Ostatní struktury odvozené od porfyrinu .....	24
2.2.3.3 $\delta$ -aminolevulová kyselina a její estery.....	26
2.2.3.4 Ftalocyaniny.....	28
2.2.4 Druhá generace fotosensitizérů - ostatní struktury .....	30
2.2.5 Třetí generace fotosensitizérů.....	31
2.3 Reaktivní formy kyslíku a oxidační stres .....	32
2.3.1 Peroxidace lipidů .....	34
2.3.2 Oxidace a peroxidace aminokyselin a proteinů .....	36
2.3.3 Oxidační poškození DNA.....	39
2.4 Buněčná smrt .....	40
2.4.1 Programovaná buněčná smrt.....	40
2.4.2 Apoptóza.....	41
2.4.2.1 Vnitřní cesta apoptózy .....	41
2.4.2.2 Vnější cesta apoptózy .....	43



2.4.3	Autofagie .....	44
2.4.4	Mitotická katastrofa .....	47
2.4.5	Nekróza a nekroptóza .....	48
2.4.6	Buněčná smrt v kontextu fotodynamické terapie .....	50
3	Cíle práce .....	55
4	Komentáře k pracím.....	57
4.1	Syntéza, charakterizace a základní <i>in vitro</i> hodnocení neagregujícího kationického ftalocyaninového fotosensitizeru .....	59
4.2	Kationické fotosensitizery absorbující ve vzdálené červené oblasti s vysokou protinádorovou aktivitou a nízkou toxicitou ve tmě.....	61
4.3	Tetra(3,4-pyrido)-porfyriziny – nová skupina fotosensitizerů pro fotodynamickou terapii nádorů.....	64
4.4	Studium neagregujícího ve vodě rozpustného anionického fotosensitizeru: objasnění nižší aktivity této skupiny látek.....	66
4.5	Tetra(3,4-pyrido)-porfyriziny – cesta k nanomolárně účinným fotosensitizerům .....	68
5	Souhrnná diskuze .....	71
6	Závěry .....	82
7	Podíl překladatele na publikacích zahrnutých v disertační práci.....	85
8	Seznam použité literatury.....	89
9	Seznam zkratk .....	114
10	Přehled publikací zahrnutých v disertační práci .....	117
11	Přehled dalších publikací .....	119
12	Prezentace na konferencích.....	122
13	Přílohy .....	125
13.1	Publikace I .....	126
13.2	Publikace II .....	152
13.3	Publikace III.....	177

13.4	Publikace IV .....	216
13.5	Publikace V .....	253

# 1 ÚVOD

Nádorová onemocnění patří mezi nejčastější příčinu úmrtí na celém světě. V roce 2012 bylo zaznamenáno přibližně 14,9 mil. případů z toho 53 % u mužů a 47 % u žen, což dává poměr 10:9 v populaci (Ferlay *et al.*, 2013). Rakovina je skupinou chorob charakteristických nekontrolovaným růstem a schopností invaze do okolní zdravé tkáně, případně se, skrze proces známý jako metastáze, šířit po těle na nová místa (Pecorino, 2012). Většina nádorových onemocnění má společné charakteristické znaky, které byly shrnuty jako: 1) růst nezávislý na růstových signálech, 2) necitlivost k signálům inhibice růstu, 3) neomezený replikační potenciál, 4) schopnost invaze do okolní tkáně a metastáze, 5) schopnost angiogeneze a 6) rezistence k programované buněčné smrti (Hanahan a Weinberg, 2011).

Tyto společné znaky spolu se stále rostoucím množstvím nových informací v oblasti biologie nádorů přináší celou řadu možných cílů zásahu protinádorových (a především cílených) chemoterapeutik; přesto se stále nepodařilo vyvinout zcela účinnou a úspěšnou léčbu. Konvenční způsoby léčby z dlouhodobého hlediska selhávají (vedle chemoterapie jsou to nejčastěji radioterapie a chirurgické odstranění solidních nádorů). Hlavním problémem současných chemoterapeutik a příčinou selhání léčby je schopnost nádorové tkáně si vyvinout stav rezistence k protinádorovému léčivu (popřípadě jejich kombinaci) skrze celou řadu molekulárních mechanismů. Fotodynamická terapie (PDT) přináší z tohoto pohledu značnou výhodu – přímý cytotoxický efekt je schopen způsobit nekrotickou smrt i v případě, že je inhibována programovaná buněčná smrt. PDT kombinuje základní prvky (světlo, kyslík a fotosenzitizér), které jsou samy o sobě netoxické, ale jejich kombinace vede k destrukci nádorové tkáně skrze oxidační stres (především skrze tvorbu singletového kyslíku) a následné poškození základních buněčných struktur. K eradikaci nádoru pak případně přispívá aktivace imunitního systému, popřípadě vaskulární efekt PDT (hypoxie a nedostatek živin).

Přestože byla PDT klinicky schválena před více než dvěma desetiletími, zůstává v klinické praxi stále málo využívaná, a to i přes své nesporné výhody (Agostinis *et al.*, 2011). Ty spočívají zejména v selektivitě PDT k nádorové tkáni, která je primárně dána ozařováním pouze novotvaru (Benov, 2015) a možností masivní tvorby reaktivních forem kyslíku vedoucí k buněčné smrti (proti čemuž si buňky nejsou schopny do značné míry vyvinout rezistenci). Nádorové buňky jsou však charakteristické značně proměnlivou aktivitou antioxidantních mechanismů a jejich zvýšení může vést k nižší účinnosti PDT (Frank *et al.*, 2006, Golab *et al.*, 2003). Je tedy nutné zvolit správný typ fotosenzitizéru s vhodnými vlastnostmi, jeho dávkování, interval mezi podáním léčiva a ozářením, způsob ozařování a

délku ozařovacího procesu; všechny tyto faktory jsou totiž důležité pro hlavní mechanismus, jakým PDT nádorovou tkáň zničí (Agostinis *et al.*, 2011).

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

## 2.1 FOTODYNAMICKÁ TERAPIE

PDT je relativně nový, neinvazivní a vysoce selektivní přístup k eradikaci cílových buněk a tkáně, který je klinicky schválen již více jak dvě desetiletí. V dnešní době nachází PDT uplatnění již v celé řadě medicínských oborů – kardiologii (Waksman *et al.*, 2008), urologii (Bozzini *et al.*, 2012), zubním lékařství (Konopka a Goslinski, 2007), oftalmologii, dermatologii (Silva *et al.*, 2008) a kosmetice (Szeimies *et al.*, 2013). V léčbě infekčních onemocnění je PDT využitelná k fotoinaktivaci virů (Costa *et al.*, 2012), ničení bakteriálních kmenů rezistentních na antibiotika (Hamblin *et al.*, 2002) a k léčbě fungálních (Calzavara-Pinton *et al.*, 2012) i protozoálních onemocnění (Jori *et al.*, 2006), stejně jako ke sterilizaci vody (Almeida *et al.*, 2014, Magaraggia *et al.*, 2006) a desinfekci povrchů (Brovko, 2010).

Základními kameny PDT jsou tyto tři komponenty – PS, světlo a molekulární kyslík ( $^3\text{O}_2$ ), které jsou samy o sobě netoxické, ale v kombinaci jsou schopné tvořit především vysoce reaktivní a cytotoxické látky, kterým obecně říkáme reaktivní formy kyslíku (ROS). Ty pak poškozují buněčné struktury v procesu označovaném jako oxidační stres, a mohou vést až k buněčné smrti (Agostinis *et al.*, 2011, MacDonald a Dougherty, 2001).

### 2.1.1 Historie fotodynamické terapie

Světlo bylo známé pro lidskou medicínu po tisíciletí – již staří Egyptané, Indové a Číňané používali sluneční záření k léčbě celé řady onemocnění, jako je vitiligo nebo psoriáza. Tento způsob léčby je nazýván fototerapií. V kontextu moderní PDT, kde jsou specifické exogenní fotosensitizéry (PS) podány pacientovi před ozářením, používáme termín fotochemoterapie. Tato forma léčby je taktéž lidstvu známá více jak tři tisíce let (Spikes, 1985).

První zmínka o buněčné smrti indukované interakcí světla a chemické látky pochází až z roku 1900. Student medicíny v Mnichově Oscar Raab pod vedením prof. Hermana von Tappeinera popsal během svého studia letální účinek světla na prvoky (konkrétně šlo o nálevníky *Paramecium caudatum*) poté, co jim byl přidán akridin. Tento účinek byl výraznější, než působení samotného akridinu, samotného světla nebo ozáření akridinu ještě

před přidáním k nálevníkům. Raab vyslovil předpoklad, že tento efekt je pravděpodobně vyvolán přenosem energie ze světla na chemickou látku podobně, jako tomu je u chlorofylu v rostlinách. Krátce na to von Tappeiner předpověděl potenciální využití fluorescenčních látek v medicíně. (Raab, 1900, von Tappeiner, 1900). Ve stejném roce podal francouzský neurolog Jean Prime parenterálně eozin pacientům s epilepsií. Zjistil, že po expozici slunečnímu záření se u pacientů objevila dermatitida na místech, která nebyla krytá oblečením (Prime, 1900). Tyto objevy vedly profesora von Tappeinera společně s dermatologem Jesionkem k využití kombinace topického podání eozinu a ozáření bílým světlem k léčbě kožních karcinomů (von Tappeiner a Jesionek, 1903). Během následujících čtyř let pak ve spolupráci s Jodlbauerem ukázal, že k tomuto procesu je potřeba přítomnost kyslíku a zavedl pojem „fotodynamický účinek“ (von Tappeiner a Jodlbauer, 1904, von Tappeiner a Jesionek, 1907).

V roce 1911 ve Vídni popsal Hausmann podobný letální efekt hematoporphyrinu na nálevníky a červené krvinky, a také popsal kožní reakce u myši po expozici světlem. Aby Friedrich Meyer-Betz zjistil, zda je stejný účinek dosažitelný i u lidí, aplikoval sám sobě hematoporphyrin v dávce 200 mg. Na místech vystavených světlu pociťoval následně dlouhotrvající bolest a otoky (Hausmann, 1911, Meyer-Betz, 1913). Díky vlastní fluorescenci porfyrinů byla ve 40. letech 20. století zjištěna lokalizace exogenního hematoporphyrinu v maligních tumorech, což vedlo k dalšímu výzkumu zaměřeného na schopnosti porfyrinů lokalizovat nádorovou tkáň. Fluorescence porfyrinů (kromě hematoporphyrinu to byly např. koproporphyrin, protoporphyrin a zinečnatý hematoporphyrin) nebyla detekována ve zdravé tkáni, pouze ve tkáni lymfatické a nádorové, a to po 24–48 h od podání a přetrvávala 10–14 dní (Auler a Banzer, 1942, Figge *et al.*, 1948). Hematoporphyrin použitý v předchozích studiích však není čistou sloučeninou, ale jde o směs porfyrinů, které mají různé vlastnosti. Částečná purifikace hematoporphyrinu vedla ke špatné schopnosti lokalizovat nádorovou tkáň, kdežto zbylá převážně oligomerní frakce si tuto schopnost zachovala. Surový hematoporphyrin Schwartz podrobil další sérii purifikačních postupů. Jeden z nich se sestával z působení kyseliny octové a sírové, filtrace, neutralizace octanem sodným a následném rozpuštění precipitátu v solném roztoku – tato látka je dnes známá jako derivát hematoporphyrinu (HpD) a skládá se převážně z oligomerů různě pospojovaných jednotek hematoporphyrinu. HpD se ukázal být přibližně dvojnásobně fototoxický než původní surový hematoporphyrin, přesto byl primární zájem zaměřen na jeho použití jako diagnostické látky k detekci nádorů. (Schwarz *et al.*, 1955, Lipson a Baldes, 1960, Lipson *et al.*, 1961).



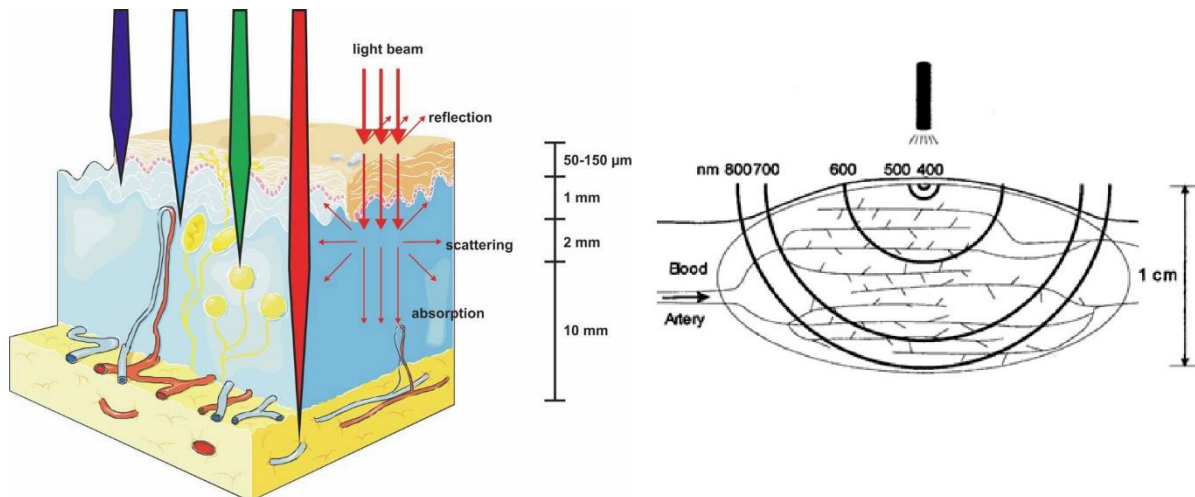
PDT, jak ji známe dnes, se začala formovat především v sedmdesátých a osmdesátých letech 20. století po další úpravě HpD (ultrafiltrace a lyofilizace) a vývoji derivátů porfyrinů a jejich využití v humánní medicíně (Sternberg *et al.*, 1998). Prvním úspěšným využitím HpD v kompletní eradikaci nádoru bylo dosaženo na zvířecích modelech s využitím dávky 2,5–5,0 mg/kg u myši resp. 5–15 mg/kg u potkanů a červené části spektra ( $> 600$  nm) xenonové obloukové lampy. Samotné světlo a HpD bez ozáření neindukovaly žádný fotodynamický efekt (Dougherty *et al.*, 1975). O tři roky později byla provedena první studie účinnosti HpD na lidské nádory u pěti pacientů s karcinomy močového měchýře. Nekróza byla pozorována pouze u maligní tkáně exponované aktivujícímu záření a nebyla pozorována u neozářené tkáně (Kelly a Snell, 1976). HpD byl pak úspěšně využit u celé řady PDT studií s různými typy nádorů a nakonec byl poprvé v roce 1993 klinicky schválen pro PDT nádorových onemocnění močového měchýře v Kanadě. V současné době je HpD ve formě porfimeru sodného komerčně dostupný jako léčivo Photofrin<sup>®</sup> a je využíván pro léčbu např. nádorů plic, jícnu, močového měchýře a děložního krčku (Dougherty *et al.*, 1998).

## 2.1.2 Koncept optického okna tkáně

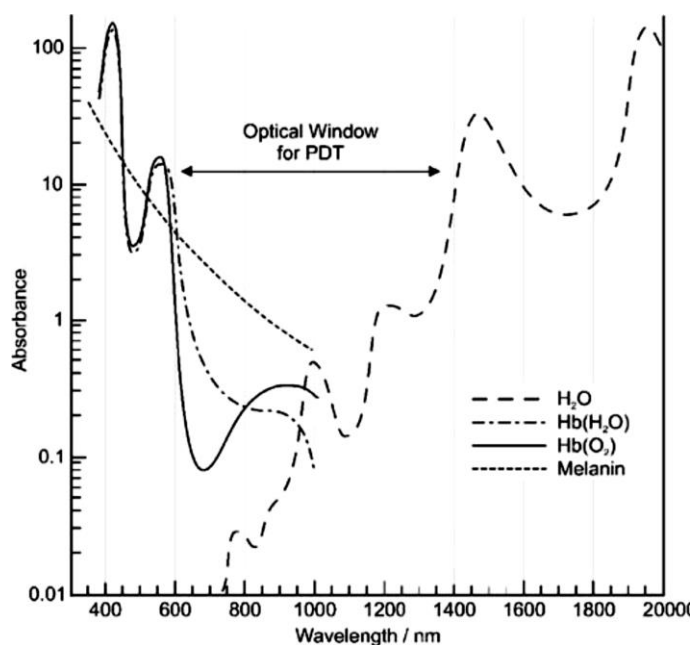
Světlo je po vstupu do tkáně rozptýleno a absorbováno. Míra těchto dvou jevů přímo souvisí s vlnovou délkou záření. Účinnost prostupu záření o krátké vlnové délce (modré světlo) je nižší než u záření o vyšší vlnové délce (červené světlo; Obr. 1), což je dáno komplexním molekulárním složením tkáně. Rozptyl a absorpci světla navíc ovlivňuje struktura tkáně – orgány, makromolekuly a organizované struktury. Pro PDT je důležité, aby aktivující záření mělo nejvyšší možnou penetraci tkání, a tudíž dosáhlo PS. Cílem je tedy syntetizovat látky absorbující především v červené oblasti záření (nad 600 nm) (Agostinis *et al.*, 2011, Plaetzer *et al.*, 2009).

Absorpce záření o vlnových délkách pod 600 nm je dána přítomností endogenních chromoforů. Nejvýznamnější z nich jsou melanin, hemoglobin, myoglobin a cytochromy (Castano *et al.*, 2004, Wilson *et al.*, 1985). Navyšování vlnových délek však není zcela výhodné, a to ze dvou důvodů. Za prvé, organická tkáň obsahuje velké množství vody způsobující významnou absorpci záření v oblasti přibližně nad 1300 nm. Za druhé, světlo o vlnové délce pouze do 800 nm má dostatečnou energii, aby bylo schopné účinně generovat

singletový kyslík ( $^1\text{O}_2$ ) (Castano *et al.*, 2004). Rozlišujeme tedy tzv. „optické okno tkáně“ (Obr. 2) v oblasti přibližně 600 – 1300 nm (Anderson a Parrish, 1981) a v souvislosti s oblastí 620 – 850 nm se často hovoří o tzv. „fototerapeutickém okně tkáně“ (Szaciłowski *et al.*, 2005).

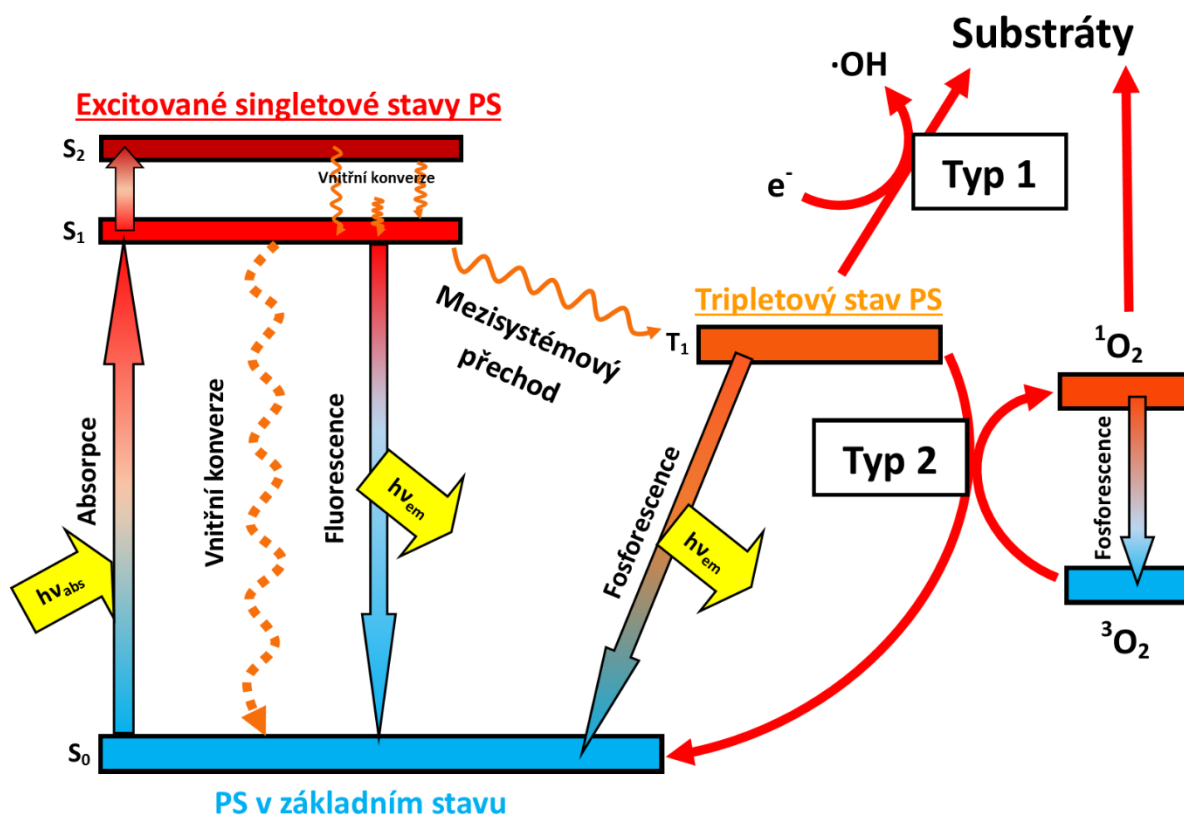


Obr. 1 Závislost hloubky penetrace světla do nádorové tkáně na jeho vlnové délce. Převzato z (Agostinis *et al.*, 2011, Sternberg *et al.*, 1998).



Obr. 2 Optické okno tkáně. Prostup světla tkání je omezen jeho absorpcí důležitými endogenními chromofory. Pro PDT je toto okno omezeno na oblast tzv. fototerapeutického okna v rozmezí přibližně 620 – 850 nm (viz. text). Převzato z (Plaetzer *et al.*, 2009).

## 2.1.3 Princip fotodynamické terapie



Obr. 3 Modifikovaný Jablonského diagram. Absorpce záření vybudí PS ze základního singletového stavu ( $S_0$ ) do excitovaného singletového stavu ( $S_1$ ,  $S_2$ ), ze kterého může mezisystémovým přechodem přejít na tripletový stav ( $T_1$ ) a tvořit ROS skrze fotoreakce typu 1 a 2. Dle (Agostinis *et al.*, 2011, Abrahamse a Hamblin, 2016).

Prvním krokem, který je kritický pro zahájení fotochemické reakce, je absorpce světelného záření chromoforem v základním singletovém stavu ( $S_0$ ) – vlnová délka aktivujícího záření se musí shodovat s absorpčním maximem PS (Obr. 3). Tím dochází k přechodu do excitovaného singletového stavu ( $S_1$ ), který trvá extrémně krátkou dobu (řádově nanosekundy), během které není schopen účinně interagovat s okolním prostředím (Henderson a Dougherty, 1992, MacDonald a Dougherty, 2001). Z  $S_1$  se chromofor dostává nazpět na  $S_0$  emisí fotonu (fluorescence) nebo na stav tripletový ( $T_1$ ) tzv. mezisystémovým přechodem (Sharman *et al.*, 2000). Přestože je přechod ze  $S_1$  na  $T_1$  z hlediska kvantové mechaniky tzv. zakázaný (je potřeba změny spinu elektronu), může k němu v malé míře také docházet. Dobrý PS je však schopen „zakázaným“ přechodem procházet s vysokou účinností (někdy až z 90 %). Z tripletového stavu se PS dostává na stav základní emisí fotonu (fosforescence) nebo přenosem své energie na jinou molekulu skrze nezářivý přenos.

Chromofor je svou energií schopen také ztratit vnitřní konverzí (teplo), nebo, což je pro PDT nejdůležitější, nezářivým přenosem během kolizí s ostatními molekulami, které jsou ve stejném spinovém stavu. V prostředí s přítomností kyslíku je tato energie z  $T_1$  stavu snadno předávána  $^3O_2$  (kyslík je jako jedna z mála molekul v základním tripletovém stavu) za vzniku  $^1O_2$ , který pak dále reaguje s organickými substráty (MacDonald a Dougherty, 2001, Sternberg *et al.*, 1998).

PS a  $^3O_2$  spolu reagují skrze své tripletové stavy – energie potřebná k přechodu na singletový stav u kyslíku je 22,5 kcal/mol (koresponduje s energií světla o vlnové délce 1274 nm), což je relativně nízká energie potřebná ke vzniku  $^1O_2$ . Tvorba  $^1O_2$  je závislá na přítomnosti kyslíku v biologickém systému a tuto reakci označujeme termínem fotoreakce typu 2 (Devasagayam a Kamat, 2002, MacDonald a Dougherty, 2001). Životnost  $^1O_2$  je velmi krátká – 2  $\mu$ s ve vodě (Sharman *et al.*, 2000, MacDonald a Dougherty, 2001), 50–100  $\mu$ s v lipidech (Henderson a Dougherty, 1992) a 10–100  $\mu$ s v organických rozpouštědlech (MacDonald a Dougherty, 2001), což limituje jeho difúzi v buňkách na vzdálenost přibližně 10 až 55 nm. Z toho vyplývá, že přímý fotodynamický efekt je striktně omezen pouze místem vzniku  $^1O_2$ , tedy lokalizací PS (Agostinis *et al.*, 2011).

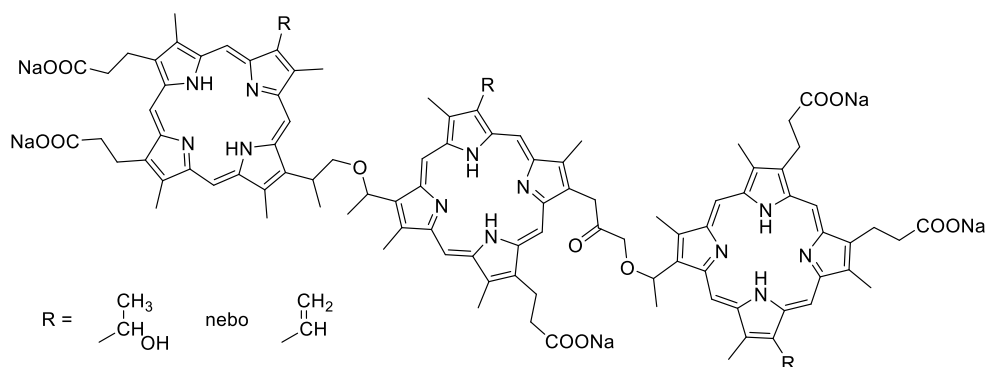
PS ve stavu  $T_1$  podstupuje ještě další typ fotoreakce. Fotoreakce typu 1 probíhá přímo se substrátem, kterým mohou být např. buněčné membrány či organické molekuly, a dochází při ní k přenosu protonu či elektronu za tvorby anionu či kationu radikálů. Vzniklý redukovaný PS je schopen produkce superoxidového anionu radikálu ( $O_2^{\cdot-}$ ), který sám o sobě není příliš reaktivní v biologických systémech (neprodukuje významné oxidační poškození).  $O_2^{\cdot-}$  je dále dismutací přeměněn na peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ), a ten jednoelektronovou redukcí na hydroxylový radikál ( $HO\cdot$ ) (Agostinis *et al.*, 2011, Castano *et al.*, 2004).

Reakce typu 1 a 2 mohou probíhat zároveň a poměr mezi nimi je závislý na typu PS, koncentraci substrátů a hladině kyslíku v biologickém systému (Castano *et al.*, 2004, Foote, 1991). Tvorba ROS skrze typ 2 je mechanisticky jednodušší a obecně je přijímáno, že za fotodynamický efekt většiny PS může právě především tvorba  $^1O_2$  (Agostinis *et al.*, 2011).

## 2.2 FOTOSENSITIZÉRY

### 2.2.1 První generace fotosensitizerů

Do první generace PS řadíme HpD a jeho další čištěné formy známé jako porfimer sodný, Photofrin<sup>®</sup> (Obr. 4), který je prvním komerčně dostupným PS na trhu a doposud s ním bylo léčeno tisíce pacientů (Allison a Sibata, 2010). Photofrin<sup>®</sup> je směs dimerů a oligomerů (porfyrinové jednotky jsou spojené etherovými, esterovými a C-C vazbami) vzniklých manipulacemi s hematoporfyrinem (Dougherty *et al.*, 1984), a přestože výsledný produkt se může zásadně lišit v poměrovém složení jednotlivých komponent, zdá se, že ve výsledném klinickém chování jsou minimální rozdíly. Tento PS není příliš účinným producentem <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (kvantový výtěžek singletového kyslíku ( $\Phi_{\Delta}$ ) je cca 20 % (Nyman a Hynninen, 2004)) při vlnové délce 630 nm (tzv. Q1 pás), která je vhodná pro PDT (nejdelší vlnová délka, kde absorbuje Photofrin<sup>®</sup>), takže ozařovací proces musí být relativně dlouhý. Photofrin<sup>®</sup> však silně absorbuje u jiných vlnových délek a to především v modré (408 nm) a zelené (510 nm) oblasti záření (Allison a Sibata, 2010, Sternberg *et al.*, 1998, Yano *et al.*, 2011). Photofrin<sup>®</sup> je podáván intravenózně (*i. v.*) v dávce 2–5 mg/kg. Ozařování probíhá po 24–48 h po podání a je využito světlo vlnové délky 630 nm o dávce 100–200 J/cm<sup>2</sup>. Další nevýhodou tohoto PS je dlouhá clearance z těla trvající 4 až 8 týdnů (Yano *et al.*, 2011) a s tím související poměrně dlouhá fotosensitizace kůže. Hlavními nevýhodami první generace PS (Photofrin<sup>®</sup>) jsou tedy absorpce záření o nízkých vlnových délkách, dlouhotrvající kožní fotosensitivita, dlouhá doba, kdy látka setrvává v organismu a fakt, že jde o komplexní směs dimerů a oligomerů (Allen *et al.*, 2001).



Obr. 4 Struktura Photofrinu<sup>®</sup> - zobrazen je oligomer složený ze tří porfyrinových jednotek.

## 2.2.2 Ideální fotosensitizer

Nevýhody první generace PS vedly k vytvoření myšlenky, jaké vlastnosti by ideální PS měl mít. Je nutné podotknout, že dosud se takovou látku nepodařilo vytvořit a pravděpodobně se nedá ani očekávat, že nějaký PS bude všechna tato kritéria splňovat. Celá řada PS druhé generace ovšem splňuje alespoň několik kritérií (Allen *et al.*, 2001).

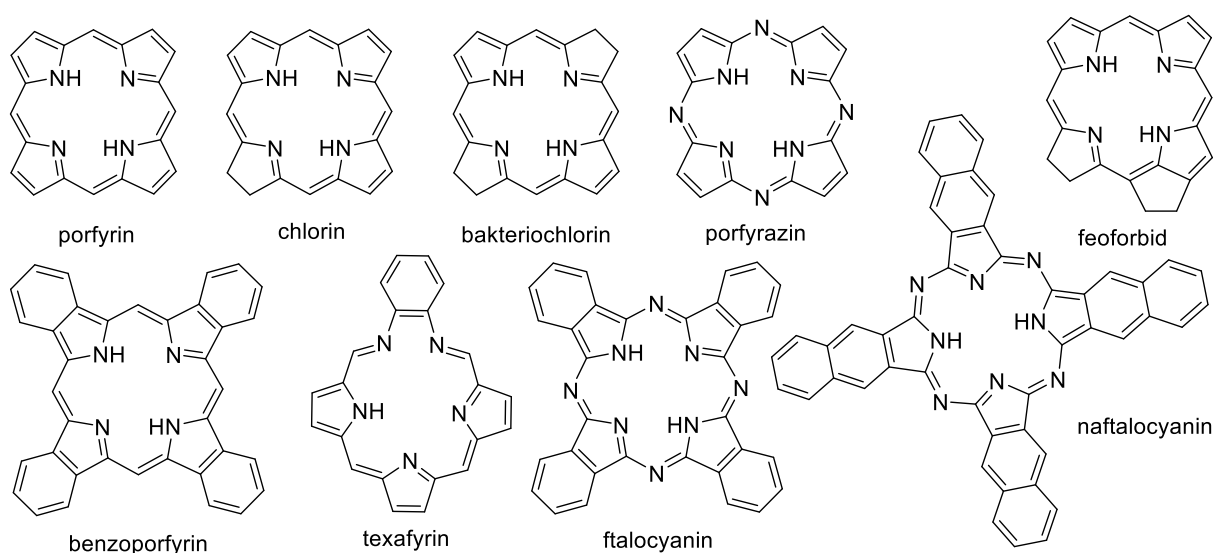
Ideální PS by měl splňovat tato kritéria:

- přednostní akumulace v maligní tkáni
- silný absorpční pás v červené až blízké infračervené oblasti spektra (600 nm – 800 nm; vysoký molární absorpční koeficient v této oblasti)
- čistá struktura se snadnou syntézou, nízkými výrobními náklady a dobrou skladovací stabilitou
- vysoký výtěžek tripletového stavu vedoucí k vysoké produkci  $^1\text{O}_2$  či jiných ROS
- velmi nízká toxicita bez ozáření (vlastní toxicita látky)
- relativně rychlé odstraňování PS z normální tkáně minimalizující nežádoucí účinky fototoxicity

Mezi dalšími parametry byla i délka intervalu mezi podáním PS a ozářením (DLI). Dříve se mělo za to, že DLI by měl být co možná nejdelší (až 4 dny), aby měl PS čas se eliminovat ze zdravé tkáně a koncentrovat se ve tkáni nádorové. Dnes se má za to, že velmi krátké DLI jsou naopak žádoucí (řádově minuty až hodiny), protože PS je přítomen v cévním řečišti nádoru, a může tak produkovat výraznější efekt na cévní zásobení (Agostinis *et al.*, 2011, Yano *et al.*, 2011).

## 2.2.3 Druhá generace fotosensitizérů – porfyrinoidy

Mezi porfyrinoidní látky řadíme porfyriny, jejich analoga (např. benzoporfyriny, chloriny, feoforbidy a bakteriochloriny), ftalocyaniny (Pc) a jejich analoga (např. azaftalocyaniny – AzaPc, a naftalocyaniny – Nc) a texafyriny (Obr. 5). Jde o 18–22  $\pi$  elektronové makrocykly složené buď ze čtyř pyrrolových jader spojených methinovými můstky, nebo v případě Pc (a jejich analog) jsou těmito jednotkami isoindoly spojené azomethinovými můstky. PS odvozené od struktury porfyriu mají charakteristický silný absorpční pás v oblasti kolem 400 nm (Soretův pás) a slabší absorpční pásy v oblasti 500 až 800 nm (Q pásy). I přes vysoký molární absorpční koeficient Soretova pásu ( $\epsilon \sim 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) je tento díky nízké vlnové délce nevhodný pro PDT především u hlouběji uložených nádorů a pro PDT je tedy nejvhodnější Q pás, který se nachází v červené až blízké infračervené oblasti (600–800 nm). Ten bývá naopak velice intenzivní u látek odvozených od Pc ( $\epsilon \sim 3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Absorpční maxima Q pásů pro porfyrinoidy jsou přibližně následující: porfyriny – 630 nm, chloriny – 670 nm, Pc – 680 nm, benzoporfyriny – 690 nm, bakteriochloriny 730 nm a texafyriny – 760 nm. (Yano *et al.*, 2011, Castano *et al.*, 2004). Následující část práce bude věnovaná především vybraným PS, které jsou klinicky používané, nebo jsou/byly ve fázi klinických studií.

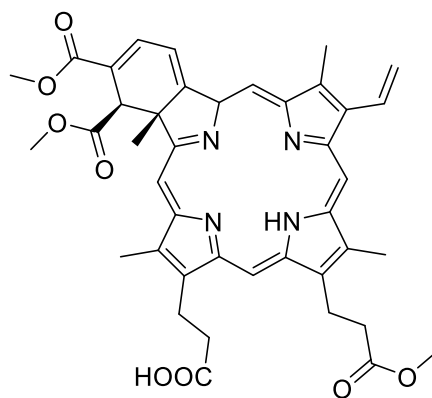


Obr. 5 Struktury hlavních zástupců porfyrinoidních fotosensitizérů.

### 2.2.3.1 Porfyriny

Do této skupiny patří strukturálně i PS první generace, Photofrin<sup>®</sup>, kterému byla věnována samostatná kapitola.

**Verteporfin** (známý pod obchodním označením Visudyne<sup>®</sup>, Obr. 6) je derivát benzoporfyrinu (BpD) poprvé syntetizovaný v polovině osmdesátých let Dielsovou-Alderovou reakcí dimethylesteru protoporfyrinu a dimethylesteru but-2-yniové kyseliny (Figueiredo a Dolphin, 1998, Pangka *et al.*, 1986). Vzniklá směs izomerů absorbuje silně v oblasti 686 nm ( $\epsilon = 3,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), což je nejdelší vlnová délka pro Q pás u všech do té doby známých PS druhé generace. Velkou výhodou verteporfinu je jeho velice rychlé vylučování z organismu. Visudyne<sup>®</sup> se podává *i. v.* v dávce 0,3 mg/kg a ozáření probíhá nejčastěji během 30 min po podání diodovým laserem o vlnové délce 690 nm s dávkou světla  $50 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ . Liposomálně podaný verteporfin se rychle akumuluje v neovaskulární tkáni oka a proto se využívá k léčbě vlhké formy věkem podmíněné makulární degenerace (AMD)(Allison a Sibata, 2010, Yano *et al.*, 2011), což je závažné onemocnění způsobující nevratnou ztrátu zraku (Wolf-Schnurrbusch *et al.*, 2011).



verteporfin (Visudyne<sup>®</sup>)

Obr. 6 Struktura verteporfinu (jeden z izomerů).



