



ROZPRAWA DOKTORSKA

**Małgorzata Kucińska**

**Ocena możliwości zastosowania nowych  
funkcjonalizowanych ftalocyjanin w terapii fotodynamicznej  
chorób nowotworowych**

Poznań, 2014

**Słowa kluczowe:** terapia fotodynamiczna, ftalocyjaniny, komórki nowotworowe, cytotoksyczność, apoptoza, nekroza, autofagia, stres oksydacyjny, reaktywne formy tlenu, enzymy antyoksydacyjne

Doktorantka była stypendystką w ramach projektu pt.:  
**„Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia Wielkopolski”**  
Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki,  
współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach  
Europejskiego Funduszu Społecznego



**KAPITAŁ LUDZKI**  
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



**UNIA EUROPEJSKA**  
EUROPEJSKI  
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Praca doktorska wykonana  
w Katedrze i Zakładzie Toksykologii  
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

Promotor: dr hab. Marek Murias

*W szczególny sposób chciałabym podziękować  
**Promotorowi Panu dr hab. Markowi  
Muriasowi** za okazaną cierpliwość,  
życzliwość, cenne wskazówki i nieocenioną  
pomoc w realizacji pracy doktorskiej*

***Pani prof. dr hab. Jadwidze Jodynis-Liebert** serdecznie dziękuję za umożliwienie mi przygotowania tej pracy w Katedrze i Zakładzie Toksykologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu*

***Panu dr hab. Tomaszowi Goślińskiemu** kierownikowi Katedry Technologii Chemicznej ŚrodkówLeczniczych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu serdecznie dziękuję za udostępnienie badanych w tej pracy fotouczulaczy oraz niezliczone niezwykle pomocne rady i wskazówki, których udzielił mi podczas wykonywanie mojej pracy*

***Pani prof. dr hab. Wandzie Baer-Dubowskiej,** kierownikowi Katedry Biochemii Farmaceutycznej, Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu serdecznie dziękuję za udostępnienie czytnika płytek Tecan Infinity 200,*

***Paniom prof. dr hab. Elizie Wyszko oraz dr Agnieszce Wyszomirskiej** z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN serdecznie dziękuję za pomoc w przeprowadzeniu eksperymentów z użyciem mikroskopu konfokalnego zmierzających do ustalenia wewnątrzkomórkowej lokalizacji związku TG3*

***Panu dr Mariuszowi Kaczmarkowi** z Pracowni Immunochemii Zakładu Immunologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu za pomoc w analizie wpływu badanego fotouczulacza na cykl komórkowy*

***Pani profesor Theresia Thalhammer** z Instytutu Patofizjologii i Alergologii Medycznego Uniwersytetu Wiedeńskiego za umożliwienie mi przeprowadzenia części badań w pracowniach IPAMUW w ramach wspólnego stypendium przyznanego nam ten projekt przez Austriacką Agencję Wymiany i Współpracy (OeAD)*

*Dziękuję wszystkim **Współpracownikom** z Katedry Toksykologii z miłą atmosferę oraz wsparcie podczas wykonywanie tej pracy*

*Praca częściowo zrealizowana w ramach stypendium przyznanego przez Austriacką Agencję Wymiany i Współpracy (OeAD)*

*Pracę dedykuję Rodzicom*

## Spis treści

WYKAZ SKRÓTÓW .....	10
1. WSTĘP .....	14
1.1 Mechanizm PDT .....	15
1.2 Drogi śmierci komórki.....	19
1.2.1 Apoptoza.....	20
1.2.2 Nekroza i nekroptoza.....	23
1.2.3 Autofagia .....	25
1.3 Lokalizacja związków fotouczulających .....	27
1.4 Mechanizmy oporności komórek na PDT .....	31
1.5 Związki fotouczulające stosowane w PDT.....	35
2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY .....	42
3. MATERIAŁY I METODY.....	43
3.1 Odczynniki.....	43
3.2 Badane związki .....	44
3.3 Linie komórkowe .....	46
3.4 Źródło światła .....	50
3.4.1 Lampa diodowa.....	50
3.4.2 Lampa laserowa .....	51
3.5 Eksperymenty PDT .....	51
3.6 Badania wstępne.....	52
3.6.1 Ocena działania cytotoksycznego- test MTT.....	52
3.6.2 Ocena wchłaniania badanych fotouczulaczy przez komórki nowotworowe .....	53
Badania cytotoksyczności dla wybranego związku TG3 na linii komórkowej nowotworu prostaty LNCaP.....	54

3.6.3	Wpływ czasu inkubacji z badanym związkiem na działanie cytotoksyczne .....	54
3.6.4	Test uwalniania dehydrogenazy mleczanowej.....	55
3.6.5	Barwienie błękitem trypanu.....	56
	Badania z zakresu wpływu badanego związku na indukowanie w komórkach nowotworowych procesów apoptozy, nekrozy oraz autofagii.....	57
3.7	Wpływ badanego związku na cykl komórkowy .....	57
3.8	Analiza zmian morfologicznych - apoptotycznych i nekrotycznych metodą podwójnego barwienia Hoechst 33342/jodek propidyny .....	58
3.9	Detekcja apoptozy w komórkach nowotworowych w oparciu o test immunoenzymatyczny ELISA .....	59
3.10	Analiza ilościowa zmian potencjału błony mitochondrialnej za pomocą barwnika fluorescencyjnego JC-1 .....	60
3.11	Aktywność kaspazy-9.....	61
3.12	Aktywność kaspazy-3.....	61
3.13	Wpływ inhibitora Bcl-2, ABT199 na cytotoksyczność związku TG3.....	62
3.14	Panel apoptotyczny <i>Human Apoptosis Array</i> .....	63
3.14.1	Uzyskanie lizatów komórkowych .....	64
3.14.2	Analiza ekspresji białek.....	64
3.15	Wpływ inhibitora autofagii Spautyny-1 na cytotoksyczność związku TG3.....	65
3.16	Wpływ Necrox-2 inhibitora nekrozy na działanie cytotoksyczne badanego związku.....	66
3.17	Wpływ TG3 na cytoszkielet komórek.....	67
	Badania z zakresu wolnorodnikowych mechanizmów działania.....	68
3.18	Detekcja stresu oksydacyjnego za pomocą 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (mikroskop fluorescencyjny).....	68
3.19	Detekcja wolnorodnikowych uszkodzeń materiału genetycznego- oznaczanie produktu uszkodzenia DNA - 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyny .....	69



3.20	Wpływ inhibitorów enzymów antyoksydacyjnych na cytotoksyczność związku TG3.....	70
3.21	Ilościowa analiza zmian stężenia glutationu w komórce z wykorzystaniem barwnika fluorescencyjnego Thioglo-1 .....	72
3.22	Generowanie tlenu azotu .....	73
3.23	Badanie subkomórkowej lokalizacji związku TG3.....	74
3.24	Pomiar białka .....	76
3.24.1	Metoda kolorymetryczna .....	76
3.24.2	Metoda fluorescencyjna.....	76
3.25	Pomiar DNA .....	76
3.26	Analiza statystyczna .....	77
4.	WYNIKI .....	78
4.1	Cytotoksyczność związków TG3, TG4, TG15, TG18 .....	78
4.2	Badanie wchłaniania związku TG3 i TG4.....	83
4.3	Zależność czasu inkubacji z badanym związkiem, a działaniem toksycznym.....	86
4.4	Analiza uwalniania LDH .....	88
4.5	Barwienie błękitem trypanu .....	92
4.6	Analiza faz cyklu komórkowego .....	95
4.7	Analiza zmian apoptotyczno-nekrotycznych metoda podwójnego barwienia Hoechst/Jodek propidyny.....	99
4.8	Zdolność badanego związku do indukcji procesu apoptozy.....	105
4.9	Wpływ badanego związku na zmiany potencjału błony mitochondrialnej.....	107
4.10	Wpływ TG3 na aktywność kaspazy-9 .....	109
4.11	Aktywność kaspazy-3.....	111
4.12	Wpływ ABT199 (inhibitora białka Bcl-2) na działanie cytotoksyczne związku TG3.....	113