### 2.2.3.2 Ostatní struktury odvozené od porfyriu

**Temoporfin** (*m*-THPC, *m*-tetra(hydroxyfenyl)chlorin, Foscan<sup>®</sup>, Foslip<sup>®</sup>, Obr. 7) je PS druhé generace z rodiny chlorinů odvozený redukcí od *m*-tetra(hydroxyfenyl)porfyriu, který se ukázal být mnohem účinnější než Photofrin<sup>®</sup> (Bonnert *et al.*, 1989, van Geel *et al.*, 1995) a řadí se mezi vůbec nejúčinnější používané PS s vysokou produkcí <sup>1</sup>O<sub>2</sub> při 652 nm (Mitra a Foster, 2005). Temoporfin se aplikuje v dávce 0,1–0,2 mg/kg a ozáření vyžaduje jen nízké dávky (20 J · cm<sup>-2</sup>) s dobou aplikace světla vyžadující jen několik minut. Ukázalo se, že u temoporfinu je výhodnější zvyšování dávky světla, než dávky léčiva. Nevýhodou je však možnost výskytu výrazných bolestí během léčby, které se dají omezit podáním analgetik. Nevýhodou temoporfinu je dlouhá doba (4 dny) akumulace v nádorové tkáni a clearance z tkáně nenádorové, než je možné aplikovat světlo. První den po aplikaci může i vystavení slabému osvětlení vést k závažné kožní fotosensitivitě a při samotné léčbě musí být aplikace světla přesně mířená (Copper *et al.*, 2003, Kübler *et al.*, 2001, Senge a Brandt, 2011). Temoporfin je schválen v Evropě pro léčbu nádorů hlavu a krku, plic, mozku, kůže a žlučových (Agostinis *et al.*, 2011).

**Talaporfin** (Obr. 7) neboli mono-L-aspartylchlorin-*e*<sub>6</sub> (NPe6, LS11, Laserphyrin<sup>®</sup>, Photolon<sup>™</sup>, Litx<sup>™</sup>, MACE, Apoptosin<sup>™</sup>) je ve vodě rozpustný derivát chlorinu s krátkým akumulačním časem v nádorové tkáni. Je vyráběný několika producenty a jeho přesná struktura a složení se může lišit, což má vliv na klinickou odezvu (Allison a Sibata, 2010). Q pás talaporfinu má maximu absorpance o vlnové délce 654 nm ( $\epsilon = 4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), kde je schopen silné produkce <sup>1</sup>O<sub>2</sub> ( $\Phi_{\Delta} = 0,77$ ). Léčebný postup je opět obdobný jako u Photofrinu<sup>®</sup>, jen s nižší dávkou léčiva (0,5–3,5 mg/kg) i světla (150 J · cm<sup>-2</sup>) o vlnové délce 664 nm. Ozáření probíhá 4 h po injekční aplikaci léčiva. Kožní fotosensitivita je omezena rychlým vyplavením z organismu (3–7 dní) a nízkou akumulací talaporfinu v kožní tkáni (Yano *et al.*, 2011).

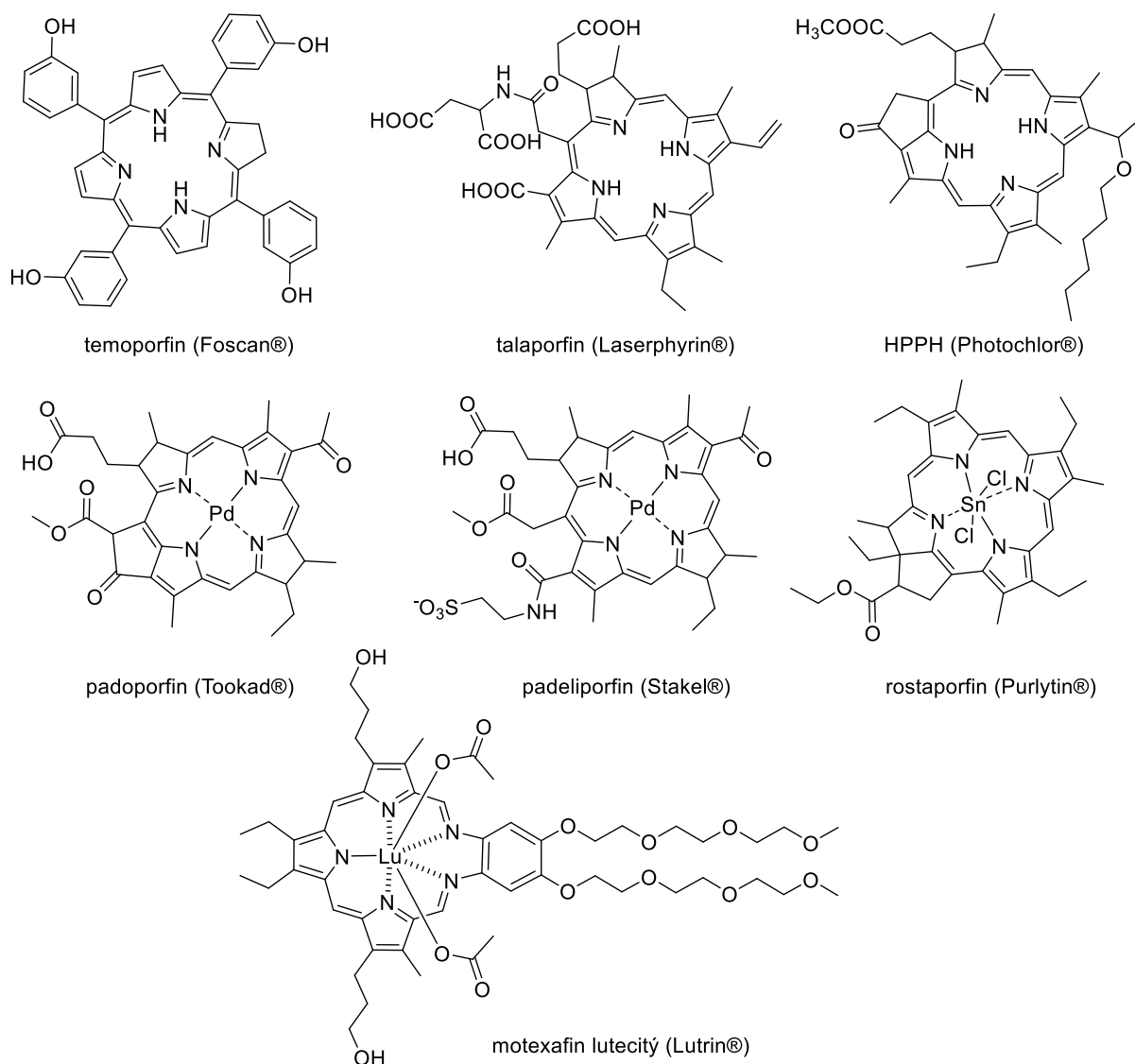
Zástupcem **feoforbidových** PS je vysoce lipofilní 2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinylpyrofeoforbid (HPPH, Photochlor<sup>®</sup>, Obr. 7), který byl navrhnut za účelem dobré penetrace skrze buněčné membrány. Photochlor<sup>®</sup> má vyšší schopnost se akumulovat v nádorové tkáni než Photofrin<sup>®</sup> i temoporfin, nedochází k jeho metabolizaci a je pomalu odstraňován z plazmy a vylučován z organismu (Bellnier *et al.*, 2003). HPPH se dá připravit v čisté formě z methylfeoforbidu a extrahovaného ze *Spirulina* spp. (Pandey *et al.*, 1996).

Q pás HPPH leží kolem absorpčního maxima 665 nm ( $\epsilon = 4,75 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  v 1% Tween-80 micelách),  $\Phi_{\Delta} = 0,48$  je vyšší než u temoporfinu, ale nižší než u talaporfinu. Typické dávky HPPH jsou 0,15 mg/kg a ozařování probíhá 24–48 h po aplikaci při 665 nm s dávkou světla  $150 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$  (Yano *et al.*, 2011). Na rozdíl od Photofrinu<sup>®</sup> se při léčbě Photochlorem<sup>®</sup> nevyskytují závažné kožní fotosensitizační reakce (Pandey *et al.*, 1991).

Lipofilní **padoporfin** (WST09, Tookad<sup>®</sup>, Obr. 7) a hydrofilní **padeliporfin** (WST11, Tookad<sup>®</sup> soluble, Stakel<sup>®</sup>, Obr. 7) jsou deriváty bakteriofeoforbidu a mají především účinek na cévní zásobením nádoru – používají se tedy ve fotodynamické terapii zaměřené na cévy (VTP) (Azzouzi *et al.*, 2013, Weersink *et al.*, 2005a). PS se rychle eliminuje z oběhu, a proto je potřeba provést ozáření ihned nebo krátce po aplikaci PS a fotosensitivita trvá jen přibližně tři hodiny (Weersink *et al.*, 2005b). Dávka je typicky 2–6 mg/kg a ozařuje se vlnovou délkou 763 nm (padoporfin) resp. 753 nm (padeliporfin) s dávkou světla kolem  $200 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$  (Bugaj, 2016). Oba PS (zvláště pak padeliporfin) jsou dnes zkoumané především v léčbě zhoubných nádorů prostaty, kde se ukázali jako velmi účinné (Azzouzi *et al.*, 2015).

**Rostaporfin**, cínčitý ethyletiopurpurin (SnET2, Purlytin<sup>®</sup>, Obr. 7), je syntetický purpurin (degradační produkt chlorofylu) (Josefsen a Boyle, 2008a) syntetizovaný na základě využití efektu těžkého kovu, díky čemuž má vysoký  $\Phi_{\Delta} = 0,71$  (Pogue *et al.*, 1998). SnET2 se aplikuje injekčně v dávce 1,2 mg/kg a dochází k jeho akumulaci v buněčných membránách a k ozáření dochází 24 h po aplikaci. Během léčby se mohou objevovat bolesti a nežádoucí fotosensitivita přetrvává až 14 dní (Yano *et al.*, 2011).

**Texafyriny** jsou rozšířené porfyrinoidy poprvé syntetizované koncem osmdesátých let (Sessler *et al.*, 1994). Do této skupiny látek patří také ve vodě rozpustný motexafin lutecitý (Lutrin<sup>®</sup>, Obr. 7) – PS se širokým a silným absorpčním Q pásem při vysokých vlnových délkách (maximum 732 nm), ale s nižší produkcí singletového kyslíku v porovnání s ostatními PS ( $\Phi_{\Delta} = 0,11$ ). Dávka Lutrinu<sup>®</sup> je relativně nízká (0,6–7,2 mg/kg) a k ozařování dochází 3 h po injekční aplikaci dávkou světla  $150 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$  (při vlnové délce 732 nm) (Young *et al.*, 1996).



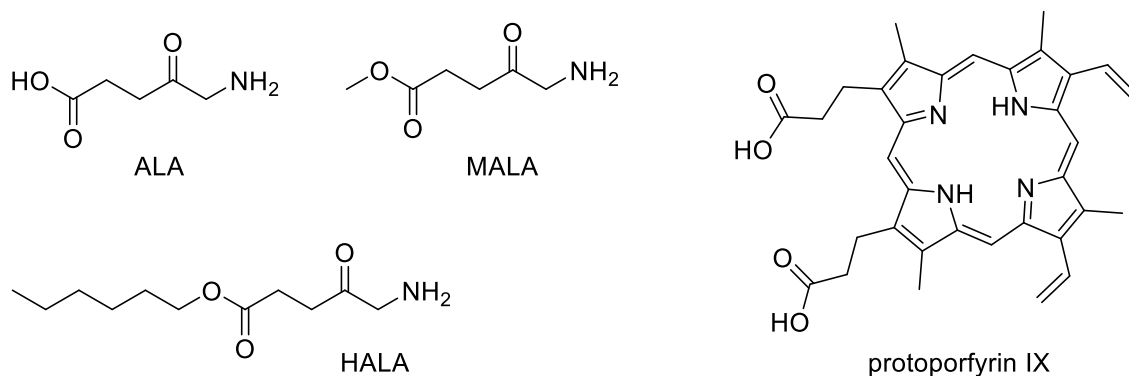
Obr. 7 Struktury PS odvozených od chlorinu, feoforbidu, bakteriofeoforbidu, purpurinu a texafyrinu.

### 2.2.3.3 $\delta$ -aminolevulová kyselina a její estery

Absolutní většina používaných PS jsou exogenní látky. Vyvolání kožní fotosensitivitu podáním exogenního porfyriu (obdobné jako u pacientů trpících hepatickou porfyrií) vedlo k objevení tzv. chemické porfyrie (Granick, 1965) a návrhu konceptu známého jako endogenní fotosensitizace (Ackroyd *et al.*, 2001), který vyžaduje podání proléčiva  **$\delta$ -aminolevulové kyseliny** (ALA; Obr. 8; sama o sobě fotodynamicky neaktivní), což je biosyntetický prekurzor fotosensitizujícího protoporfyrinu IX (PpIX) (Kennedy a Pottier, 1992).

Jednou z výhod ALA je možnost orálního podání léčiva (vedle topického a *i. v.*). Ukázalo se, že přednostní akumulace PS probíhá v mukóze dutých orgánů (Loh *et al.*, 1993). Za fyziologických podmínek je veškerý PpIX přeměněn na fotodynamicky neaktivní hem. Pokud je však podáno nadbytečné množství ALA, je překročena kapacita tvorby hemu a dochází k hromadění fotosensitizujícího PpIX. Neoplastická tkáň je navíc schopná produkovat vyšší množství PpIX v porovnání s okolní normální tkání. Při topickém podání lze cílovou tkáň ozařovat 18 h po aplikaci modrým (410 nm), zeleným (510 nm) i červeným (635 nm) světlem. Tvorba  $^1\text{O}_2$  je účinnější u kratších vlnových délek a léčba červeným světlem tak vyžaduje delší dobu ozáření. (Allison a Sibata, 2010).

Ke zvýšení lipofility a tudíž i schopnosti proléčiva pronikat hlouběji do tkáně byl vyvinut methylester ALA (MALA, Metvix; Obr. 8) (Morton, 2003). Průnik MALA je až dvojnásobný (2 mm) v porovnání s ALA. Esterová vazba je štěpena v cílové tkáni endogenními nitrobuněčnými esterasami za uvolnění ALA a následné biosyntézy PpIX (Allison a Sibata, 2010). Výhodou MALA po topickém podání oproti ALA je omezení systémových účinků – k tvorbě PpIX dochází jen v místě podání MALA. Doba průniku ALA skrze normální tkáň z kůže do krevního řečiště je přibližně 5 h – toto nebylo pozorováno u esterů ALA (Moan *et al.*, 2001). Studována byla celá řada dalších esterů, ale ukázalo se, že estery s kratším alkylovým řetězcem mají nejvyšší produkci fluorescence ve tkáni (Kloek *et al.*, 1998). Hexylester ALA (HALA, Hexvix<sup>®</sup>; Obr. 8) se po *i. v.* podání akumuluje především v nádorové tkáni močového měchýře a používá se ve fotodynamické diagnostice při eliminování těchto malignit (Mariappan *et al.*, 2015).



Obr. 8 Struktury proléčiv 5-aminolevulové kyseliny (ALA), jejích esterů (MALA, HALA) a aktivního PS protoporphyrinu IX.

### 2.2.3.4 Ftalocyaniny

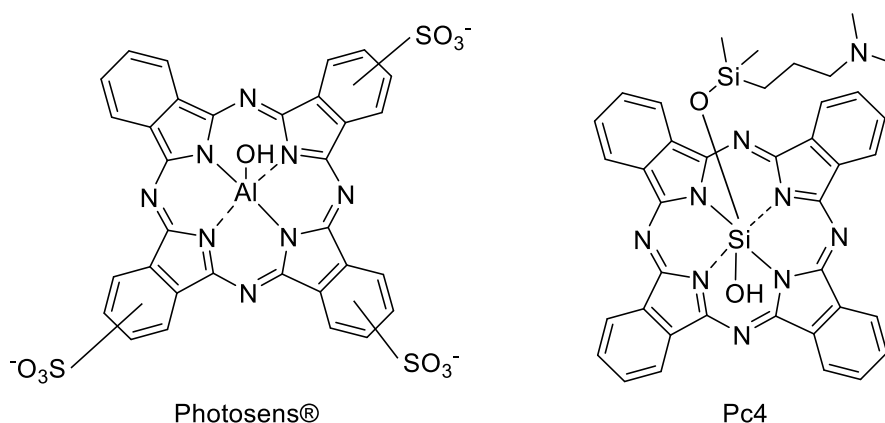
Ftalocyaniny (tetrabenzoporfyriziny, 29*H*,31*H*-tetrabenzo[*b,g,l,q*]-5,10,15,20-tetraazaporfyriny) jsou syntetické analogy porfyrinů lišící se od nich benzenovým jádrem přikondenzovaným k pyrrolovým podjednotkám a atomem dusíku ve spojovacím můstku mezi těmito podjednotkami. Tato modifikace struktury vede k rozšíření konjugovaného systému, což dále vede k absorpci při vyšších vlnových délkách (600–850 nm). Monomerní Pc mají charakteristické absorpční spektrum se Soretovým pásem (kolem 350 nm), slabé maximum kolem 600 nm a úzký a silný Q pás ve vzdálené červené oblasti záření kolem 680 nm (Kadish *et al.*, 2010, Allen *et al.*, 2001, Lukyanets a Nemykin, 2010), který se nachází v “optickém okně tkáně” (Castano *et al.*, 2004). Název „ftalocyanin“, odvozený z řeckých slov *naphtha* (petrolej) a *cyanine* (tmavě modrý), byl poprvé použit Sirem Reginaldem Linsteadem a popisoval charakteristické barvy prvních syntetizovaných Pc (Linstead, 1933). Chemická struktura (Obr. 5) a planární charakter Pc jádra byl objeven krátce na to stejnou vědeckou skupinou (Dent *et al.*, 1934) a později potvrzen rentgenovou krystalografií (Robertson a Woodward, 1940).

Komplexy Pc s kovovými ionty ovlivňují fotofyzikální vlastnosti – výtěžek tripletového stavu a jeho dobu života. Komplexace iontů paramagnetických kovů či kovů s otevřenou slupkou jako jsou např.  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{VO}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$  nebo  $\text{Pd}^{2+}$  zkracují dobu života tripletového stavu díky zvýšenému mezisystémovému přechodu zpět na základní stav, což vede k fotoinaktivním látkám (Chan *et al.*, 1987). Na druhou stranu Pc obsahující ionty kovů s uzavřenou *d* slupkou nebo ionty diamagnetických kovů (např.  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  a  $\text{Ga}^{3+}$ ) produkují vysoké výtěžky tripletového stavu s dlouhou dobou života. Výtěžky  $^1\text{O}_2$  jsou pak ovlivnitelné také do určité míry periferní i axiální substitucí Pc. I přes to však mají Pc tendenci ve vodném prostředí agregovat nebo dimerizovat, což vede k redukci až ztrátě jejich aktivity. Po ozáření světlem je energie spotřebována na vnitřní konverzi do základního stavu místo na tvorbu tripletového stavu a následně  $^1\text{O}_2$  (Darwent *et al.*, 1982). Agregaci Pc lze snadno odhalit spektroskopickými metodami – dochází k modrému (hypsochromnímu) posunu absorpčního maxima (30–50 nm) a Q pás se stává méně intenzivní a širší (Allen *et al.*, 2001).

Nevýhody HpD vedly k hledání jiných, účinnějších PS. Díky výhodným fotofyzikálním a fotochemickým vlastnostem, se zájem zaměřil i na Pc. Sulfonovaný

chlorohlinový ftalocyanin se ukázal být srovnatelně účinným až lepším PS než HpD, zatímco prokázal nižší kožní fotosensitivitu v přítomnosti bílého světla (Bown *et al.*, 1986, Chan *et al.*, 1986). Nevýhodou tohoto PS je opět fakt, že se jedná o směs ftalocyaninů, které jsou di- a především tri- (ale také v menší míře až tetra-) substituované sulfonovou funkční skupinou. Tato látka v modifikované formě (**sulfonovaný hydroxyhlinový ftalocyanin**, stupeň sulfonace  $n \sim 3$ ) je dnes známá pod označením Photosens<sup>®</sup> (Obr. 9). Absorpční maximum Q pásu je 675 nm a tento PS zde má jeden z nejvyšších molárních absorpčních koeficientů mezi PS druhé generace ( $\epsilon = 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), což vede k mnohem nižším (0,5–0,6 mg/kg) dávkám PS i světla ( $150 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) v porovnání s HpD. Photosens<sup>®</sup> prošel třetí fází klinického hodnocení na nádorech prsu, plic, hrtanu, nosohltanu a dlaždicového karcinomu (Yano *et al.*, 2011). Od roku 2001 je schválen pro klinické použití v Rusku (Ormond a Freeman, 2013).

Druhým významným zástupcem je **křemičitý ftalocyanin Pc4** (Obr. 9; stejně jako Photosens<sup>®</sup> jde o PS druhé generace), který byl vyvinutý na Case Western Reserve University (He *et al.*, 1997). Pc4 stejně jako Photosens<sup>®</sup> absorbuje v Q pásu při vlnové délce 675 nm (Agostinis *et al.*, 2011). Pc4 je bezpečný v léčbě pacientů s kožními nádory a přinesl klinické zlepšení u pacientů s kožním T-lymfocytomem (CTCL). Na úrovni buněčných organel jej nacházíme vázaný na membrány mitochondrií, lyzozomů a ER. V současné době je Pc4 ve fázi klinických studií pro léčbu psoriázy a CTCL (Soler *et al.*, 2016).



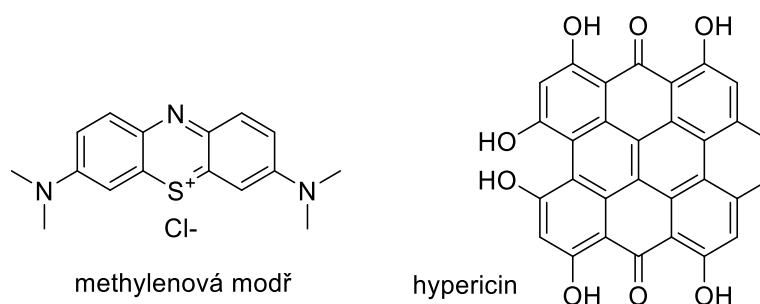
Obr. 9 Struktury ftalocyaninových PS Photosens<sup>®</sup> (na obrázku je trisulfonovaný derivát) a Pc4.

## 2.2.4 Druhá generace fotosensitizerů - ostatní struktury

Kromě PS odvozených od porfyrinoidů našly v PDT uplatnění i strukturálně odlišné látky – některé z nich budou popsány v této kapitole.

Do neporfyrinoidních PS patří skupina fenothiazinových barviv – **methylenová modř** (MB; Obr. 10), toluidinová modř, Nilská modř A a jejich deriváty. Přestože je MB účinným PS v *in vitro* podmínkách, v *in vivo* se ukázala být neúčinná po *i. v.* podání pravděpodobně díky své vysoké hydrofilitě (Yano *et al.*, 2011) a rychlé redukci na leuko-formu. Lipofilnější deriváty MB však vedly jen malému zlepšení poměru fototoxicity a toxicity bez ozáření v *in vitro* podmínkách a navíc u některých derivátů došlo k významnému zvýšení toxicity bez ozáření (Mellish *et al.*, 2002). Přestože MB prokázala aktivitu u různých typů kožních nádorů (Tardivo *et al.*, 2005), našla své uplatnění spíše ve fotodynamické inaktivaci infekčních agens (Usacheva *et al.*, 2003, Wainwright, 2004).

**Hypericin** (Obr. 10) je perylenchinon izolovaný z třezalky tečkované (*Hypericum perforatum*) s hlavním absorpčním pásem kolem 600 nm, slibnými fotosensitivními vlastnostmi a afinitou k nádorové tkáni. Hypericin je navíc příkladem látky s několika cíli – má schopnost inhibovat angiogenezi a tvorbu metastáz díky ovlivnění několika klíčových buněčných drah (Kleemann *et al.*, 2014). Hypericin je lipofilní, a tak pro podání vyžaduje formulaci v nosičovém systému (liposomy, micely, nanočástice) (Liu *et al.*, 2015).



Obr. 10 Struktura methylenové modři a hypericinu.

Jako PS se samozřejmě uplatňuje i celá řada dalších látek, jejichž výčet přesahuje rámec této práce – patří sem dále např. deriváty hypocrelinu (He *et al.*, 1999, Chio-Srichan *et al.*, 2010), squarainová barviva (Beverina *et al.*, 2008, Zou *et al.*, 2015), deriváty BODIPY a jejich analoga (Yogo *et al.*, 2005), kurkumin (Leite *et al.*, 2014), rhodaminy a psoraleny

(Wainwright, 1996) a mnoho dalších. Za zmínku stojí také fulereny, které stejně jako Pc získaly oblibu a uplatnění v celé řadě odvětví, a stejně tak se ukázaly jako látky s vhodnými vlastnostmi pro PDT (Otake *et al.*, 2010).

## 2.2.5 Třetí generace fotosensitizerů

I přes vhodné fotofyzikální a fotochemické vlastnosti trpí většina PS druhé generace nízkou rozpustností ve vodném prostředí (především při fyziologickém pH), což omezuje i jejich přímé *i. v.* podání. Výzkum je v této oblasti zaměřen především na vytváření transportních systémů schopných výrazně zvýšit selektivitu a specifitu PS druhé generace – mikroemulze, liposomy a nanočástice. Nevýhodou této strategie však může být snížení  $\Phi_{\Delta}$  neseného PS, protože  $^1\text{O}_2$  musí difundovat mimo nosičový systém a díky omezené schopnosti difúze  $^1\text{O}_2$ , nemusí tento dosáhnout svého biologického cíle (Josefsen a Boyle, 2008a). Druhou možností, jak zvýšit selektivní akumulaci v nádorové tkáni, je konjugace PS s biologicky aktivní molekulou, která zajistí cílení. Těmito molekulami mohou být peptidy, monoklonální protilátky, bílkoviny, LDL, kyselina listová, cukry apod. (Yano *et al.*, 2011, Abrahamse a Hamblin, 2016). V *in vitro* a *in vivo* podmínkách již byla studována celá řada takových konjugátů, jako je např. temoporfin konjugovaný s folátem (Gravier *et al.*, 2008), řada glykokonjugovaných porfyrinů a chlorinů (Hirohara *et al.*, 2009) či Pc konjugovaný s trastuzumabem (Sato *et al.*, 2015), kde tyto konjugáty PS prokázaly lepší selektivitu, než jejich nekonjugované protějšky a zároveň zachovanou fotodynamickou aktivitu. Vývoj nových PS systémů s nádorově-specifickými vlastnostmi pravděpodobně povede k efektivnější PDT a novým aplikacím těchto látek (Josefsen a Boyle, 2008b).



## 2.3 REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU A OXIDAČNÍ STRES

Oxidační stres nastává, pokud je rovnováha mezi antioxidanty a prooxidanty posunuta ve prospěch prooxidantů (Sies, 1986). V biologických systémech jsou prooxidanty nejčastěji ROS, což je skupina celé řady molekul a volných radikálů (reaktivní částice, které mají jeden nebo více nepárových elektronů) odvozených od molekulárního kyslíku.  $^3\text{O}_2$  je ve svém základním (tripletovém) stavu bi-radikál obsahující dva nepárové elektrony ve vnější slupce. Oba tyto elektrony mají stejný spin, takže  $^3\text{O}_2$  není příliš reaktivní; pokud však dojde ke změně spinu jednoho z těchto elektronů, tvoří se  $^1\text{O}_2$ , který je silným oxidačním činidlem (Turrens, 2003). Dva elektrony s opačným spinem u  $^1\text{O}_2$  mohou snadno reagovat s jinými páry elektronů – oxidační poškození biomolekul tak může postihnout lipidy, proteiny, steroly, RNA i DNA (Davies, 2003).

Rozlišujeme dvě formy  $^1\text{O}_2$ , které se dají od sebe odlišit díky rozdílným emisním maximům. Delta singletový kyslík ( $^1\Delta_g \text{O}_2$ ), který je pro biologické systémy nejdůležitější, má energetickou hladinu 22,5 kcal/mol nad základním tripletovým stavem ( $^3\Sigma_g$ ). Druhou formou je sigma singletový kyslík ( $^1\Sigma_g \text{O}_2$ ), který má energetickou hladinu 37,5 kcal/mol nad  $^3\Sigma_g$  a většinou přechází na  $^1\Delta_g$  dříve, než stihne reagovat s jinou hmotou (Devasagayam a Kamat, 2002); jeho poločas ve vodném prostředí je  $10^{-9}$  s v porovnání s  $10^{-6}$ – $10^{-5}$  s u  $^1\Delta_g \text{O}_2$  (Bland, 1976, Devasagayam a Kamat, 2002). Konverze  $^3\text{O}_2$  na  $^1\text{O}_2$  vyžaduje dodání energie a v biologických systémech tomu může být dvěma způsoby: fotoexcitací a chemickou excitací. Hlavním zdrojem  $^1\text{O}_2$  je fotoreakce typu 2 – po ozáření jsou jako generátory  $^1\text{O}_2$  schopné fungovat nitrobuněčné molekuly (flaviny, cytochromy, 4-thiouridin apod.), stejně tak i xenobiotika (tetracykliny (Glette a Sandberg, 1986), chlorpromazin (Kochevar, 1981), merbromin (Gollnick a Held, 1990), chlorchinon (Spikes, 1998) apod.). Bez přítomnosti světla jsou schopné produkovat  $^1\text{O}_2$  některé enzymy. Radíme sem např. laktoperoxidasy (Kanofsky, 1983), myeloperoxidasy (Kanofsky *et al.*, 1984), cytochromy (Yasui *et al.*, 2002), či lipoxygenasy (Kanofsky a Axelrod, 1986).

Jedním z nejdůležitějších ROS v biologických systémech je  $\text{O}_2^-$ , který je produkován enzymaticky i neenzymaticky. Enzymatickými zdroji  $\text{O}_2^-$  jsou především NADPH-oxidasy (Babior, 2000, Babior *et al.*, 2002), cytochrom-P<sub>450</sub>-dependentní oxygenasy (Coon *et al.*, 1992) a proteolytická konverze xanthindehydrogenasy na xanthinoxidasu (Yokoyama *et al.*, 1990). Neenzymaticky je  $\text{O}_2^-$  produkován, když je jeden elektron přenesen přímo na  $^3\text{O}_2$

redukovanými koenzymy či prostetickými skupinami (např. flaviny nebo Fe-S klastry), nebo xenobiotiky předem redukovanými příslušnými enzymy. Mitochondriální dýchací řetězec obsahuje celou řadu redoxních center, odkud mohou unikat elektrony a reagovat s  $^3\text{O}_2$  – což je považováno za hlavní zdroj  $\text{O}_2^{\cdot-}$  ve většině tkání. Superoxid je odstraňován tzv. dismutací za vzniku peroxidu vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Tato reakce je spontánní nebo může být katalyzovaná antioxidantními enzymy superoxiddismutasami (SOD) (Turrens, 2003). SOD pracují ve spojení s enzymy odstraňující  $\text{H}_2\text{O}_2$  jako jsou katalasy a glutathionperoxidasy (Michiels *et al.*, 1994).  $\text{O}_2^{\cdot-}$  je považován za „primární ROS“ a reakcí s ostatními molekulami poskytuje „sekundární ROS“ ať už přímo, nebo skrze enzymatickou přeměnu či přeměnu katalyzovanou kovy.  $\text{O}_2^{\cdot-}$  nereaguje přímo s polypeptidy, cukry a nukleovými kyselinami. Jeho schopnost peroxidace lipidů je sporná (Valko *et al.*, 2006).

$\text{H}_2\text{O}_2$  je toxický pro většinu buněk v rozmezí koncentrací 10–100  $\mu\text{M}$ , způsobující apoptózu nebo senescenci (Halliwell a Gutteridge, 2007). Mechanismus účinku  $\text{H}_2\text{O}_2$  spočívá především ve tvorbě  $\text{HO}^{\cdot}$  (Linley *et al.*, 2012). Při nižších koncentracích je však schopen indukovat proliferaci u některých buněčných linií, a naopak, při vyšších koncentracích inhibuje apoptózu a způsobuje nekrotickou buněčnou smrt (Halliwell a Gutteridge, 2007).  $\text{H}_2\text{O}_2$  se neomezeně mísí s vodou a je schopen difúze mezi buňkami *in vivo* a stejně jako voda využívá pro přenos skrze membrány i akvaporiny (Bienert a Chaumont, 2014). Jeho reaktivita je nízká a jde o slabé redoxní činidlo s nízkou reaktivitou. V organismu vzniká především dismutací  $\text{O}_2^{\cdot-}$  a působením monoaminové oxidasy (Halliwell a Gutteridge, 2007).

Tvorba celé řady toxických ROS je úzce spojená s účastí redoxně-aktivních kovů – v kontextu buněk jde především o železo, případně i měď. Fyziologický metabolismus železa se snaží, aby v buňce bylo volné (tj. redoxně-aktivní) železo v omezeném množství – v *in vivo* podmínkách je však během stresu  $\text{O}_2^{\cdot-}$  schopný uvolnit železo z proteinů a jiných molekul, které ho obsahují (např. proteiny obsahující 4Fe-4S klastry) (Liochev a Fridovich, 1994). Uvolněné železo ( $\text{Fe}^{2+}$ ) se může účastnit Fentonovy reakce ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^{\cdot} + \text{HO}^-$ ) a vytvářet vysoce reaktivní a nebezpečný  $\text{HO}^{\cdot}$ . Superoxid se tak účastní Haberově-Weissově reakce ( $\text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{HO}^{\cdot} + \text{HO}^-$ ) kombinující Fentonovu reakci s redukcí  $\text{Fe}^{3+}$  superoxidem ( $\text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^{\cdot-} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$ ) (Leonard *et al.*, 2004, Liochev a Fridovich, 2002).

Hydroxylový radikál je vysoce reaktivní molekula s poločasem ve vodném prostředí kratším, než 1 ns, takže pokud je produkován *in vivo*, reaguje velice blízko místu svého vzniku. Kromě výše zmíněného mechanismu může  $\text{HO}^{\cdot}$  vznikat z vody působením

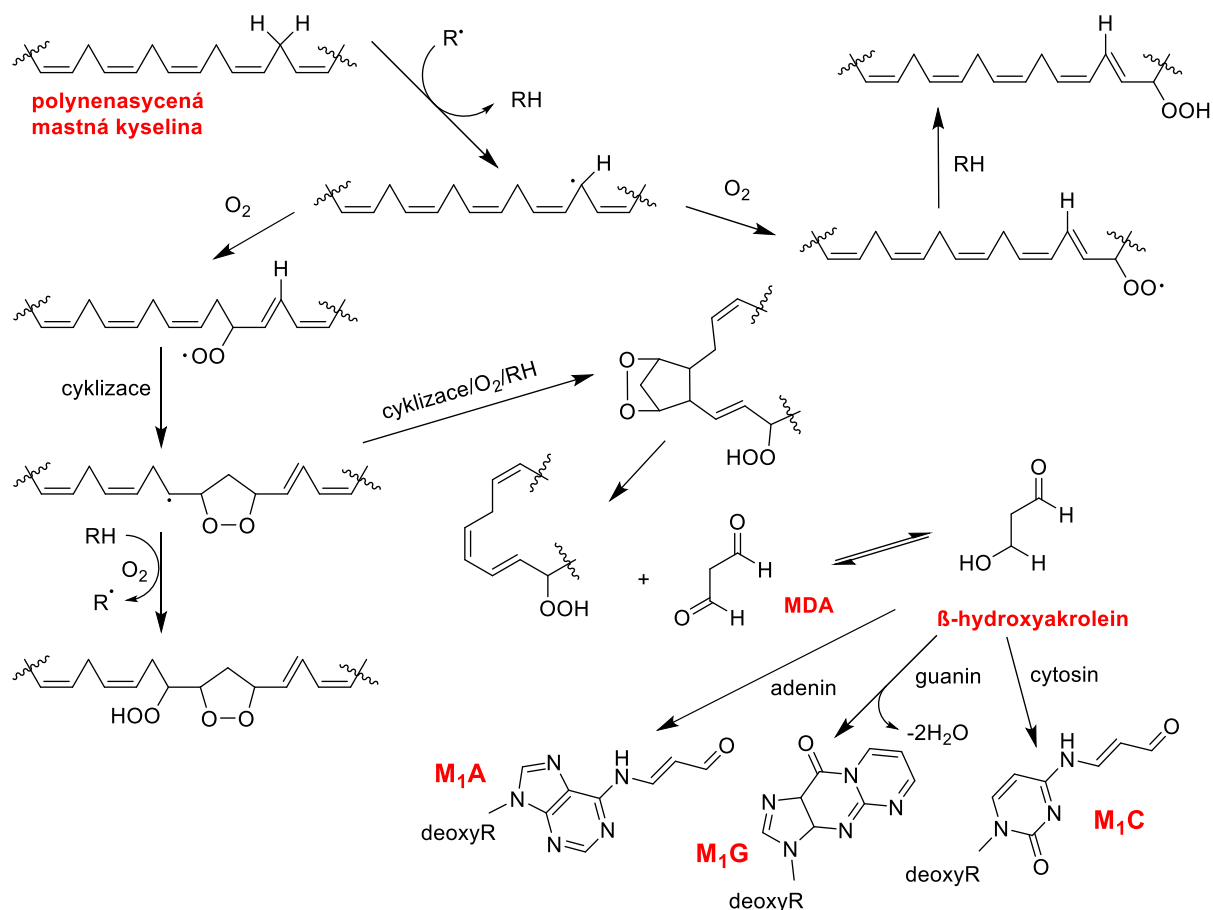
ionizačního záření, nebo fotolýzou alkylhydroperoxidů. Produkce HO· blízko DNA vede k reakcím s DNA bázemi a zlomům na řetězcích (Valko *et al.*, 2006).

### 2.3.1 Peroxidace lipidů

Polynenasycené mastné kyseliny ve fosfolipidech jsou extrémně citlivé k oxidaci.  $^1\text{O}_2$  reaguje s nenasycenými mastnými kyselinami za vzniku hydroperoxidů. Peroxidace lipidů způsobená  $^1\text{O}_2$  byla prokázána u hemolýzy erytrocytů, poškození kardiomyocytů a degeneraci buněčných membrán v celé řadě tkání (Devasagayam a Kamat, 2002).

Polynenasycené mastné kyseliny obsahují jednu nebo více methylenových skupin mezi dvěma *cis* dvojnými vazbami, a tato skupina je velice náchylná k oxidaci. Dochází k odtržení vodíku za tvorby uhlíkového radikálu, který pak dále reaguje s kyslíkem s následnou produkcí peroxylových radikálů (Obr. 11). Další reakce jsou pak závislé na poloze radikálu v řetězci mastné kyseliny. Pokud leží na konci systému dvojných vazeb, dochází k jeho redukci na hydroperoxid, který je relativně stabilní (při absenci přechodných kovů). Pokud je však peroxylový radikál umístěn uvnitř řetězce mastné kyseliny, dochází k cyklizaci s vedlejší dvojnou vazbou za tvorby cyklického peroxidu sousedícího s uhlíkovým radikálem. Tento radikál může buď reagovat s kyslíkem za tvorby peroxylového radikálu a následně hydroperoxidu, nebo může podstoupit druhou cyklizaci za tvorby bicyklického peroxidu, který může posloužit k tvorbě malondialdehydu (MDA, Obr. 11) (Marnett, 1999). Dalším hlavním produktem lipoperoxidace je 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) (Jomova a Valko, 2011).

Přestože je MDA hlavním produktem a je mutagenní u bakterií i savčích buněk a karcinogenní u potkanů i myší a HNE je jen slabě mutagenní, zdá se, že HNE je nejtoxictějším produktem peroxidace lipidů (Esterbauer *et al.*, 1990). HNE má navíc silný modulační efekt na buněčné signální dráhy (Valko *et al.*, 2006). MDA i HNE mají prokázanou spojitost s karcinogenezí skrze tvorbu aduktů s proteiny, fosfolipidy a zejména DNA (Marnett, 1999, Zhong a Yin, 2015).



Obr. 11 Zjednodušené schematické znázornění **peroxidace lipidů**. Výslednými produkty působení MDA jsou DNA adukty vzniklé tvorbou vazby s příslušnými nukleosidy (adenin, guanin a cytosin):  $M_1A$ ,  $M_1G$  a  $M_1C$ . Dle (Marnett, 1999, Valko *et al.*, 2006).

Celá řada studií prokázala zapojení  $^1O_2$  v peroxidaci lipidů vyvolané fotodynamickým účinkem fotosensitizerů. Jako příklady můžeme uvést účinek merocyaninu 540 na myší leukemické L1210 buňky (Geiger *et al.*, 1997) či *meso*-tetrakis[4-(karboxymethylenoxy)fenyl]porfyrinu na lipoperoxidaci izolovaných mitochondrií (Chatterjee *et al.*, 1999).

Lipoperoxidace má přímé i nepřímé důsledky. Normální nepoškozené buněčné membrány jsou selektivně propustné pouze pro některé látky. Tuto schopnost však membrány ztrácí díky peroxidaci lipidů, protože produkty těchto reakcí mění fyzikální vlastnosti biologických membrán – snižují fluiditu a zvyšují permeabilitu. Kromě fyzikálních změn také dochází k zesíťování mezi dvěma mastnými kyselinami a mezi mastnou kyselinou a jinou molekulou, např. proteinem, což také vede ke změně vlastností membrán a ztrátě na membrány vázaných enzymů (Devasagayam a Kamat, 2002).

## 2.3.2 Oxidace a peroxidace aminokyselin a proteinů

Vzhledem k tomu, že proteiny jsou v buňkách přítomny ve vysokých koncentracích v porovnání s ostatními buněčnými komponenty, dá se očekávat, že budou hlavním cílem pro  $^1\text{O}_2$ , který s nimi může reagovat dvěma hlavními cestami: fyzikálním zhášením a chemickými reakcemi. Většina reakcí  $^1\text{O}_2$  s proteiny se děje skrze chemickou cestu a vede k jejich modifikacím (Davies, 2003). Pouze tryptofan je schopný výrazného fyzikálního zhášení, protože konstanty jsou pro obě cesty srovnatelné. Jejich podíl na výsledném efektu je ale ovlivňován mnoha faktory okolního prostředí (Matheson *et al.*, 1975).

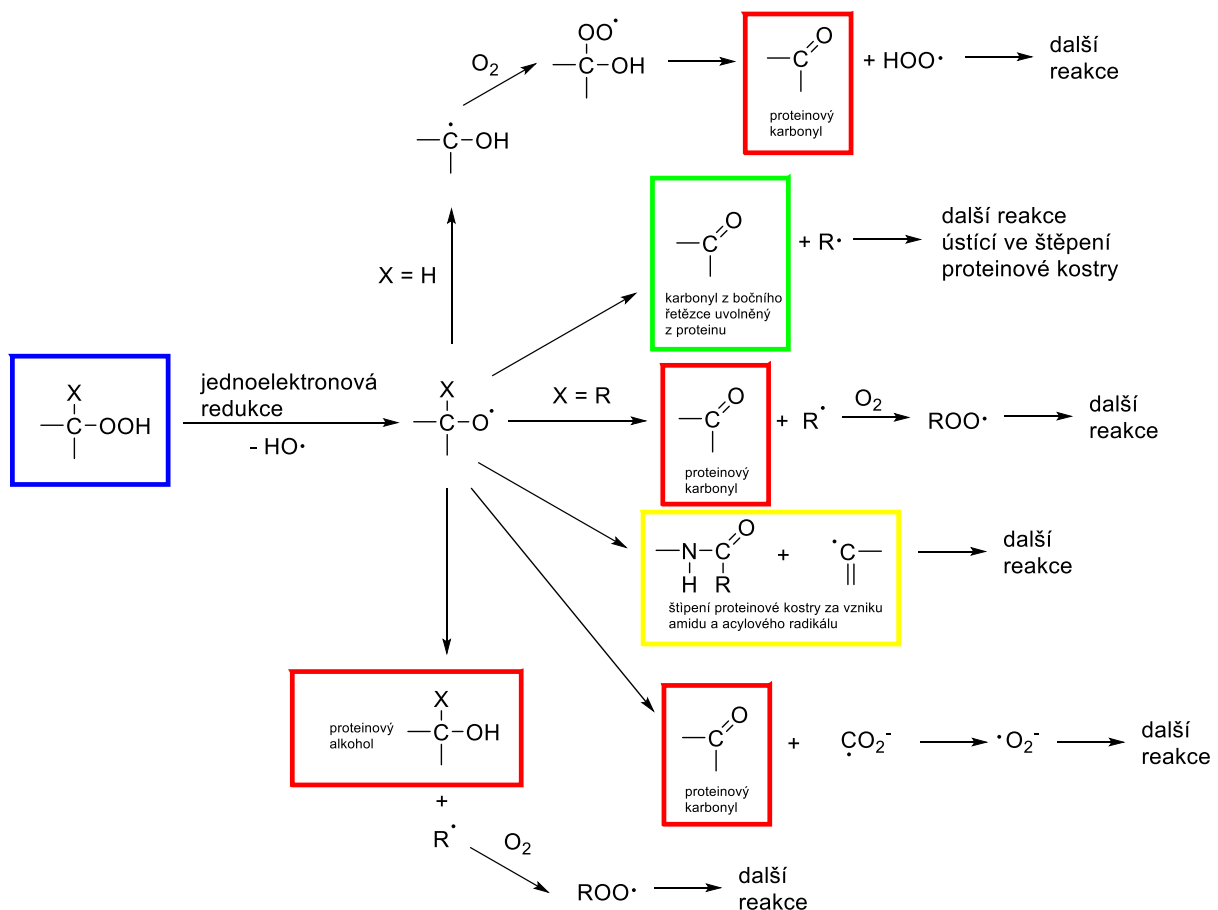
Vzhledem k tomu, že se v proteinech vyskytuje 20 běžných aminokyselin s různými bočními řetězci na proteinové kostře, může na proteinech vznikat velké množství různých radikálů. Jaké radikály vzniknou, záleží především na povaze reaktivní molekuly (radikálu) přistupující k proteinu. Elektrofilní radikály jsou *in vivo* mnohem běžnější než nukleofilní radikály. Tyto látky (např.  $\text{HO}\cdot$  a ostatní radikály odvozené od kyslíku, jako je např.  $\text{RO}\cdot$  a  $\text{ROO}\cdot$ ) oxidují přednostně místa bohatá na elektrony. Hlavní cestou je zde odtržení vodíkového atomu z C-H (v případě Cys S-H) vazeb. U aromatických aminokyselin pak převládá adiční reakce na bočním řetězci. Preferenčně jsou napadána místa vzdálená od deaktivující protonované aminové skupiny (tento efekt je eliminován inkorporací aminoskupiny do peptidové vazby). Tento účinek klesá se vzdáleností, takže u aminokyselin s dlouhým řetězcem (Val, Leu, Ile) je poškození orientováno spíše na vzdálená místa bočního řetězce. Dále je ovlivňováno množstvím C-H vazeb v řetězci (statistický faktor), stabilitou vznikajícího uhlíkového radikálu a případnou přítomností dalších stabilizujících/destabilizujících funkčních skupin. Odtržení vodíku tedy probíhá nejčastěji poblíž hydroxylové skupiny Ser a Thr. Na druhou stranu protonovaná aminoskupina Lys zamezuje napadnutí na uhlíku C-6 a tudíž odtržení vodíku probíhá spíše na uhlících C-4 a C-5 (Davies, 2016).

Hlavními iniciačními meziprodukty radikálového poškození aminokyselin a proteinů jsou uhlíkové radikály. Podobné radikály ale mohou vznikat skrze sekundární reakce, jako jsou např. přeskupení či fragmentace, alkoxylových, peroxylových, thiylových a dusíkových radikálů. V nepřítomnosti kyslíku dochází k dimerizaci a disproporcionaci uhlíkových radikálů. Tyto reakce jsou závislé na struktuře, ale dochází k nim většinou velmi rychle díky

nízkým energetickým bariérám (Dizdaroglu a Simic, 1983). Některé dimerizační produkty byly již charakterizovány (z radikálů pocházejících z aminokyselin a malých peptidů). U větších peptidů bylo pozorováno zesíťování; velké množství možných kombinací, permutací a stereoizomerů nicméně znesnadňuje analýzu těchto produktů. Uhlíkové radikály mohou také indukovat odtržení vodíku ze slabých X-H vazeb (např. z thiolů) především v prostředí s nízkou koncentrací kyslíku, jako jsou např. nádory. I přes celou řadu možných reakcí k odstranění uhlíkového radikálu, dochází nejčastěji k reakci s molekulárním kyslíkem za tvorby peroxylového radikálu. ROO· se opět může účastnit velkého množství reakcí (tvorba alkoholů a aldehydů/ketonů radikálovou terminační reakcí; tetroxidy z terciálních peroxylových radikálů, které se rozpadají za tvorby dvou alkoxylových radikálů a kyslíku; apod.). V biologických systémech jsou ale nejčastějším produktem hydroperoxydy (Davies, 2016). Z hydroperoxidů mohou vznikat alkoxylové radikály jedoelektronovou redukcí (Gilbert *et al.*, 1976), fotolýzou nebo termální homolýzou (Wright *et al.*, 2002). Primární i sekundární RO· z hydroperoxidů podstupují rychlé přesuny vodíků ve vodném prostředí za vzniku  $\alpha$ -hydroxalkylových radikálů (Obr. 12). Finálním produktem těchto reakcí jsou alkoholy (Gilbert *et al.*, 1976). Štěpení proteinové kostry není tak častým jevem, ale může k němu docházet např. rozkladem  $\alpha$ -uhlíkových hydroperoxidů (katalyzované kovy či UV zářením) za vzniku RO·, ze kterých pak dále vznikají karbonylové skupiny a sekundární acylové radikály (Davies, 2016).

Oxidace a peroxidace proteinů má celou řadu dopadů skrze jejich biofyzikální a biochemické změny. Prvním z nich je inhibice enzymové aktivity. Dobře je to ukázáno na enzymech obsahujících velké množství Cys, protože hydroperoxydy snadno reagují právě s nimi (Davies, 2016). Příkladem může být např. glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa, u které dochází k její rychlé inaktivaci celou řadou hydroperoxidů odvozených od aminokyselin a proteinů, což je způsobeno reakcí s jejími thiolovými skupinami (Morgan *et al.*, 2002). Aminokyselinové, peptidové a proteinové hydroperoxydy také mohou způsobovat poškození lipidů. Radikály vzniklé z těchto hydroperoxidů mohou hrát roli v iniciaci lipidové oxidace (Gebicki *et al.*, 2000). Podobně dochází i k poškození DNA, kde může vznikat např. zesíťování mezi DNA a proteinem či jednořetězcové zlomy (Gebicki a Gebicki, 1999, Luxford *et al.*, 2002). Zvýšená tvorba oxidačních produktů proteinů (případně i aminokyselin a peptidů) vede mj. také ke změnám v redoxním stavu buňky. Přítomnost peptidových hydroperoxidů navozuje ztrátu buněčných thiolů a GSH, která předchází ztrátě buněčné životaschopnosti (Rahmanto *et al.*, 2010). K tomuto výčtu změn patří také zvýšená náchylnost

oxidovaných proteinů k proteolýze a k jejich mechanickým změnám (např. u kolagenu), změny jejich konformace, změny v hydrofobitě, či vazbě kofaktorů a iontů kovů (Davies, 2003).



Obr. 12 Sekundární fragmentace, přeskupení a odtržení vodíkového atomu z alkoxylového radikálu ( $\text{RO}\cdot$ ) vzniklého z proteinových hydroperoxidů. Modře – rozklad hydroperoxidu na  $\text{RO}\cdot$  může vyústit ve tvorbu stabilního produktu (karbonylové sloučeniny a alkoholy – červeně), ztrátu bočního řetězce (zeleně), fragmentaci proteinové kostry (žlutě), ale také v tvorbu dalších reaktivních radikálů. Dle (Davies, 2016).

### 2.3.3 Oxidační poškození DNA

Reakce  $^1\text{O}_2$  (a dalších ROS) s DNA může vést k řetězcovým zlomům, tvorbě pozměněných bází, změnám na deoxyribózové kostře a zesíťování DNA. Jednořetězcová DNA je k poškození náchylnější než DNA dvouřetězcová a je známo více než 100 produktů oxidačního poškození DNA. Tyto změny mohou vést buď k zástavě, nebo indukci transkripce, indukci signálních drah, chybám v replikaci a genové nestabilitě. Toto vše může být spojeno s karcinogenezí (Devasagayam a Kamat, 2002, Valko *et al.*, 2006). Nejlépe prostudovaným oxidačním poškozením DNA bází je tvorba 8-hydroxyguaninu (8-OH-G). Tento produkt je důležitý, protože je snadno tvořen a hraje roli v mutagenezi a karcinogenezi. 8-OH-G se využívá jako biomarker oxidačního stresu (Li *et al.*, 2013) a je také využitelný jako potencionální biomarker karcinogeneze spojené s oxidačním stresem (Valavanidis *et al.*, 2009). V jaderné DNA je ~90 % oxidovaných bází opraveno jedno-nukleotidovým reparačním mechanismem a zbylých 10 % excizní reparací. Hlavní cestou opravy 8-OH-G je nukleotidová excizní reparace (Valko *et al.*, 2006).



## 2.4 BUNĚČNÁ SMRT

### 2.4.1 Programovaná buněčná smrt

Programovaná buněčná smrt (PCD) byla historicky brána jako synonymum apoptózy. Díky intenzivnímu výzkumu v oblasti buněčné smrti však dnes rozeznáváme celou řadu podtypů tohoto buněčného procesu, kde apoptóza hraje nejdůležitější roli a je také nejlépe prostudovaným typem PCD. V průběhu posledních desetiletí intenzivního studia PCD bylo z „apoptózy“ vyčleněno několik dalších nových modalit buněčné smrti. Docházelo k opětovnému spojování, dalšímu rozdělování, přejmenovávání apod. Dnes dle doporučení NCCD (Nomenclature Committee on Cell Death) rozeznáváme následující hlavní typy PCD (Galluzzi *et al.*, 2012):

- anoikis
- apoptóza – vnější cesta skrze receptory smrti
- apoptóza – vnější cesta skrze dependentní receptory
- apoptóza – vnitřní cesta závislá na kaspasách
- apoptóza – vnitřní cesta nezávislá na kaspasách
- autofagická buněčná smrt
- entóza
- kornifikace
- mitotická katastrofa
- nekroptóza
- NETóza
- parthanatos
- pyroptóza

Role PCD ve vývoji mnohobuněčných organismů byla poprvé pozorovaná u obojživelníků v polovině 19. století (Vogt, 1842). Později bylo zjištěno, že buněčná smrt se vyskytuje v celé řadě vyvíjejících se tkáních u bezobratlých i obratlovců (Clarke a Clarke, 1996). Původně byl pojem PCD použit k popisu buněčné smrti objevující se na předvídatelných místech a v předvídatelnou dobu během vývoje k zdůraznění, že buněčná

smrt je nějakým způsobem zakomponovaná do vývojového plánu organismu (Lockshin a Williams, 1964). Téměř dvacet let však trvalo, než bylo obecně přijato, že zvířecí buňky mají vrozenou schopnost PCD (Jacobson *et al.*, 1997), a to především díky genetickým studiím provedeným na háďátku *Caenorhabditis elegans*, které odhalily geny důležité pro buněčnou smrt a její kontrolu (Ellis a Horvitz, 1986). Bylo zjištěno, že některé z těchto genů jsou homologní se savčími geny (Yuan *et al.*, 1993). První dělení buněčné smrti rozlišovalo tři typy – buněčná smrt typu I (heterofagie), buněčná smrt typu II (autofagie) a buněčná smrt typu III, která nebyla asociovaná s žádným typem trávení – odpovídají apoptóze, autofagické buněčné smrti a nekróze (Schweichel a Merker, 1973, Galluzzi *et al.*, 2007). Pro PDT jsou důležité především apoptóza, autofagie a nekróza (Buytaert *et al.*, 2007). V poslední době je v kontextu PDT zaměřena pozornost také na mitotickou katastrofu (Rello-Varona *et al.*, 2008, Soares *et al.*, 2012).

## 2.4.2 Apoptóza

Termín apoptóza byl poprvé použit v roce 1972 – popisoval buněčnou smrt spojenou se specifickými morfologickými změnami. Dnes víme, že samotné morfologické změny nestačí k definování typu buněčné smrti. Přestože jsou některé tyto znaky pro apoptózu typické (smršťování buňky, membránový blebbing, kondenzace chromatinu apod.), můžeme je najít i u jiných modalit, a některé z nich i u jiných procesů, než je buněčná smrt. Určování buněčné smrti by se proto mělo opírat vždy o použití více metodik, které jsou ideálně navíc principiálně odlišné (Duprez *et al.*, 2009, Galluzzi *et al.*, 2009).

### 2.4.2.1 Vnitřní cesta apoptózy

Vnitřní cesta apoptózy je iniciovaná celou řadou podnětů – poškozením DNA, oxidačním poškozením, přetížením cytosolickým  $Ca^{2+}$ , mírná exitotoxicita, špatně složené proteiny v endoplazmatickém retikulu (ER) apod. a vždy působí skrze mitochondrie (Galluzzi *et al.*, 2012, Elmore, 2007). Tento proces je kontrolován proteiny z rodiny Bcl-2 (obsahují jednu nebo více domén BH1-4). Někteří pro-apoptotičtí členové Bcl-2 rodiny obsahující

pouze BH3 doménu (tzv. BH3-only proteiny; např. Bid, Bim, PUMA, Bad). Druhým typem pro-apoptotických Bcl-2 proteinů jsou multidoménové efektorové proteiny a patří sem Bax a Bak schopné tvořit póry ve vnější mitochondriální membráně. Na druhou stranu, antiapoptotické proteiny obsahují všechny BH domény (patří mezi ně např. Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> a Mcl-1) a inhibují aktivitu pro-apoptotických proteinů vazbou na ně a tudíž zabraňují aktivaci Bak a Bax (Green, 2011).

Posunutí rovnováhy ve prospěch pro-apoptotických proteinů vede k fenoménu známému jako permeabilizace vnější mitochondriální membrány (MOMP) (Green, 2011). MOMP může být důsledkem (ale podle některých studií i příčinou) zvýšení permeability vnitřní mitochondriální membrány díky otevření tzv. MPTP (mitochondriální permeabilní tranzitní pór), kterým mohou prostupovat molekuly o velikosti až 1500 Da, což vede ke zrušení kompartmentace mitochondrie – charakteristické ztrátou potenciálu vnitřní mitochondriální membrány ( $\Delta\Psi_m$ ) resp. přerušení tvorby ATP. Přesné složení proteinů účastnících se MPTP je v tuto chvíli stále ještě nejasné (Baines, 2009, Galluzzi *et al.*, 2012, Halestrap, 2009). Úplné přerušení tvorby ATP však vede buněčné smrti skrze nekrózu (Green, 2011). MOMP vede k uvolnění toxických proteinů z mezimembránového mitochondriálního prostoru do cytosolu – jde především o cytochrom c (CYTC), apoptózu indukující faktor (AIF), endonukleasu G (ENDO G), IAP přímo vážící protein s nízkým pI (DIABLO, známý také jako SMAC) a HTRA2.

V cytoplazmě tvoří CYTC a Apaf-1 za účasti dATP apoptosom, který je zodpovědný za aktivaci prokaspasy 9. Dimerizace prokaspasy 9 vede k tvorbě aktivní kaspasy 9, která štěpením aktivuje efektorové kaspasy (zejména 3 a 7). Aktivní kaspasy 3 a 7 jsou zodpovědné za charakteristické znaky exekuční fáze apoptózy – štěpení DNA na malé fragmenty, kondenzace chromatinu, ztráty  $\Delta\Psi_m$  a redistribuci fosfatidylserinu (Galluzzi *et al.*, 2012, Green, 2011), fosfolipidu běžně se vyskytujícího v eukaryotických membránách. Za fyziologických podmínek je vystaven na vnitřní straně cytoplazmatické membrány, což je zajišťováno ATP-dependentním enzymem flipasou. Během apoptózy je fosfatidylserin relokalizován z vnitřní stany cytoplazmatické membrány na vnější stranu pomocí enzymů známých jako skramblasy (Nagata *et al.*, 2016). Dále jsou AIF a ENDO G relokalizovány do jádra, kde zprostředkovávají fragmentaci DNA nezávislou na kaspasách (Jozá *et al.*, 2001, Li *et al.*, 2001) a SMAC spolu s HTRA2 inhibují anti-apoptotickou funkci celé řady proteinů z rodiny IAP (proteiny inhibující apoptózu) (Chai *et al.*, 2000, Srinivasula *et al.*, 2003).

Apoptóza zahrnuje celou řadu komplexních procesů, které mohou být do určité míry zvráceny či inhibovány. MOMP je nicméně obecně považován za tzv. „bod odkud není návratu“ – jakmile dojde k MOMP, tak buňka projde procesem apoptózy (či nekrózy) a zemře. Několik studií však naznačilo, že ne vždy je to pravda (Tait a Green, 2013).

#### 2.4.2.2 Vnější cesta apoptózy

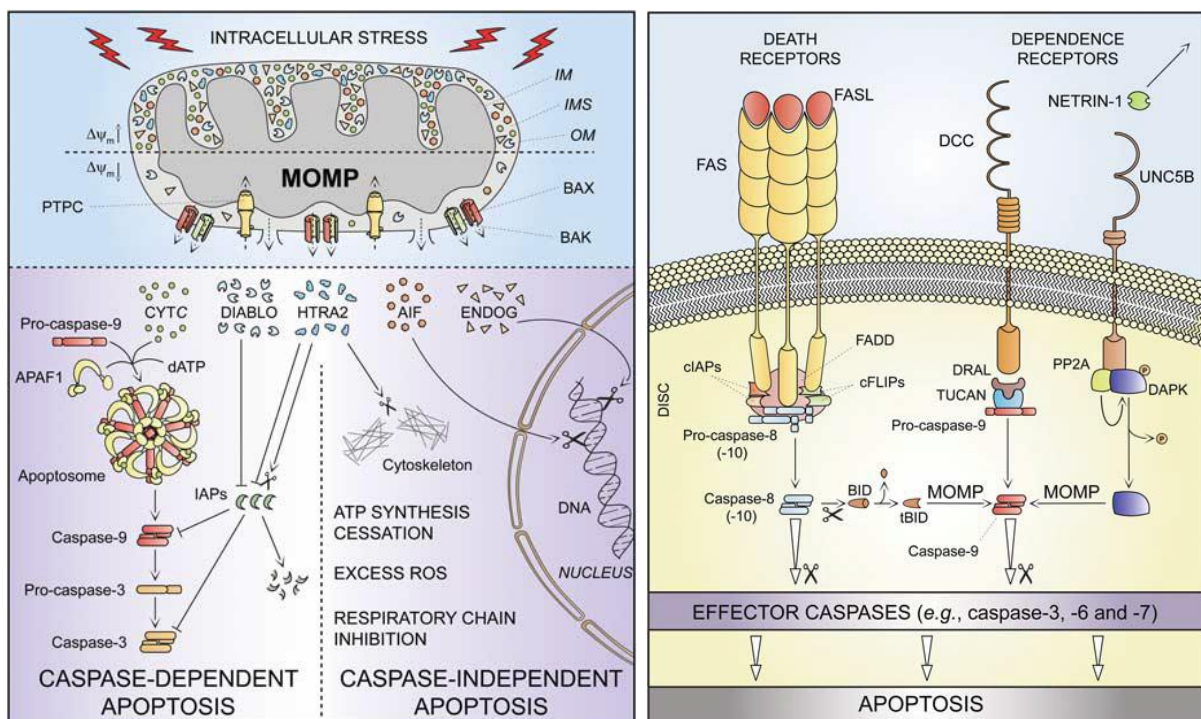
Vnější cesta apoptózy je zahájena extracelulárními stresovými signály vázajícími se na specifické transmembránové receptory. Takovými signály mohou být tzv. smrtící ligandy, jakými jsou např. FAS/CD95 ligand (FASL/CD95L), tumor nekrotizující faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), s TNF související apoptózu indukující ligand (TRAIL) vázající se na příslušné receptory (tzv. receptory smrti) – FAS/CD95, TNF $\alpha$  receptor 1 (TNFR1) a TRAIL receptor 1 a 2 (TRAILR1/2) (Duprez *et al.*, 2009, Galluzzi *et al.*, 2012). Vnější cesta apoptózy může také být iniciována nízkou koncentrací (pod kritickou mezí) specifických ligandů pro tzv. dependentní receptory (např. netrinové receptory UNC5 a DCC) (Goldschneider a Mehlen, 2010).

V nepřítomnosti FASL se FAS podjednotky spontánně skládají v plazmatické membráně za tvorby trimerů. Vazba ligandu tyto trimery stabilizuje a zároveň indukuje konformační změny, které dovolují složení dynamického multiproteinového komplexu na cytosolické části receptoru, což je možné díky tzv. doméně smrti (DD), která je společná pro všechny receptory smrti (Boldin *et al.*, 1995, Schulze-Osthoff *et al.*, 1998). Mezi proteiny asociující se s DD na FAS receptoru patří s receptorem interagující proteinkinasa 1 (RIPK1, známá také jako RIP1) (Festjens *et al.*, 2007), FAS-asociovaný protein obsahující DD (FADD) (Lee *et al.*, 2012), izoformy inhibičních proteinů buněčného FLICE (c-FLIP; FLICE = IL-1 $\beta$ -konvertující enzym podobný FADD) (Safa, 2012), buněčný IAP (cIAP), E3-ubikvitinligasy a prokaspasy 8 nebo 10. Výsledný supramolekulární komplex je zodpovědný za tvorbu aktivních forem kaspasy 8 a 10, a je také znám jako „signální komplex indukující smrt“ (DISC) (Galluzzi *et al.*, 2012).

Na rozdíl od FAS a TRAILR1/2 potřebuje TNFR1 pro asociaci s FADD a prokaspasou 8 také s TNFR asociovanou DD (TRADD). Agregace TNFR1 dále vede k tvorbě dvou komplexů. Komplex I se skládá z TNFR1, TRADD, s TNFR asociovaný faktor 2

(TRAF2), RIP1, cIAP1 a cIAP2 a je vytvářen na cytoplazmatické membráně. Endocytóza TNFR1 je následována tvorbou komplexu II který je analogem DISC a zahrnuje TRADD, FADD a prokaspasu 8 a/nebo 10. Aktivace prokaspasy 8 a 10 vede k aktivaci efektorových kaspas a exekční fáze apoptózy (Duprez *et al.*, 2009, Galluzzi *et al.*, 2012, Wang *et al.*, 2008).

Za zmínku stojí také fakt, že kaspasa 8 může štěpit protein Bid a zesilovat tak buněčnou smrt aktivací mitochondriální cesty apoptózy skrze jeho štěpný produkt tBid (Li *et al.*, 1998). Buňka tedy může získat vnější signál k zahájení apoptózy, který s mitochondriemi nesouvisí, a přesto vykazovat známky MOMP a tvorbu apoptosomu. Přesný podíl kaspas 8 a 10 na exekční fázi apoptózy tedy stále zůstává nejasný (Galluzzi *et al.*, 2012).



Obr. 13 Schematické znázornění vnitřní (vlevo) a vnější (vpravo) cesty apoptózy (Galluzzi *et al.*, 2012).

## 2.4.3 Autofagie

Pojem „autofagie“ (pochází z řečtiny a znamená „trávení sebe sama“) byl poprvé použit před téměř 50 lety, kdy Christian de Duve pozoroval degradaci mitochondrií a jiných intracelulárních struktur v lysosomech potkaních jater - zde byla indukována glukagonem (De Duve a Wattiaux, 1966, Deter a De Duve, 1967). Autofagie je dnes chápána jako fyziologický

katabolický proces s nezastupitelnou funkcí v udržování buněčné a tkáňové homeostázy díky schopnosti degradace proteinů a celých organel. V posledních letech se množství substrátů rozšířilo o lipidy – v tomto kontextu se často hovoří o tzv. lipofagii (Ward *et al.*, 2016). V tuto chvíli je známo 35 různých genů souvisejících s autofagií (Atg) objevených u kvasinek. Celá řada z nich je zachována i u savců, což také poukazuje na důležitost autofagického procesu (Mizushima *et al.*, 2011).

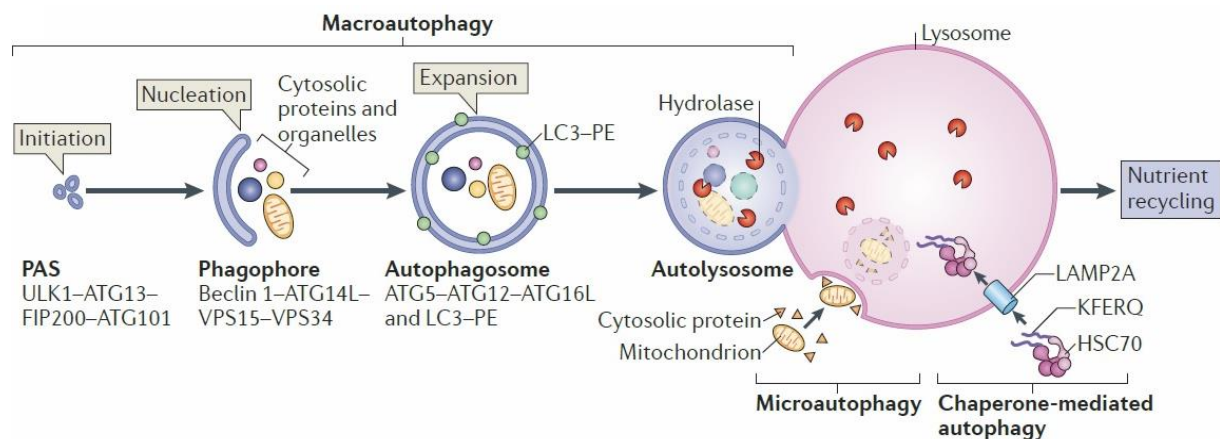
Autofagii můžeme rozdělit na tři typy – makroautofagii, mikroautofagii a autofagii zprostředkovanou chaperony. Během makroautofagie je velká část cytosolu dopravena autofagosomem do lyzozomu, se kterým splývá za tvorby autolyzozomu. Mikroautofagii rozumíme proces, kdy jsou cytosolické komponenty pohlceny lyzozomy přímo. V obou případech může jít o proces selektivní i neselektivní a je jím možné pohltnout velké struktury. V procesu autofagie zprostředkované chaperony jsou proteiny přeneseny skrze lyzozomální membránu jako komplex s chaperonovými proteiny (např. Hsp-70), které jsou rozeznávány lyzozomálním membránovým receptorem LAMP-2A (membránový protein asociovaný s lyzozomy 2A) (Duprez *et al.*, 2009, Glick *et al.*, 2010).

Hlavním bodem regulace autofagie je kinasa savčí cíl rapamycinu (mTOR), která tento proces inhibuje. V případě nedostatku živin či hypoxie je funkce mTOR potlačena a nastává aktivace komplexu ULK-Atg13-FIP200, což vede ke tvorbě autofagosomu. Tvorba autofagických vakuol vyžaduje krok nukleace, který je iniciován vytvořením PI3KC3 komplexu, kde Beclin-1 (Atg6) slouží jako základ pro vazbu PI3KC3 (jinak také Vps34) a také UVRAG, Bif-1 a Ambra-1, které slouží jako pozitivní regulátory aktivity PI3KC3 (Duprez *et al.*, 2009). Negativně na této úrovni mohou autofagii regulovat proteiny Rubicon a Bcl-2. Bcl-2 tedy hraje dvojí roli v procesu buněčné smrti/přežití. 1) inhibicí uvolnění CYTC blokuje apoptózu a funguje jako signál pro přežití a 2) interakcí s Beclin-1 inhibuje autofagii a může vést k neapoptotické buněčné smrti. Aktivní komplex PI3KC3 je pak schopen tvořit fosfatidyl inositol trifosfát (PI3P), který je důležitý pro prodlužování autofagosomu, a také pro asociaci dalších Atg proteinů na autofagosom (Glick *et al.*, 2010, Kaur a Debnath, 2015).

Pro autofagii jsou klíčové dva systémy podobné ubikvitinu působící v konjugaci Atg5-Atg12 a zpracování LC3 (Atg8). V prvním případě Atg7 aktivuje za přítomnosti ATP Atg12, která je pak přenesena na Atg10 potencující tvorbu kovalentní vazby Atg12 na Atg5. Konjugovaný Atg5-Atg12 se nekovalentně váže s dimery Atg16L za tvorby multimerního Atg5-Atg12-Atg16L komplexu, který se asociuje s prodlužujícím se autofagosomem. V druhém případě je během autofagie pomocí Atg4 štěpen LC3B (který je přítomen ve

většině buněk jako cytosolický protein) za vzniku LC3B-I. Aktivovaný LC3B-I je přenesen na Atg3 a následně konjugován s fosfatidylethanolaminem (PE) za tvorby LC3B-II (známý také jako LC3-PE). Integrace LC3B-II do rostoucího autofagosomu je závislá na Atg5-Atg12 a můžeme jej nalézt na vnitřní i vnější straně membrány autofagosomu. Zároveň přítomnost LC3B-II je důležitá pro tvorbu Atg5-Atg12-Atg16L komplexu, protože deficit v LC3B-II vede k dramatickému snížení konjugace Atg5 a Atg12. V posledním kroku dochází k fúzi autofagosomu s lyzozomem za tvorby autolyzozomu (Burman a Ktistakis, 2010, Duprez *et al.*, 2009, Glick *et al.*, 2010, Kaur a Debnath, 2015). Důležitou roli v tomto procesu hraje Rab7 (Gutierrez *et al.*, 2004), Lamp-1, Lamp-2 (Eskelinen, 2006), cytoskelet (Monastyrska *et al.*, 2009) a pravděpodobně i další proteiny.

Stále však zůstává otázka, kterou je třeba mít na mysli při hodnocení autofagické buněčné smrti. Je autofagická aktivita během buněčné smrti příčinou, nebo jde o záchranný mechanismus, resp. jde o buněčnou smrt spojenou s autofagií, nebo o buněčnou smrt autofagií (Tsujimoto a Shimizu, 2005)? Na základě doporučení NCCD by neměla být autofagická buněčná smrt klasifikována jako modalita buněčné smrti vykazující známky autofagie (např. lipidace Atg8 nebo zvýšenou degradaci autofagických substrátů jako je SQSTM1) pokud nemůže být blokována inhibitory autofagie (Galluzzi *et al.*, 2012).



Obr. 14 Schematické znázornění průběhu autofagie (Kaur a Debnath, 2015).

## 2.4.4 Mitotická katastrofa

Poprvé byl tento jev popsán v roce 1984 jako „mikrotubulová katastrofa“ (McIntosh, 1984), ale pojem mitotická katastrofa (MC) byl použit až po dvou letech k popsání fenotypu kvasinek, u kterých nebyl zastaven buněčný cyklus, a vešly předčasně do mitózy, kterou nebyly schopné efektivně dokončit (Russell a Nurse, 1986). MC je dnes vztahována na buněčnou smrt způsobenou abnormální mitózou a realizována buď během mitózy, nebo v následné interfázi. Někteří autoři ji také klasifikovali jako speciální typ apoptózy, protože s ní sdílí celou řadu biochemických znaků (aktivace kaspas a MOMP). Stejně tak je stále nejasné, zda je MC způsob buněčné smrti, nebo zda jen o proces vedoucí k buněčné smrti apoptózou či nekrózou (Galluzzi *et al.*, 2012, Vakifahmetoglu *et al.*, 2008).

MC pravděpodobně netvoří exekuční mechanismus buněčné smrti, ale onkosupresivní cestu předcházející a odlišující se, a přesto pracující skrze buněčnou smrt a senescenci. Po abnormální mitóze vykazují buňky výrazné jaderné změny (mikro- a multinukleace), které byly často brány jako morfologické znaky MC. Vyskytovat se však mohou i během nekrózy a apoptózy. Deplece pro-apoptotických proteinů (např. Bax) snižuje pravděpodobnost buněčné smrti skrze MC, a působí tedy potenciálně onkogenní polyploidii (Galluzzi *et al.*, 2012, Vitale *et al.*, 2011).

Doposud byly popsány tři způsoby MC: 1) Během mitotické smrti vyústí mitotická porucha v aktivaci buněčné smrti v přítomnosti zvýšené hladiny cyklinu B1 (neukončená mitóza). 2) MC může spustit letální dráhu, která není vykonána, dokud buňka nevstoupí do interfáze v dalším cyklu. V tomto případě se může buněčná smrt objevit krátce po ukončení mitózy. 3) V některých případech nedochází k buněčné smrti, ale k buněčné senescenci (nevratná zástava buněčného cyklu zabraňující amplifikaci genomicky nestabilních buněk).