4.13	Wpływ związku TG3 na poziom wybranych białek pro i antyapoptotycznych .....	117
4.14	Wpływ inhibitora autofagii- spautyny-1.....	128
4.15	Wpływ inhibitora nekrozy na działanie cytotoksyczne związku TG3.....	133
4.16	Wpływ związku TG3 na cytoszkielet komórek .....	137
4.17	Ocena indukcji stresu oksydacyjnego .....	140
4.18	Ocena wolnorodnikowych uszkodzeń materiału genetycznego pod wpływem związku TG3 .....	144
4.19	Wpływ inhibitorów enzymów antyoksydacyjnych na działanie cytotoksyczne związku TG3 .....	146
4.20	Zmiany poziomu glutationu pod wpływem związku TG3 .....	150
4.21	Poziom tlenku azotu podczas PDT z zastosowaniem związku TG3.....	154
4.22	Subkomórkowa lokalizacja związku TG3 .....	156
5.	DYSKUSJA .....	158
6.	WNIOSKI .....	180
7.	PIŚMIENNICTWO .....	182
8.	STRESZCZENIE .....	203
9.	SUMMARY .....	206
10.	SPIS RYCIN .....	209
11.	SPIS TABEL.....	213
12.	SUPLEMENT FOTOGRAFICZNY .....	214

## WYKAZ SKRÓTÓW

- 17-AAG- inhibitor białka Hsp90, 7-alliloamino-17-demetoksygeldanamycyna, (ang. 17-N-allyloamino-17-demethoxygeldanamycin)
- 17-DMAG- inhibitor białka Hsp90, (ang. 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin)
- 1c1c7- mysia linia komórek nowotworu wątroby
- 2-BA-2-DMHB- butyloamini-2-demetoksyhipokrelina, (ang. 2-butyloamino-2-demethoxyhypocrellin B)
- 2-ME-2-metoksyestradiol, (ang. 2-methoxyestradiol)
- 3-AT-3-amino-1,2,4-triazol, (ang. 3-amino-1,2,2,4-triazole)
- 8-OH-2dG-8-hydroksy-2-deoksygwanozyna, (ang. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine)
- A1- antyapoptyczne białko z rodziny Bcl-2
- A375-ludzka linia komórkowa nowotworu skóry
- A431- ludzka linia komórkowa nowotworu skóry
- A549- ludzka linia komórkowa nowotworu płuc
- ABT199- inhibitor białka Bcl-2, (ang. 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
- ABTS -sulfonian 2,2'-azyno-bis-3-etylobenzotiazolowy
- AIF- czynnik indukujący apoptozę, (ang. Apoptosis inducing factor)
- AIP- rodzina białek regulujących apoptozę (ang. inhibitors of apoptosis)
- Akt- kinaza serynowo-treoninowa
- ALA- kwas 5-aminolewulinowy, (ang. aminolevulinic acid)
- AMPK- kinaza aktywowana 5'AMP, (ang. 5'AMP-activated protein kinase)
- Apaf-1- cytozolowe białko proapoptyczne, (ang. apoptotic protease activating factor-1)
- ASC- białko adaptorowe, (ang. apoptosis-associated speck-like protein containing a carboxy-terminal CARD)
- ASTC-1-a- ludzka linia komórkowa nowotworu płuc
- Atg- białka związane z autofagią (ang. Autophagy-related protein)
- ATX-s10- pochodna chloryny
- Bel-7402- ludzka linia komórkowa nowotworu wątroby
- BMG-1- ludzka linia komórkowa glejaka
- BODIPY- barwniki oparte o strukturę 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenu
- BSA- bydlęca albumina, (ang. Bovine serum albumine)
- BSO- sulfoksymina L-butioniny, (ang. buthionine sulfoximine)
- BT-474- ludzka linia komórkowa nowotworu piersi
- BVR- biliwerdyna, (ang. biliverdin)
- CAT- katalaza, (ang. catalase)
- CCRF-CEM- ludzka linia komórkowa białaczki
- CDK2/6- kinaza cyklozależne 2 i 6, (ang. cyclin-dependent kinases)
- Chol-O-SiPc- pochodna ftalocyjaniny krzemowej, (ang. bis(cholesteryloxy) derivate)
- ciAP-1- białko antyapoptyczne z rodziny IAP, (ang. cellular inhibitor of apoptosis protein 1)
- ciAP-2- białko antyapoptyczne z rodziny IAP, (ang. cellular inhibitor of apoptosis protein 2)
- cPLA<sub>2</sub>- cytozolowa fosfolipaza A2, (ang. cytosolic phospholipase A2)
- CPO- porficyna, (ang. porphycene)
- DAF-FM- 4-amino-5-metyloamino-2',7'-difluorofluoresceiny, (ang. 4-Amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein)

DAF-FM DA- dioctan 4-amino-5-metyloamino-2',7'-difluorofluoresceiny, (ang. 4-Amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate)

DCF- 2',7'-dichlorofluoresceina, (ang. 2', 7'- dichlorofluorescein)

DCFH- 2',7'-dichlorodihydrofluoresceina, (ang. 2', 7'- dichlorodihydrofluorescein)

DCFH-DA- dioctan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceine, (ang. 2', 7'- dichlorodihydrofluorescein diacetate)

DDC- dietyloditiokarbaminian, (ang. diethyldithiocarbamate)

DiOC<sub>6</sub>- 3,3'-heksylokarbocyjanianu jodowego, (ang. 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide)

DISC- kompleks sygnalizacyjny na szlaku receptorowym apoptozy (ang. death-inducing signaling complex)

DMEM- pożywka hodowlana, (ang. Dulbecco's Modified Eagle's medium)

DMSO- dimetylosulfotlenek, (ang. dimethylsulfoxide)

DR3- receptor śmierci-3, (ang. Death Receptor 3)

EAHB- 2-etanolamino-2-demetoksy-17-etanolimino-hipokrelina B, (ang. 2-ethanolamino-2-demethoxy-17-ethanolimino-hypocrellin B)

ELISA- test immunoenzymatyczny, (ang. enzyme-linked immunosorbent assay)

eNOS- endotelialna syntetaza tlenu azotu

FADD- białko adaptorowe, (ang. FAS-associated death domain)

Fas/APO-1 komórkowy receptor śmierci określany także jako CD95

FBS- bydlęca surowica płodowa, (ang. Fetal bovine serum)

FIP200- białko związane z autofagia, (ang. focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa)

GS- syntetaza glutationu, (ang. glutathione synthetase)