Přesné molekulární mechanismy, které stojí především za regulací MC, jsou stále nejasné a předmětem intenzivního studia. Mechanismy manifestace a průběhu procesů předcházejících (kontrolní body a senzory mitotického selhání) a následujících po MC (apoptóza, nekróza, senescence) jsou již popsány relativně dobře (Vitale *et al.*, 2011). Fosforylace kaspas 2 a 9 komplexem cyklin-dependentní kinasy 1 (Cdk1) a cyklinu B1 (Ck1) zabraňuje apoptóze během mitózy (Andersen *et al.*, 2009, Allan a Clarke, 2007). Kinetika aktivace kaspas a degradace Ck1, která je během zástavy mitózy opožděná, může



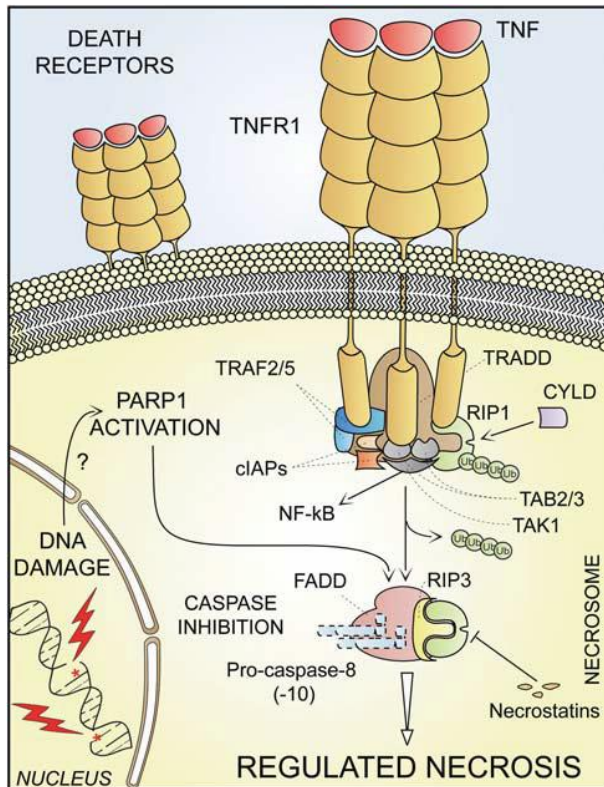
alespoň částečně vysvětlit rozdíly v odpovědi nádorových buněk na induktory MC (Gascoigne a Taylor, 2008). Na druhou stranu může sama MC vést k na kaspasach nezávislé apoptóze (Mansilla *et al.*, 2006). MC může také být zprostředkovaná p53, neboť p53<sup>-/-</sup> buňky podstupují polyploidizaci v odpovědi na induktory MC mnohem snáze než buňky s funkčním p53 (Senovilla *et al.*, 2009). Absence p53 navíc dovoluje dělení tetraploidních buněk za vzniku buněk aneuploidních (genomicky nestabilních) a tudíž potencionálně tumorigenních dceřiných buněk (Vitale *et al.*, 2010).

Jedním z nejnápadnějších morfologických projevů MC je tvorba obrovských buněk s jadernými abnormalitami. Poprvé byl tento jev pozorován u buněk ozářených vysokou dávkou radiace, kdy objem některých buněk vzrostl až 200 krát oproti objemu normálních buněk. Původně byl tento jev vysvětlován několika mechanismy – buď fúzí dceřiných buněk po buněčném dělení, nebo abnormálním buněčným dělením popř. kombinací obou. Přestože endopolyploidie může být hlavním mechanismem tvorby obrovských buněk, zdá se, že hlavní příčinou je odpražení DNA syntézy od buněčného dělení (Vakifahmetoglu *et al.*, 2008).

## 2.4.5 Nekróza a nekroptóza

V klasickém pojetí je nekróza brána jako proces nekontrolované formy buněčné smrti zaviněný nespecifickým a závažným buněčným poškozením, což může být pravda u buněčné smrti vycházející z rozsáhlého fyzikálně-chemického poškození (např. hypertermie a cytolýza způsobená detergenty) (Alvarez *et al.*, 2010). Bylo však prokázáno že ne ani tak typ stimulu, jako spíš jeho závažnost hraje hlavní roli v tom, zda buňka projde apoptotickou nebo nekrotickou buněčnou smrtí (Bonfoco *et al.*, 1995). Nekróza je z morfologického hlediska charakterizovaná zvětšováním objemu buněk, nevratným poškozením cytoplazmatické membrány a destrukcí organel. Lýza buněk vede k uvolnění buněčného obsahu do extracelulárního prostoru, kde funguje jako stimulace buněk imunitního systému vedoucí k zánětlivé reakci (Festjens *et al.*, 2007, Proskuryakov *et al.*, 2003). V posledních letech se ukázalo, že i nekróza může být regulována signálními drahami obdobně jako např. apoptóza. Výskyt apoptotických i nekrotických znaků během buněčné smrti nalézajících se zároveň ve stejné buňce vedl ke vzniku pojmu „aponekróza“, jako nového typu buněčné smrti (Formigli *et al.*, 2000). Dnes se však přiklání spíše k používání pojmu

„regulovaná/programovaná nekroza“ (Galluzzi *et al.*, 2012), který byl poprvé použit již před třinácti lety (Chan *et al.*, 2003).



Obr. 15 Schematické znázornění signalizace v buněčné smrti formou regulované nekrozy (Galluzzi *et al.*, 2012).

Relativně nedávno došlo k zavedení nového pojmu „nekroptóza“ – jde o typ regulované/programované nekrozy, který je závislý na aktivitě RIP1 (Galluzzi a Kroemer, 2008). V případě, že jsou kaspasy (zejm. kaspasa 8) inhibovány (genetická manipulace, farmakologický zásah), nedochází k degradaci RIP1 (a jeho homologu RIP3) proteolytickým štěpením a dochází k exekuci nekrotické buněčné smrti (Vandenabeele *et al.*, 2010). Nekroptóza je indukována celou řadou různých buněčných podnětů – patří sem TNF $\alpha$ , FASL, TRAIL, dvoušroubovicová RNA, interferon- $\gamma$ , deplece ATP, ischemicko-reperfúzní poškození a patogeny. U hodnocení nekroptózy je potřeba si také uvědomit, že tento typ buněčné smrti nezahrnuje žádný unikátní biochemický znak, ale *in vitro* je charakteristický porušením plazmatické membrány a absencí apoptotických znaků, především aktivitou kaspas a kondenzací chromatinu. Stejně tak aktivita RIP1 může být zaznamenána během apoptózy, zvláště pak, pokud dojde k inhibici nebo depleci cIAP, což vede ke tvorbě komplexu ripoptosomu FADD-RIP1-kaspasa-8. Na rozdíl od apoptózy, nekroptóza indukovaná TNF- $\alpha$

vyžaduje inhibici kaspasy 8 a tvorbu komplexu RIP1-RIP3 I**b**, který je také znám pod pojmem nekrosom. Asociace RIP1 a RIP3 probíhá skrze homotypické interakční domény a je následována vzájemnou fosforylací. Co přesně určuje přechod mezi komplexem IIa (vnější cesta apoptózy) na II**b** stále není známo, ale tento přechod vyžaduje aktivitu enzymu CYLD. V tomto procesu se dále uplatňuje NAD-dependentní deacetylasa SIRT2, mitochondriální fosfatasa 5 a MLKL (z angl. mixed lineage kinase like protein) (Christofferson a Yuan, 2010, Galluzzi *et al.*, 2012, Kaczmarek *et al.*, 2013). Dle dnešního stavu poznání se má za to, že přirozeně se vyskytující nekroptóza je pozorována pouze u infekčních onemocnění (Kaczmarek *et al.*, 2013).

## 2.4.6 Buněčná smrt v kontextu fotodynamické terapie

Během fotodynamického zásahu dochází k přímému a nevratnému poškození subcelulárních komponent (plazmatická membrána, mitochondrie, lyzosomy, Golgiho systém, ER), což vede ke zničení nádorové buňky. Na rozdíl od konvenční chemoterapie či radioterapie, při PDT nedochází k přímému poškození DNA působením léčiva, protože většina PS se (až na výjimky (Yu *et al.*, 2016)) nelokalizuje do jádra. Možnost vzniku mutací vedoucích k nechtěné sekundární karcinogenezi je tedy minimální (Oleinick *et al.*, 2002). Jak již bylo zmíněno, přímé poškození působením PDT je omezeno lokalizací PS. Během ozařovacího procesu se však mohou některé PS relokalizovat na jiná místa v buňce a působit tak další sekundární poškození mimo primární místo účinku (Alvarez *et al.*, 2011, Kessel, 2002, Kessel *et al.*, 2005b). Místo zásahu vytvořených ROS je jeden z hlavních faktorů předurčujících způsob buněčné smrti. Obecně je přijímáno (Buytaert *et al.*, 2007, Benov, 2015), že lokalizace PS v mitochondriích (Noodt *et al.*, 1998, Kessel *et al.*, 1997), Golgiho systému a ER (Teiten *et al.*, 2003, Ke *et al.*, 2008) vede k apoptóze po ozáření, zatímco PS nalézající se v lyzosomech (Machacek *et al.*, 2015) nebo cytoplazmatické membráně (Dellinger, 1996, Aveline a Redmond, 1999, Kim *et al.*, 2014) způsobuje spíše nekrózu. Na druhou stranu, toto neplatí vždy – apoptózu mohou vyvolat i PS vázané na plazmatickou membránu (Lin *et al.*, 2000), nebo lokalizované v lyzosomech (Woodburn *et al.*, 1997, Jiang *et al.*, 2011). Subcelulární lokalizace tedy není jediným faktorem určující způsob buněčné smrti během PDT. Důležitou roli v procesu buněčné smrti v důsledku PDT hraje typ ovlivněné buňky, dávka světla, typ PS a délka inkubace s PS (Oleinick *et al.*, 2002). Posun

z apoptózy k nekróze s použitím stejného PS lze snadno dosáhnout zvýšením PDT dávky (koncentrace PS a/nebo dávky světla), což má za následek masivní tvorbu ROS vedoucí okamžitě k bioenergetické katastrofě, rychlému poklesu koncentrace ATP a celkové metabolické inhibici (Buytaert *et al.*, 2007).

Nejlépe prozkoumaným typem buněčné smrti je apoptóza – to platí i u PDT, kde byla poprvé popsána před pětadvaceti lety (Agarwal *et al.*, 1991). PS lokalizované v mitochondriích způsobují apoptózu skrze aktivaci specifických signálních drah. Krátce po ozáření dochází k uvolnění CYTC do cytoplazmy z poškozených mitochondrií, což je doprovázeno rychlým poklesem  $\Delta\Psi_m$ . Depolarizace membrány je pravděpodobně důsledkem otevření MPTP. Důležitým spouštěčem uvolnění CYTC v důsledku PDT může být zvýšení hladiny  $Ca^{2+}$  v cytoplazmě (Moor, 2000, Almeida *et al.*, 2004), protože ROS spolu s mitochondriálním  $Ca^{2+}$  přetížením hrají důležitou roli v permeabilizaci mitochondriální membrány (Tajeddine, 2016). Efekt fotodynamického procesu na mitochondrie byl intenzivně studován na izolovaných mitochondriích i celých buňkách. Roli MPTP v mitochondriální apoptóze v důsledku PDT podporuje několik faktů. Předpokládané komponenty MPTP jsou náchylné k fotooxidaci a některé PS mají afinitu k proteinům mitochondriálních membrány s doloženou nebo předpokládanou funkcí v MPTP. Farmakologická inhibice MPTP vede zároveň k inhibici uvolnění CYTC do cytoplazmy a redukcii fotocytotoxicity. (Belzacq *et al.*, 2001, Costantini *et al.*, 2000, Furre *et al.*, 2005, Lam *et al.*, 2001).

Jak již bylo zmíněno výše, proteiny z rodiny Bcl-2 hrají důležitou roli v procesu apoptózy. Pro-apoptotický protein Bid může představovat klíčový signál v aktivaci jiných proteinů z Bcl-2 rodiny – Bax a Bak. Kaspasa 8 štěpí Bid, ale stejnou funkci plní i katepsiny uvolněné do cytosolu z poškozených lyzosomů, což může být relevantní v případě PS lokalizovaných v endo-lyzosomálním kompartmentu (Cirman *et al.*, 2004). Tato cesta aktivace apoptózy byla demonstrována např. fotoaktivací takto lokalizovaného NPe6 na buněčné linii 1c1c7 (Reiners *et al.*, 2002). Apoptózu indukovanou tímto způsobem na HeLa buňkách s použitím porfyrinového PS nesoucího označení ATX-S10 bylo možné inhibovat použitím specifických inhibitorů katepsinů B a D (Ichinose *et al.*, 2006). Lyzosomálně vázané PS však mohou proces apoptózy oslabovat skrze uvolnění katepsinů a štěpení prokaspasy 3 (Kessel a Luo, 2001). PDT poškození lyzosomů může tedy vést k indukci i inhibici apoptózy.

Zvýšené hladiny anti-apoptotického proteinu Bcl-2 mohou způsobovat rezistenci nádorových buněk ke klasickým chemoterapeutikům a radiační léčbě (Adams a Cory, 2007). Role Bcl-2 v PDT však není jednoznačná. Byla pozorována částečná protekce před

PDT-indukovanou apoptózou u buněk zvýšeně exprimujících Bcl-2, ale v jiných případech vyšší hladiny Bcl-2 zvýšily účinnost fotopoškození (Buytaert *et al.*, 2007, Oleinick *et al.*, 2002). Dnes je známá celá řada PS, jejichž cílem je po ozáření Bcl-2 a v důsledku působení PDT dochází k jeho poškození – patří sem např. SnET2, Pc 4, 9-kapronyloxytetrakis-(methoxyethyl)porfycen nebo temoporfin. Bcl-2 byl cílen v obou svých lokalizacích – tj. jak na mitochondriích, tak v ER (Kessel a Castelli, 2001, Kessel *et al.*, 2005a). Fotopoškození Bcl-2 a Bcl-xL fotodynamickým působením Pc 4 vychází z okamžitého, na světle a ROS závislého procesu způsobujícího zesíťování proteinů. Tento proces vyžaduje přítomnost Bcl-2 a Bcl-xL v membránách a je nezávislý na působení kaspas a jiných proteolytických signálů. Ostatní proteiny vnější mitochondriální membrány (např. Bak či VDAC) a cytosolický Bax zůstávají neovlivněné. Důležitým faktorem je vzdálenost mezi cílem a PS, což bylo potvrzeno FRET analýzou (Usuda *et al.*, 2003, Xue *et al.*, 2003, Morris *et al.*, 2003).

Rozpor mezi autory vyvstává v názoru na to, zda je výhodnější, pokud PS způsobuje po PDT nekrotickou či apoptotickou buněčnou smrt nádorových buněk. Některé studie naznačují, že stimulace imunitního systému v důsledku nekrózy přispívá k eradikaci nádoru, zatímco jiné zase upřednostňují apoptózu, především pak v místech, kde je nežádoucí otok tkáně (především nádory v oblasti hlavy) (Abrahamse a Hamblin, 2016).

Kromě apoptózy a nekrózy hraje v buněčné smrti po PDT potenciální roli i autofagie. V savčích buňkách představuje autofago-lyzomální systém hlavní proteolytický systém mající za úkol odstraňování organel poškozených ROS a nevratně oxidovaných cytosolických proteinů (Scherz-Shouval a Elazar, 2007). Role autofagie v PDT-indukované buněčné smrti stále není plně objasněná, a navíc stále zůstává otázka, zda je autofagie procesem důležitým pro přežití, nebo naopak potencujícím buněčnou smrt nádorových buněk. Cytoprotektivní role autofagie v PDT byla demonstrována s PS lokalizovaným v ER – hypericinem, který indukuje přímé oxidativní poškození SERCA2 pumpy (její inhibice indukuje autofagii). Pokud zde dojde k vyřazení funkce Atg5 (siRNA způsobený knockout) nebo farmakologické inhibici autofagie pomocí 3-methyladeninu, dochází k nárůstu cytotoxického efektu PDT. Celá řada studií se však spíše přiklání k opačné funkci autofagie v důsledku PDT (Reiners *et al.*, 2010). Jako příklad může sloužit inhibice buněčné smrti v důsledku inhibice autofagie indukované PDT za použití hypericinu u *Bax<sup>-/-</sup>Bak<sup>-/-</sup>* knockout myších embryonálních fibroblastů (Buytaert *et al.*, 2006). Známým způsobem indukce autofagie je farmakologická inhibice mTOR. V podmínkách *in vitro* na buněčných kulturách, ale také *in vivo* na nádorových xenograftech, bylo zjištěno, že amfifilní PS lokalizující se primárně v ER má jako přímý cíl

právě mTOR signální dráhu (Weyergang *et al.*, 2009). Ne všechny proteiny účastníci se autofagie jsou cílem PDT. Experimenty s vysokou dávkou PDT za použití BpD na L1210 buňkách neprokázaly signifikantní fotopoškození proteinů Beclin1, Atg5 ani Atg7. Tento PS se akumuluje primárně v mitochondriích a ne v lyzosomech. Obdobných výsledků bylo dosaženo za použití hypericinu a HeLa buněk (Reiners *et al.*, 2010).

Lyzosomy a endosomy jsou cílem působení celé řady PS, používaných v PDT protokolech. Některé z těchto látek se lokalizují v membránách organel, zatímco jiné nalezneme koncentrované v matrix těchto organel (Reiners *et al.*, 2010). Ozáření buněk obsahujících sulfonovaný tetrafenylporfin 4 (TPPS<sub>4</sub>; lokalizuje se v matrix) vede k fotooxidaci komponent matrix, včetně hydrolytických enzymů. V důsledku poškození membrán dochází k vylití obsahu do cytoplazmy. V tomto případě jsou však touto dobou lyzosomální enzymy inaktivované, a TPPS<sub>4</sub> tak působí selektivní destrukci endosomů a lyzosomů bez dalšího poškození ostatních organel (Berg a Moan, 1994). NPe6 a sulfonovaný tetrafenylporfin 2a jsou amfifilní PS vážící se na endosomální a lyzosomální membrány. Pokud dojde k ozáření, dochází k poškození membrán těchto organel, ty se stávají permeabilní a obsah organel se dostává do cytoplazmy, aniž by byl inaktivován. Pokud nejsou uvolněné proteasy inaktivovány endogenními inhibitory, dochází ke štěpení Bid katepsiny a indukci mitochondriální apoptotické dráhy (Reiners *et al.*, 2002).

Vzhledem k tomu, že jsou lyzosomy nezastupitelnou součástí autofagického procesu, nabízí se myšlenka, že fotopoškození lyzosomů (ať už membrány nebo enzymatického obsahu) má za následek narušení autofagie. Experimentální modely ukázaly, že tvorba autofagosomů se může objevit i v případě, kdy byly pozdní endosomy a lyzosomy zničeny účinkem PDT. Dokončení autofagického procesu je ale pravděpodobně narušeno, protože nejsou přítomny žádné lyzosomy, se kterými by mohly autofagosomy fúzovat a nemůže dojít k degradaci obsahu autofagosomů (Reiners *et al.*, 2010).

V *in vitro* podmínkách byl popsán tzv. „efekt přihlížejícího“, kdy buňky po ozáření neumírají náhodně a jednotlivě, ale spíše ve skupinách, což má za následek tvorbu míst, kde všechny buňky umírají, nebo naopak nejsou vůbec ovlivněny. Tento efekt se ukázal být výraznější, pokud šlo o nekrotickou buněčnou smrt – to je pravděpodobně dáno výraznějším uvolňováním cytotoxických látek skrze poškozené membrány do extracelulárního prostoru. U apoptózy pak hraje roli i míra konfluence. Čím vyšší konfluence, tím vyšší je míra mezibuněčných kontaktů – to má za následek vyšší citlivost k buněčné smrti. Jako možný mechanismus byla navržena komunikace skrze nexy (gap-junctions). Tato domněnka však

byla popřena ovlivněním buněčné kultury inhibítorem nexů (dielidrinem), kdy nedošlo k omezení „efektu přihlížejícího“ (Dahle *et al.*, 1997, Dahle *et al.*, 1999, Dahle *et al.*, 2000). Tento efekt tedy zůstává na molekulární úrovni stále nevysvětlen. Jako další možný mechanismus se nabízí vazba FAS (vázaného na membráně jedné buňky) na FASL buňky sousední. „Efekt přihlížejícího“ poukazuje na důležitý fakt, tedy že inaktivace nádorových buněk neprobíhá pouze přímým poškozením v důsledku PDT, ale důležitou roli také hraje komunikace mezi buňkami během tohoto procesu (Oleinick *et al.*, 2002).

### 3 CÍLE PRÁCE



- Stanovení fotodynamické aktivity nových fotosensitizerů ze skupiny ftalocyaninů a jejich dusíkatých izosterů (tetrapiryridoporfyrasinů a tetrapyrasinoporfyrasinů) po expozici aktivujícím záření. Stanovení toxicity těchto látek v absenci jakéhokoli světelného záření *in vitro* na lidské nádorové linii karcinomu děložního čípku (HeLa). U vybraných látek stanovit tyto toxicity i na dalších nádorových a nenádorových liniích.
- U vybraných látek určit závislost délky ozařování na schopnosti ničit nádorové buňky.
- Určení lokalizace fotosensitizerů v buňkách (primární cíl po ozáření) pomocí fluorescenčních sond či fluorescenčně značených proteinů specifických pro jednotlivé buněčné organely metodou epifluorescenční a/nebo konfokální mikroskopie.
- U vybraných látek stanovit rychlost prostupu (časový profil) do buněk.
- Stanovit časový profil vzniku reaktivních forem kyslíku a dusíku před, během a po ukončení ozařovacího procesu.
- Metodami světelné, fluorescenční a konfokální mikroskopie charakterizovat změny v buněčné morfologii a morfologii vybraných buněčných struktur.
- Stanovit typ buněčné smrti vyvolaný fotodynamickým působením vybraných účinných fotosensitizerů.
- U anionických derivátů se pokusit objasnit příčinu nižších aktivit těchto látek oproti derivátům nesoucím kationické skupiny.
- Porovnat vlastnosti studovaných látek mezi sebou a pokusit se objasnit vliv struktury na fotodynamickou účinnost. Porovnat nové fotosensitizery s některými z klinicky používaných látek.

## 4 KOMENTÁŘE K PRACÍM

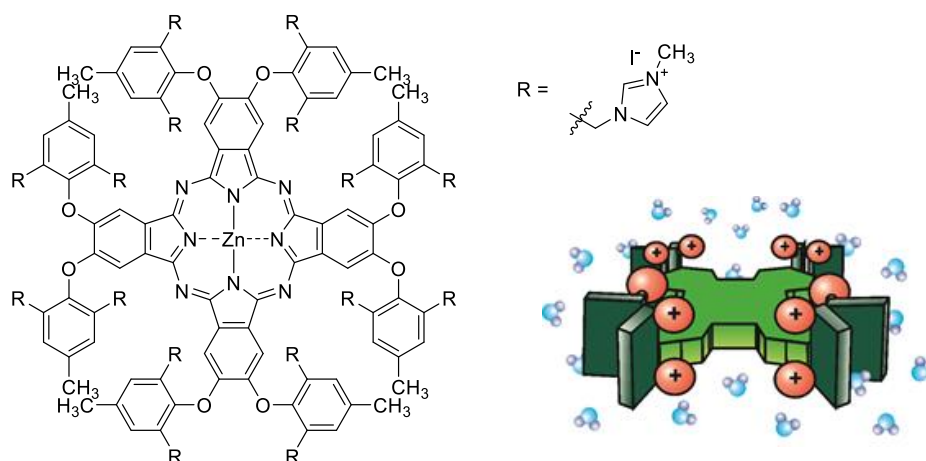
Tato disertační práce je předkládána jako komentovaný soubor pěti prací. Čtyři práce byly publikovány v mezinárodních impaktovaných časopisech a jedna práce je předložena ve formě rukopisu v pokročilé fázi recenzního řízení. Všechny publikace jsou původní experimentální práce zaměřené na syntézu a možnosti využití originálních fotosensitizerů na bázi ftalocyaninů a jejich dusíkatých izosterů, azaftalocyaninů, ve fotodynamické terapii nádorových onemocnění.

## 4.1 SYNTÉZA, CHARAKTERIZACE A ZÁKLADNÍ *IN VITRO* HODNOCENÍ NEAGREGUJÍCÍHO KATIONICKÉHO FTALOCYANINOVÉHO FOTOSENSITIZÉRU

Makhseed S, Macháček M, Alfadly W, Tuhl A, Vinodh V, Šimůnek T, Nováková V, Kubat P, Rudolf E a Zimčík P. Water-soluble non-aggregating zinc phthalocyanine and in vitro studies for photodynamic therapy. *Chemical Communications*. 2013; 49(95): 11149-51.

Pc jsou důležitou skupinou látek vhodných pro PDT především nádorových onemocnění. Díky silné absorpci Q pásu v oblasti viditelného záření při vysokých vlnových délkách (červená oblast viditelného záření) jde o látky potenciálně použitelné u léčby i hlouběji položených nádorů (Josefsen a Boyle, 2008a). Nevýhodou Pc, i přesto, že jsou vhodně substituovány hydrofilními skupinami, je jejich tendence ke tvorbě agregátů a ztrátě fotodynamické aktivity a to zejména ve vodném prostředí (Darwent *et al.*, 1982). Pc a AzaPc jsou ve vědecké skupině doc. Zimčíka na Farmaceutické Fakultě UK v Hradci Králové studovány a vyvíjeny již delší dobu a ve spolupráci s kolegy ze skupiny prof. Makhseeda z Kuvajtské univerzity se nám podařilo vyvinout a charakterizovat Pc, který je díky rigidně uspořádaným kladně nabitým objemným skupinám velice dobře rozpustný ve vodě a navíc zde neagreguje, což je velice vzácný jev u této skupiny látek.

Struktura a uspořádání v prostoru tohoto Pc nesoucího na periférii v  $\beta$  polohách substituenty s celkem šestnácti kvarternizovanými imidazolylovými skupinami (**Pc-Im<sub>16</sub>**) byly potvrzeny kromě elementární analýzy a NMR také rentgenovou krystalografií (Obr. 16). Nabitě objemné substituenty jsou nuceny se orientovat nad a pod rovinu lipofilního Pc jádra, a tím jim díky elektrostatickým repulzivním silám chrání před agregací. Fotofyzikální měření a  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie v  $\text{D}_2\text{O}$  potvrdily, že je tato látka schopná si udržet zcela monomerní stav ve vodném prostředí i při vysokých koncentracích až 100 mg/ml. Hodnoty  $\Phi_{\Delta}$  získané časově rozlišenou luminiscencí  $^1\text{O}_2$  v blízké infračervené oblasti při 1270 nm v dimethylformamidu (DMF) a  $\text{D}_2\text{O}$  byly vysoké ( $\Phi_{\Delta} = 0,61$  v DMF a  $\Phi_{\Delta} = 0,37$  v  $\text{D}_2\text{O}$ ), naznačující efektivní tvorbu  $^1\text{O}_2$  po aktivaci látky červeným světlem.



Obr. 16 Struktura **Pc-Im<sub>16</sub>** a schematické prostorové znázornění této látky (Makhseed *et al.*, 2013).

Díky monomernímu stavu látky ve vodném prostředí (např. kultivační médium) jsme byli schopni určit střední hodnotu vlastní toxicity struktury bez přítomnosti aktivujícího záření ( $TC_{50}$ ) a hodnotu střední efektivní koncentrace po aktivaci **Pc-Im<sub>16</sub>** zářením ( $EC_{50}$ ). Hodnota  $TC_{50}$  byla na nemaligní linii myších fibroblastů (3T3) stanovena na  $395 \mu\text{M}$  – obdobnou hodnotu jsme naměřili i pro nádorovou linii odvozenou od lidského karcinomu děložního čípku (HeLa), kde dosahovala  $TC_{50} = 628 \mu\text{M}$ . Aktivace **Pc-Im<sub>16</sub>** ( $\lambda > 570 \text{ nm}$ ,  $12,4 \text{ mW/cm}^2$ ,  $11,2 \text{ J/cm}^2$ ) indukovala silný fotodynamický efekt vůči HeLa buňkám s hodnotou  $EC_{50} = 36,7 \text{ nM}$  (Obr. 23b). Oba tyto výsledky naznačují velice nízkou toxicitu bez ozáření a zároveň vysokou fotodynamickou aktivitu, které jsou dobrými předpoklady úspěšného PS – poměr  $TC_{50}/EC_{50}$  (obdoba terapeutického indexu) je tak výjimečně vysoký, přesahující hodnotu 10 000. Toxické působení **Pc-Im<sub>16</sub>** po ozáření indukuje morfologické změny, které byly pozorovány jako změna tvaru buněk již během ozařování (zatažení filipodií, částečné zakulacení buněk). Krátce po ukončení ozařování dochází k rozsáhlé tvorbě membránových blebů. Jako hlavním cílem působení tohoto PS byly fluorescenční mikroskopii za použití specifických fluorescenčních sond určeny lyzosomy.

Výsledky této studie poukázaly na důležitost rigidity uspořádání kationických nábojů **Pc-Im<sub>16</sub>** v souvislosti s účinností jejich fotodynamického působení. Podařilo se tak navrhnout, syntetizovat a charakterizovat účinný PS, který vykázal vysokou aktivitu po ozáření červenou oblastí viditelného záření.

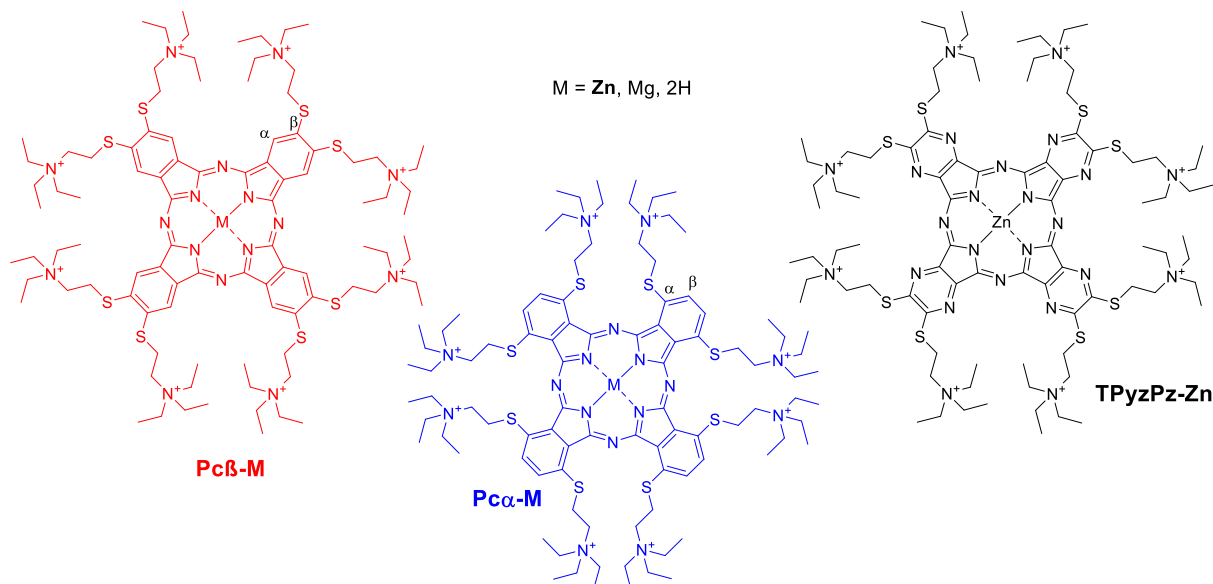
## 4.2 KATIONICKÉ FOTOSENSITIZÉRY ABSORBUJÍCÍ VE VZDÁLENÉ ČERVENÉ OBLASTI S VYSOKOU PROTINÁDOROVU AKTIVITOU A NÍZKOU TOXICITOU VE TMĚ

Macháček M, Cidlina A, Nováková V, Švec J, Rudolf E, Miletín M, Kučera R, Šimůnek T, Zimčík P. Far-red absorbing cationic phthalocyanine photosensitizers: Synthesis and evaluation of the photodynamic anti-cancer activity and the mode of cell death induction. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2015; 58(4): 1736–1749.

Pozice Q absorpčního pásu ftalocyaninového PS může být ovlivněna vhodnou substitucí jádra, zejména použitím spojovacího heteroatomu (O, S, N) mezi jádrem a substituentem – posun Q pásu může pak být k 800 nm. V literatuře byl popsán posun dokonce až k 1000 nm (Furuyama *et al.*, 2014), absorpce při takto vysoké vlnové délce však již není vhodná pro PDT, protože pouze záření zhruba do 800 nm má dostatečnou energii pro tvorbu  $^1\text{O}_2$  (Castano *et al.*, 2004). V této práci jsme se zabývali ve vodě rozpustnými Pc a tetrapyrazinoporfyrinem (TPyzPz), které absorbují v oblasti kolem 700 nm. Všechny PS z této studie nesou stejný [(triethylammonio)ethyl]sulfanylový substituent – trvalé kladné náboje zde nesou kvarterní amoniové soli. Předmětem této studie bylo především ovlivnění aktivity PS pozicí substituentů (neperiferní  $\alpha$  a periferní  $\beta$  poloha) na Pc jádře resp. izosterní záměnou uhlíku dusíkem v jádře PS nesoucím stejný substituent (struktury na Obr. 17).

Nejdůležitější absorpční pás pro PDT, Q pás, vykazoval bathochromní posun v následujícím pořadí: **TPyzPz-Zn** 656 nm < **Pc $\beta$ -Zn** 704 nm < **Pc $\alpha$ -Zn** 756 nm. Poloha Q pásu je zvláště zajímavá u neperiferně substituovaného Pc, kde přesahuje 750 nm, což je pro PDT vhodná fotofyzikální vlastnost. Nejnižší hodnota absorpčního maxima Q pásu u **TPyzPz-Zn** byla způsobena izosterní substitucí Pc jádra dusíkem, což vedlo k typickému hypsochromnímu posunu o 40 – 50 nm v porovnání s pásy parentního Pc analogu (Zimčík *et al.*, 2012). Rozdíly v absorpčních maximech  $\alpha$  a  $\beta$  substituovaných Pc je zase dána pozicí substituce na jádře, jak již bylo dříve demonstrováno v jiných studiích (Kobayashi *et al.*, 2003, Kostka *et al.*, 2006). Díky kvarternizaci jsou všechny látky vysoce rozpustné ve vodě a dle absorpčních a fluorescenčních spekter jsou **Pc $\alpha$ -Zn** a **TPyzPz-Zn** v monomerním stavu. **Pc $\beta$ -Zn** vykazuje tvorbu H-agregátů. Tvorba agregátů ve vodě ovlivňuje aktivitu látky a v případě **Pc $\beta$ -Zn** dochází k výraznému poklesu hodnoty  $\Phi_F$  (kvantový výtěžek fluorescence)

ve vodě oproti DMF. Pozice substituentu na jádře zároveň ovlivňuje hodnotu  $\Phi_{\Delta}$ , která je v DMF výrazně vyšší pro **Pc $\alpha$ -Zn** (0,91) oproti té naměřené u periferního analogu **Pc $\beta$ -Zn** (0,68). Nejnižší hodnotu ze zinečnatých derivátů měl **TPyzPz-Zn** ( $\Phi_{\Delta} = 0,20$ ). Tyto fotofyzikální parametry dobře korelují s fotodynamickými aktivitami studovaných látek.



Obr. 17 Struktury ftalocyaninů (Pc) a zinečnatého tetrapyrazinoporfyrazinu (**TPyzPz-Zn**) substituovaných [(triethylammonio)ethyl]sulfanylovými skupinami (Machacek *et al.*, 2015).

Rychlost prostupu látek do HeLa buněk byla rychlá v prvních hodinách s nástupem plató fáze během 12 h (Obr. 22a). Všechny PS se poté kumulovaly v lyzosomech, které tak představují primární cíl jejich fotodynamického působení. Jak ukázal časosběrný experiment, krátce po ozáření dochází k poškození lyzosomální membrány a redistribuci látek do cytoplazmy ještě během ozařování. Fotodynamické působení látek na maligní buněčné linie HeLa, SK-MEL-28 (lidský melanom) a HCT 116 (lidský kolorektální karcinom) i nemaligní linii 3T3 vyvolalo silný fotodynamický efekt dobře odrážející fotofyzikální měření – neaktivnější se ukázal být neperiferní **Pc $\alpha$ -Zn** (HeLa,  $EC_{50} = 0,31 \mu\text{M}$ ) a řádově podobnou aktivitu vykazoval i přes přítomnost agregace periferní **Pc $\beta$ -Zn** (HeLa,  $EC_{50} = 0,54 \mu\text{M}$ ), nejnižší pak azaftalocyanin **TPyzPz-Zn** (HeLa,  $EC_{50} = 3,70 \mu\text{M}$ ). Toxicita bez ozáření byla u všech látek nízká jak na HeLa, tak i 3T3 buňkách – v případě **Pc $\alpha$ -Zn** a **TPyzPz-Zn** v řádu stovek  $\mu\text{M}$ . Výjimečně nízkou vlastní toxicitu (dle dostupných dat jednu z nejnižších publikovaných v případě (Aza)Pc) jsme naměřili u **Pc $\beta$ -Zn** (HeLa,  $TC_{50} = 1639 \mu\text{M}$ ). Do studie byly zařazeny také PS neobsahující centrální kovový ion (**Pc $\alpha$ / $\beta$ -2H**) nebo obsahující

hořečnatý ion (**Pc $\alpha$ / $\beta$ -Mg**). Tyto nejsou tak silnými generátory  $^1\text{O}_2$  v porovnání s jejich zinečnatými analogy, a tudíž nebyly schopné vyvolat fotodynamický efekt v našich experimentálních podmínkách. Toxicita vlastní struktury bez ozáření však zůstává přibližně stejná, jako u fotodynamicky aktivních zinečnatých derivátů, a není tedy výrazně ovlivněna centrálně koordinovaným atomem.

Jak již bylo zmíněno výše, krátce po ozáření dochází k prasknutí lyzozomů, to však není jediná morfologická změna spojená s buněčnou smrtí vyvolanou fotodynamickým působením těchto PS. Během ozařování dochází ke zkracování a zakulacení mitochondrií, k prostupu jodidu propidia skrze poškozenou cytoplazmatickou membránu do buňky a extenzivní tvorbě membránových blebů až puchýřů. Přestup jodidu propidia a PS skrze jadernou membránu začíná až po ozáření a je kompletní během 15 min po ozáření. Afinita studovaných PS k jádru je daná kationickými náboji nesenými PS a anionickou povahou DNA. Žádné změny ve tvaru jádra nebo struktuře chromatinu nebyly pozorovány.