GSH- zredukowana forma glutationu

HA14-1- inhibitor białka Bcl-2, (ang. ethyl [2-amino-6-bromo-4-(1-cyano-2-ethoxy-2-oxoethyl)]-4H-chromene-3-carboxylate)

HBXIP- białko tworzące kompleks z surwiwiną (ang. Hepatitis B X-interacting protein)

HeLa- linia komórkowa nowotworu szyjki macicy

HepG2- ludzka linia komórkowa nowotworu wątroby

Hex-ALA- ester heksylowy kwasu 5-aminolewulinowego

HFFF2- linia komórkowa ludzkich fibroblastów

HIF-1 $\alpha$ - czynnik indukowany hipoksją, (ang. Hypoxia-inducible factor 1-alpha)

HL60- ludzka linia komórkowa białaczki

HO-1- oksygenaza hemowa, (ang. heme oxygenase-1)

HPD- pochodne hematoporfiryny, (ang. hematoporphyrin derivative)

HPPH- 2-(1-heksyloetylo)-2-dewinylopyrofeoforbid, (ang. 2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinyl pyropheophorbide a)

HSPs- białka szoku cieplnego, (ang. heat shock protein)

HtrA2/Omi- białko proapoptotyczne, (ang. high temperature requirement protein A2)

iNOS- indukowana syntetaza tlenu azotu

JC-1- jodek 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetylobenzimidazololcarbocyanonowy, (ang. 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide)

JNK- kinaza białka c-Jun, (ang. c-Jun N-terminal kinases)

L2210- mysia linia komórkowa białaczki

LAMP-1, LAMP-2- białka błonowe związane z lizosomami, (ang. lysosomal-associated membrane protein 1)

LDH- dehydrogenaza mleczanowa, (ang. lactate dehydrogenase)

LMP- wzrost przepuszczalności błony lizosomu, (ang. lysosomal membrane permeabilization)

LNCaP- linia komórkowa nowotworu prostaty

LOX – lipooksygenazy, (ang. lipoxygenase)  
 M18-linia komórkowa nowotworu skóry  
 M6- ludzka linia komórkowa nowotworu skóry  
 MCF-7- linia komórkowa nowotworu piersi  
 MCL-1- antyapoptotyczne białko z rodziny Bcl-2  
 Met-ALA- ester metylowy kwasu 5-aminolewulinowego  
 MeWo- linia komórkowa nowotworu skóry  
 MNNG-N-metylo-N'-nitro-N-nitrozoguanidyna  
 MnSOD- dysmutaza mitochondrialna, (ang. manganese superoxide dismutase)  
 MOMP- spadek potencjału zewnętrznej błony mitochondrialnej, (ang. mitochondrial outer membrane permeabilization)  
 m-THPC- pochodna chloryny, (ang. m-Tetra(hydroxyphenyl)chlorin)  
 mTOR- kinaza wiążąca się z rapamycyną, (ang. mammalian target of rapamycin kinase)  
 MTT- bromek 3-(4,5-dimetylo-tiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazolu, (ang. 3-(4,5-dimethyl-1H-tetrazol-5-yl)-1,2,4-diphenylmethanone bromide)  
 NADH- zredukowana postać dinukleotydu nikotynamidoadeninowego  
 NFκ-B- czynnik transkrypcyjny, (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)  
 NHIK 3025- ludzka linia nowotworu szyjki macicy  
 NLR- receptory NOD-podobne, (ang. nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing family, NOD-like receptors)  
 NLRP3- receptor NOD-podobny, (ang. NOD-like receptor family pyrin domain-containing protein)  
 NO- tlenek azotu, (ang. nitric oxide)  
 NOX- oksygenaza NADP-1, (ang. NADPH oxidase 1)  
 NPe6- pochodna chloryny, (ang. Mono-L-aspartyl chlorin e6)  
 Nrf2- transkrypcyjny jądrowy czynnik 2, (ang. Nuclear factor erythroid 2-related factor)  
 PAR- polimery poli(ADP-rybozy), (ang. poly(ADP-ribose))  
 PARP-1- polimeraza poli ADP-rybozy, (ang. Poly [ADP-ribose] polymerase 1)  
 PBS- bufor fosforanowy, (ang. phosphate buffer saline)  
 PC3- ludzka linia komórkowa nowotworu prostaty  
 Pcs- ftalocyjaniny, (ang. phthalocyanines)  
 PDT- terapia fotodynamiczna, (ang. Photodynamic therapy)  
 PE-fosfatydyloetanolamina, (ang. phosphatidylethanolamine)  
 p-ERK1/2- ufosforylowana postać kinazy aktywowanej przez czynniki pozakomórkowe, (ang. phosphorylated form of extracellular signal-regulated kinase 1/2)  
 PS- fotouczulacz, (ang. Photosensitizer)  
 PSMA- antygen błony komórkowej prostaty, (ang. prostate specific membrane antigen)  
 Pu-18- purpuryna-18  
 Py<sub>3</sub>MeO-TB- pochodna porficyny, (ang. 2,7,12-tris (α-pyridinio-p-tolyl)-17-(p-methoxymethyl) phenyl porphycene)  
 R4- linia komórkowa fibroblastów  
 RFT- reaktywne formy tlenu, (ang. ROS- reactive oxygen species)  
 RIF-1- linia komórkowa włóknakomięsaka  
 RIP1- kinaza związana z nekroptozą, (ang. receptor interacting protein-1)  
 RIP3- kinaza związana z nekroptozą, (ang. receptor interacting protein-3)  
 RKIP- białko inhibitorowe kinazy Raf-1, (ang. Raf kinase inhibitor protein-1)  
 RPMI-1640- pożywka hodowlana, (ang. Roswell Park Memorial Institute medium)  
 SCC-13- ludzka linia komórkowa nowotworu skóry

SERCA- pompa jonowa, (ang. sarcoendoplasmic reticulum calcium transport ATPase)

SKBR-3- ludzka linia komórkowa nowotworu piersi

SK-MEL-2- ludzka linia komórkowa nowotworu skóry

SnET2- pochodna etiopurpuryny

T24- ludzka linia komórkowa nowotworu pęcherza moczowego

T47D- linia nowotworu piersi

TG15- Jodek magnez(II)1,4,8,11,15,18,22,25-oktakis[2-(4-N-metylomorfolin-4-ylo)etoksy]ftalocyjaniny

TG18- Cynk(II)-1,4,8,11,15,18,22,25-oktakis[2-(morfolin-4-ylo)etoksy]ftalocyjanina

TG3- Cynk(II)1,4,-dis[2-(morfolin-4-ylo)etoksy]ftalocyjanina

TG4- Magnez(II)-1,4,8,11,15,18,22,25-oktakis[2-(morfolin-4-ylo)etoksy]ftalocyjanina

TL1A- białko transbłonowe należące do rodziny TNF, (ang. TNF-like ligand 1A)

TLR- receptor Toll-podobny, (ang. Toll-like receptor)

TNFR1- białko receptorowe, (ang. Ligand-activated tumour-necrosis factor receptor-1)

TNF $\alpha$ - czynnik martwicy nowotworu, (ang. tumor necrosis factor alpha)

TPPS<sub>1</sub>, TPPS<sub>2a</sub>, TPSS<sub>2o</sub>, TPPS<sub>4</sub>- sulfonowane *mezo*-tetrafenyloporfiryny

TRADD- białko adaptorowe, (ang. TNFR1 associated death domain protein)