V průběhu buněčné smrti dochází k translokaci fosfatidylserinu z vnitřní strany buněčné membrány na vnější; toto může být detekováno pomocí fluorescenčně značeného Annexinu-V a kvantifikováno průtokovou cytometrií (Vermes *et al.*, 1995). V kombinaci s jodidem propidia, který je schopen barvit jádra buněk s vážně poškozenou cytoplazmatickou a jadernou membránou (pozdně apoptotické a/nebo nekrotické buňky) je možné odlišit buňky podstupující buněčnou smrt od buněk, které byly schopné přežít cytotoxický zásah. Při použití nízkých dávek **Pc $\alpha$ -Zn** i **Pc $\beta$ -Zn** (koncentrace odpovídající hodnotám jejich  $\text{EC}_{15}$ ) došlo pouze k mírnému nárůstu buněk podstupujících apoptózu resp. buněk nekrotických. Při použití vyšších dávek ( $\text{EC}_{85}$ ) byl nárůst v obou populacích buněk pozitivních na Annexin-V a negativních (časná apoptóza) či pozitivních (pozdní apoptóza a nekróza) na propidium jodid, kdy efekt byl výraznější u fotodynamicky aktivnějšího **Pc $\alpha$ -Zn** derivátu. Měření aktivity kaspas (3+7, 8 a 9) chemiluminiscenční metodou ukázalo, že zatímco iniciační kaspasy 8 a 9 aktivovány nebyly (s výjimkou kaspasy 9 ve vzorku obsahujícího **Pc $\beta$ -Zn** o koncentraci odpovídající  $\text{EC}_{15}$  6 h po ozáření), u efektorových kaspas 3+7 bylo pozorováno přechodné zvýšení aktivity u obou Pc 4 h po ozáření. Výsledky z průtokové cytometrie a aktivity kaspas spolu s rychlým nástupem vážných morfologických změn naznačuje, že dochází k buněčné smrti především nekrotického typu.

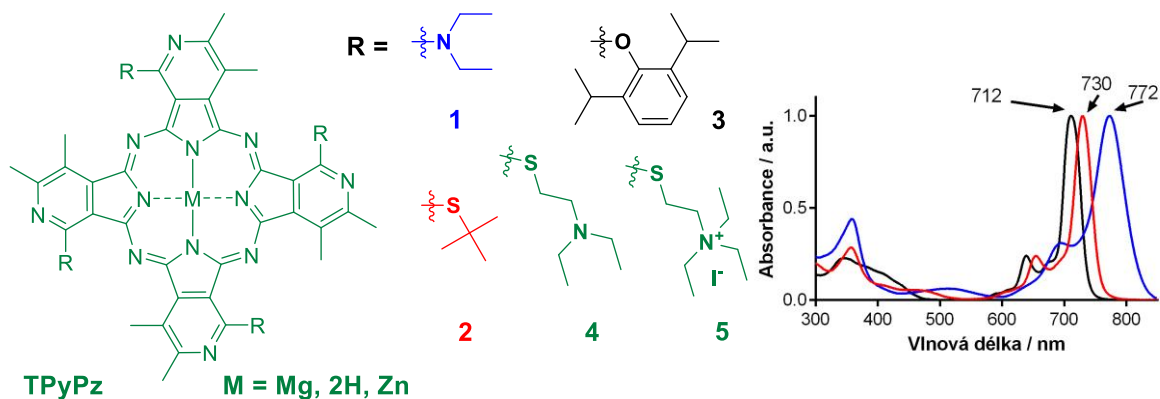
Výsledky této studie ukazují důležitost místa substituce Pc jádra stejně jako typ použitého jádra PS. Tyto strukturální obměny výrazně ovlivňují fotofyzikální, fotochemické a v důsledku i biologické chování hydrofilních fotosensitizerů založených na Pc jádře.



## 4.3 TETRA(3,4-PYRIDO)-PORFYRAZINY – NOVÁ SKUPINA FOTOSENSITIZÉRŮ PRO FOTODYNAMICKOU TERAPII NÁDORŮ

Vachova L, Macháček M, Kučera R, Demuth J, Čermák P, Kopecký K, Miletín M, Jedličková A, Šimůnek T, Novaková V and Zimčík P. Heteroatom-substituted tetra(3,4-pyrido)-porphyrazines: a stride toward near-infrared-absorbing macrocycles. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2015; 13: 5608-5612.

TPyPz jsou látky strukturálně odvozené od Pc izosterní záměnou uhlíku za dusík (všechny benzeny jsou zaměněny za pyridin) a byly poprvé syntetizovány koncem třicátých let 20. století (Linstead *et al.*, 1937). Do dnešní doby se však veškeré obměny soustředily pouze na změny centrálně koordinovaných iontů kovů a možnost kvarternizace pyridinových dusíků. V této studii jsme jako první uvedli možnost syntézy TPyPz (vhodných především pro PDT) substituovaných přes heteroatom (O, S, N). Touto substitucí je možné významně ovlivnit spektrální, fotofyzikální a fyzikálně-chemické vlastnosti PS odvozených od Pc (Zimčík *et al.*, 2012).



Obr. 18 Struktury substituovaných TPyPz a absorpční spektra (černá **TPyPz3-Zn**, červená **TPyPz2-Zn**, modrá **TPyPz1-Zn**) některých zástupců demonstrující červený posun Q pásu (Vachova *et al.*, 2015).

V této práci byla připravena série nekovových, hořečnatých a zinečnatých derivátů TPyPz s celou řadou periferních substituentů (Obr. 18). Zatímco pozice Q pásu nesubstituovaného TPyPz leží kolem 676 nm (Szulbinski a Kincaid, 1998), námi syntetizované PS vykazovaly významný bathochromní posun důležitý pro PDT – např. aryloxy derivát (**TPyPz3-Zn**) 712 nm, alkylsulfanylový (**TPyPz2-Zn**) 730 nm a dialkylamino (**TPyPz1-Zn**) substituovaný 772 nm (Obr. 18). Nejvýraznější červený posun však vykazovala

látka **TPyPz1-H** (806 nm), která se ale díky absenci kovového iontu s uzavřenou vnější slupkou (např. Zn) nehodí pro PDT ( $\Phi_{\Delta} = 0,01$ ). Až na látku **TPyPz2-H** nevykazovaly dle fluorescenčních spekter žádné PS agregaci v tetrahydrofuranu resp. v DMF. Díky rozpustnosti ve vodě, dostatečnému bathochromnímu posunu Q pásu (722 nm) a relativně vysokému  $\Phi_{\Delta} = 0,61$  je z hlediska použitelnosti pro PDT nejvhodnější **TPyPz5-Zn**.

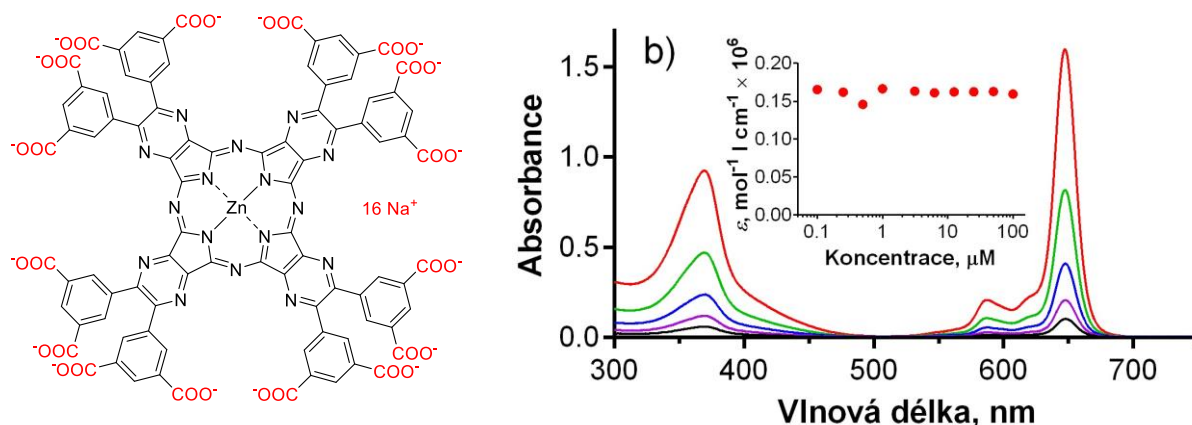
Časový profil prostupu **TPyPz5-Zn** do HeLa buněk byl obdobný, jako tomu bylo u předchozích látek a PS byl na konci inkubace lokalizován v endo-lyzosomálním kompartmentu. Ozáření červeným světlem indukovalo silný fotodynamický efekt  $EC_{50} = 0,26 \mu\text{M}$ , což je mírně vyšší aktivita srovnatelná s ve vodě rozpustnými **Pc $\alpha$ /B-Zn** z předchozí studie, které však nesou dvojnásobné množství nábojů. Strukturální změna na jádře však zároveň vedla k mírnému zvýšení toxicity bez ozáření ( $TC_{50} = 105 \mu\text{M}$ ).

Tato studie jako první demonstrovala syntetickou cestu vedoucí k substituovaným TPyPz – v tomto případě pro použití v PDT. Nové PS mají o něco vyšší fotodynamickou aktivitu, než jejich Pc a TPyzPz analoga, ale zároveň došlo k navýšení toxicity bez ozáření. Je proto nutné pokračovat ve studiu dalších derivátů, abychom zjistili, zda se toto týká pouze námi studovaných látek, nebo zda jde o vlastnost obecnou pro TPyPz.

## 4.4 STUDIUM NEAGREGUJÍCÍHO VE VODĚ ROZPUSTNÉHO ANIONICKÉHO FOTOSENSITIZÉRU: OBJASNĚNÍ NIŽŠÍ AKTIVITY TÉTO SKUPINY LÁTEK

Macháček M, Kollár J, Miletín M, Kučera R, Kubát P, Šimůnek T, Nováková V, Zimčík P. Anionic hexadeca-carboxylate tetrapyrazinoporphyrazine: synthesis and in vitro photodynamic studies of water-soluble non-aggregating photosensitizer. RSC Advances. 2016; 6: 10064-10077.

V naší studii s neagregujícím **Pc-Im<sub>16</sub>** jsme demonstrovali důležitost schopnosti PS zůstat ve zcela monomerním, neagregovaném stavu ve vodném prostředí, díky čemuž si je PS schopen zachovat produkci <sup>1</sup>O<sub>2</sub> resp. fotodynamickou aktivitu (Makhseed *et al.*, 2013). Dosud publikované anionické Pc PS vykazovaly vždy relativně nízkou fotodynamickou aktivitu (Xia *et al.*, 2011), která může být dána přítomností agregátů. Výjimkou je např. neagregující anionický Pc, který má i přes dobrou rozpustnost ve vodném prostředí výrazně nižší fotodynamickou aktivitu, než kationické deriváty (Liu *et al.*, 2005). Přítomnost agregátů tedy není uspokojivým vysvětlením tohoto jevu.



Obr. 19 Struktura **TPyzPz-COONa<sub>16</sub>**. Absorpční spektrum ve fosfáto-citrátovém pufru (pH 7,1; koncentrace od 6 μM, černá do 100 μM, červená) a závislost molárního extinkčního koeficientu na koncentraci demonstruje monomerní stav ve vodném prostředí.

Za účelem hlubšího studia aktivity anionických PS odvozených od struktury Pc, byl připraven zinečnatý TPyzPz substituovaný periferně osmi 3,5-dikarboxylátofenylovými skupinami, který ve formě sodné soli nese šestnáct záporných nábojů v rigidním uspořádání

(**TPyzPz-COONa<sub>16</sub>**, Obr. 19). Toto uspořádání substituentů je schopné udržet PS v monomerním stavu i při vysokých koncentracích ve vodném prostředí, jak bylo potvrzeno fotofyzikálními měřeními (Obr. 19) i v komplexní směsi iontů (DMEM médium). **TPyzPz-COONa<sub>16</sub>** má Q pás lokalizovaný kolem 647 nm. Měřením luminiscence <sup>1</sup>O<sub>2</sub> v blízké infračervené oblasti byla zjištěno, že  $\Phi_{\Delta} = 0,23$ , což je ve vodném prostředí velice dobrý výsledek (neagregující kationický **Pc-Im<sub>16</sub>** měl pouze mírně vyšší  $\Phi_{\Delta} = 0,37$ ).

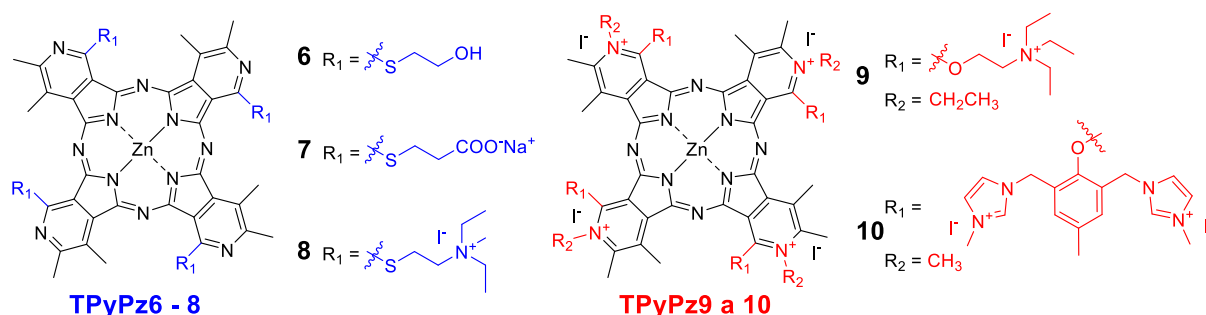
**TPyzPz-COONa<sub>16</sub>** se tedy z hlediska fotofyziky zdá být dobrým PS s rychlým vstupem do buněk v prvních hodinách, dosahující plató fáze během 12 h (Obr. 24b, červená křivka). Fluorescenční mikroskopie s použitím fluorescenčně značeného dextransu a fluorescenčních proteinů specifických pro lyzosomy a endosomy určila jako hlavní cíl této látky endo-lyzosomální kompartment. Po ukončení inkubace s HeLa buňkami byla změřena koncentrace **TPyzPz-COONa<sub>16</sub>** v buněčném lyzátu (0,20 nmol PS na 1 mg proteinu). Celkové množství **TPyzPz-COONa<sub>16</sub>** bylo přibližně 2,5× nižší, než tomu je v případě **Pc-Im<sub>16</sub>** (0,55 nmol PS na 1 mg proteinu). Cytotoxické experimenty v přítomnosti aktivujícího záření ale odhalily nízkou aktivitu **TPyzPz-COONa<sub>16</sub>** i při absenci agregace (5,7  $\mu$ M), která není vysvětlitelná pouze nižším množstvím látky v buňkách a nižším  $\Phi_{\Delta}$ .

V této práci bylo zjištěno a popsáno, že hlavním důvodem nižší aktivity anionických PS odvozených od Pc je vliv nízkého intralyzosomálního pH při kterém dochází u tohoto PS k agregaci. Další faktor vedoucí k nižší aktivitě je silná vazba na proteiny. Vazbou na proteiny dochází k zhášení excitovaného stavu, a tudíž i nižší produkci <sup>1</sup>O<sub>2</sub>.

## 4.5 TETRA(3,4-PYRIDO)-PORFYRAZINY – CESTA K NANOMOLÁRNĚ ÚČINNÝM FOTOSENSITIZÉRŮM

Macháček M, Demuth J, Čermák P, Vavrečková M, Hrubá L, Jedličková A, Kubát P, Šimůnek T, Nováková V, Zimčík P. Tetra(3,4-pyrido)porphyrazines caught in the cationic cage: toward nanomolar active photosensitizers. (rukopis ve fázi vyžádané revize v Journal of Medicinal Chemistry).

V předchozí studii (Vachova *et al.*, 2015) zabývající se tímto typem AzaPc jsme publikovali syntetickou cestu vedoucí k substituovaným TPyPz, které by mohly být účinnějšími analogy Pc a TPyZPz nesoucím stejné funkční skupiny. V této práci jsme rozšířili sérii TPyPz o další deriváty, které by měly být dobře rozpustné ve vodě a vykazovat dobrou fotodynamickou aktivitu vůči nádorovým buňkám *in vitro*. PS substituované skrze síru jako spojovací atom (**TPyPz6-8**, Obr. 20) mají Q pás lokalizovaný kolem 720 nm. Deriváty, kde jsou substituenty připojené skrze kyslík (**TPyPz9** a **TPyPz10**, Obr. 20) vykazují slabší hypsochromní posun Q pásu do oblasti cca 710 nm. V této práci byly také pro porovnání studovány některé PS využívané v praxi – konkrétně Photosens<sup>®</sup>, verteporfin, temoporfin a methylenová modř. Dále byly provedeny experimenty také s PpIX, který je fotodynamicky aktivním produktem proléčiva ALA a jeho derivátů. Všechny studované TPyPz oproti uvedeným PS absorbují Q pásem ve vyšších vlnových délkách, což je, jak již bylo zmíněno, výhodné pro PDT.



Obr. 20 Struktury série zinečnatých TPyPz, z nichž nejzajímavější látkou je **TPyPz10** (Machacek *et al.*, 2016, manuskript).

Z této série TPyPz jako jediný ve vodě neagreguje **TPyPz10**, což bylo detekovatelné absencí změn v absorpčním spektru po rozpuštění v kulturačním médiu obsahujícím fetální

hovězí sérum. U ostatních látek byl pozorován široký Q pás, objevily se nové hypsochromně posunuté absorpční pásy a byly naměřeny nižší extinkční koeficienty. U **TPyPz10** dochází podobně jako u **Pc-Im16** díky rigidně uspořádaným substituentům k odpuzování TPyPz jader repulzivními silami. Tento efekt je zde však navíc umocněn přítomností nábojů také na jádře díky přítomnosti kvarternizovaných pyridinů. **TPyPz10** zůstává monomerní ve vodném prostředí i při vysokých koncentracích a tento stav není ovlivněn pH, přítomností proteinů ani změnami iontových sil prostředí. Nízké  $\Phi_{\Delta}$  v DMF vykazovala pouze látka **TPyPz7** ( $\Phi_{\Delta} = 0,09$ ), ostatní díky monomernímu stavu v tomto rozpouštědle měly vysoké kvantové výtěžky singletového kyslíku ( $\Phi_{\Delta} = 0,42 - 0,72$ ). Měřením  $\Phi_{\Delta}$  **TPyPz10** v D<sub>2</sub>O jsme ověřili, že tato látka zůstává účinným generátorem <sup>1</sup>O<sub>2</sub> i ve vodném prostředí. Jeho hodnota  $\Phi_{\Delta} = 0,58$  byla dokonce vyšší než u **Pc-Im16** ( $\Phi_{\Delta} = 0,37$ ).

V *in vitro* hodnocení cytotoxicity po ozáření se ukázaly jako zcela neaktivní deriváty **TPyPz6** a **TPyPz7**, kdy se až do koncentrace 50  $\mu$ M neprojevila žádná fotodynamická aktivita. Zatímco deriváty **TPyPz8** (EC<sub>50</sub> = 150 nM) a **TPyPz9** (EC<sub>50</sub> = 870 nM) vykazují vysokou aktivitu srovnatelnou s námi již dříve publikovanými látkami, derivát **TPyPz10** (EC<sub>50</sub> = 3,8 nM) se ukázal být látkou s jednou z nejvyšších fotodynamických aktivit dosud publikovaných jakoukoli vědeckou skupinou. Podobnou aktivitu vykazuje **TPyPz10** i vůči jiným maligním buněčným liniím – SK-MEL-28 (3,77 nM), A549 (lidský plicní karcinom; 5,15 nM) a MCF-7 (lidský prsní karcinom; 2,83 nM). Zajímavým zjištěním byla určitá selektivita vůči nádorové tkáni, kdy aktivita vůči 3T3 buňkám i lidským keratinocytům (HaCaT) byla nižší (14,9 nM pro 3T3 a 42,3 nM pro HaCaT). Žádný z klinicky používaných PS uvedených do těchto experimentů takto vysokou aktivitu nevykazoval a všechny měly výrazně vyšší toxicitu bez ozáření, která je pro **TPyPz10** TC<sub>50</sub> = 427  $\mu$ M.

Primárním cílem **TPyPz10** po ozáření je, stejně jako u všech námi dříve studovaných PS, endo-lyzosomální systém. Toto bylo kromě fluorescenční mikroskopie potvrzeno mikroskopií konfokální (Obr. 26b). Fotodynamický proces tvoří reaktivní formy kyslíku a dusíku pouze během ozařovacího procesu a sekundární produkce pozorována nebyla. Fotodynamické působení **TPyPz10** vyvolává změny na buňkách již 5 min po začátku ozařování: Dochází k retrakci buněk, následované tvorbou membránových blebů, skrze poškozenou membránu proniká jodid propidia do cytoplazmy a již během ozařování prostupuje skrze poškozenou jadernou membránu a váže se na DNA. **TPyPz10** má díky své kationické povaze také afinitu k DNA – do jádra proniká 15 min po ukončení ozáření a barvení jader je finální během 1 h. Fotodynamické působení **TPyPz10** vyvolává ve vysoké

dávce ( $EC_{85} = 7,58 \text{ nM}$ ) komplexní změny – pyknóza, reorganizace mikrotubulů a mikrofilament, poškození mitochondrií a tvorba masivních membránových blebů neobsahujících organely. Rychlé morfologické změny spolu s barvením jader jodidem propidia naznačuje, že rozsáhlé oxidační poškození nejen lyzosomů (místo lokalizace PS na začátku ozáření), ale i ostatních organel (po reorganizaci PS z lyzosomů do cytoplazmy) vede k nekrotickému typu buněčné smrti, což bylo potvrzeno průtokovou cytometrií s použitím Annexinu V, kdy nebyly detekovány téměř žádné apoptotické buňky.

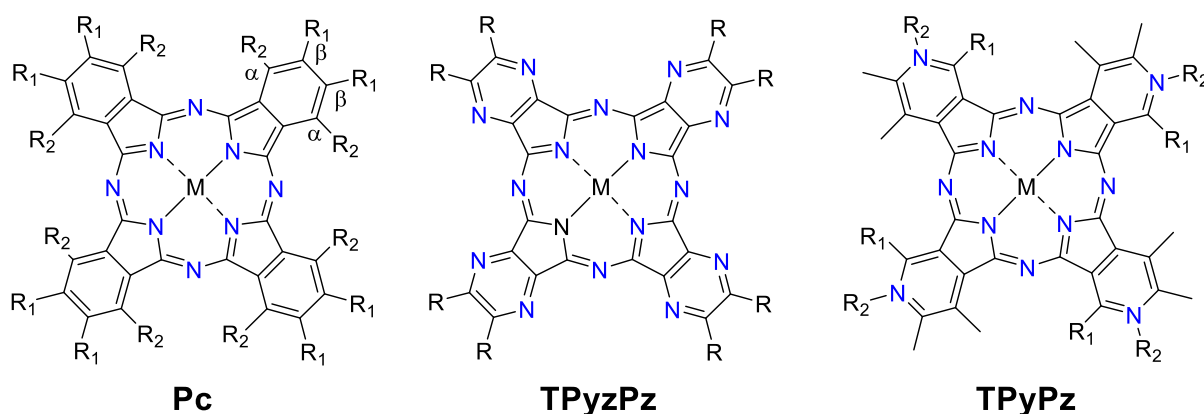
Díky vysoké hydrofilítě, absenci agregace a vysoké aktivitě, byla aktivita **TPyPz10** měřena v protokolu VTP na buněčné linii EA.hy926 (imortalizovaná linie lidských endotelových buněk), kde nedochází k preinkubaci buněk s PS. Tento derivát byl schopen i v tomto protokolu indukovat vysoký fotodynamický efekt  $EC_{50} = 15,3 \text{ nM}$ . Vzhledem k možnosti *i.v.* podání PS je velice důležité, aby takto podaná látka nezpůsobovala žádný nežádoucí hematologický efekt, jakým je např. hemolýza způsobená léčivem (Dausset a Contu, 1967). Proto jsme do experimentů zahrnuli *ex vivo* zkoušku hemolýzy červených krvinek, kde **TPyPz10** neindukoval hemolýzu ani ve velmi vysokých koncentracích ( $1000 \mu\text{M}$ ), které jsou již terapeuticky nedosažitelné.

Tato studie uvedla originální PS s výjimečně vysokou fotodynamickou aktivitou vůči celé řadě nádorových linií *in vitro*, zatímco si tato látka zachovala velice nízkou toxicitu bez ozáření, díky čemuž je i poměr  $TC_{50}/EC_{50}$  mimořádně vysoký, přesahující hodnotu 115 000.

## 5 SOUHRNNÁ DISKUZE



Účinnost PDT do značné míry ovlivňuje typ použitého PS. První a druhá generace PS je charakteristická spíše hydrofobními látkami, které je nutné podávat *i. v.* v nosičovém systému (nejčastěji liposomy a nanočástice) a přímé podání je tak možné pouze topicky u kožních malignit. Současný výzkum je zaměřen především na zvýšení účinnosti a/nebo zvýšení cílicích vlastností PS vůči nádorové tkáni, což je možné např. konjugací s nádorově specifickými ligandy (Josefsen a Boyle, 2008b). Vzhledem k možnosti selektivního ozařování pouze cílové tkáně, toto nemusí být vždy nezbytně nutné, pokud PS splňuje některá další kritéria tzv. ideálního PS. Mezi tyto vlastnosti patří minimální toxicita ve zdravé tkáni a absence nežádoucí kožní fotosensitivitu; těm se dá předejít i snížením expozice PS využitím vysoce hydrofilních látek s rychlou clearance z organismu (Li *et al.*, 2015b). V naší práci jsme se zaměřili především právě na tyto látky ze skupiny Pc (tetrabenzoporfyrainů; Obr. 21) a jejich dusíkatých izosterů (AzaPc) – konkrétně tetra(3,4-pyrido)porfyrainů (TPyPz; Obr. 21) a tetrapyrainoporfyrainů (TPyzPz; Obr. 21).



Obr. 21 Struktury jader fotosenzitizérů studovaných v rámci této disertační práce. Pc – ftalocyanin (tetrabenzoporfyrain); TPyzPz – tetrapyrainoporfyrain; TPyPz - tetra(3,4-pyrido)porfyrain. M = 2H, Mg, Zn.

Ftalocyaniny jsou látky podobné porfyrinům složené ze čtyř izoindolových jednotek a atomy dusíku v *meso* polohách. Pc jádro je aromatická cyklická planární struktura – jde tedy o lipofilní látku s tendencí agregovat ve vodném prostředí. Agregace Pc jader vede ke zhášení fluorescence, rapidnímu snížení tvorby  $^1O_2$ , a tudíž k částečné až úplné ztrátě fotodynamické aktivity (Lang, 2009). Tyto vlastnosti mají shodné se svými dusíkatými izostery. Výhodou TPyPz může být možnost tvorby tetraalkylovaného jádra kvarternizací – vnesením nábojů na planární aromatické jádro se stávají TPyPz rozpustné ve vodě (Seotsanyana-Mokhosi *et al.*, 2001). Účinnost (Aza)Pc jako PS a jejich vlastnosti se dají ovlivnit záměnou centrálně koordinovaného kovového iontu a vhodnou substitucí jádra (Lukyanets a Nemykin, 2010).

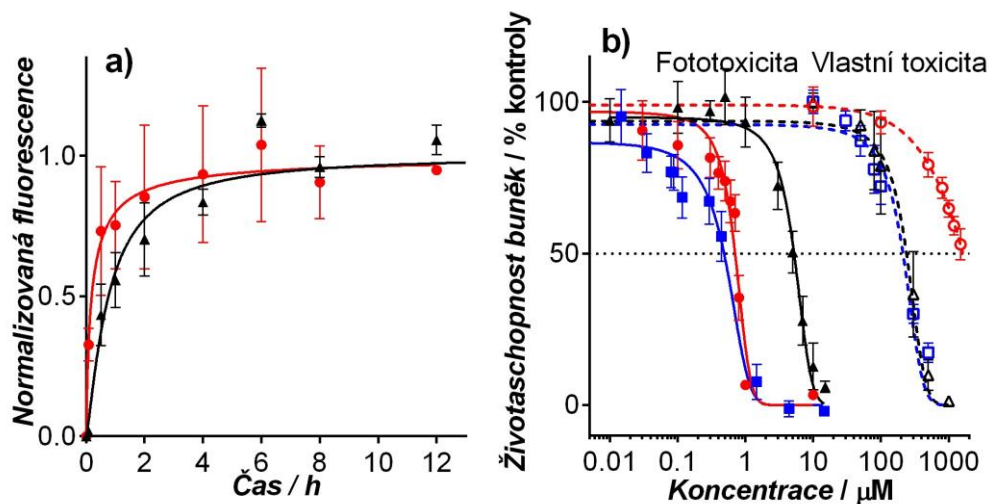
Vnášení axiálních (možné v případě, že je centrálním atomem např. Si) či periferně umístěných hydrofilních skupin je vhodným přístupem, jak částečně předcházet agregaci. Takto připravené Pc neagregují pouze při nižších koncentracích a se stoupající koncentrací stoupá i míra agregace. Doposud bylo publikováno jen několik málo prací demonstrujících substituované Pc schopné udržet si zcela monomerní stav i při vyšších koncentracích ve vodném prostředí (Li *et al.*, 2015a, Li *et al.*, 2015b).

### **Ve vodě rozpustné ftalocyaniny a tetrapyrazinoporfyraziny pro fotodynamickou terapii**

Naším cílem bylo vytvořit substituované Pc a AzaPc, které by vykazovaly vysokou fotodynamickou aktivitu, nízkou vlastní toxicitu a zároveň byly rozpustné ve vodném prostředí. Periferně v  $\beta$  (popř. také neperiferně v  $\alpha$  polohách u Pc; Obr. 21) oktasubstituované Pc a TPyzPz nesoucí [(triethylammonio)ethyl]sulfanylové skupiny (Obr. 17) se z fotofyzikálního hlediska ukázaly být vhodnými kandidáty. Tyto látky vykazují nízkou míru agregace a zinečnaté deriváty Pc se vyznačují vysokou produkcí  $^1\text{O}_2$  ( $\Phi_{\Delta} = 0,91$  pro **Pc $\alpha$ -Zn** a 0,68 pro **Pc $\beta$ -Zn**). Jednou z vlastností ovlivňující DLI fotosensitizačních chemoterapeutik je i jejich rychlost prostupu do buněk – ta se v tomto případě ukázala relativně rychlá během prvních hodin a plató fáze bylo dosaženo během 12 hodin (Obr. 22a). Po této době jsou tyto kationické PS lokalizovány v endo-lyzosomálním kompartmentu, především v lyzosomech, jak bylo demonstrováno pomocí fluorescenční mikroskopie (Machacek *et al.*, 2015). Kationické ftalocyaniny však byly již dříve publikovány jako látky mající tendenci se lokalizovat v mitochondriích (Dummin *et al.*, 1997). Důvodem pro akumulaci kationických PS v mitochondriích má být vliv  $\Delta\Psi_m$  a anionických komponent mitochondriální membrány (Rashid a Horobin, 1990). Několik studií však tuto teorii v kontextu PS vyvrací lokalizací kationických PS v jiných buněčných kompartmentech – např. některé kationické porfyryny se lokalizují na cytoplazmatické membráně (Kessel, 2002) a některé kationické Pc zase v lyzosomech (Marino *et al.*, 2010) podobně jako námi studované látky. Výslednou nitrobuněčnou lokalizaci PS tedy kromě náboje ovlivňují i další faktory. Těmi jsou pravděpodobně velikost molekuly, její tvar, přístup k náboji, jeho orientace a lipofilita bočních řetězců, které určují sílu elektrostatických a hydrofobních interakcí PS s okolními molekulami a ve finále i distribuci PS v buněčných strukturách a organelách (Benov, 2015).

Lyzosomálně lokalizované PS jsou obecně přijímány jako méně účinné v indukci buněčné smrti, než PS lokalizované v mitochondriích a jiných buněčných strukturách. Důvodem může být vyšší tendence PS agregovat v prostředí lyzosomů (Castano *et al.*, 2004), ale také inaktivace lyzosomálních enzymů fotodynamickým působením PS nalézajících se

v lumen těchto organel (Berg a Moan, 1994). V naší studii jsme zjistili, že k poškození lyzozomů a redistribuci v nich lokalizovaných kationických PS do cytoplazmy buňky dochází již relativně krátce po zahájení ozařování a PS tedy mohou ve svém fotodynamickém působení pokračovat i na jiných nitrobuněčných cílech. Tento proces vyústil v rychlé poškození mitochondrií a dalších buněčných komponent, což se projevilo mj. tvorbou blebů krátce po zahájení ozařování, vstupem jodidu propidia do cytoplazmy a později i relokací PS do jádra skrze poškozenou jadernou membránu (jako důsledek vazby kladně nabitě molekuly PS se záporně nabitou DNA). Buněčná smrt nastává pravděpodobně především nekrotickou cestou v důsledku rychlého a masivního oxidativního poškození buněčných struktur. Zatímco **Pca-Zn** i **Pcβ-Zn** ukázaly řádově podobnou fotodynamickou aktivitu *in vitro* vůči HeLa buňkám (stovky nM, Obr. 22b), **TPyzPz-Zn** vykázal aktivitu o řád nižší, což bylo způsobeno zejména nízkým  $\Phi_{\Delta} = 0,20$  (Machacek *et al.*, 2015). Přestože jde o lyzozomálně lokalizované PS, jejich *in vitro* fotodynamická aktivita se ukázala řádově srovnatelně vysoká jako u již dříve publikovaných prací se zinečnatými Pc (Duan *et al.*, 2010, Li *et al.*, 2008) i TPyzPz (Zimcik *et al.*, 2010).



Obr. 22 (a) Časový profil prostupu **Pcβ-Zn** (červená) a **TPyzPz-Zn** (černá) do HeLa buněk. (b) Vlastní toxicita látek (otevřené symboly, přerušovaná čára) a toxicita po ozařování (fototoxicita, plné symboly, plná čára) vůči HeLa buňkám. **Pcβ-Zn** (červená), **Pca-Zn** (modrá) a **TPyzPz-Zn** (černá) (Machacek *et al.*, 2015).

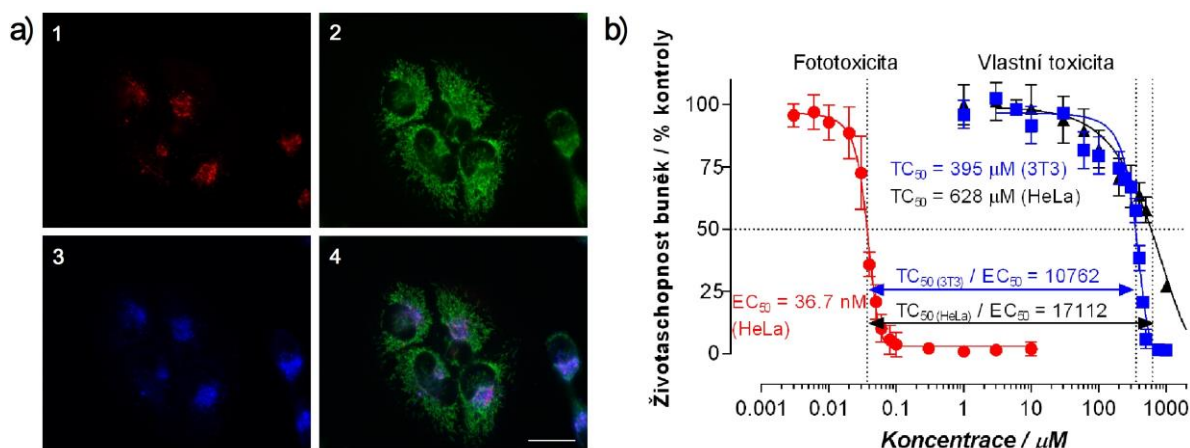
### Neagregující vysoce účinný kationický ftalocyaninový fotosensitizer

Přestože tyto ve vodě rozpustné deriváty vykazují relativně vysokou fotodynamickou aktivitu, je tato aktivita stále negativně ovlivňována přítomností agregace, což je způsobeno flexibilním připojením substituentů nesoucích trvalý kladný náboj. Tyto postranní řetězce se

mohou ve vodném prostředí volně orientovat a dovolit tak přístupu lipofilních jader PS k sobě a vzniku méně aktivních až neaktivních agregátů.

Ve spolupráci s kolegy z vědecké skupiny prof. Saada Makhseeda z Kuvajtské univerzity se nám podařilo vyvinout zinečnatý Pc nesoucí na periferii v  $\beta$  polohách substituenty s celkovým počtem šestnáct kvarternizovaných imidazolylových skupin (**Pc-Im<sub>16</sub>**). Krystalografická struktura potvrdila uspořádání těchto skupin nad a pod rovinu Pc jádra, přičemž díky objemnosti substituentů je toto uspořádání silně rigidní. Neumožňuje tak vybočení trvalých kladných nábojů z polohy nad a pod rovinou a na základě elektrostatických odpuzivých sil tak vede k úplnému zamezení agregace ve vodném prostředí i při vysokých koncentracích. Jak již bylo zmíněno výše, tato vlastnost Pc je na poli PDT výjimečná a vzácně publikovaná.

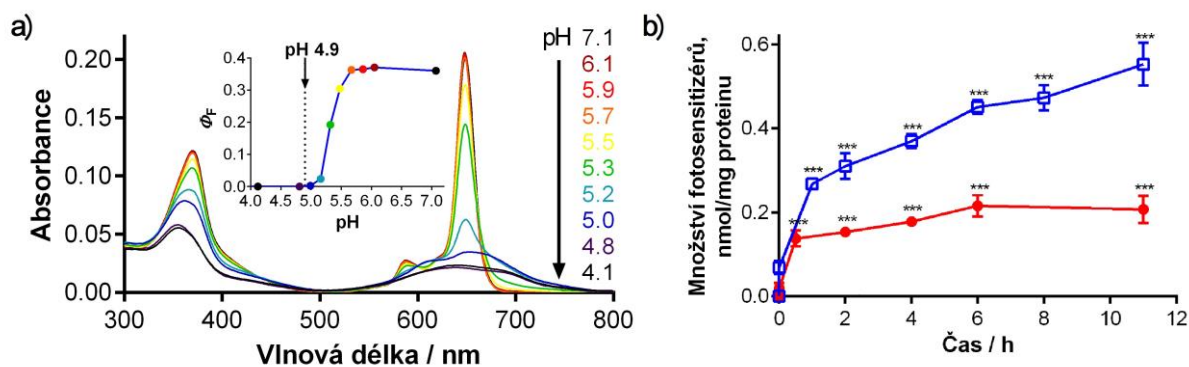
Tento Pc se po rychlém prostupu do buněk (během 12 h; Obr. 24b, modrá křivka) lokalizoval obdobně jako předchozí Pc v lysosomech (Obr. 23a) a po ozáření byl schopen výjimečně vysoké fotodynamické aktivity *in vitro*. Hodnota  $EC_{50} = 36,7$  nM (Obr. 23b) byla dle dostupných dat jednou z nejnižších hodnot do té doby publikovaných pro Pc fotosensitizer (Makhseed *et al.*, 2013). Tato vysoká aktivita **Pc-Im<sub>16</sub>** není negativně ovlivňována nízkým intralysosomálním pH (Obr. 25b, modrá křivka) ani vazbou na bílkoviny (Machacek *et al.*, 2016).