TRAF2/5- białko receptorowe związane z receptorem TNF, (ang. TNF receptor-associated factor 2/5)

TRAIL/Apo2-L- ligand czynnika martwicy nowotworu indukujący apoptozę, (ang. tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)

TRAIL-R1/DR4- receptor śmierci do nadrodziny receptorów TNF (ang. TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1/ Death Receptor-4)

TRAIL-R2 (DR5)- receptor śmierci należący do nadrodziny receptorów TNF (ang. TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 5/ Death Receptor 5)

U251- ludzka linia komórkowa glejaka

U87- ludzka linia komórkowa glejaka

U937- ludzka linia komórkowa białaczki

ULK1- kinaza regulująca autofagię, (ang. UNC-51-like kinase-1)

ULK-2- kinaza regulująca autofagię, (ang. UNC-51-like kinase-2)

UPR- odpowiedź na nieprawidłowo sfałdowane białka, (ang. unfolded protein response)

UVRAG- produkt genu związanego z opornością na promieniowanie ultrafioletowe, (ang. Ultraviolet irradiation resistance-associated gene)

VEGF- czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego, (ang. Vascular Endothelial Growth Factor)

WIPs- białka związane z procesem autofagii (ang. WD-repeat protein Interacting with PhosphoInosides)

XIAP- białko antyapoptotyczne, (ang. X-linked inhibitor of apoptosis)

YUSAC2/T34A- ludzka linia komórkowa nowotworu skóry

ZnCuSOD- miedziowo cynkowa (cytoplazmatyczna) dysmutaza ponadtlenkowa

# 1. WSTĘP

Choroby nowotworowe stanowią jedną z głównych przyczyn zgonów w krajach rozwijających się oraz wysokorozwiniętych (1;2). Współcześnie stosowane metody leczenia chorób nowotworowych określane, jako konwencjonalne, czyli radioterapia, chemioterapia oraz chirurgia nadal nie zapewniają oczekiwanej skuteczności. Radioterapia związana jest z możliwością uszkodzenia materiału genetycznego, prowadząc do wystąpienia mutacji oraz indukowania wtórnego procesu nowotworowego (3;4). Bardzo niepokojącym zjawiskiem jest także wzrastająca oporność komórek nowotworowych na standardowo stosowane chemioterapeutyki, a liczne działania niepożądane towarzyszące terapii przekładają się na wysokie koszty społeczne i ekonomiczne (5;6). Ponadto, za wyjątkiem leczenia chirurgicznego, które obarczone jest nie tylko wysokimi kosztami wynikającymi z czasu hospitalizacji, ale także w wielu przypadkach obniżające jakość życia pacjentów, są to metody mało selektywne. W związku z tym poszukiwania skutecznych metod leczenia oraz prewencji chorób nowotworowych wyznacza istotny kierunek badań nauk medycznych.

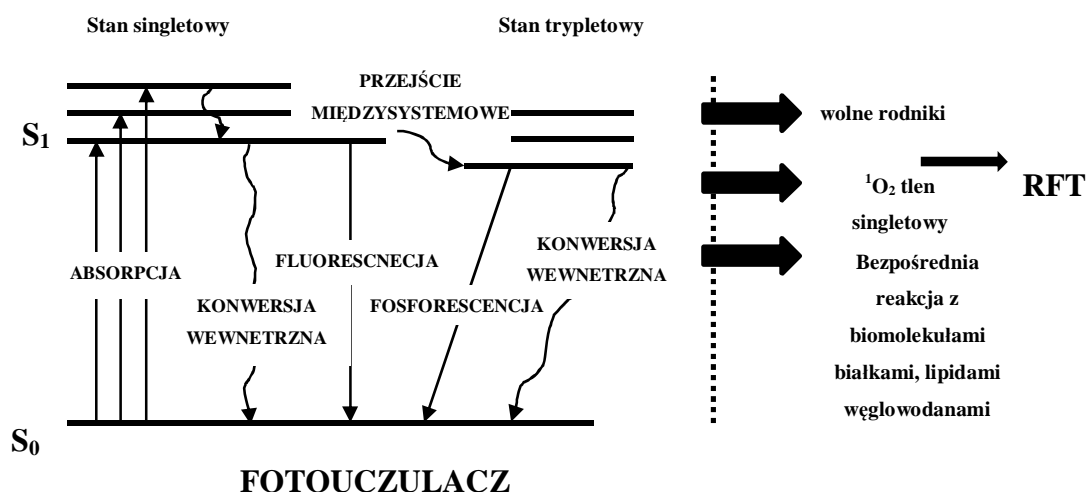
Terapia fotodynamiczna (PDT) to mało inwazyjna metoda leczenia opierająca się na wykorzystaniu związku chemicznego tzw. fotouczulacza\* oraz światła o określonej długości fali (7). PDT znalazła zastosowanie w leczeniu licznych schorzeń, w tym: chorób nowotworowych (8) infekcji bakteryjnych (9), infekcji grzybiczych (10), chorób dermatologicznych (11) zwyrodnienia plamki żółtej (12) oraz jako narzędzie diagnostyczne (13). Bardzo istotną zaletą PDT jest możliwość uzyskania działania selektywnego, z uwagi na fakt, że wiele fotouczulaczy gromadzi się w wyższych stężeniach w tkankach i komórkach nowotworowych w porównaniu ze zdrową tkanką (14-16). Dodatkowo ograniczenie naświetlania jedynie do miejsca zmiany nowotworowej pozwala zwiększyć selektywny efekt PDT.

W związku z faktem, że podstawowym i kluczowym elementem niezbędnym do uzyskania efektu leczniczego są związki fotouczulające, bardzo istotną część badań prowadzonych z zakresu terapii fotodynamicznej dotyczy fotouczulaczy zarówno tych, które znalazły już zastosowanie w leczeniu jak i nowych struktur, jako potencjalnych związków w PDT.

Pojęcie "fotouczulacz" używane w j. polskim dla określenia związku chemicznego stosowanego w PDT stanowi bezpośrednie tłumaczenie z j. angielskiego słowa "photosensitizer", Pojęcie to może okazać się mylące, ponieważ mogłoby oznaczać, że związek taki wywiera działanie na drodze aktywacji układu immunologicznego związanej z IV typem nadwrażliwości i nabyciem cech pełnego antygeny przez związek pod wpływem światła tak, jak w przypadku fotoalergii. Pojęcie "fotouczulacz" określające związek chemiczny używany w PDT weszło jednak na stałe do j. polskiego naukowego i jest powszechnie używane, również z uwagi na fakt, że jak nie wprowadzono jego bardziej precyzyjnego zamiennika.