Obr. 23 (a) Lokalizace **Pc-Im<sub>16</sub>** v HeLa buňkách. 1 – fotosensitizer, 2 – mitochondrie, 3 – lysosomy, 4 – překryv fluorescenčních kanálů. (b) Výsledky cytotoxicitních experimentů – fototoxicita (červená, HeLa buňky) a vlastní toxicita (modrá, 3T3 buňky; černá, HeLa buňky) **Pc-Im<sub>16</sub>**.

## Anionický neagregující fotosenzitizér na bázi tetrapyrazinoporfyrazinu

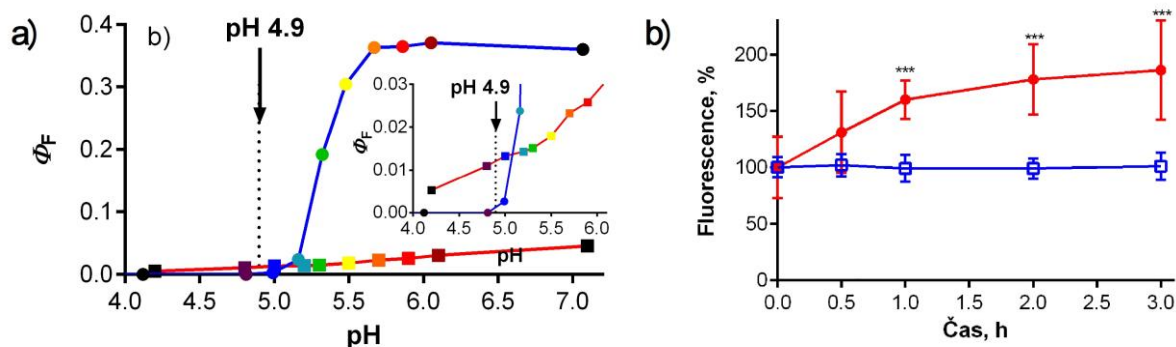
Substitucí TPyzPz osmi 3,5-dikarboxylátovými skupinami jsme získali ve vodě rozpustný PS nesoucí šestnáct záporných nábojů ve formě sodné soli (**TPyzPz-COONa<sub>16</sub>**; Obr. 19). Dle dostupných zdrojů byla dosud syntetizována celá řada anionických Pc a AzaPc PS, které však vykazovali relativně nízkou fotodynamickou aktivitu s hodnotami  $EC_{50}$  v jednotkách až desítkách  $\mu\text{M}$  (Choi *et al.*, 2004, Oda *et al.*, 2000, Xia *et al.*, 2011, Liu *et al.*, 2005), což by se dalo připisovat vlivu agregace. Námi připravený anionický PS byl navrhnout tak, aby splňoval nároky na rozpustnost ve vodném prostředí a přítomnost šestnácti nábojů na objemných rigidních substituentech díky repulzivním silám zabraňuje agregaci ve vodě i pufru až do vysokých koncentrací. I přes jeho plně monomerní stav se však ukázalo, že látka byla schopná po aktivaci světlem v *in vitro* podmínkách vyvolat cytotoxický účinek v koncentracích ( $EC_{50} = 5,7 \mu\text{M}$ ) srovnatelných s již dříve publikovanými anionickými PS (tzn. přibližně o dva řády nižší aktivita než pro neagregující kationický derivát **Pc-Im<sub>16</sub>**), což vede k myšlence, že agregace v roztoku není jediný faktor negativně ovlivňující účinnost těchto látek v PDT. Dosud však tento mechanismus nebyl u anionických (Aza)Pc uspokojivě vysvětlen.



Obr. 24 (a) Změny v absorpčním spektru **TPyzPz-COONa<sub>16</sub>** ( $c = 1 \text{ mM}$ ) v citráto-fosfátovém pufru při různých hodnotách pH. Vložka: závislost  $\Phi_F$  **TPyzPz-COONa<sub>16</sub>** v pufru na pH ( $\lambda_{\text{exc}} = 594 \text{ nm}$ ). (b) Časový profil prostupu **TPyzPz-COONa<sub>16</sub>** (červená) a **Pc-Im<sub>16</sub>** (modrá) do HeLa buněk (Machacek *et al.*, 2016).

Jako možné vysvětlení se nabízí samotný charakter látky – sůl anionické skupiny by mohla v kyselém pH uvnitř lyzozomů hydrolyzovat, přecházet tak ze sodné soli do formy volné karboxylové kyseliny. Ta poté již nemůže potlačovat agregaci díky nepřítomnosti náboje. Intralyzozomální pH v HeLa buňkách jsme změřili pomocí sondy LysoSensor Yellow/Blue DND-160 – hodnota pH je zde 4,9. Změny v absorpčním spektru **TPyzPz-COONa<sub>16</sub>** při různých hodnotách pH v citráto-fosfátovém pufru (Obr. 24a) spolu se

změnami hodnoty  $\Phi_F$  v závislosti na pH (Obr. 24a, vložka) odhalily, že tato látka ve vodném prostředí zůstává monomerní pouze nad hodnotu pH = 5,7. S klesajícím pH ztrácí karboxylátové skupiny náboj a látka agreguje. Experimenty na HeLa buňkách s fluorescenčně značeným dextranem (konvenční značení bazickou sondou LysoTracker nebylo možné, protože s anionickým TPyzPz tvořily heterodimery se vzájemným zhášením fluorescence) určily jako buněčný cíl endo-lyzosomální kompartment. Transfekce HeLa buněk s Lamp1-RFP (lyzosomální protein (Saftig a Klumperman, 2009)) a Rab7a-GFP (protein přítomný na membráně především pozdních endosomů (Vanlandingham a Ceresa, 2009)) dále potvrdily lokalizaci v lysosomech i pozdních endosomech. Logickým krokem bylo následné ovlivnění pH lysosomů, které jsme provedli dvěma metodami s odlišným mechanismem alkalizace tohoto kompartmentu –  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Poole a Ohkuma, 1981) a selektivním inhibitorem vakuolární  $\text{H}^+$ -ATPasy bafilomycinem  $\text{A}_1$  (Yoshimori *et al.*, 1991). Obě metody vedou ke zvýšení pH na hodnotu přibližně pH = 6. Vnitrobuněčná fluorescence **TPyzPz-COONa<sub>16</sub>** vzrostla v obou případech dvojnásobně, což potvrdilo částečně teorii o vlivu pH na aktivitu této látky. Dle titrační křivky (Obr. 25a, modrá křivka) v pufru by však při intralyzosomálním pH = 4,9 měl být **TPyzPz-COONa<sub>16</sub>** zcela agregovaný a neúčinný a zvýšení na pH = 6 by mělo vést k nárůstu fluorescence ne dvakrát (Obr. 25b, červená křivka), nýbrž minimálně o dva řády, což je v rozporu s pozorováním změn na buňkách po alkalizaci lysosomů.



Obr. 25 (a) Závislost  $\Phi_F$  **TPyzPz-COONa<sub>16</sub>** na pH v kulturačním médiu obsahujícím sérum (červená křivka, čtverce) a v citráto-fosfátovém pufru (modrá křivka, čtverce) ( $\lambda_{\text{exc}} = 594 \text{ nm}$ ). Vložená zvětšená část zobrazuje situaci kolem lyzosomálního pH (změřeno u HeLa buněk). (b) Změny intenzity fluorescence **TPyzPz-COONa<sub>16</sub>** (červená) a **Pc-Im<sub>16</sub>** (modrá) v HeLa buňkách jako funkce inkubačního času s bafilomycinem  $\text{A}_1$  (Machacek *et al.*, 2016).

Některé nabité i nenabité PS se mohou vázat na proteiny (Alpugan *et al.*, 2013) a v případě úspěšného derivátu bakteriochlorofylu – padeliporfinu (Tookad<sup>®</sup> soluble, Stakel<sup>®</sup>; Obr. 7) je toto dokonce žádoucí, protože ve vodném prostředí vytváří tento PS mikroagregáty a vazbou na sérové proteiny monomerizuje (Brandis *et al.*, 2005, Mazor *et al.*, 2005). Pouze

několik studií však bere v potaz také možné zhášení excitovaných stavů PS po interakci s proteiny (Lang *et al.*, 1994, Lebedeva *et al.*, 2013). Titrace **TPyzPz-COONa<sub>16</sub>** fetálním hovězím sérem v bezsérovém médiu či sérovým hovězím albuminem ukázala posun v absorpčním i emisním spektru a koncentračně závislý pokles fluorescence, což naznačuje, že vazbou na sérové proteiny opravdu dochází v tomto případě k zhášení excitovaného stavu, a tudíž i nižší produkci <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. **TPyzPz-COONa<sub>16</sub>** ovšem stále zůstává v monomerní formě i po interakci se sérovými proteiny a to i při snížení na pH = 4, což je zcela jiné než pozorování změn asociovaných se snížením pH v čistém pufru. Při snížení pH v přítomnosti sérových proteinů dochází pouze k silnější interakci s proteinem, která se projevuje jako pozvolné snížení fluorescence (nikoliv tak prudké jako v čistém pufru; Obr. 25b, červená křivka). Přestože vazbou na proteiny tedy dochází k signifikantnímu poklesu produkce cytotoxického <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, **TPyzPz-COONa<sub>16</sub>** asociovaný s proteiny je také částečně chráněn před vlivem nízkého pH, a tudíž si částečně zachovává fotodynamickou aktivitu i při pH 4,9. Z titrační křivky v přítomnosti sérových proteinů (Obr. 25b, červená křivka) je také zřejmé, že změna pH z 4,9 na 6 vede přibližně k dvojnásobnému nárůstu fluorescence, což je zcela v souladu s experimenty, při kterých bylo ovlivňováno intralyzozomální pH (NH<sub>4</sub>Cl, bafilomycin A<sub>1</sub>). Následné cytotoxicitní experimenty v bezsérovém médiu potvrdily, že aktivita je silně ovlivněna vazbou na proteiny – aktivita **TPyzPz-COONa<sub>16</sub>** vzrostla přibližně desetkrát. Interakce s proteiny byla vyloučena u **Pc-Im<sub>16</sub>**, a zdá se tedy, že negativně ovlivňuje pouze anionické (Aza)Pc (Machacek *et al.*, 2016).

### **Tetra(3,4-pyrido)porfyriziny jako nová skupina fotosensitizerů**

Izosterickou záměnou uhlíku za dusík v Pc je možné získat i jiný typ AzaPc jádra, než pouze TPyPz. Koncem třicátých let byly poprvé připraveny TPyPz (Linstead *et al.*, 1937); od té doby však nebyly publikovány téměř žádné studie zabývající se syntézou substituovaných TPyPz vhodných pro PDT. Několik studií se zabývalo záměnou centrálního kovového iontu a možností kvarternizace pyridinových dusíků za účelem zvýšení hydrofility popřípadě substitucí na benzenových jádrech tris(benzo)-3,4-pyridoporfyrizínů, bis(benzo)-bis(3,4-pyrido)porfyrizínů či benzo-tris(3,4-pyrido)porfyrizínů (Sakamoto *et al.*, 2002, Seotsanyana-Mokhosi *et al.*, 2001, Sakamoto *et al.*, 2005, Dupouy *et al.*, 2004, Martí *et al.*, 2000). Nesubstituovaný zinečnatý TPyPz má absorpční maximum Q pásu při 676 nm (Szulbinski a Kincaid, 1998), což je při obdobné vlnové délce, jako tomu je u nesubstituovaného zinečnatého Pc (Staicu *et al.*, 2013).

Naší vědecké skupině se podařilo vyvinout syntetickou cestu přípravy substituovaných TPyPz s potenciálem pro využití v PDT. Zinečnatý TPyPz substituovaný [(triethylammonio)ethyl]sulfanylovými skupinami (**TPyPz5-Zn**; Obr. 18) se ukázal být z celé série nejvhodnější s výrazným červeným posunem absorpčního maxima v Q pásu až k 730 nm. I když charakter TPyPz jádra v porovnání s Pc jádrem dovoluje při vnesení stejného substituentu na jádro nést pouze poloviční množství nábojů, tento PS přesto vykazuje nízkou míru agregace ve vodném prostředí a aktivitu o něco lepší než tomu bylo u Pc derivátů. Nevýhodou však bylo také zvýšení vlastní toxicity látky (Vachova *et al.*, 2015).

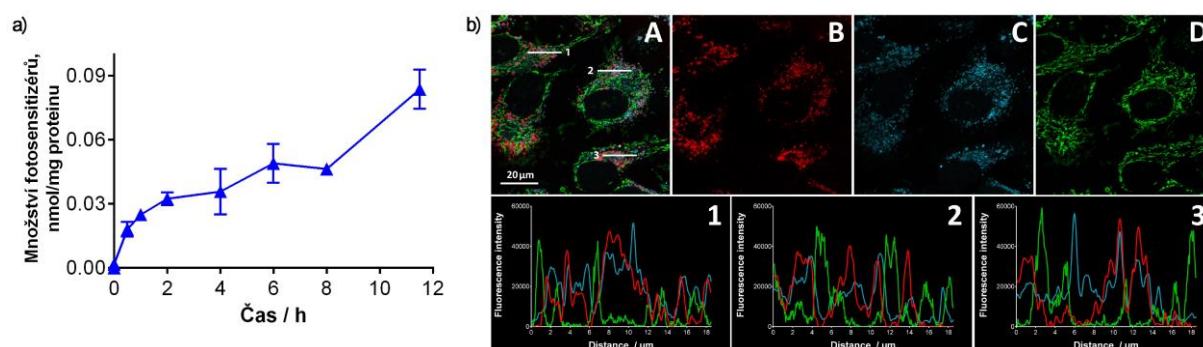
Spojením nejvýhodnějších vlastností předchozích PS s možností kvarternizace pyridinových dusíků na jádře TPyPz se nám podařilo navrhnout a připravit kationický zcela neagregující TPyPz substituovaný čtyřmi substituenty nesoucími vždy dva kvarternizované imidazoly (**TPyPz10**; Obr. 20). Objemné nabitě substituenty jsou stericky nuceny být orientovány mimo rovinu TPyPz jádra a zabraňují tak tvorbě dimerů a agregátů. Výsledkem je PS schopný po ozáření cytotoxicky působit ve velmi nízkých koncentracích – v *in vitro* podmínkách na buněčné linii HeLa jsme hodnotu  $EC_{50}$  stanovili na 3,77 nM (Machacek *et al.*, 2016, manuskript), což řadí tuto látku na jeden z neúčinnějších Pc vůbec.

V roce 2011 publikovala vědecká skupina prof. Ng křemičitý Pc, který vykazoval vysokou aktivitu – v *in vitro* podmínkách na buněčné linii HT29 (buněčná linie odvozená od lidského střevního adenokarcinomu) byl schopný vyvolat 50% pokles viability v koncentraci 1,1 nM. Tento Pc byl axiálně substituovaný 3-(methylamino)propoxy skupinami a ozáření probíhalo halogenovou lampou ( $\lambda > 610$  nm) s celkovou dávkou světla  $48 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$  (Jiang *et al.*, 2011), což je přibližně čtyřnásobná dávka světla, než byla použita v našem experimentálním uspořádání (Xe lampa,  $\lambda > 570$  nm,  $11,2 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ ). Dá se očekávat, že při použití obdobně vysoké dávky světla v našem experimentálním uspořádání bychom byli schopni se dostat na podobnou hodnotu  $EC_{50}$ . Tuto myšlenku také podporují výsledky experimentu s prodlouženou dobou ozařování – za použití konstantní koncentrace odpovídající  $EC_{50}$  došlo při prodloužení ozařování o 15 min (celkem 30 min) k poklesu viability o dalších 31 %. Dávka světla zde odpovídala  $22,3 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ .

**TPyPz10** je schopen dosáhnout podobného fotodynamického působení i u ostatních nádorových buněčných linií – nejvyššího účinku ( $EC_{50} = 2,83$  nM) pak u buněčné linie MCF-7 (odvozená od lidského prsního karcinomu). Vysoká aktivita spolu s velmi nízkou vlastní toxicitou na nádorové (HeLa) i nenádorové (3T3) buněčné linii byla charakterizována vysokým poměrem  $TC_{50}/EC_{50} > 115\ 000$ , což je jeden z předpokladů úspěšného PS.



Tento účinný kationický TPyPz se do buněk dostává relativně rychle (Obr. 26a) a je lokalizován v lyzosomech, což bylo také potvrzeno konfokální mikroskopií (Obr. 26b). Vysoká aktivita **TPyPz10** je navíc dosažena i při poměrně nízké intracelulární koncentraci. Po 12 h inkubaci s 4  $\mu$ M TPyPz se v buněčném lyzátu nachází 0,08 nmol PS na 1 mg proteinu (Machacek *et al.*, 2016, manuskript), což je téměř sedminásobně nižší koncentrace PS, než tomu bylo u účinného neagregujícího kationického **Pc-Im16** (Makhseed *et al.*, 2013), u něhož byla celková koncentrace v buněčném lyzátu změřena 0,55 nmol PS na 1 mg proteinu (Machacek *et al.*, 2016).



Obr. 26 (a) Časový profil prostupu **TPyPz10** do HeLa buněk. (b) Lokalizace **TPyPz10** v HeLa buňkách určená pomocí konfokální mikroskopie. A – překryv fluorescenčních kanálů, B – **TPyPz10**, C – lyzomy, D – mitochondrie, 1 až 3 – profily intenzit fluorescenčních signálů na řezech v A (Machacek *et al.*, 2016, manuskript).

Po ozáření **TPyPz10**, který se na konci inkubace nachází v lyzosomech (Obr. 26b), poškozuje tyto organely a redistribuuje se do cytoplazmy, kde dochází k poškození mitochondrií a buněčné membrány ještě během ozařování. Vyšší dávka **TPyPz10** ( $EC_{85} = 7,58$  nM) vyvolala již krátce po ozáření (1 h) změnu tvaru jádra a zmenšení jeho objemu – kondenzaci chromatinu však bylo možné pozorovat 24 h po ozáření. Změny byly pozorovatelné i na buněčném cytoskeletu již po 1 h od ozáření vyšší dávkou PS – ztráta stresových vláken, lokalizace svazků aktinových vláken i mikrotubulů na periferii apod. U některých buněk byly po 24 h zaznamenány změny v mitotickém vřeténku. Morfologické změny, rychlý nástup účinku PS a výsledky průtokové cytometrie s jodidem propidia a fluorescenčně značeným Annexinem-V (Machacek *et al.*, 2016, manuskript) naznačují obdobný průběh fotodynamického procesu jako u předchozích kationických PS (Makhseed *et al.*, 2013, Machacek *et al.*, 2015).

Vzhledem k tomu, že existuje značná variabilita v PDT protokolech používaných jednotlivými vědeckými skupinami, je značně obtížné objektivně posuzovat rozdíly v aktivitě

jednotlivých PS publikovaných ve vědeckých pracích – různé buněčné linie, způsoby ozařování, použité metody stanovení životaschopnosti buněk apod. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli do cytotoxicitních experimentů v našem PDT experimentálním uspořádání zařadit i již klinicky používané látky – konkrétně jde o ftalocyanin Photosens<sup>®</sup>, derivát benzoporphyrinu verteporfin, chlorin temoporfin a porfyrin PpIX (fotodynamicky aktivní produkt proléčiv ALA, MALA a HALA). Do této série byla zařazena i methylenová modř, přestože je dnes využívána spíše ve fotoinaktivaci infekčních agens či jako standard fotofyzikálních metod – byla však spolu se svými deriváty studována dříve i v PDT nádorových onemocnění (Rice *et al.*, 2000). Zatímco methylenová modř a Photosens<sup>®</sup> jsou srovnatelně aktivní jako **TPyPz-COONa<sub>16</sub>** (jednotky  $\mu\text{M}$ ) a PpIX se aktivitou 0,8  $\mu\text{M}$  řadí na stejnou úroveň jako kationické (Aza)Pc s flexibilním připojením nábojů, verteporfin a temoporfin vykazaly vysokou aktivitu (36 nM a 45 nM), která je řadí na úroveň **Pc-Im<sub>16</sub>**. Žádný z klinicky využívaných PS však nebyl schopen dosáhnout stejně vysoké fotodynamické aktivity jako **TPyPz10**, který má navíc mnohonásobně nižší vlastní toxicitu (435  $\mu\text{M}$ ) než neúčinnější verteporfin (19  $\mu\text{M}$ ) (Machacek *et al.*, 2016, manuskript).

Rozpustnost ve vodném prostředí bez vzniku agregátů a vysoká fotodynamická aktivita předurčuje neagregující (Aza)Pc k použití v protokolu tzv. VTP, kde je cytotoxický účinek zaměřený na cévy vedoucí k jejich uzávěru a zamezení přísunu kyslíku a živin k nádorové tkáni (Kamarulzaman *et al.*, 2011). Tento přístup nevyžaduje čas nutný k tomu, aby se PS dostal do nádorové tkáně a významně se tak zkrátí DLI a léčba je i pro pacienta komfortnější. VTP v kombinaci s verteporfinem se dnes v klinické praxi využívá k léčbě AMD (Algvere a Seregard, 2002). Pro léčbu nádorových onemocnění je v III. fázi klinických studií fotosensitizující látka padeliporfin (Tookad<sup>®</sup> Soluble), kde vykazuje slibné výsledky (Azzouzi *et al.*, 2015). **TPyPz10** si zachoval vysokou aktivitu i v *in vitro* VTP protokolu vůči nádorovým (HeLa) i nenádorovým endotelovým (EA.hy926 a HUVEC) buněčným liniím s hodnotami  $\text{EC}_{50} = 14,8 - 19,2$  nM srovnatelnými s PDT protokolem (Machacek *et al.*, nepublikovaná data). To naznačuje, že hydrofilní kationické (Aza)Pc PS nevyžadují inkubační dobu nutnou k tomu, aby se dostaly do nádorové buňky, ale jsou zřejmě schopné účinně cytotoxicky působit i při minimálních intracelulárních koncentracích nebo dokonce z extracelulárního prostředí. Potřeba je však ještě dalšího detailnějšího studia zaměřeného na přesný mechanismus účinku (Aza)Pc v obou protokolech (PDT i VTP) jak *in vitro* tak *in vivo*.

## 6 ZÁVĚRY

- Po expozici aktivujícím záření se ukázaly nejúčinnější kationické (Aza)Pc deriváty. Tuto aktivitu vykazovaly PS u všech použitých nádorových linií. I přes vysokou fotodynamickou aktivitu si tyto látky zachovaly velice nízkou toxicitu bez ozáření, což je dobrý předpoklad úspěšného PS. Nejúčinnější látka dokonce vykazovala určitou míru selektivity vůči nádorovým liniím.
- Délka trvání ozařovacího protokolu významně ovlivňuje účinnost fototoxického působení látek. Výrazné prodloužení expozice světlu je schopné indukovat snížení životaschopnosti buněk až o 40 %.
- U všech námi studovaných nových PS byla zjištěna stejná primární buněčná lokalizace – endo-lyzosomální systém. U kationických derivátů bylo možné (u některých již během ozařování) pozorovat relokaci do jádra díky poškození jaderné membrány a negativnímu náboji DNA.
- Časový profil prostupu látek do buněk ukázal ve všech případech rychlý nástup v prvních hodinách inkubace, a poté se po zbytek 12 h periody rychlost prostupu snížila.
- Tvorba reaktivních forem kyslíku a dusíku byla pozorována pouze během doby působení aktivujícího záření. Po ukončení ozařování nebyla zaznamenána žádná významná sekundární tvorba reaktivních forem kyslíku a dusíku.
- Fotodynamické působení nových Pc a AzaPc fotosenzitizérů vyvolává významné změny v buněčné morfologii. Na úrovni celé buňky dochází k počátečnímu smršťování buněk v důsledku stresu vyvolaného indukci oxidačního stresu a poškození vnitrobuněčných struktur. Fotosenzitizéry lokalizované v endo-lyzosomálním kompartmentu poškozují membrány endosomů a lyzomů a dostávají se do cytoplazmy již během ozařování. Sekundárně dochází k poškození mitochondrií a je možné pozorovat změny také na buněčném jádře a cytoskeletu.

- Působení PS vyvolává masivní tvorbu ROS a oxidační stres indukuje buněčnou smrt nekrotického typu.
- Bylo zjištěno, že za nízkou aktivitu anionických derivátů může vazba na proteiny, která v kombinaci s nízkým intralyzosomálním pH výrazně snižuje produkci  $^1\text{O}_2$ . Vazba na proteiny však zároveň udržuje PS v monomerním stavu, a je tak schopna částečně chránit látku před negativním působením nízkého pH, čímž částečně zachovává fotodynamickou aktivitu.
- Přítomnost velkého množství nábojů není jediným faktorem dostatečným k pozitivnímu ovlivnění fotodynamické aktivity fotosensitizerů ve vodném prostředí. Důležitý je také způsob, v jakém jsou substituenty vůči jádru uspořádány. Rigidní uspořádání nábojů kolem jádra se zdá být srovnatelně důležitým faktorem. Díky tomu se ukázal být kationický TPyPz s rigidním uspořádáním substituentů nejúčinnější, a navíc byla jeho aktivita vyšší, než u klinicky používaných PS studovaných v našem experimentálním uspořádání.

## 7    PODÍL PŘEKLADATELE NA PUBLIKACÍCH ZAHRNUTÝCH V DISERTAČNÍ PRÁCI

- I. Makhseed S, Macháček M, Alfadly W, Tuhl A, Vinodh V, Šimůnek T, Novaková V, Kubát P, Rudolf E a Zimčík P. **Water-soluble non-aggregating zinc phthalocyanine and in vitro studies for photodynamic therapy.** *Chemical Communications*. 2013; 49(95): 11149-51.
- Kultivace buněčných linií HeLa a 3T3.
  - Stanovení toxicit po ozáření a bez přítomnosti aktivujícího záření.
  - Stanovení časového profilu prostupu látky do buněk.
  - Podíl na určení subcelulární lokalizace fluorescenční mikroskopií.
  - Změny v morfologii buněk před, během a po ozařování – časosběrné video.
  - Podíl na textu publikace.
- II. Macháček M, Cidlina A, Novaková V, Švec J, Rudolf E, Miletín M, Kučera R, Šimůnek T, Zimčík P. **Far-red absorbing cationic phthalocyanine photosensitizers: Synthesis and evaluation of the photodynamic anti-cancer activity and the mode of cell death induction.** *Journal of Medicinal Chemistry*. 2015; 58(4): 1736–17491.
- Kultivace buněčných linií HeLa, 3T3, SK-MEL-28, HCT 116.
  - Stanovení toxicit po ozáření a bez přítomnosti aktivujícího záření.
  - Stanovení závislosti délky ozařovacího procesu na fotodynamické aktivitě látek.
  - Stanovení časového profilu prostupu látek do buněk.
  - Podíl na určení subcelulární lokalizace fluorescenční mikroskopií.
  - Stanovení časového profilu tvorby reaktivních forem kyslíku a dusíku.
  - Dokumentace morfologických změn na buňce, jádrech, mitochondriích a lyzozomech v čase.
  - Měření aktivit kaspas 3/7, 8 a 9 luminiscenční metodou.
  - Stanovení populací živých, apoptotických a pozdně apoptotických/nekrotických buněk pomocí průtokové cytometrie.
  - Podíl na stanovení přítomnosti autofagie v procesu buněčné smrti.
  - Statistická analýza dat.
  - Podíl na textu publikace.

- III. Vachova L, Macháček M, Kučera R, Demuth J, Čermák P, Kopecký K, Miletín M, Jedličková A, Šimůnek T, Nováková V and Zimčík P. **Heteroatom-substituted tetra(3,4-pyrido)-porphyrazines: a stride toward near-infrared-absorbing macrocycles.** *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2015; 13: 5608-5612.
- Kultivace buněčné linie HeLa.
  - Stanovení toxicit po ozáření a bez přítomnosti aktivujícího záření.
  - Stanovení časového profilu prostupu látky do buněk.
  - Určení subcelulární lokalizace fluorescenční mikroskopií.
  - Podíl na textu publikace.
- IV. Macháček M, Kollár J, Miletín M, Kučera R, Kubát P, Šimůnek T, Nováková V, Zimčík P. **Anionic hexadeca-carboxylate tetrapyrazinoporphyrazine: synthesis and in vitro photodynamic studies of water-soluble non-aggregating photosensitizer.** *RSC Advances*. 2016; 6: 10064-10077.
- Kultivace buněčné linie HeLa.
  - Stanovení toxicit po ozáření a bez přítomnosti aktivujícího záření.
  - Stanovení časového profilu prostupu látek do buněk a podíl na stanovení koncentrace látek v buňkách po 12 h inkubaci.
  - Transfekce buněk Rab7a-GFP a Lamp1-RFP.
  - Určení subcelulární lokalizace fluorescenční mikroskopií.
  - Měření intralyzozomálního pH.
  - Alkalizace lyzozomů  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a bafilomycinem  $\text{A}_1$  a měření fluorescence látek po alkalizaci lyzozomů.
  - Statistická analýza dat.
  - Podíl na textu publikace.



V. Macháček M, Demuth J, Čermák P, Vavrečková M, Hrubá L, Jedličková A, Kubát P, Šimůnek T, Nováková V, Zimčík P. **Tetra(3,4-pyrido)porphyrazines caught in the cationic cage: toward nanomolar active photosensitizers.** (*rukopis ve fázi vyžádané revize v Journal of Medicinal Chemistry* ).

- Kultivace buněčných linií HeLa, 3T3, SK-MEL-28, A 549, MCF-7, HaCaT a EA.hy926.
- Stanovení toxicit po ozáření a bez přítomnosti aktivujícího záření.
- Stanovení toxicity po ozáření v protokolu „fotodynamické terapie zaměřené na cévy“.
- Stanovení závislosti délky ozařovacího procesu na fotodynamické aktivitě látek.
- Stanovení časového profilu prostupu látek do buněk.
- Určení subcelulární lokalizace fluorescenční a konfokální mikroskopii.
- Stanovení překryvu signálu intenzit fluorescenčních sond a fotosensitizeru.
- Stanovení časového profilu tvorby reaktivních forem kyslíku a dusíku.
- Dokumentace morfologických změn na buňce, jádrech, mitochondriích, buněčné membráně, aktinovém cytoskeletu a mikrotubulech v čase.
- Stanovení populací živých, apoptotických a pozdně apoptotických/nekrotických buněk pomocí průtokové cytometrie.
- Statistická analýza dat.
- Podíl na textu publikace.

## 8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ABRAHAMSE, H. & HAMBLIN, M. R. 2016. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem J*, 473, 347-64.
- ACKROYD, R., KELTY, C., BROWN, N. & REED, M. 2001. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 74, 656-669.
- ADAMS, J. M. & CORY, S. 2007. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26, 1324-37.
- AGARWAL, M. L., CLAY, M. E., HARVEY, E. J., EVANS, H. H., ANTUNEZ, A. R. & OLEINICK, N. L. 1991. Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y mouse lymphoma cells. *Cancer Res*, 51, 5993-6.
- AGOSTINIS, P., BERG, K., CENGEL, K. A., FOSTER, T. H., GIROTTI, A. W., GOLLNICK, S. O., HAHN, S. M., HAMBLIN, M. R., JUZENIENE, A., KESSEL, D., KORBELIK, M., MOAN, J., MROZ, P., NOWIS, D., PIETTE, J., WILSON, B. C. & GOLAB, J. 2011. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61, 250-281.
- ALGVERE, P. V. & SEREGARD, S. 2002. Age-related maculopathy: pathogenetic features and new treatment modalities. *Acta Ophthalmol Scand*, 80, 136-43.
- ALLAN, L. A. & CLARKE, P. R. 2007. Phosphorylation of caspase-9 by CDK1/cyclin B1 protects mitotic cells against apoptosis. *Mol Cell*, 26, 301-10.
- ALLEN, C. M., SHARMAN, W. M. & VAN LIER, J. E. 2001. Current status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 5, 161-169.
- ALLISON, R. R. & SIBATA, C. H. 2010. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 7, 61-75.
- ALMEIDA, J., TOME, J. P., NEVES, M. G., TOME, A. C., CAVALEIRO, J. A., CUNHA, A., COSTA, L., FAUSTINO, M. A. & ALMEIDA, A. 2014. Photodynamic inactivation of multidrug-resistant bacteria in hospital wastewaters: influence of residual antibiotics. *Photochem Photobiol Sci*, 13, 626-33.
- ALMEIDA, R. D., MANADAS, B. J., CARVALHO, A. P. & DUARTE, C. B. 2004. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta*, 1704, 59-86.
- ALPUGAN, S., GARCIA, G., POYER, F., DURMUŞ, M., MAILLARD, P., AHSEN, V. & DUMOULIN, F. 2013. Dendrimeric-like hexadecahydroxylated zinc phthalocyanine: Synthesis and evaluation of photodynamic efficiency. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 17, 596-603.
- ALVAREZ, A., LACALLE, J., CAÑAVATE, M., ALONSO-ALCONADA, D., LARACELADOR, I., ALVAREZ, F. & HILARIO, E. 2010. Cell death. A comprehensive approximation. Necrosis. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education. Badajoz: Formatex Research Centre*, 1025-1032.

- ALVAREZ, M., VILLANUEVA, Á., ACEDO, P., CAÑETE, M. & STOCKERT, J. C. 2011. Cell death causes relocalization of photosensitizing fluorescent probes. *Acta Histochemica*, 113, 363-368.
- ANDERSEN, J. L., JOHNSON, C. E., FREEL, C. D., PARRISH, A. B., DAY, J. L., BUCHAKJIAN, M. R., NUTT, L. K., THOMPSON, J. W., MOSELEY, M. A. & KORNBLUTH, S. 2009. Restraint of apoptosis during mitosis through interdomain phosphorylation of caspase-2. *The EMBO Journal*, 28, 3216-3227.
- ANDERSON, R. R. & PARRISH, J. A. 1981. The Optics of Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 77, 13-19.
- AULER, H. & BANZER, G. 1942. Untersuchungen über die Rolle der Porphyrine bei geschwulstkranken Menschen und Tieren. *Zeitschrift für Krebsforschung*, 53, 65-68.
- AVELINE, B. M. & REDMOND, R. W. 1999. Can cellular phototoxicity be accurately predicted on the basis of sensitizer photophysics? *Photochem Photobiol*, 69, 306-16.
- AZZOUZI, A. R., BARRET, E., MOORE, C. M., VILLERS, A., ALLEN, C., SCHERZ, A., MUIR, G., DE WILDT, M., BARBER, N. J., LEBDAI, S. & EMBERTON, M. 2013. TOOKAD(R) Soluble vascular-targeted photodynamic (VTP) therapy: determination of optimal treatment conditions and assessment of effects in patients with localised prostate cancer. *BJU Int*, 112, 766-74.
- AZZOUZI, A. R., LEBDAI, S., BENZAGHOU, F. & STIEF, C. 2015. Vascular-targeted photodynamic therapy with TOOKAD(R) Soluble in localized prostate cancer: standardization of the procedure. *World J Urol*, 33, 937-44.
- BABIOR, B. M. 2000. The NADPH oxidase of endothelial cells. *IUBMB Life*, 50, 267-9.
- BABIOR, B. M., LAMBETH, J. D. & NAUSEEF, W. 2002. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys*, 397, 342-4.
- BAINES, C. P. 2009. The molecular composition of the mitochondrial permeability transition pore. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 46, 850-857.
- BELLNIER, D. A., GRECO, W. R., LOEWEN, G. M., NAVA, H., OSEROFF, A. R., PANDEY, R. K., TSUCHIDA, T. & DOUGHERTY, T. J. 2003. Population pharmacokinetics of the photodynamic therapy agent 2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbide-a in cancer patients. *Cancer Res*, 63, 1806-13.
- BELZACQ, A. S., JACOTOT, E., VIEIRA, H. L., MISTRO, D., GRANVILLE, D. J., XIE, Z., REED, J. C., KROEMER, G. & BRENNER, C. 2001. Apoptosis induction by the photosensitizer verteporfin: identification of mitochondrial adenine nucleotide translocator as a critical target. *Cancer Res*, 61, 1260-4.
- BENOV, L. 2015. Photodynamic therapy: current status and future directions. *Med Princ Pract*, 24 Suppl 1, 14-28.
- BERG, K. & MOAN, J. 1994. Lysosomes as photochemical targets. *Int J Cancer*, 59, 814-22.