## 1.1 Mechanizm PDT

Uzyskanie efektu leczniczego podczas PDT wymaga obecności trzech elementów: fotouczulacza (PS), światła o określonej długości fali (zakres promieniowania widzialnego oraz bliskiego podczerwieni) oraz tlenu (7). Występując pojedynczo każdy z tych składników nie wykazuje działania cytotoksycznego, natomiast w połączeniu czynniki te mogą inicjować reakcję fotodynamiczną, która staje się źródłem reaktywnych form tlenu i/lub wolnych rodników prowadząc do śmierci komórek nowotworowych. Reakcja fotodynamiczna rozpoczyna się w momencie przejścia fotouczulacza w stan wzbudzony (trypletowy). Fotouczulacz znajdując się w stanie podstawowym posiada dwa elektrony o przeciwnych spinach na orbitalu molekularnym o niskiej energii (17). Pod wpływem absorpcji światła (fotonów) ma miejsce przeniesienie jednego z elektronów na orbital molekularny o wyższej energii, bez zmiany kierunku spinu i PS osiąga tzw. pierwszy stan wzbudzony ( $S_1$ ). Stan ten charakteryzuje się bardzo krótkim czasem półtrwania i wzbudzona cząsteczka fotouczulacza może powrócić do stanu podstawowego poprzez zjawisko fluorescencji lub emisji ciepła (17;18). Cząsteczka może także na skutek tzw. konwersji międzysystemowej osiągnąć stan trypletowy i ulegać kolejnym reakcjom tradycyjnie klasyfikowanym, jako reakcje I, II i III typu (rycina 1).



**Rycina 1.** Diagram Jabłońskiego przedstawiający procesy zachodzące podczas PDT w wyniku zaabsorbowania energii pochodzącej z promieniowania przez fotouczulacz;  $S_1$  – pierwszy stan wzbudzony,  $S_0$  stan podstawowy, RFT-reaktywne formy tlenu (19).

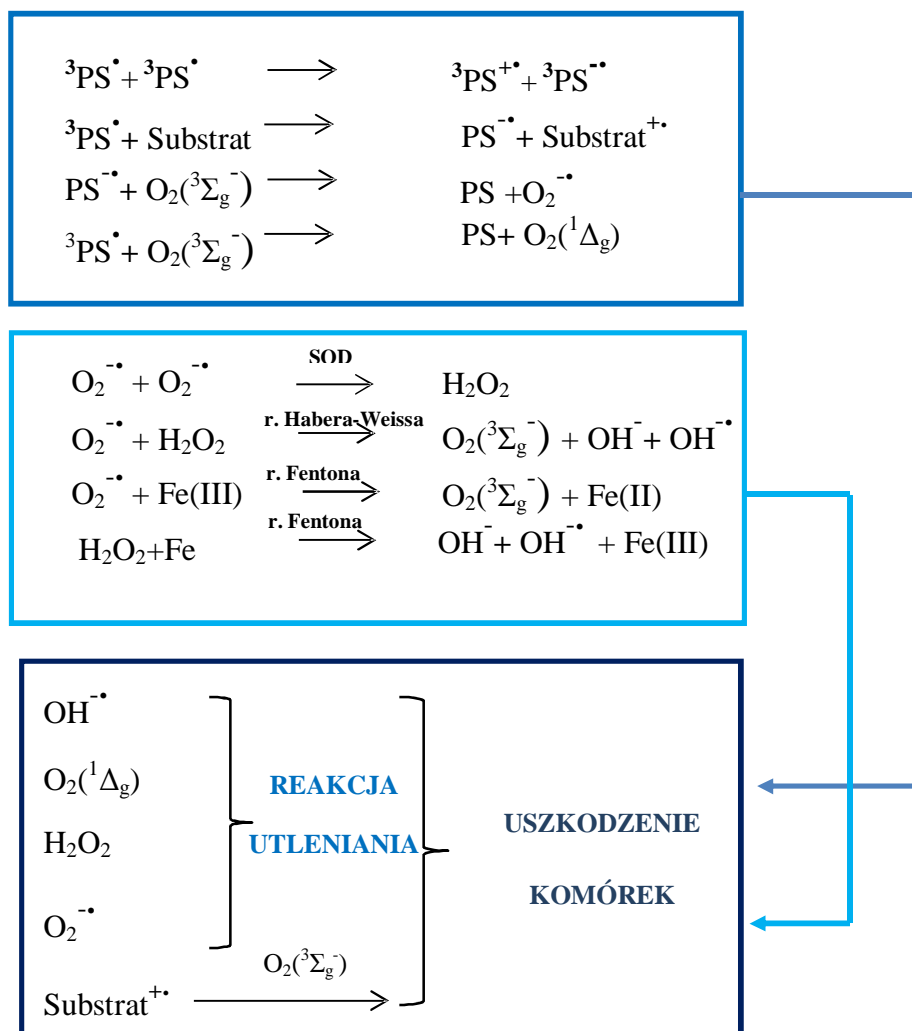


W wyniku reakcji I typu ma miejsce przeniesienie elektronu lub protonu z sąsiadującej cząsteczki (może ona stanowić składnik błony komórkowej, może to być inna cząsteczka fotouczulacza) prowadząc do powstawania rodnika anionowego lub kationowego. Rodnik anionowy w obecności tlenu może generować reaktywne formy tlenu, w tym głównie anionorodnik nadadtlenkowy ( $O_2^{\bullet-}$ ) (17). Następnie w wyniku reakcji dysmutacji katalizowanej przez dysmutazę nadadtlenkową z anionorodnika nadadtlenkowego może powstawać nadtlenek wodoru (17) (rycina 2), który jest uważany za cząsteczkę szczególnie ważną w aspekcie komórkowej równowagi redox ponieważ może przenikać przez błony komórkowe, a nie może być usuwany przez komórki (17). Nadtlenek wodoru może reagować z anionorodnikiem nadadtlenkowym prowadząc do powstania rodnika hydroksylogowego (reakcja Habera-Weissa) (rycina 2). W obecności jonów metali (żelaza, miedzi) anionorodnik nadadtlenkowy może spełniać również rolę reduktora prowadząc do powstania rodnika hydroksylogowego ( $HO^{\bullet}$ ) oraz jonu hydroksylogowego ( $OH^{\bullet}$ ) (reakcja Fentona) (17;20) (rycina 2). Rodnik hydroksylogowy należy do najsilniejszych znanych obecnie oksydantów, który w wyniku reakcji z anionorodnikiem nadadtlenkowym może generować tlen singletowy, a w obecności tlenku azotu ( $NO^{\bullet}$ ) nadtlenoazotyny ( $OONO^{\bullet}$ ) (17).

W wyniku reakcji II typu ma miejsce przeniesienie energii bezpośrednio na tlen molekularny w wyniku, czego powstaje bardzo reaktywny tlen singletowy (21). Generalnie uważa się, że to właśnie reakcja typu II stanowi główne źródło RFT w komórkach poddanych PDT. Powstające w nadmiernej ilości wolne rodniki oraz RFT, w tym tlen singletowy zaburzają prawidłowe funkcjonowanie komórek poprzez reakcje z lipidami (22-24), białkami (25-27) oraz DNA (28), a powstające w konsekwencji tych reakcji oksydacyjne uszkodzenia prowadzą do śmierci komórek poddanych PDT. Dodatkowo biorąc pod uwagę fakt, że jądro komórkowe nie stanowi struktury docelowej dla większości fotouczulaczy, prawdopodobieństwo wystąpienia na skutek PDT oksydacyjnych uszkodzeń DNA, które mogą wiązać z ryzykiem indukcji procesu nowotworowego oraz powstawania opornych na leczenie klonów komórek nowotworowych jest stosunkowo niewielkie (7).

W wypadku większości fotouczulaczy uważa się, że obie reakcje I i II typu zachodzą jednocześnie, a ich wzajemne relacje zależą od licznych czynników w tym właściwości i rodzaju PS, dostępności substratu i środowiska w którym reakcje zachodzą (20).