- BEVERINA, L., CRIPPA, M., LANDENNA, M., RUFFO, R., SALICE, P., SILVESTRI, F., VERSARI, S., VILLA, A., CIAFFONI, L., COLLINI, E., FERRANTE, C., BRADAMANTE, S., MARI, C. M., BOZIO, R. & PAGANI, G. A. 2008. Assessment of water-soluble pi-extended squaraines as one- and two-photon singlet oxygen photosensitizers: design, synthesis, and characterization. *J Am Chem Soc*, 130, 1894-902.
- BIENERT, G. P. & CHAUMONT, F. 2014. Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta*, 1840, 1596-604.
- BLAND, J. 1976. Biochemical effects of excited state molecular oxygen. *Journal of Chemical Education*, 53, 274-279.
- BOLDIN, M. P., METT, I. L., VARFOLOMEEV, E. E., CHUMAKOV, I., SHEMER-AVNI, Y., CAMONIS, J. H. & WALLACH, D. 1995. Self-association of the "death domains" of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects. *J Biol Chem*, 270, 387-91.
- BONFOCO, E., KRAINC, D., ANKARCRONA, M., NICOTERA, P. & LIPTON, S. A. 1995. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 7162-6.
- BONNETT, R., WHITE, R. D., WINFIELD, U. J. & BERENBAUM, M. C. 1989. Hydroporphyrins of the meso-tetra(hydroxyphenyl)porphyrin series as tumour photosensitizers. *Biochemical Journal*, 261, 277-280.
- BOWN, S. G., TRALAU, C. J., SMITH, P. D., AKDEMIR, D. & WIEMAN, T. J. 1986. Photodynamic therapy with porphyrin and phthalocyanine sensitisation: quantitative studies in normal rat liver. *Br J Cancer*, 54, 43-52.
- BOZZINI, G., COLIN, P., BETROUNI, N., NEVOUX, P., OUZZANE, A., PUECH, P., VILLERS, A. & MORDON, S. 2012. Photodynamic therapy in urology: what can we do now and where are we heading? *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 9, 261-73.
- BRANDIS, A., MAZOR, O., NEUMARK, E., ROSENBAACH-BELKIN, V., SALOMON, Y. & SCHERZ, A. 2005. Novel water-soluble bacteriochlorophyll derivatives for vascular-targeted photodynamic therapy: synthesis, solubility, phototoxicity and the effect of serum proteins. *Photochem Photobiol*, 81, 983-93.
- BROVKO, L. 2010. Photodynamic treatment: a new efficient alternative for surface sanitation. *Adv Food Nutr Res*, 61, 119-47.
- BUGAJ, A. M. 2016. Vascular targeted photochemotherapy using padoporfin and padeliporfin as a method of the focal treatment of localised prostate cancer - clinician's insight. *World Journal of Methodology*, 6, 65-76.
- BURMAN, C. & KTISTAKIS, N. T. 2010. Autophagosome formation in mammalian cells. *Semin Immunopathol*, 32, 397-413.
- BUYTAERT, E., CALLEWAERT, G., HENDRICKX, N., SCORRANO, L., HARTMANN, D., MISSIAEN, L., VANDENHEEDE, J. R., HEIRMAN, I., GROOTEN, J. &

- AGOSTINIS, P. 2006. Role of endoplasmic reticulum depletion and multidomain proapoptotic BAX and BAK proteins in shaping cell death after hypericin-mediated photodynamic therapy. *Faseb j*, 20, 756-8.
- BUYTAERT, E., DEWAELE, M. & AGOSTINIS, P. 2007. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta*, 1776, 86-107.
- CALZAVARA-PINTON, P., ROSSI, M. T., SALA, R. & VENTURINI, M. 2012. Photodynamic antifungal chemotherapy. *Photochem Photobiol*, 88, 512-22.
- CASTANO, A. P., DEMIDOVA, T. N. & HAMBLIN, M. R. 2004. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1, 279-293.
- CIRMAN, T., ORESIC, K., MAZOVEC, G. D., TURK, V., REED, J. C., MYERS, R. M., SALVESEN, G. S. & TURK, B. 2004. Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins. *J Biol Chem*, 279, 3578-87.
- CLARKE, P. G. H. & CLARKE, S. 1996. Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anatomy and Embryology*, 193, 81-99.
- COON, M. J., DING, X. X., PERNECKY, S. J. & VAZ, A. D. 1992. Cytochrome P450: progress and predictions. *Faseb j*, 6, 669-73.
- COPPER, M. P., TAN, I. B., OPPELAAR, H., RUEVEKAMP, M. C. & STEWART, F. A. 2003. Meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin photodynamic therapy in early-stage squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 129, 709-11.
- COSTA, L., FAUSTINO, M. A., NEVES, M. G., CUNHA, A. & ALMEIDA, A. 2012. Photodynamic inactivation of mammalian viruses and bacteriophages. *Viruses*, 4, 1034-74.
- COSTANTINI, P., BELZACQ, A. S., VIEIRA, H. L., LAROCLETTE, N., DE PABLO, M. A., ZAMZAMI, N., SUSIN, S. A., BRENNER, C. & KROEMER, G. 2000. Oxidation of a critical thiol residue of the adenine nucleotide translocator enforces Bcl-2-independent permeability transition pore opening and apoptosis. *Oncogene*, 19, 307-14.
- DAHLE, J., BAGDONAS, S., KAALHUS, O., OLSEN, G., STEEN, H. B. & MOAN, J. 2000. The bystander effect in photodynamic inactivation of cells. *Biochim Biophys Acta*, 1475, 273-80.
- DAHLE, J., KAALHUS, O., MOAN, J. & STEEN, H. B. 1997. Cooperative effects of photodynamic treatment of cells in microcolonies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 1773-8.
- DAHLE, J., STEEN, H. B. & MOAN, J. 1999. The mode of cell death induced by photodynamic treatment depends on cell density. *Photochem Photobiol*, 70, 363-7.

- DARWENT, J. R., DOUGLAS, P., HARRIMAN, A., PORTER, G. & RICHOUX, M.-C. 1982. Metal phthalocyanines and porphyrins as photosensitizers for reduction of water to hydrogen. *Coordination Chemistry Reviews*, 44, 83-126.
- DAUSSET, J. & CONTU, L. 1967. Drug-induced hemolysis. *Annu Rev Med*, 18, 55-70.
- DAVIES, M. J. 2003. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 305, 761-770.
- DAVIES, M. J. 2016. Protein oxidation and peroxidation. *Biochem J*, 473, 805-25.
- DE DUVE, C. & WATTIAUX, R. 1966. Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol*, 28, 435-92.
- DELLINGER, M. 1996. Apoptosis or necrosis following Photofrin photosensitization: influence of the incubation protocol. *Photochem Photobiol*, 64, 182-7.
- DENT, C. E., LINSTED, R. P. & LOWE, A. R. 1934. 217. Phthalocyanines. Part VI. The structure of the phthalocyanines. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 10.1039/JR9340001033, 1033-1039.
- DETER, R. L. & DE DUVE, C. 1967. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *J Cell Biol*, 33, 437-49.
- DEVASAGAYAM, T. P. & KAMAT, J. P. 2002. Biological significance of singlet oxygen. *Indian J Exp Biol*, 40, 680-92.
- DIZDAROGLU, M. & SIMIC, M. G. 1983. Isolation and characterization of radiation-induced aliphatic peptide dimers. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, 44, 231-9.
- DOUGHERTY, T. J., GOMER, C. J., HENDERSON, B. W., JORI, G., KESSEL, D., KORBELIK, M., MOAN, J. & PENG, Q. 1998. Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 90, 889-905.
- DOUGHERTY, T. J., GRINDEY, G. B., FIEL, R., WEISHAUP, K. R. & BOYLE, D. G. 1975. Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. *J Natl Cancer Inst*, 55, 115-21.
- DOUGHERTY, T. J., POTTER, W. R. & WEISHAUP, K. R. 1984. The Structure of the Active Component of Hematoporphyrin Derivative. In: ANDREONI, A. & CUBEDDU, R. (eds.) *Porphyrins in Tumor Phototherapy*. Boston, MA: Springer US.
- DUAN, W., LO, P. C., DUAN, L., FONG, W. P. & NG, D. K. 2010. Preparation and in vitro photodynamic activity of amphiphilic zinc(II) phthalocyanines substituted with 2-(dimethylamino)ethylthio moieties and their N-alkylated derivatives. *Bioorg Med Chem*, 18, 2672-7.
- DUMMIN, H., CERNAY, T. & ZIMMERMANN, H. W. 1997. Selective photosensitization of mitochondria in HeLa cells by cationic Zn(II)phthalocyanines with lipophilic side-chains. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 37, 219-229.

- DUPOUY, E. A., LAZZERI, D. & DURANTINI, E. N. 2004. Photodynamic activity of cationic and non-charged Zn(ii) tetrapyrroline derivatives: biological consequences in human erythrocytes and *Escherichia coli*. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 3, 992-998.
- DUPREZ, L., WIRAWAN, E., VANDEN BERGHE, T. & VANDENABEELE, P. 2009. Major cell death pathways at a glance. *Microbes Infect*, 11, 1050-62.
- ELLIS, H. M. & HORVITZ, H. R. 1986. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, 44, 817-29.
- ELMORE, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35, 495-516.
- ESKELINEN, E. L. 2006. Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Aspects Med*, 27, 495-502.
- ESTERBAUER, H., ECKL, P. & ORTNER, A. 1990. Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. *Mutat Res*, 238, 223-33.
- FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., ERVIK, M., DIKSHIT, R., ESER, S., MATHERS, C., REBELO, M., PARKIN, D., FORMAN, D. & BRAY, F. 2013. *GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11* [Online]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx> [Accessed 8. 8. 2016].
- FESTJENS, N., VANDEN BERGHE, T., CORNELIS, S. & VANDENABEELE, P. 2007. RIP1, a kinase on the crossroads of a cell's decision to live or die. *Cell Death Differ*, 14, 400-410.
- FIGGE, F. H., WEILAND, G. S. & MANGANIELLO, L. O. 1948. Cancer detection and therapy; affinity of neoplastic, embryonic, and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins. *Proc Soc Exp Biol Med*, 68, 640.
- FIGUEIREDO, T. L. C. & DOLPHIN, D. 1998. Meso-Arylporphyrins as dienophiles in Diels-Alder reactions: A Novel Approach to the Synthesis of Chlorins, Bacteriochlorins, and Naphthoporphyrins *Organic Chemistry*, 11, 297-300.
- FOOTE, C. S. 1991. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol*, 54, 659.
- FORMIGLI, L., PAPUCCI, L., TANI, A., SCHIAVONE, N., TEMPESTINI, A., ORLANDINI, G. E., CAPACCIOLI, S. & ORLANDINI, S. Z. 2000. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol*, 182, 41-9.
- FRANK, J., FLACCUS, A., SCHWARZ, C., LAMBERT, C. & BIESALSKI, H. K. 2006. Ascorbic acid suppresses cell death in rat DS-sarcoma cancer cells induced by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. *Free Radical Biology and Medicine*, 40, 827-836.



- FURRE, I. E., SHAHZIDI, S., LUKSIENE, Z., MOLLER, M. T., BORGAN, E., MORGAN, J., TKACZ-STACHOWSKA, K., NESLAND, J. M. & 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, 11051-60.
- FURUYAMA, T., SATOH, K., KUSHIYA, T. & KOBAYASHI, N. 2014. Design, Synthesis, and Properties of Phthalocyanine Complexes with Main-Group Elements Showing Main Absorption and Fluorescence beyond 1000 nm. *J Am Chem Soc*, 136, 765-776.
- GALLUZZI, L., AARONSON, S. A., ABRAMS, J., ALNEMRI, E. S., ANDREWS, D. W., BAEHRECKE, E. H., BAZAN, N. G., BLAGOSKLONNY, M. V., BLOMGREN, K., BORNER, C., BREDESEN, D. E., BRENNER, C., CASTEDO, M., CIDLOWSKI, J. A., CIECHANOVER, A., COHEN, G. M., DE LAURENZI, V., DE MARIA, R., DESHMUKH, M., DYNLACHT, B. D., EL-DEIRY, W. S., FLAVELL, R. A., FULDA, S., GARRIDO, C., GOLSTEIN, P., GOUGEON, M. L., GREEN, D. R., GRONEMEYER, H., HAJNOCZKY, G., HARDWICK, J. M., HENGARTNER, M. O., ICHIJO, H., JAATTELA, M., KEPP, O., KIMCHI, A., KLIONSKY, D. J., KNIGHT, R. A., KORNBLUTH, S., KUMAR, S., LEVINE, B., LIPTON, S. A., LUGLI, E., MADEO, F., MALOMI, W., MARINE, J. C., MARTIN, S. J., MEDEMA, J. P., MEHLEN, P., MELINO, G., MOLL, U. M., MORSELLI, E., NAGATA, S., NICHOLSON, D. W., NICOTERA, P., NUNEZ, G., OREN, M., PENNINGER, J., PERVAIZ, S., PETER, M. E., PIACENTINI, M., PREHN, J. H., PUTHALAKATH, H., RABINOVICH, G. A., RIZZUTO, R., RODRIGUES, C. M., RUBINSZTEIN, D. C., RUDEL, T., SCORRANO, L., SIMON, H. U., STELLER, H., TSCHOPP, J., TSUJIMOTO, Y., VANDENABEELE, P., VITALE, I., VOUSDEN, K. H., YOULE, R. J., YUAN, J., ZHIVOTOVSKY, B. & KROEMER, G. 2009. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ*, 16, 1093-107.
- GALLUZZI, L. & KROEMER, G. 2008. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell*, 135, 1161-3.
- GALLUZZI, L., MAIURI, M. C., VITALE, I., ZISCHKA, H., CASTEDO, M., ZITVOGEL, L. & KROEMER, G. 2007. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ*, 14, 1237-43.
- GALLUZZI, L., VITALE, I., ABRAMS, J. M., ALNEMRI, E. S., BAEHRECKE, E. H., BLAGOSKLONNY, M. V., DAWSON, T. M., DAWSON, V. L., EL-DEIRY, W. S., FULDA, S., GOTTLIEB, E., GREEN, D. R., HENGARTNER, M. O., KEPP, O., KNIGHT, R. A., KUMAR, S., LIPTON, S. A., LU, X., MADEO, F., MALORNI, W., MEHLEN, P., NUNEZ, G., PETER, M. E., PIACENTINI, M., RUBINSZTEIN, D. C., SHI, Y., SIMON, H. U., VANDENABEELE, P., WHITE, E., YUAN, J., ZHIVOTOVSKY, B., MELINO, G. & KROEMER, G. 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*, 19, 107-20.
- GASCOIGNE, K. E. & TAYLOR, S. S. 2008. Cancer cells display profound intra- and interline variation following prolonged exposure to antimitotic drugs. *Cancer Cell*, 14, 111-22.

- GEBICKI, J. M., DU, J., COLLINS, J. & TWEEDDALE, H. 2000. Peroxidation of proteins and lipids in suspensions of liposomes, in blood serum, and in mouse myeloma cells. *Acta Biochim Pol*, 47, 901-11.
- GEBICKI, S. & GEBICKI, J. M. 1999. Crosslinking of DNA and proteins induced by protein hydroperoxides. *Biochem J*, 338 ( Pt 3), 629-36.
- GEIGER, P. G., KORYTOWSKI, W., LIN, F. & GIROTTI, A. W. 1997. Lipid peroxidation in photodynamically stressed mammalian cells: use of cholesterol hydroperoxides as mechanistic reporters. *Free Radic Biol Med*, 23, 57-68.
- GILBERT, B. C., HOLMES, R. G. G., LAUE, H. A. H. & NORMAN, R. O. C. 1976. Electron spin resonance studies. Part L. Reactions of alkoxy radicals generated from alkyl hydroperoxides and titanium(III) ion in aqueous solution. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 10.1039/P29760001047, 1047-1052.
- GLETTTE, J. & SANDBERG, S. 1986. Phototoxicity of tetracyclines as related to singlet oxygen production and uptake by polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Pharmacol*, 35, 2883-5.
- GLICK, D., BARTH, S. & MACLEOD, K. F. 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*, 221, 3-12.
- GOLAB, J., NOWIS, D., SKRZYCKI, M., CZECZOT, H., BARANCZYK-KUZMA, A., WILCZYNSKI, G. M., MAKOWSKI, M., MROZ, P., KOZAR, K., KAMINSKI, R., JALILI, A., KOPEC, M., GRZELA, T. & JAKOBISIAK, M. 2003. Antitumor effects of photodynamic therapy are potentiated by 2-methoxyestradiol. A superoxide dismutase inhibitor. *J Biol Chem*, 278, 407-14.
- GOLDSCHNEIDER, D. & MEHLEN, P. 2010. Dependence receptors: a new paradigm in cell signaling and cancer therapy. *Oncogene*, 29, 1865-1882.
- GOLLNICK, K. & HELD, S. 1990. Merbromin (mercurochrome) — a photosensitizer for singlet oxygen reactions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 5, 85-93.
- GRANICK, S. 1965. Hepatic porphyria and drug-induced or chemical porphyria. *Ann N Y Acad Sci*, 123, 188-197.
- GRAVIER, J., SCHNEIDER, R., FROCHOT, C., BASTOGNE, T., SCHMITT, F., DIDELON, J., GUILLEMIN, F. & BARBERI-HEYOB, M. 2008. Improvement of meta-tetra(Hydroxyphenyl)chlorin-Like Photosensitizer Selectivity with Folate-Based Targeted Delivery. Synthesis and in Vivo Delivery Studies. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51, 3867-3877.
- GREEN, D. R. 2011. *Apoptosis: Physiology and Pathology*, New York, Cambridge University Press.
- GUTIERREZ, M. G., MUNAFO, D. B., BERON, W. & COLOMBO, M. I. 2004. Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. *J Cell Sci*, 117, 2687-97.

- HALESTRAP, A. P. 2009. What is the mitochondrial permeability transition pore? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 46, 821-831.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*, New York, Oxford University Press Inc.
- HAMBLIN, M. R., O'DONNELL, D. A., MURTHY, N., RAJAGOPALAN, K., MICHAUD, N., SHERWOOD, M. E. & HASAN, T. 2002. Polycationic photosensitizer conjugates: effects of chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria. *J Antimicrob Chemother*, 49, 941-51.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- HAUSMANN, W. 1911. Die sensibilisierende Wirkung des Hämatorporphyrins *Biochem. Zeitschr.*, 30, 276-316.
- HE, J., LARKIN, H. E., LI, Y. S., RIHTER, D., ZAIDI, S. I., RODGERS, M. A., MUKHTAR, H., KENNEY, M. E. & OLEINICK, N. L. 1997. The synthesis, photophysical and photobiological properties and in vitro structure-activity relationships of a set of silicon phthalocyanine PDT photosensitizers. *Photochem Photobiol*, 65, 581-6.
- HE, Y.-Y., LIU, H.-Y., AN, J.-Y., HAN, R. & JIANG, L.-J. 1999. Photodynamic action of hypocrellin dyes: structure-activity relationships. *Dyes and Pigments*, 44, 63-67.
- HENDERSON, B. W. & DOUGHERTY, T. J. 1992. How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol*, 55, 145-57.
- HIROHARA, S., OBATA, M., ALITOMO, H., SHARYO, K., ANDO, T., TANIHARA, M. & YANO, S. 2009. Synthesis, photophysical properties and sugar-dependent in vitro photocytotoxicity of pyrrolidine-fused chlorins bearing S-glycosides. *J Photochem Photobiol B*, 97, 22-33.
- CHAI, J., DU, C., WU, J. W., KYIN, S., WANG, X. & SHI, Y. 2000. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature*, 406, 855-62.
- CHAN, F. K., SHISLER, J., BIXBY, J. G., FELICES, M., ZHENG, L., APPEL, M., ORENSTEIN, J., MOSS, B. & LENARDO, M. J. 2003. A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses. *J Biol Chem*, 278, 51613-21.
- CHAN, W. S., MARSHALL, J. F., SVENSEN, R., PHILLIPS, D. & HART, I. R. 1987. Photosensitising activity of phthalocyanine dyes screened against tissue culture cells. *Photochemistry and Photobiology*, 45, 757-761.
- CHAN, W. S., SVENSEN, R., PHILLIPS, D. & HART, I. R. 1986. Cell uptake, distribution and response to aluminium chloro sulphonated phthalocyanine, a potential anti-tumour photosensitizer. *Br J Cancer*, 53, 255-263.
- CHATTERJEE, S. R., POSSEL, H., SRIVASTAVA, T. S., KAMAT, J. P., WOLF, G. & DEVASAGAYAM, T. P. 1999. Photodynamic effects induced by meso-tetrakis[4-

- (carboxymethyleneoxy)phenyl] porphyrin on isolated Sarcoma 180 ascites mitochondria. *J Photochem Photobiol B*, 50, 79-87.
- CHIO-SRICHAN, S., OUDRHIRI, N., BENNACEUR-GRISCELLI, A., TURHAN, A. G., DUMAS, P. & REFREGIERS, M. 2010. Toxicity and phototoxicity of Hypocrellin A on malignant human cell lines, evidence of a synergistic action of photodynamic therapy with Imatinib mesylate. *J Photochem Photobiol B*, 99, 100-4.
- CHOI, C.-F., TSANG, P.-T., HUANG, J.-D., CHAN, E. Y. M., KO, W.-H., FONG, W.-P. & NG, D. K. P. 2004. Synthesis and in vitro photodynamic activity of new hexadeca-carboxy phthalocyanines. *Chemical Communications*, 10.1039/B405868B, 2236-2237.
- CHRISTOFFERSON, D. E. & YUAN, J. 2010. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Current opinion in cell biology*, 22, 263-268.
- 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, N. L. & 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, 349-55.
- JACOBSON, M. D., WEIL, M. & RAFF, M. C. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell*, 88, 347-54.
- JIANG, X.-J., YEUNG, S.-L., LO, P.-C., FONG, W.-P. & NG, D. K. P. 2011. Phthalocyanine–Polyamine Conjugates as Highly Efficient Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54, 320-330.
- JOMOVA, K. & VALKO, M. 2011. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283, 65-87.
- JORI, G., FABRIS, C., SONCIN, M., FERRO, S., COPPELLOTTI, O., DEI, D., FANTETTI, L., CHITI, G. & RONCUCCI, G. 2006. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: Basic principles and perspective applications. *Lasers in Surgery and Medicine*, 38, 468-481.
- JOSEFSEN, L. B. & BOYLE, R. W. 2008a. Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. *Met Based Drugs*, 2008, 276109.
- JOSEFSEN, L. B. & BOYLE, R. W. 2008b. Photodynamic therapy: novel third-generation photosensitizers one step closer? *British Journal of Pharmacology*, 154, 1-3.
- JOZA, N., SUSIN, S. A., DAUGAS, E., STANFORD, W. L., CHO, S. K., LI, C. Y., SASAKI, T., ELIA, A. J., CHENG, H. Y., RAVAGNAN, L., FERRI, K. F., ZAMZAMI, N., WAKEHAM, A., HAKEM, R., YOSHIDA, H., KONG, Y. Y., MAK, T. W., ZUNIGA-PFLUCKER, J. C., KROEMER, G. & PENNINGER, J. M. 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 410, 549-54.

- KACZMAREK, A., VANDENABEELE, P. & KRYSKO, D. V. 2013. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity*, 38, 209-23.
- KADISH, K. M., SMITH, K. M. & GUILARD, R. (eds.) 2010. *Handbook of Porphyrin Science*, Singapore: World Scientific Publishing.
- KAMARULZAMAN, E. E., BENACHOUR, H., BARBERI-HEYOB, M., FROCHOT, C. L., WAHAB, H. A., GUILLEMIN, F. O. & VANDERESSE, R. G. 2011. Vascular-Targeted Photodynamic Therapy (VTP). In: GALI-MUHTASIB, H. (ed.) *Advances in Cancer Therapy*. InTech.
- KANOFSKY, J. R. 1983. Singlet oxygen production by lactoperoxidase - evidence from 1270-nm chemi-luminescence. *Journal of Biological Chemistry*, 258, 5991-5993.
- KANOFSKY, J. R. & AXELROD, B. 1986. Singlet oxygen production by soybean lipoygenase isozymes. *Journal of Biological Chemistry*, 261, 1099-1104.
- KANOFSKY, J. R., WRIGHT, J., MILES-RICHARDSON, G. E. & TAUBER, A. I. 1984. Biochemical requirements for singlet oxygen production by purified human myeloperoxidase. *Journal of Clinical Investigation*, 74, 1489-1495.
- KAUR, J. & DEBNATH, J. 2015. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16, 461-72.
- KE, M. S., XUE, L.-Y., FEYES, D. K., AZIZUDDIN, K., BARON, E. D., MCCORMICK, T. S., MUKHTAR, H., PANNEERSELVAM, A., SCHLUCHTER, M. D., COOPER, K. D., OLEINICK, N. L. & STEVENS, S. R. 2008. Apoptosis Mechanisms Related to the Increased Sensitivity of Jurkat T-cells versus A431 Epidermoid Cells to Photodynamic Therapy with the Phthalocyanine Pc 4. *Photochemistry and Photobiology*, 84, 819-819.
- KELLY, J. F. & SNELL, M. E. 1976. Hematoporphyrin derivative: a possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder. *J Urol*, 115, 150-1.
- KENNEDY, J. C. & POTTIER, R. H. 1992. Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*, 14, 275-92.
- KESSEL, D. 2002. Relocalization of cationic porphyrins during photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci*, 1, 837-40.
- KESSEL, D. & CASTELLI, M. 2001. Evidence that bcl-2 is the target of three photosensitizers that induce a rapid apoptotic response. *Photochem Photobiol*, 74, 318-22.
- KESSEL, D., CASTELLI, M. & REINERS, J. J. 2005a. Ruthenium red-mediated suppression of Bcl-2 loss and Ca(2+) release initiated by photodamage to the endoplasmic reticulum: scavenging of reactive oxygen species. *Cell Death Differ*, 12, 502-11.
- KESSEL, D., CONLEY, M., VICENTE, M. G. & REINERS, J. J. 2005b. Studies on the subcellular localization of the porphyrin CPO. *Photochem Photobiol*, 81, 569-72.

- KESSEL, D. & LUO, Y. 2001. Intracellular sites of photodamage as a factor in apoptotic cell death. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 5, 181-184.
- KESSEL, D., LUO, Y., DENG, Y. & CHANG, C. K. 1997. The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*, 65, 422-6.
- KIM, J., SANTOS, O. A. & PARK, J. H. 2014. Selective photosensitizer delivery into plasma membrane for effective photodynamic therapy. *J Control Release*, 191, 98-104.
- KLEEMANN, B., LOOS, B., SCRIBA, T. J., LANG, D. & DAVIDS, L. M. 2014. St John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) photomedicine: hypericin-photodynamic therapy induces metastatic melanoma cell death. *PLoS One*, 9, e103762.
- KLOEK, J., AKKERMANS, W. & BEIJERSBERGEN VAN HENEGOUWEN, G. M. 1998. Derivatives of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy: enzymatic conversion into protoporphyrin. *Photochem Photobiol*, 67, 150-4.
- KOBAYASHI, N., OGATA, H., NONAKA, N. & LUK'YANETS, E. A. 2003. Effect of peripheral substitution on the electronic absorption and fluorescence spectra of metal-free and zinc phthalocyanines. *Chemistry*, 9, 5123-34.
- KOCHEVAR, I. E. 1981. Phototoxicity Mechanisms: Chlorpromazine Photosensitized Damage to DNA and Cell Membranes. *Journal of Investigative Dermatology*, 77, 59-64.
- KONOPKA, K. & GOSLINSKI, T. 2007. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res*, 86, 694-707.
- KOSTKA, M., ZIMCIK, P., MILETIN, M., KLEMERA, P., KOPECKY, K. & MUSIL, Z. 2006. Comparison of aggregation properties and photodynamic activity of phthalocyanines and azaphthalocyanines. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 178, 16-25.
- KÜBLER, A. C., DE CARPENTIER, J., HOPPER, C., LEONARD, A. G. & PUTNAM, G. 2001. Treatment of squamous cell carcinoma of the lip using Foscan-mediated photodynamic therapy. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 30, 504-9.
- LAM, M., OLEINICK, N. L. & NIEMINEN, A. L. 2001. Photodynamic therapy-induced apoptosis in epidermoid carcinoma cells. Reactive oxygen species and mitochondrial inner membrane permeabilization. *J Biol Chem*, 276, 47379-86.
- LANG, A. R. 2009. *Dyes and Pigments: New Research*, New York, Nova Science Publishers.
- LANG, K., WAGNEROVÁ, D. M., KUBÁT, P. & ENGST, P. 1994. Quenching of Triplet State Metallophthalocyanines by Dioxygen in the Presence of Bovine Serum Albumin. *Zeit.Phys. Chem.*, 187, 213-221.
- LEBEDEVA, N. S., POPOVA, T. E., MAL'KOVA, E. A. & GUBAREV, Y. A. 2013. Formation of bovine serum albumin associates with zinc tetra(4,4'-carboxy)phenylamino- and tetra-(4,4'-carboxy)phenoxy phthalocyanines in aqueous-organic solutions at 298 K. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 87, 2030-2033.

- LEE, E. W., SEO, J., JEONG, M., LEE, S. & SONG, J. 2012. The roles of FADD in extrinsic apoptosis and necroptosis. *BMB Rep*, 45, 496-508.
- LEITE, D. P., PAOLILLO, F. R., PARMESANO, T. N., FONTANA, C. R. & BAGNATO, V. S. 2014. Effects of photodynamic therapy with blue light and curcumin as mouth rinse for oral disinfection: a randomized controlled trial. *Photomed Laser Surg*, 32, 627-32.
- LEONARD, S. S., HARRIS, G. K. & SHI, X. 2004. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic Biol Med*, 37, 1921-42.
- LI, H., JENSEN, T. J., FRONCZEK, F. R. & VICENTE, M. G. 2008. Syntheses and properties of a series of cationic water-soluble phthalocyanines. *J Med Chem*, 51, 502-11.
- LI, H., ZHU, H., XU, C.-J. & YUAN, J. 1998. Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell*, 94, 491-501.
- LI, L. Y., LUO, X. & WANG, X. 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, 412, 95-9.
- LI, X.-S., GUO, J., ZHUANG, J.-J., ZHENG, B.-Y., KE, M.-R. & HUANG, J.-D. 2015a. Highly positive-charged zinc(II) phthalocyanine as non-aggregated and efficient antifungal photosensitizer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25, 2386-2389.
- LI, X.-S., KE, M.-R., ZHANG, M.-F., TANG, Q.-Q., ZHENG, B.-Y. & HUANG, J.-D. 2015b. A non-aggregated and tumour-associated macrophage-targeted photosensitiser for photodynamic therapy: a novel zinc(ii) phthalocyanine containing octa-sulphonates. *Chemical Communications*, 51, 4704-4707.
- LI, Y. S., SONG, M. F., KASAI, H. & KAWAI, K. 2013. 8-hydroxyguanine in urine and serum as an oxidative stress marker: effects of diabetes and aging. *Juoeh*, 35, 119-27.
- LIN, C. P., LYNCH, M. C. & KOCHEVAR, I. E. 2000. Reactive Oxidizing Species Produced near the Plasma Membrane Induce Apoptosis in Bovine Aorta Endothelial Cells. *Exp Cell Res*, 259, 351-359.
- LINLEY, E., DENYER, S. P., MCDONNELL, G., SIMONS, C. & MAILLARD, J. Y. 2012. Use of hydrogen peroxide as a biocide: new consideration of its mechanisms of biocidal action. *J Antimicrob Chemother*, 67, 1589-96.
- LINSTEAD, R. P. 1933. The phthalocyanines: a new class of synthetic colours. *British Association for the Advancement of Science Report*. Leicester.
- LINSTEAD, R. P., NOBLE, E. G. & WRIGHT, J. M. 1937. Phthalocyanines. IX. Derivatives of thiophene, thionaphthene, pyridine and pyrazine, and a note on the nomenclature. *Journal of the Chemical Society*, 911-921.
- LIOCHEV, S. I. & FRIDOVICH, I. 1994. The role of O<sub>2</sub>·- in the production of HO·: in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med*, 16, 29-33.

- LIOCHEV, S. I. & FRIDOVICH, I. 2002. The Haber-Weiss cycle -- 70 years later: an alternative view. *Redox Rep*, 7, 55-7; author reply 59-60.
- LIPSON, R. L. & BALDES, E. J. 1960. The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative. *Arch Dermatol*, 82, 508-16.
- LIPSON, R. L., BALDES, E. J. & OLSEN, A. M. 1961. The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *J Natl Cancer Inst*, 26, 1-11.
- LIU, W., JENSEN, T. J., FRONCZEK, F. R., HAMMER, R. P., SMITH, K. M. & VICENTE, M. G. 2005. Synthesis and cellular studies of nonaggregated water-soluble phthalocyanines. *J Med Chem*, 48, 1033-41.
- LIU, X., JIANG, C., LI, Y., LIU, W., YAO, N., GAO, M., JI, Y., HUANG, D., YIN, Z., SUN, Z., NI, Y. & ZHANG, J. 2015. Evaluation of Hypericin: Effect of Aggregation on Targeting Biodistribution. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104, 215-222.
- LOCKSHIN, R. A. & WILLIAMS, C. M. 1964. Programmed cell death—II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmths. *Journal of Insect Physiology*, 10, 643-649.
- LOH, C. S., VERNON, D., MACROBERT, A. J., BEDWELL, J., BOWN, S. G. & BROWN, S. B. 1993. Endogenous porphyrin distribution induced by 5-aminolaevulinic acid in the tissue layers of the gastrointestinal tract. *J Photochem Photobiol B*, 20, 47-54.
- LUKYANETS, E. A. & NEMYKIN, V. N. 2010. The key role of peripheral substituents in the chemistry of phthalocyanines and their analogs. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 14, 1-40.
- LUXFORD, C., DEAN, R. T. & DAVIES, M. J. 2002. Induction of DNA damage by oxidised amino acids and proteins. *Biogerontology*, 3, 95-102.
- MACDONALD, I. J. & DOUGHERTY, T. J. 2001. Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 5, 105-129.
- MAGARAGGIA, M., FACCENDA, F., GANDOLFI, A. & JORI, G. 2006. Treatment of microbiologically polluted aquaculture waters by a novel photochemical technique of potentially low environmental impact. *Journal of Environmental Monitoring*, 8, 923-931.
- MACHACEK, M., CIDLINA, A., NOVAKOVA, V., SVEC, J., RUDOLF, E., MILETIN, M., KUCERA, R., SIMUNEK, T. & ZIMCIK, P. 2015. Far-red-absorbing cationic phthalocyanine photosensitizers: synthesis and evaluation of the photodynamic anticancer activity and the mode of cell death induction. *J Med Chem*, 58, 1736-49.
- MACHACEK, M., DEMUTH, J., CERMAK, P., VAVRECKOVA, M., HRUBA, L., JEDLICKOVA, A., KUBAT, P., SIMUNEK, T., NOVAKOVA, V. & ZIMCIK, P. 2016, manuskript. Tetra(3,4-pyrido)porphyrazines caught in the cationic cage: toward nanomolar active photosensitizers.
- MACHACEK, M., KOLLAR, J., MILETIN, M., KUCERA, R., KUBAT, P., SIMUNEK, T., NOVAKOVA, V. & ZIMCIK, P. 2016. Anionic hexadeca-carboxylate



- tetrapyrazinoporphyrazine: synthesis and in vitro photodynamic studies of a water-soluble, non-aggregating photosensitizer. *RSC Advances*, 6, 10064-10077.
- MACHACEK, M., PODHORSKA, G., FIKROVA, P., VAVROVA, A., BRAZDOVA, P., HROCH, M., NACHTIGAL, P., NOVAKOVA, V., ZIMCIK, P. & SIMUNEK, T. nepublikovaná data. In vitro evaluation of water soluble cationic zinc phthalocyanine and azaphthalocyanine photosensitizers for vascular targeted photodynamic therapy.
- MAKHSEED, S., MACHACEK, M., ALFADLY, W., TUHL, A., VINODH, M., SIMUNEK, T., NOVAKOVA, V., KUBAT, P., RUDOLF, E. & ZIMCIK, P. 2013. Water-soluble non-aggregating zinc phthalocyanine and in vitro studies for photodynamic therapy. *Chemical Communications*, 49, 11149-11151.
- MANSILLA, S., PRIEBE, W. & PORTUGAL, J. 2006. Mitotic catastrophe results in cell death by caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Cell Cycle*, 5, 53-60.
- MARIAPPAN, P., RAI, B., EL-MOKADEM, I., ANDERSON, C. H., LEE, H., STEWART, S. & DONAT, R. 2015. Real-life Experience: Early Recurrence With Hexvix Photodynamic Diagnosis-assisted Transurethral Resection of Bladder Tumour vs Good-quality White Light TURBT in New Non-muscle-invasive Bladder Cancer. *Urology*, 86, 327-331.
- MARINO, J., GARCÍA VIOR, M. C., DICELIO, L. E., ROGUIN, L. P. & AWRUCH, J. 2010. Photodynamic effects of isosteric water-soluble phthalocyanines on human nasopharynx KB carcinoma cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 4129-4139.
- MARNETT, L. J. 1999. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 424, 83-95.
- MARTÍ, C., NONELL, S., NICOLAU, M. & TORRES, T. 2000. Photophysical Properties of Neutral and Cationic Tetrapyrrolynes. *Photochemistry and Photobiology*, 71, 53-59.
- MATHESON, I. B., ETHERIDGE, R. D., KRATOWICH, N. R. & LEE, J. 1975. The quenching of singlet oxygen by amino acids and proteins. *Photochem Photobiol*, 21, 165-71.
- MAZOR, O., BRANDIS, A., PLAKS, V., NEUMARK, E., ROSENBAACH-BELKIN, V., SALOMON, Y. & SCHERZ, A. 2005. WST11, a novel water-soluble bacteriochlorophyll derivative; cellular uptake, pharmacokinetics, biodistribution and vascular-targeted photodynamic activity using melanoma tumors as a model. *Photochem Photobiol*, 81, 342-51.
- MCINTOSH, J. R. 1984. Cell biology. Microtubule catastrophe. *Nature*, 312, 196-7.
- MELLISH, K. J., COX, R. D., VERNON, D. I., GRIFFITHS, J. & BROWN, S. B. 2002. In vitro photodynamic activity of a series of methylene blue analogues. *Photochem Photobiol*, 75, 392-7.

- MEYER-BETZ, F. 1913. Untersuchungen über die biologische (photodynamische) Wirkung des Hamatoporphyrins und andere Derivate des Blut- und Galenfarbstoffs. *Dtsch. Arch. Klin. Med.*, 112, 476-503.
- MICHIELS, C., RAES, M., TOUSSAINT, O. & REMACLE, J. 1994. Importance of S-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 17, 235-48.
- MITRA, S. & FOSTER, T. H. 2005. Photophysical parameters, photosensitizer retention and tissue optical properties completely account for the higher photodynamic efficacy of meso-tetra-hydroxyphenyl-chlorin vs Photofrin. *Photochem Photobiol*, 81, 849-59.
- MIZUSHIMA, N., YOSHIMORI, T. & OHSUMI, Y. 2011. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 27, 107-32.
- MOAN, J., MA, L. W. & IANI, V. 2001. On the pharmacokinetics of topically applied 5-aminolevulinic acid and two of its esters. *Int J Cancer*, 92, 139-143.
- MONASTYRSKA, I., RIETER, E., KLIONSKY, D. J. & REGGIORI, F. 2009. Multiple roles of the cytoskeleton in autophagy. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 84, 431-48.
- MOOR, A. C. 2000. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*, 57, 1-13.
- MORGAN, P. E., DEAN, R. T. & DAVIES, M. J. 2002. Inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by peptide and protein peroxides generated by singlet oxygen attack. *Eur J Biochem*, 269, 1916-25.
- MORRIS, R. L., AZIZUDDIN, K., LAM, M., BERLIN, J., NIEMINEN, A. L., KENNEY, M. E., SAMIA, A. C., BURDA, C. & OLEINICK, N. L. 2003. Fluorescence resonance energy transfer reveals a binding site of a photosensitizer for photodynamic therapy. *Cancer Res*, 63, 5194-7.
- MORTON, C. A. 2003. Methyl aminolevulinate (Metvix) photodynamic therapy - practical pearls. *J Dermatolog Treat*, 14 Suppl 3, 23-6.
- NAGATA, S., SUZUKI, J., SEGAWA, K. & FUJII, T. 2016. Exposure of phosphatidylserine on the cell surface. *Cell Death Differ*, 23, 952-61.
- NOODT, B. B., RODAL, G. H., WAINWRIGHT, M., PENG, Q., HOROBIN, R., NESLAND, J. M. & BERG, K. 1998. Apoptosis induction by different pathways with methylene blue derivative and light from mitochondrial sites in V79 cells. *Int J Cancer*, 75, 941-8.
- NYMAN, E. S. & HYNINEN, P. H. 2004. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 73, 1-28.
- ODA, K., OGURA, S. & OKURA, I. 2000. Preparation of a water-soluble fluorinated zinc phthalocyanine and its effect for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*, 59, 20-5.