Trzeci typ reakcji dotyczy bezpośredniego oddziaływania wzbudzonego fotouczulacza z biomolekułami takimi jak białka, lipidy czy węglowodany prowadząc do zniszczenia cząsteczek jak również modyfikacji struktury lub rozpadu samego fotouczulacza. Sugeruje się, że ten typ reakcji odgrywa mniej istotną rolę w mechanizmie cytotoksycznym związanym z PDT (29).



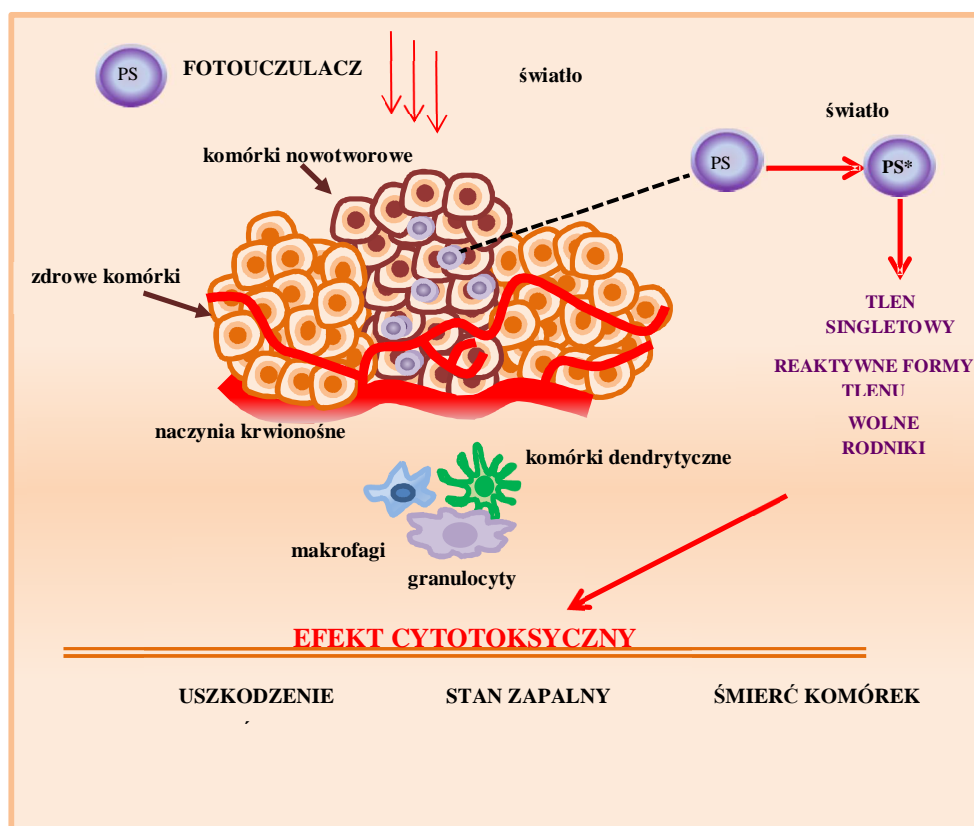
**Rycina 2.** Schemat przedstawiający procesy wolnorodnikowe zachodzące podczas PDT i rodzaj generowanych RFT;  ${}^3\text{PS}^{\bullet}$ - wzbudzony fotouczulacz;  ${}^3\text{PS}^{+\bullet}$ - kationorodnik;  ${}^3\text{PS}^{-\bullet}$ - anionorodnik;  $\text{O}_2({}^1\Delta_g)$ -tlen molekularny;  $\text{O}_2({}^3\Sigma_g^-)$ - tlen singletowy,  $\text{OH}^{-\bullet}$ - rodnik hydroksylowy;  $\text{O}_2^{-\bullet}$ - anionorodnik ponadtlenkowy;  $\text{OH}^-$ - jon hydroksylowy (20).

Istotnymi parametrami fotofizycznymi opisującymi właściwości PS są: wydajność kwantowa: generowania tlenu singletowego- $\phi_{\Delta}$ , stanu trypletowego ( $\phi_t$ ), fluorescencji ( $\phi_f$ ); energia stanu trypletowego, czas trwania stanu trypletowego, stałą szybkości wygaszania stanu trypletowego przez tlen ( $k_t^h$ ) i parametr  $S_{\Delta}$  (obliczany

ze wzoru  $\phi_{\Delta} = S_{\Delta} \phi t$ ). Zdolność PS do generowania tlenu singletowego podczas naświetlania z uwzględnieniem mocy oraz stężenia określa współczynnik  $\alpha$  wyrażony wzorem  $\alpha = 1,925 \times 10^{-5} \lambda \phi_{\Delta} \epsilon$  (gdzie  $\lambda$  – długość fali,  $\epsilon$  – molowy współczynnik ekstynkcji (30).

Reakcjom fotodynamicznym podczas PDT mogą towarzyszyć zmiany w strukturze cząsteczki fotouczulacza na skutek procesu określanego, jako *photobleaching*. Zjawisko to może prowadzić do modyfikacji struktury lub rozpadu na mniejsze fragmenty. W przeciwieństwie do fotodegradacji, której towarzyszy zanik zdolności do absorpcji promieniowania i utrata funkcji, fotomodyfikacja może prowadzić do uzyskania produktów o większej aktywności niż związek wyjściowy (20;31).

Zwiększona wewnątrzkomórkowa produkcja reaktywnych form tlenu w wyniku reakcji I i II typu może prowadzić do śmierci komórek nowotworowych na skutek bezpośredniego efektu cytotoksycznego, uszkodzenia naczyń krwionośnych zaopatrujących tkankę nowotworową oraz poprzez indukowanie stanu zapalnego i rozwoju związanej z nim odpowiedzi immunologicznej (7) (rycina 3).



**Rycina 3.** Mechanizm działania terapii fotodynamicznej (wykonano na podstawie (32)).

Terapii fotodynamicznej może towarzyszyć działanie immunostymulujące lub immunosupresyjne, a rodzaj oddziaływania na układ immunologiczny zależy od takich czynników jak powierzchnia objęta interwencją terapeutyczną, zastosowana procedura leczenia czy właściwości samego fotouczulacza (7;33). Sugeruje się, że immunosupresja wywołana PDT może w szczególny sposób wiązać się z podaniem skórnym i transdermalnym dotyczącym większych powierzchni ciała i może wynikać z obniżenia reakcji nadwrażliwości (7;33). Indukcja stanu zapalnego podczas PDT jest związana między innymi z aktywacją białek szoku cieplnego, czynników transkrypcyjnych: AP-1 oraz NFκB (34), napływem neutrofilów oraz innych komórek układu immunologicznego w obrębie zmiany nowotworowej (35;36) oraz wpływem na aktywność komórek dendrytycznych (37-39).

Naczynia krwionośne zaopatrujące tkankę nowotworową w substancje odżywcze oraz tlen stanowią cel licznych terapii przeciwnowotworowych nie tylko z zakresu PDT, jednak w przypadku PDT ich znaczenie wydaje się być szczególnie istotne (40). Uszkodzenia naczyń krwionośnych towarzyszące PDT mogą być wynikiem zmian w ich przepuszczalności, zniszczenia ich struktury lub okluzji (41;42). Z drugiej strony zaburzenie unaczynienia tkanki nowotworowej w wyniku PDT może prowadzić do nasilenia produkcji i uwalniania czynników promujących proces angiogenezy takich jak czynnik wzrostu śródbłonnka naczyniowego (VEGF) (43-45), metaloproteinazy (46;47), cyklooksygenazy 2 (48-50). W związku z tym szczególnie duże zainteresowania wzbudzają eksperymenty badające możliwość łączenia PDT z inhibitorami angiogenezy w celu osiągnięcia korzystniejszych efektów terapeutycznych (50-52).

## **1.2 Drogi śmierci komórki**

Uszkodzenia będące skutkiem PDT mogą prowadzić do śmierci komórki na drodze różnych szlaków śmierci: apoptozy (53), nekrozy/nekroptozy (53;54), autofagii (53), katastrofy mitotycznej (55;56), czy procesu uznawanego za odmianę apoptozy, który nie doczekał się jeszcze polskiego odpowiednika, a określanego jako anoikis (57). W kontekście śmierci komórek podczas PDT największą rolę przypisuje się procesom apoptozy, nekrozy/regulowanej nekrozy oraz autofagii, a uruchomienie określonego mechanizmu prowadzącego do destrukcji komórek zależy od licznych

czynników, w tym właściwości samego fotouczulacza, zastosowanego stężenia, mocy światła jak również wewnątrzkomórkowej lokalizacji związku (53).

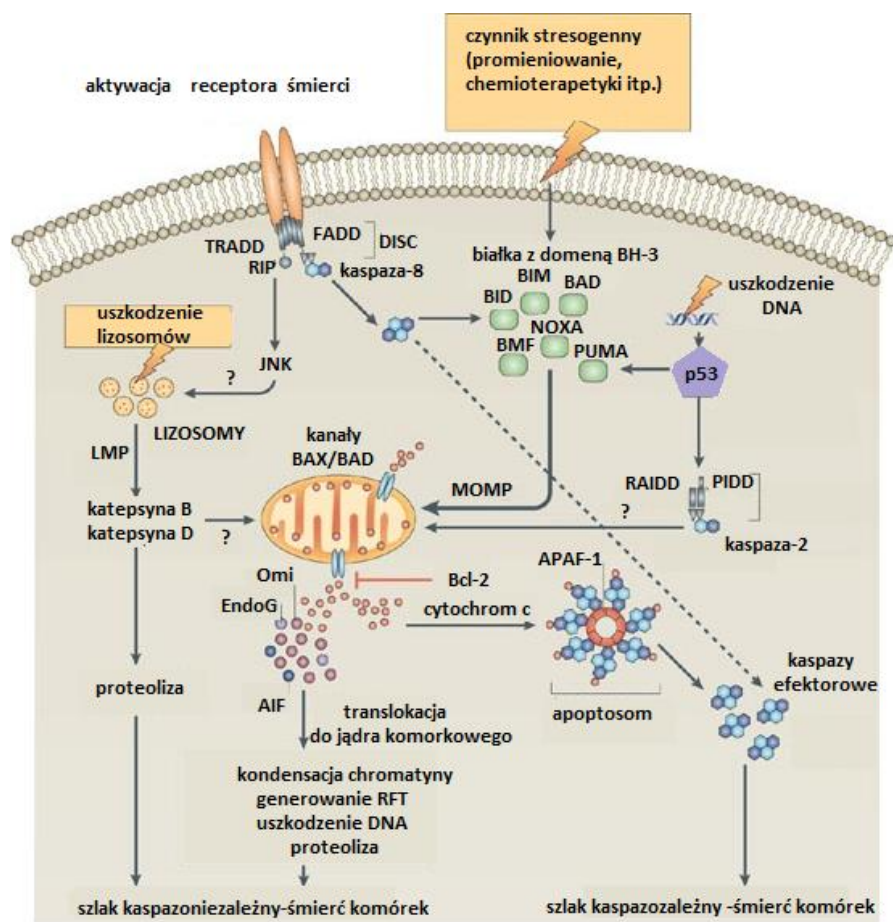
### 1.2.1 Apoptoza

Apoptoza to rodzaj śmierci komórek, której towarzyszy szereg zmian morfologicznych takich jak kondensacja chromatyny, zmiany struktury jądra komórkowego tworzenie się ciałek apoptotycznych, jak i biochemicznych związanych z aktywacją licznych białek klasyfikowanych zarówno jako czynniki transkrypcyjne jak i enzymy (58). Obecnie wyróżnia się dwa główne szlaki apoptozy określne jako: wewnętrzny (tzw. mitochondrialny) oraz zewnętrzny (tzw. receptorowy) (58) (rycina 4). W szlaku wewnętrznym apoptozy istotną rolę odgrywają mitochondria. Wzrost stężenia jonów wapnia w cytoplazmie komórek oraz aktywność proapoptotyczna białek z rodziny Bcl-2 takich jak Bax oraz Bak, może prowadzić do zmian potencjału błony mitochondrialnej. Spadek potencjału błon mitochondrialnych skutkuje uwolnieniem do cytoplazmy proapoptotycznych białek: cytochromu c, AIF, Smac/DIABLO (59). Uwolniony cytochrom c łączy się z prokaspazą-9 oraz czynnikiem Apaf-1 tworząc kompleks określany jako apoptosom (60;61). Kaspaza-9 odpowiada następnie za aktywację kaspaz wykonawczych kaspazy-3,-6 oraz -7 (60). Ponadto uwalniane z mitochondriów białka: Smac/DIABLO oraz HtrA2/Omi wpływają na aktywność kaspaz poprzez unieczynnienie antyapoptotycznych białek z rodziny IAP (cIAP-1, cIAP-2, XIAP) (62;63). Szlak wewnątrz apoptozy może także przebiegać bez udziału kaspaz. W procesie tym, uwolnione z mitochondriów białka takie jak HtrA2/Omi, AIF czy endonukleaza G ulegają translokacji do jądra komórkowego, co może prowadzić do fragmentacji DNA w efekcie śmierci komórek (64-66). Ponadto, uwolnione z mitochondriów białko HtrA2/Omi może niszczyć strukturę cytozolowych białek m.in. białek budujących cytoszkielet komórek- aktyny,  $\alpha$ - i  $\beta$ -tubuliny oraz wimentyny (63).

Szlak zewnętrzny apoptozy jest związany z obecnością w błonie komórkowej tzw. receptorów śmierci, które należą do białek z rodziny TNF takich jak: TNF receptor-1 (TNFR1), CD95 (Fas/APO-1), receptor śmierci 3 (DR3), TRAIL-R1/DR4) czy TRAIL-R2 (DR5). W wyniku związania się receptora śmierci z określonym ligandem (TNF, CD95-ligand/CD95-L/Fas-L; TRAIL/Apo2-L; TL1A) dochodzi do zmian konformacyjnych w obrębie domeny śmierci i utworzenia kompleksu DISC (ang. death-inducing signaling complex), w skład którego wchodzi białka adaptorowe

FADD (ang. FAS-associated death domain) lub TRADD (ang. TNFR-associated death domain) rekrutujące poprzez domenę śmierci prokaspazy efektorowe: -8 oraz -10. W efekcie tego procesu aktywne kaspaza-8 oraz kaspaza-10 prowadzą do uruchomienia kaskady kaspaz wykonawczych (67;68).

Szlak receptorowy może przebiegać niezależnie od mitochondrialnego lub obie ścieżki mogą ulec połączeniu poprzez białko Bid. Kaspaza-8 może aktywować białko Bid do postaci tBid (ang. truncated Bid), które następnie wpływa na obniżenie potencjału błony mitochondrialnej zależne od białek Bax/Bak (62).