- OLEINICK, N. L., MORRIS, R. L. & BELICHENKO, I. 2002. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem Photobiol Sci*, 1, 1-21.
- ORMOND, A. & FREEMAN, H. 2013. Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. *Materials*, 6, 817.
- OTAKE, E., SAKUMA, S., TORII, K., MAEDA, A., OHI, H., YANO, S. & MORITA, A. 2010. Effect and mechanism of a new photodynamic therapy with glycoconjugated fullerene. *Photochem Photobiol*, 86, 1356-63.
- PANDEY, R. K., BELLNIER, D. A., SMITH, K. M. & DOUGHERTY, T. J. 1991. Chlorin and porphyrin derivatives as potential photosensitizers in photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 53, 65-72.
- PANDEY, R. K., SUMLIN, A. B., CONSTANTINE, S., AOUDIA, M., POTTER, W. R., BELLNIER, D. A., HENDERSON, B. W., RODGERS, M. A., SMITH, K. M. & DOUGHERTY, T. J. 1996. Alkyl Ether Analogs of Chlorophyll-a Derivatives: Part I. Synthesis, Photophysical Properties and Photodynamic Efficacy. *Photochemistry and Photobiology*, 64, 194-204.
- PANGKA, V. S., MORGAN, A. R. & DOLPHIN, D. 1986. Diels-Alder Reactions of Protoporphyrin IX Dimethyl Ester with Electron-Deficient Alkynes. *J. Org. Chem.*, 51, 1094-1100.
- PECORINO, L. 2012. *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics* Oxford, Oxford University Press.
- PLAETZER, K., KRAMMER, B., BERLANDA, J., BERR, F. & KIESSLICH, T. 2009. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med Sci*, 24, 259-68.
- POGUE, B. W., REDMOND, R. W., TRIVEDI, N. & HASAN, T. 1998. Photophysical properties of tin ethyl etiopurpurin I (SnET2) and tin octaethylbenzochlorin (SnOEBC) in solution and bound to albumin. *Photochem Photobiol*, 68, 809-15.
- POOLE, B. & OHKUMA, S. 1981. Effect of weak bases on the intralysosomal pH in mouse peritoneal macrophages. *J Cell Biol*, 90, 665-9.
- PRIME, J. 1900. *Les accidentes toxiques par l'eosinate de sodium*, Paris, Jouve et Boyer
- PROSKURYAKOV, S. Y., KONOPLYANNIKOV, A. G. & GABAI, V. L. 2003. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res*, 283, 1-16.
- RAAB, O. 1900. Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. *Zeitung Biol*, 39, 524-526.
- RAHMANTO, A. S., MORGAN, P. E., HAWKINS, C. L. & DAVIES, M. J. 2010. Cellular effects of peptide and protein hydroperoxides. *Free Radic Biol Med*, 48, 1071-8.
- RASHID, F. & HOROBIN, R. W. 1990. Interaction of molecular probes with living cells and tissues. Part 2. A structure-activity analysis of mitochondrial staining by cationic

- probes, and a discussion of the synergistic nature of image-based and biochemical approaches. *Histochemistry*, 94, 303-8.
- REINERS, J. J., JR., AGOSTINIS, P., BERG, K., OLEINICK, N. L. & KESSEL, D. 2010. Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy. *Autophagy*, 6, 7-18.
- REINERS, J. J., JR., CARUSO, J. A., MATHIEU, P., CHELLADURAI, B., YIN, X. M. & KESSEL, D. 2002. Release of cytochrome c and activation of pro-caspase-9 following lysosomal photodamage involves Bid cleavage. *Cell Death Differ*, 9, 934-44.
- RELLO-VARONA, S., STOCKERT, J. C., CANETE, M., ACEDO, P. & VILLANUEVA, A. 2008. Mitotic catastrophe induced in HeLa cells by photodynamic treatment with Zn(II)-phthalocyanine. *Int J Oncol*, 32, 1189-96.
- RICE, L., WAINWRIGHT, M. & PHOEMIX, D. A. 2000. Phenothiazine photosensitizers. III. Activity of methylene blue derivatives against pigmented melanoma cell lines. *J Chemother*, 12, 94-104.
- ROBERTSON, J. M. & WOODWARD, I. 1940. 7. An X-ray study of the phthalocyanines. Part IV. Direct quantitative analysis of the platinum compound. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 10.1039/JR9400000036, 36-48.
- RUSSELL, P. & NURSE, P. 1986. cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell*, 45, 145-53.
- SAFA, A. R. 2012. c-FLIP, a master anti-apoptotic regulator. *Exp Oncol*, 34, 176-84.
- SAFTIG, P. & KLUMPERMAN, J. 2009. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 623-35.
- SAKAMOTO, K., KATO, T., KAWAGUCHI, T., OHNO-OKUMURA, E., URANO, T., YAMAOKA, T., SUZUKI, S. & COOK, M. J. 2002. Photosensitizer efficacy of non-peripheral substituted alkylbenzopyridoporphyrazines for photodynamic therapy of cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 153, 245-253.
- SAKAMOTO, K., KATO, T., OHNO-OKUMURA, E., WATANABE, M. & COOK, M. J. 2005. Synthesis of novel cationic amphiphilic phthalocyanine derivatives for next generation photosensitizer using photodynamic therapy of cancer. *Dyes and Pigments*, 64, 63-71.
- SATO, K., NAGAYA, T., CHOYKE, P. L. & KOBAYASHI, H. 2015. Near infrared photoimmunotherapy in the treatment of pleural disseminated NSCLC: preclinical experience. *Theranostics*, 5, 698-709.
- SENIGE, M. O. & BRANDT, J. C. 2011. Temoporfin (Foscan®), 5,10,15,20-Tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin—A Second-generation Photosensitizer†,‡. *Photochemistry and Photobiology*, 87, 1240-1296.
- SENOVILLA, L., VITALE, I., GALLUZZI, L., VIVET, S., JOZA, N., YOUNES, A. B., RELLO-VARONA, S., CASTEDO, M. & KROEMER, G. 2009. p53 represses the polyploidization of primary mammary epithelial cells by activating apoptosis. *Cell Cycle*, 8, 1380-5.

- SEOTSANYANA-MOKHOSI, I., KUZNETSOVA, N. & NYOKONG, T. 2001. Photochemical studies of tetra-2,3-pyridinoporphyrazines. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 140, 215-222.
- SESSLER, J. L., HEMMI, G., MODY, T. D., MURAI, T., BURRELL, A. & YOUNG, S. W. 1994. Texaphyrins: Synthesis and Applications. *Accounts of Chemical Research*, 27, 43-50.
- SHARMAN, W. M., ALLEN, C. M. & VAN LIER, J. E. 2000. Role of activated oxygen species in photodynamic therapy. *Methods Enzymol*, 319, 376-400.
- SCHERZ-SHOVAL, R. & ELAZAR, Z. 2007. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends Cell Biol*, 17, 422-7.
- SCHULZE-OSTHOFF, K., FERRARI, D., LOS, M., WESSELBORG, S. & PETER, M. E. 1998. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem*, 254, 439-59.
- SCHWARZ, S., ABSOLON, K. & VERMUND, H. 1955. Some relationship of porphyrins, X-rays and tumors. *Univ. Minnesota Med. Bull*, 27, 7-8.
- SCHWEICHEL, J. U. & MERKER, H. J. 1973. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology*, 7, 253-66.
- SIES, H. 1986. Biochemistry of Oxidative Stress. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 25, 1058-1071.
- SILVA, J. N., FILIPE, P., MORLIERE, P., MAZIERE, J. C., FREITAS, J. P., GOMES, M. M. & SANTUS, R. 2008. Photodynamic therapy: Dermatology and ophthalmology as main fields of current applications in clinic. *Biomed Mater Eng*, 18, 319-27.
- SOARES, A. R., NEVES, M. G., TOME, A. C., IGLESIAS-DE LA CRUZ, M. C., ZAMARRON, A., CARRASCO, E., GONZALEZ, S., CAVALEIRO, J. A., TORRES, T., GULDI, D. M. & JUARRANZ, A. 2012. Glycophthalocyanines as photosensitizers for triggering mitotic catastrophe and apoptosis in cancer cells. *Chem Res Toxicol*, 25, 940-51.
- SOLER, D. C., OHTOLA, J., SUGIYAMA, H., RODRIGUEZ, M. E., HAN, L., OLEINICK, N. L., LAM, M., BARON, E. D., COOPER, K. D. & MCCORMICK, T. S. 2016. Activated T cells exhibit increased uptake of silicon phthalocyanine Pc 4 and increased susceptibility to Pc 4-photodynamic therapy-mediated cell death. *Photochem Photobiol Sci*, 15, 822-31.
- SPIKES, J. D. 1985. The Historical Development of Ideas on Applications of Photosensitized Reactions in the Health Sciences. In: BENSASSON, R. V., JORI, G., LAND, E. J. & TRUSCOTT, T. G. (eds.) *Primary Photo-Processes in Biology and Medicine*. Springer US.
- SPIKES, J. D. 1998. Photosensitizing properties of quinine and synthetic antimalarials. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 42, 1-11.
- SRINIVASULA, S. M., GUPTA, S., DATTA, P., ZHANG, Z., HEGDE, R., CHEONG, N., FERNANDES-ALNEMRI, T. & ALNEMRI, E. S. 2003. Inhibitor of apoptosis

- proteins are substrates for the mitochondrial serine protease Omi/HtrA2. *J Biol Chem*, 278, 31469-72.
- STAICU, A., PASCU, A., BONI, M., PASCU, M. L. & ENESCU, M. 2013. Photophysical study of Zn phthalocyanine in binary solvent mixtures. *Journal of Molecular Structure*, 1044, 188-193.
- STERNBERG, E. D., DOLPHIN, D. & BRÜCKNER, C. 1998. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron*, 54, 4151-4202.
- SZACIŁOWSKI, K., MACYK, W., DRZEWIECKA-MATUSZEK, A., BRINDELL, M. & STOCHEL, G. 2005. Bioinorganic Photochemistry: Frontiers and Mechanisms. *Chemical Reviews*, 105, 2647-2694.
- SZEIMIES, R.-M., LISCHNER, S., PHILIPP-DORMSTON, W., WALKER, T., HIEPE-WEGENER, D., FEISE, K., PODDA, M., PRAGER, W., KOHL, E. & KARRER, S. 2013. Photodynamic therapy for skin rejuvenation: treatment options – results of a consensus conference of an expert group for aesthetic photodynamic therapy. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 11, 632-636.
- SZULBINSKI, W. S. & KINCAID, J. R. 1998. Synthesis and Spectroscopic Characterization of Zinc Tetra(3,4-pyridine)Porphyrine Entrapped within the Supercages of Y-Zeolite. *Inorg Chem*, 37, 5014-5020.
- TAIT, S. W. & GREEN, D. R. 2013. Mitochondrial regulation of cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5.
- TAJEDDINE, N. 2016. How do reactive oxygen species and calcium trigger mitochondrial membrane permeabilisation? *Biochim Biophys Acta*, 1860, 1079-88.
- TARDIVO, J. P., DEL GIGLIO, A., DE OLIVEIRA, C. S., GABRIELLI, D. S., JUNQUEIRA, H. C., TADA, D. B., SEVERINO, D., DE FÁTIMA TURCHIELLO, R. & BAPTISTA, M. S. 2005. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2, 175-191.
- TEITEN, M. H., BEZDETNYAYA, L., MORLIERE, P., SANTUS, R. & GUILLEMIN, F. 2003. Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are the preferential sites of Foscan localisation in cultured tumour cells. *Br J Cancer*, 88, 146-52.
- TSUJIMOTO, Y. & SHIMIZU, S. 2005. Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ*, 12, 1528-1534.
- TURRENS, J. F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, 552, 335-44.
- USACHEVA, M. N., TEICHERT, M. C. & BIEL, M. A. 2003. The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 71, 87-98.
- USUDA, J., CHIU, S. M., MURPHY, E. S., LAM, M., NIEMINEN, A. L. & OLEINICK, N. L. 2003. Domain-dependent photodamage to Bcl-2. A membrane anchorage region is

- needed to form the target of phthalocyanine photosensitization. *J Biol Chem*, 278, 2021-9.
- VACHOVA, L., MACHACEK, M., KUCERA, R., DEMUTH, J., CERMAK, P., KOPECKY, K., MILETIN, M., JEDLICKOVA, A., SIMUNEK, T., NOVAKOVA, V. & ZIMCIK, P. 2015. Heteroatom-substituted tetra(3,4-pyrido)porphyrazines: a stride toward near-infrared-absorbing macrocycles. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 13, 5608-5612.
- VAKIFAHMETOGLU, H., OLSSON, M. & ZHIVOTOVSKY, B. 2008. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ*, 15, 1153-62.
- VALAVANIDIS, A., VLACHOGIANNI, T. & FIOTAKIS, C. 2009. 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 27, 120-139.
- VALKO, M., RHODES, C. J., MONCOL, J., IZAKOVIC, M. & MAZUR, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 160, 1-40.
- VAN GEEL, I. P., OPPELAAR, H., OUSSOREN, Y. G., VAN DER VALK, M. A. & STEWART, F. A. 1995. Photosensitizing efficacy of MTHPC-PDT compared to photofrin-PDT in the RIF1 mouse tumour and normal skin. *Int J Cancer*, 60, 388-94.
- VANDENABEELE, P., GALLUZZI, L., VANDEN BERGHE, T. & KROEMER, G. 2010. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 700-14.
- VANLANDINGHAM, P. A. & CERESA, B. P. 2009. Rab7 regulates late endocytic trafficking downstream of multivesicular body biogenesis and cargo sequestration. *J Biol Chem*, 284, 12110-24.
- VERMES, I., HAANEN, C., STEFFENS-NAKKEN, H. & REUTELINGSPERGER, C. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*, 184, 39-51.
- VITALE, I., GALLUZZI, L., CASTEDO, M. & KROEMER, G. 2011. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12, 385-92.
- VITALE, I., SENOVILLA, L., JEMÀ, M., MICHAUD, M., GALLUZZI, L., KEPP, O., NANTY, L., CRIOLLO, A., RELLO-VARONA, S., MANIC, G., MÉTIVIER, D., VIVET, S., TAJEDDINE, N., JOZA, N., VALENT, A., CASTEDO, M. & KROEMER, G. 2010. Multipolar mitosis of tetraploid cells: inhibition by p53 and dependency on Mos. *The EMBO Journal*, 29, 1272-1284.
- VOGT, C. C. 1842. *Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (Alytes obstetricians)*. Solothurn, Jent und Gassman
- VON TAPPEINER, H. 1900. Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien nach Versuchen von Raab. *Münchener Medizinische Wochenschrift*, 1, 5-7.

- VON TAPPEINER, H. & JESIONEK, A. 1903. Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. *Münchener Medizinische Wochenschrift*, 47, 2042–2044.
- VON TAPPEINER, H. & JESIONEK, A. 1907. *Die sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen. Gesammelte Untersuchungen über die photodynamische Erscheinung.*, Leipzig F.C.W. Vogel
- VON TAPPEINER, H. & JODLBAUER, A. 1904. Über die Wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) Stoffe auf Infusorien. *Deutsches Archiv der Klinischen Medizin*, 80, 427–487.
- WAINWRIGHT, M. 1996. Non-porphyrin photosensitizers in biomedicine. *Chemical Society Reviews*, 25, 351-359.
- WAINWRIGHT, M. 2004. Photoinactivation of viruses. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 3, 406-411.
- WAKSMAN, R., MCEWAN, P. E., MOORE, T. I., PAKALA, R., KOLODZIE, F. D., HELLINGA, D. G., SEABRON, R. C., RYCHNOVSKY, S. J., VASEK, J., SCOTT, R. W. & VIRMANI, R. 2008. PhotoPoint photodynamic therapy promotes stabilization of atherosclerotic plaques and inhibits plaque progression. *J Am Coll Cardiol*, 52, 1024-32.
- WANG, L., DU, F. & WANG, X. 2008. TNF- $\alpha$  Induces Two Distinct Caspase-8 Activation Pathways. *Cell*, 133, 693-703.
- WARD, C., MARTINEZ-LOPEZ, N., OTTEN, E. G., CARROLL, B., MAETZEL, D., SINGH, R., SARKAR, S. & KOROLCHUK, V. I. 2016. Autophagy, lipophagy and lysosomal lipid storage disorders. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861, 269-284.
- WEERSINK, R. A., BOGAARDS, A., GERTNER, M., DAVIDSON, S. R., ZHANG, K., NETCHEV, G., TRACHTENBERG, J. & WILSON, B. C. 2005a. Techniques for delivery and monitoring of TOOKAD (WST09)-mediated photodynamic therapy of the prostate: clinical experience and practicalities. *J Photochem Photobiol B*, 79, 211-22.
- WEERSINK, R. A., FORBES, J., BISLAND, S., TRACHTENBERG, J., ELHILALI, M., BRUN, P. H. & WILSON, B. C. 2005b. Assessment of cutaneous photosensitivity of TOOKAD (WST09) in preclinical animal models and in patients. *Photochem Photobiol*, 81, 106-13.
- WEYERGANG, A., BERG, K., KAALHUS, O., PENG, Q. & SELBO, P. K. 2009. Photodynamic therapy targets the mTOR signaling network in vitro and in vivo. *Mol Pharm*, 6, 255-64.
- WILSON, B. C., JEEVES, W. P. & LOWE, D. M. 1985. In vivo and post mortem measurements of the attenuation spectra of light in mammalian tissues. *Photochem Photobiol*, 42, 153-62.
- WOLF-SCHNURRBUSCH, U. E. K., BRINKMANN, C. K., BERGER, L. & WOLF, S. 2011. Effects of combination therapy with verteporfin photodynamic therapy and



- ranibizumab in patients with age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmologica*, 89, 585-590.
- WOODBURN, K. W., FAN, Q., MILES, D. R., KESSEL, D., LUO, Y. & YOUNG, S. W. 1997. Localization and efficacy analysis of the phototherapeutic lutetium texaphyrin (PCI-0123) in the murine EMT6 sarcoma model. *Photochem Photobiol*, 65, 410-5.
- WRIGHT, A., BUBB, W. A., HAWKINS, C. L. & DAVIES, M. J. 2002. Singlet Oxygen-mediated Protein Oxidation: Evidence for the Formation of Reactive Side Chain Peroxides on Tyrosine Residues¶. *Photochemistry and Photobiology*, 76, 35-46.
- XIA, C., WANG, Y., CHEN, W., YU, W., WANG, B. & LI, T. 2011. New hydrophilic/lipophilic tetra-alpha-(4-carboxyphenoxy) phthalocyanine zinc-mediated photodynamic therapy inhibits the proliferation of human hepatocellular carcinoma Bel-7402 cells by triggering apoptosis and arresting cell cycle. *Molecules*, 16, 1389-401.
- XUE, L.-Y., CHIU, S.-M., FIEBIG, A., ANDREWS, D. W. & OLEINICK, N. L. 2003. Photodamage to multiple Bcl-xL isoforms by photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4. *Oncogene*, 22, 9197-9204.
- YANO, S., HIROHARA, S., OBATA, M., HAGIYA, Y., OGURA, S.-I., IKEDA, A., KATAOKA, H., TANAKA, M. & JOH, T. 2011. Current states and future views in photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 12, 46-67.
- YASUI, H., DEO, K., OGURA, Y., YOSHIDA, H., SHIRAGA, T., KAGAYAMA, A. & SAKURAI, H. 2002. Evidence for singlet oxygen involvement in rat and human cytochrome P450-dependent substrate oxidations. *Drug Metab Pharmacokinet*, 17, 416-26.
- YOGO, T., URANO, Y., ISHITSUKA, Y., MANIWA, F. & NAGANO, T. 2005. Highly efficient and photostable photosensitizer based on BODIPY chromophore. *J Am Chem Soc*, 127, 12162-3.
- YOKOYAMA, Y., BECKMAN, J. S., BECKMAN, T. K., WHEAT, J. K., CASH, T. G., FREEMAN, B. A. & PARKS, D. A. 1990. Circulating xanthine oxidase: potential mediator of ischemic injury. *Am J Physiol*, 258, G564-70.
- YOSHIMORI, T., YAMAMOTO, A., MORIYAMA, Y., FUTAI, M. & TASHIRO, Y. 1991. Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J Biol Chem*, 266, 17707-12.
- YOUNG, S. W., WOODBURN, K. W., WRIGHT, M., MODY, T. D., FAN, Q., SESSLER, J. L., DOW, W. C. & MILLER, R. A. 1996. Lutetium Texaphyrin (PCI-0123): A Near-Infrared, Water-Soluble Photosensitizer. *Photochemistry and Photobiology*, 63, 892-897.
- YU, Z., PAN, W., LI, N. & TANG, B. 2016. A nuclear targeted dual-photosensitizer for drug-resistant cancer therapy with NIR activated multiple ROS. *Chemical Science*, 7, 4237-4244.

- YUAN, J. Y., SHAHAM, S., LEDOUX, S., ELLIS, H. M. & HORVITZ, H. R. 1993. The C-Elegans Cell-Death Gene Ced-3 Encodes a Protein Similar to Mammalian Interleukin-1-Beta-Converting Enzyme. *Cell*, 75, 641-652.
- ZHONG, H. & YIN, H. 2015. Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: Focusing on mitochondria. *Redox Biology*, 4, 193-199.
- ZIMCIK, P., MILETIN, M., RADILOVA, H., NOVAKOVA, V., KOPECKY, K., SVEC, J. & RUDOLF, E. 2010. Synthesis, Properties and In Vitro Photodynamic Activity of Water-soluble Azaphthalocyanines and Azanaphthalocyanines. *Photochemistry and Photobiology*, 86, 168-175.
- ZIMCIK, P., NOVAKOVA, V., KOPECKY, K., MILETIN, M., USLU KOBAK, R. Z., SVANDRLIKOVA, E., VÁCHOVÁ, L. & LANG, K. 2012. Magnesium Azaphthalocyanines: An Emerging Family of Excellent Red-Emitting Fluorophores. *Inorg Chem*, 51, 4215-4223.
- ZOU, Q., ZHAO, H., ZHAO, Y., FANG, Y., CHEN, D., REN, J., WANG, X., WANG, Y., GU, Y. & WU, F. 2015. Effective Two-Photon Excited Photodynamic Therapy of Xenograft Tumors Sensitized by Water-Soluble Bis(arylidene)cycloalkanone Photosensitizers. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58, 7949-7958.

## 9 SEZNAM ZKRATEK

$\Delta\Psi_m$	potenciál vnitřní mitochondriální membrány
8-OH-G	8-hydroxyguanin
AIF	apoptózu indukující faktor
ALA	5-aminolevulová kyselina
AMD	věkem podmíněná makulární degenerace
AzaPc	azaftalocyanin
BpD	derivát benzoporphyrinu
Cdk1	cyklin dependentní kinasa 1
c-FLIP	izoformy inhibičních proteinů buněčného FLICE
cIAP	buněčný IAP
CkB1	cyklin B1
CTCL	kožní T lymfocytom
CYTC	cytochrom c
DD	doména smrti
DIABLO	IAP přímo vážící protein s nízkým pI (synonymum SMAC)
DISC	signální komplex indukující smrt
DLI	interval mezi podáním fotosenzitizéru a ozářením
DMF	dimethylformamid
EC <sub>50</sub>	střední efektivní koncentrace (zde toxicita po ozáření)
ENDO G	endonukleasa G
ER	endoplazmatické retikulum
FADD	FAS asociovaný protein obsahující DD
FASL	FAS ligand
FLICE	IL-1 $\beta$ konvertující enzym podobný FADD
HALA	hexylester 5-aminolevulové kyseliny
HNE	4-hydroxy-2-nonenal
HpD	derivát hematoporphyrinu
<i>i.v.</i>	intravenózní podání
IAP	rodina proteinů inhibujících apoptózu
LAMP-1 a 2	membránový protein asociovaný s lyzosomy 1 a 2
MALA	metylester 5-aminolevulové kyseliny
MB	methylenová modř
MC	mitotická katastrofa
MDA	malondialdehyd
MOMP	permeabilizace vnější mitochondriální membrány
MPTP	mitochondriální permeabilní tranzitní pór

m-THPC	temoporfin, m-Tetra(hydroxyfenyl)chlorin, Foscan®
mTOR	kinasa savčí cíl rapamycinu
Nc	naftalocyanin
Pc	ftalocyanin
PCD	programovaná buněčná smrt
PDT	fotodynamická terapie
PE	fosfatidylethanolamin
PpIX	protoporfyrin IX
PS	fotosenzitizer
RIPK1 (RIP1)	s receptorem interagující proteinkinasa 1
ROS	reaktivní formy kyslíku
S <sub>0</sub>	základní singletový stav
S <sub>1</sub>	excitovaný singletový stav
SMAC	mitochondriální aktivátor kaspáz (synonymum DIABLO)
SOD	superoxiddismutasa
T <sub>1</sub>	tripletový stav
TC <sub>50</sub>	střední toxická koncentrace (zde toxicita bez přítomnosti aktivujícího záření)
TNFR1	receptor pro TNF 1
TNF $\alpha$	tumor nekrotizující faktor $\alpha$
TPPS <sub>4</sub>	sulfonovaný tetrafenylporfin 4
TPyPz	tetra(3,4-pyrido)porfyrizin
TPyzPz	tetrapyrizinoporfyrizin
TRADD	DD asociovaná s TNFR
TRAF2	faktor 2 asociovaný s TNFR
TRAIL	apoptózu indukující ligand související s TNF
TRAILR1 a 2	receptor pro TRAIL 1 a 2
VTP	fotodynamická terapie zaměřená na cévy
$\Phi_{\Delta}$	kvantový výtěžek singletového kyslíku
$\Phi_F$	kvantový výtěžek fluorescence

## 10 PŘEHLED PUBLIKACÍ ZAHRNUTÝCH V DISERTAČNÍ PRÁCI

- I. Makhseed S, Macháček M, Alfadly W, Tuhl A, Vinodh V, Šimůnek T, Nováková V, Kubát P, Rudolf E a Zimčík P. **Water-soluble non-aggregating zinc phthalocyanine and in vitro studies for photodynamic therapy.** *Chemical Communications*. 2013; 49(95): 11149-51. [IF<sub>2015</sub> = 6,567]
- II. Macháček M, Cidlina A, Nováková V, Švec J, Rudolf E, Miletín M, Kučera R, Šimůnek T, Zimčík P. **Far-red absorbing cationic phthalocyanine photosensitizers: Synthesis and evaluation of the photodynamic anti-cancer activity and the mode of cell death induction.** *Journal of Medicinal Chemistry*. 2015; 58(4): 1736–1749. [IF<sub>2015</sub> = 5,589]
- III. Vachova L, Macháček M, Kučera R, Demuth J, Čermák P, Kopecký K, Miletín M, Jedličková A, Šimůnek T, Nováková V and Zimčík P. **Heteroatom-substituted tetra(3,4-pyrido)-porphyrazines: a stride toward near-infrared-absorbing macrocycles.** *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2015; 13: 5608-5612. [IF<sub>2015</sub> = 3.559]
- IV. Macháček M, Kollár J, Miletín M, Kučera R, Kubát P, Šimůnek T, Nováková V, Zimčík P. **Anionic hexadeca-carboxylate tetrapyrazinoporphyrazine: synthesis and in vitro photodynamic studies of water-soluble non-aggregating photosensitizer.** *RSC Advances*. 2016; 6: 10064-10077. [IF<sub>2015</sub> = 3.289]
- V. Macháček M, Demuth J, Čermák P, Vavrečková M, Hrubá L, Jedličková A, Kubát P, Šimůnek T, Nováková V, Zimčík P. **Tetra(3,4-pyrido)porphyrazines caught in the cationic cage: toward nanomolar active photosensitizers.** (*rukopis ve fázi vyžádané revize v Journal of Medicinal Chemistry*).

## 11 PŘEHLED DALŠÍCH PUBLIKACÍ



- I. Vávrová A, Jansová H, Macková E, Macháček M, Hašková P, Tichotová L, Štěrba M, Šimůnek T. **Catalytic inhibitors of topoisomerase II differentially modulate the toxicity of anthracyclines towards cardiac and cancer cells.** *PLoS ONE*. 2013; 8(10): 1-13. [IF<sub>2015</sub> = 3.234]
- II. Potuckova E, Jansova H, Macháček M, Vávrová A, Hašková P, Tichotova L, Richardson V, Kalinowski DS, Richardson DR, Simunek T. **Quantitative analysis of the anti-proliferative activity of combinations of selected iron-chelating agents and clinically used anti-neoplastic drugs.** *PLoS One*. 2014; 9(2): e88754. [IF<sub>2015</sub> = 3.234]
- III. Jansová H, Macháček M, Wang Q, Hašková P, Vávrová A, Potůčková E, Kielar F, Franz KJ, Šimůnek T. **Comparison of various iron chelators and prochelators as protecting agents against cardiomyocyte oxidative injury.** *Free Radical Biology & Medicine*. 2014; 74; 210–221. [IF<sub>2015</sub> = 5.784]
- IV. Potůčková E, Hrušková K, Bureš J, Kovaříková P, Špirková IA, Pravdíková K, Kolbabová L, Hergeselová T, Hašková P, Jansová H, Macháček M, Jirkovská A, Richardson V, Lane DJR, Kalinowski DS, Richardson DR, Vávrová K, Šimůnek T. **Structure-activity relationships of novel salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH) analogs: iron chelation, anti-oxidant and cytotoxic properties.** *PLoS One*. 2014; 9(11): e112059. [IF<sub>2015</sub> = 3.234]
- V. Jirkovská-Vávrová A, Roh J, Lenčová-Popelová O, Jirkovský E, Hrušková K, Potůčková-Macková E, Jansová H, Hašková P, Martinková P, Eisner T, Kratochvíl M, Šůs J, Macháček M, Vostatková-Tichotová L, Geršl V, Muller MT, Richardson DR, Vávrová K, Štěrba M, Šimůnek T. **Synthesis and analysis of novel analogues of dexrazoxane and its open-ring hydrolysis product for protection against anthracycline cardiotoxicity in vitro and in vivo.** *Toxicology Research*. 2015; 4: 1098-1114. [IF<sub>2015</sub> = 3.983]

- VI. Potůčková E, Roh J, Macháček M, Stariat J, Šesták V, Jansová H, Hašková P, Jirkovská A, Vávrová A, Kovaříková P, Richardson DR, Šimůnek T. **In vitro characterization of pharmacological properties of the anticancer iron chelator Bp4eT and its phase I metabolites.** *PLoS One*. 2015; 10(10): e0139929. DOI:10.1371/journal.pone.0139929. [IF<sub>2015</sub> = 3.234]
- VII. Jansová H, Bureš J, Macháček M, Hašková P, Jirkovská A, Roh J, Wang Q, Franz KJ, Kovaříková P, Šimůnek T. **Characterization of cytoprotective and toxic properties of iron chelator SIH, prochelator BSIH and their degradation products.** *Toxicology*. 2015; 250: 15-24. [IF<sub>2015</sub> = 3.817]
- VIII. Kopečná M, Macháček M, Prchalova E, Štěpánek P, Drašar P, Kotora M, Vávrová K. **Dodecyl amino glucoside enhances transdermal and topical drug delivery via reversible interaction with skin barrier lipids.** (*rukopis v recenzním řízení v European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*)
- IX. Haškova P, Jansova H, Bureš J, Macháček M, Jirkovská A, Franz KJ, Kovaříkova P, Šimůnek T. **Cardioprotective effects of iron chelator HAPI and ROS-activated boronate prochelator BHAPI against catecholamine-induced oxidative cellular injury.** (*připravovaný rukopis*)
- X. Němeček J, Karabanovich G, Macháček M, Zemanová J, Soukup O, Pasdiorová M, Sychra P, Stolaříková J, Konečná K, Vávrová K, Klimešová V, Hrabálek A, Pávek P, Mikušová K, Roh J. **Structure-Activity Relationship Studies on 3,5-Dinitrophenyl Tetrazoles as Selective Antitubercular Agents.** (*připravovaný rukopis*)
- XI. Novotná E, Waisser K, Hofman J, Skálová L, Szotáková B, Buchta V, Jílek P, Stolaříková J, Pávová M, Weber J, Skarka A, Macháček M, Wsól V. **Benzoxazine derivatives active against multidrug resistant strains of Mycobacterium tuberculosis.** (*připravovaný rukopis*)

## 12 PREZENTACE NA KONFERENCÍCH

- I. Miloslav Macháček, Saad Makhseed, Waleed Alfadly, Antonín Cidlina, Veronika Novaková, Petr Zimčík, Pavlina Hašková and Tomas Šimůnek. **Novel Zinc Phthalocyanines with High Antitumor Photodynamic Activity and Low Dark Toxicity.** *10th International ISSX Meeting.* 30. září – 3. říjen 2013, Toronto, Kanada.
- II. Macháček M., Cidlina A., Nováková V., Zimčík P., Šimůnek T. **Novel zinc azaphthalocyanine and phthalocyanine photosensitisers with low inherent toxicity showed high antitumor activity under photodynamic treatment *in vitro*.** *4. Postgraduální & 2. postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK;* 28. – 29. leden 2013, Hradec Králové, Česká republika.
- III. Miloslav Macháček, Antonín Cidlina, Veronika Novaková, Saad Makhseed, Waleed Alfadly, Emil Rudolf, Jan Švec, Petr Zimčík and Tomas Šimůnek. **Series of cationic zinc phthalocyanine photosensitizers with suitable properties for photodynamic therapy of cancer – *in vitro* study.** *International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines* 8. 22. – 27. červen 2014, Istanbul, Turecko.
- IV. Macháček M, Brázdová P, Nováková V, Cidlina A, Rudolf E, Zimčík P, Šimůnek T. **An insight into cell death process after photodynamic treatment of cancer cells with phthalocyanines and their aza-analogues.** *5. Postgraduální & 3. postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK;* 3. – 4. únor 2015, Hradec Králové, Česká republika.
- V. Miloslav Macháček, Petra Brázdová, Adéla Jedličková, Petr Zimčík, Veronika Nováková and Tomas Simunek. **Novel Phthalocyanines and Tetrapyrrodo-porphyrazines in Photodynamic Therapy and Vascular-Targeted Photodynamic Therapy of Cancer – *in vitro* study.** *13th European Meeting of the International Society for the Study of Xenobiotics.* 22. – 25. červen 2015, Glasgow, Spojené Království.

- VI. Macháček M., Jedličková A., Firková P., Podhorská G., Půlkrábková M., Kollár J., Nováková V., Zimčík P., Šimůnek T. ***In vitro* Evaluation of Non-Aggregating (Aza)phthalocyanines – Influence of Peripheral Substitution on Photodynamic Activity.** 6. Postgraduální & 4. postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK; 9. – 10. únor 2016, Hradec Králové, Česká republika.
- VII. Miloslav Macháček, Veronika Nováková, Petr Zimčík, Tomáš Šimůnek. **Fthalocyaniny a jejich dusíkaté izostery jako fotosenzitizéry ve fotodynamické terapii nádorových onemocnění – *in vitro* studie.** XVI. Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků; 10. – 13. květen 2016, Milovy, Česká republika.
- VIII. Miloslav Macháček, Veronika Nováková, Jan Kollár, Pavel Čermák, Petr Zimčík and Tomas Šimůnek. **Photodynamic activity of non-aggregating cationic and anionic phthalocyanines and azaphthalocyanines.** *International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines* 9. 3. – 8. červenec 2016, Nanjing, Čína.

## 13 PŘÍLOHY

## 13.1 PUBLIKACE I

Makhseed S, Macháček M, Alfadly W, Tuhl A, Vinodh V, Šimůnek T, Nováková V, Kubát P, Rudolf E a Zimčík P. Water-soluble non-aggregating zinc phthalocyanine and in vitro studies for photodynamic therapy. *Chemical Communications*. 2013;49(95):11149-11151.

## 13.2 PUBLIKACE II

Macháček M, Cidlina A, Nováková V, Švec J, Rudolf E, Miletín M, Kučera R, Šimůnek T, Zimčík P. Far-red absorbing cationic phthalocyanine photosensitizers: Synthesis and evaluation of the photodynamic anti-cancer activity and the mode of cell death induction. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2015; 58(4):1736–1749.



### 13.3 PUBLIKACE III

Vachova L, Macháček M, Kučera R, Demuth J, Čermák P, Kopecký K, Miletín M, Jedličková A, Šimůnek T, Nováková V and Zimčík P. Heteroatom-substituted tetra(3,4-pyrido)-porphyrazines: a stride toward near-infrared-absorbing macrocycles. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2015; 13: 5608-5612.

## 13.4 PUBLIKACE IV

Macháček M, Kollár J, Miletín M, Kučera R, Kubát P, Šimůnek T, Nováková V, Zimčík P. Anionic hexadeca-carboxylate tetrapyrazinoporphyrine: synthesis and in vitro photodynamic studies of water-soluble non-aggregating photosensitizer. RSC Advances. 2016; 6: 10064-10077.

## 13.5 PUBLIKACE V

Macháček M, Demuth J, Čermák P, Vavrečková M, Hrubá L, Jedličková A, Kubát P, Šimůnek T, Nováková V, Zimčík P. Tetra(3,4-pyrido)porphyrazines caught in the cationic cage: toward nanomolar active photosensitizers. (rukopis ve fázi vyžádané revize v Journal of Medicinal Chemistry)