**Rycina 4.** Schemat przedstawiający zewnętrzny oraz wewnętrzny szlak apoptozy; LMP (ang. lysosomal membrane permeabilization - wzrost przepuszczalności błony lizosomalnej, EndoG-endonukleaza G, MOMP (ang. mitochondrial outer membrane permeabilization, wzrost przepuszczalności zewnętrznej błony błony mitochondrialnej) (69).

Istotnymi regulatorami apoptozy są pro i antyapoptotyczne białka z rodziny Bcl-2 obejmujące trzy grupy protein klasyfikowane w zależności od kierunku działania i obecności w ich strukturze domen homologii Bcl-2 (HB, ang. Bcl-2 homology) (70). Do antyapoptotycznych białek z rodziny Bcl-2 należą: zawierające domeny BH1-4 białka: A1, Bcl-2, Bcl-xL oraz MCL-1 (71). Działanie antyapoptotyczne polega na utrzymywaniu integralności błony mitochondrialnej poprzez wiązanie i dezaktywowanie proapoptotycznych białek z rodziny Bcl-2 (70). Białka te zlokalizowane są głównie w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, a ponadto mogą się znajdować w retikulum endoplazmatycznym (ER) i cytozolu. Proapoptotyczne białka z rodziny Bcl-2 zostały podzielone na dwie grupy. Pierwsza z nich zawiera domeny BH1-3 i obejmuje takie białka jak: Bax oraz Bak (tzw. białka efektorowe), które niezależnie od siebie mogą zwiększać przepuszczalność błony mitochondrialnej (71). Oba białka różnią się lokalizacją: białko Bak jest zlokalizowane głównie w zewnętrznej błonie mitochondrium oraz w ER, natomiast Bax jest białkiem cytozolowym, które podczas aktywacji szlaku apoptozy musi ulec relokalizacji. Druga grupa proapoptotycznych białek zawiera domenę BH-3 i obejmuje białka: Bad, Bid, Bim, BMF, Puma, Noxa. Mechanizm ich działania pro-apoptotycznego polega na inhibicji białek Bcl-2 oraz bezpośredniej aktywacji białek efektorowych (Bak oraz Bax) w przypadku białek Bid, Bim oraz PUMA lub jak w przypadku białek Bad, Bmf, Hrk, Noxa na wiązaniu i inhibicji antyapoptotycznych białek Bcl-2 (71;72).

Niezwykle istotnym białkiem zaangażowanym w proces apoptozy jest białko p53, które jako czynnik transkrypcyjny wpływa na ekspresję licznych białek proapoptotycznych takich jak Bax, Noxa, PUMA, Bid, CD95, Apaf-1, DR5, p53AIP1 oraz może regulować proces apoptozy bezpośrednio poprzez wiązanie się z białkami antyapoptotycznymi (Bcl-2 and Bcl-xL) i aktywację białek proapoptotycznych (Bax oraz Bak) (73).

Terapia fotodynamiczna może prowadzić do śmierci komórek drodze apoptozy i zarówno w warunkach *in vitro* (74-76) oraz *in vivo* (77-81). Apoptoza podczas PDT może przebiegać zarówno szlakiem zewnętrznym jak i wewnętrznym (82-86).

### 1.2.2 Nekroza i nekroptoza

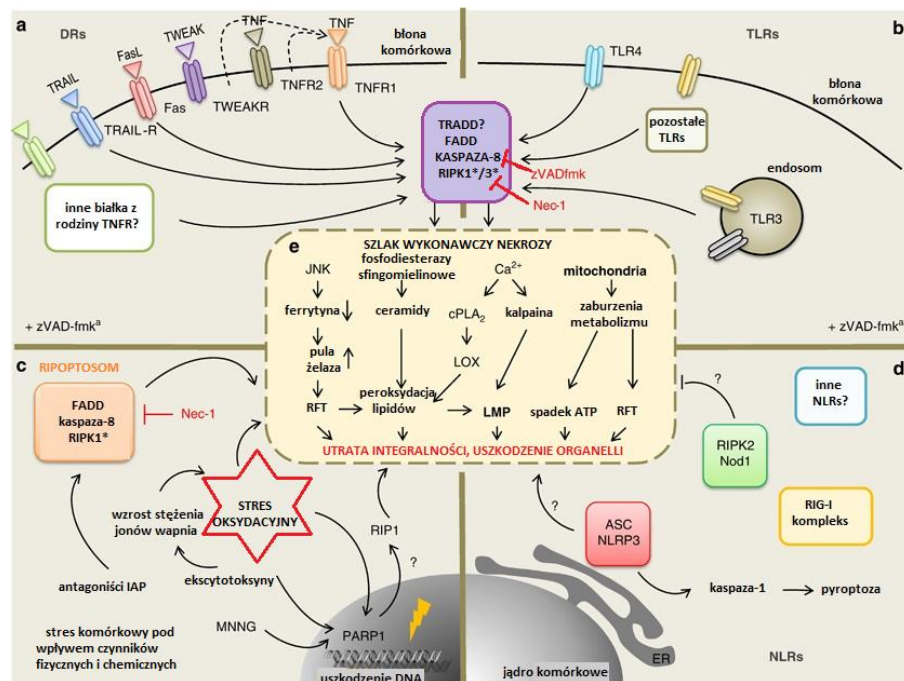
Nekroza może być wywołana przez liczne czynniki chemiczne oraz fizyczne (promieniowanie, gwałtowne zmiany temperatury) i charakteryzuje się zaburzeniem integralności błony komórkowej, spęcznieniem cytoplazmy, uszkodzeniem organelli, i wypływem zawartości komórki na zewnątrz (87). Rozpad komórek podczas nekrozy, wypływ ich zawartości w tym prozapalnych czynników takich jak cytokiny może prowadzić do wystąpienia stanu zapalnego (87). Sugeruje się, że stan zapalny towarzyszący nekrozie uważany dotychczasowo za niekorzystne zjawisko może odpowiadać za działanie immunostymulujące związane z napływem leukocytów w obrębie zmiany nowotworowej i nasilenie prezentacji antygeny (88).

Przez wiele lat nekroza uważana była nieprogramowaną śmierć komórki, natomiast aktualna wiedza pozwala stwierdzić, że podobnie jak apoptoza czy autofagia także nekroza może być procesem podlegającym kontroli. Intensywne badania nad mechanizmem nekrozy doprowadziły do wprowadzenia pojęcia regulowanej nekrozy określanej również jako nekroptoza (89).

Proces nekroptozy jest związany z aktywacją receptorów śmierci znajdujących się w błonie komórkowej takie jak: TNFR1, TNFR2, Fas oraz receptorów TLR (ang. Toll-like receptor) w wyniku związania się z odpowiednim ligandem (90). Przyłączenie TNF $\alpha$  do receptora może zainicjować utworzenie kompleksu (tzw. kompleksu I) obejmującego białka TRADD, RIP1 (określany również jako RIPK1; ang. receptor interacting protein kinase 1), FADD oraz ligazy ubikwityny (białka hamujące apoptozę np. cIAP1, cIAP-2), TRAF2/5 (90;91). Utworzony kompleks może prowadzić do aktywacji szlaku sygnałowego NF- $\kappa$ B o działaniu cytoprotekcyjnym lub poprzez aktywację NOX-1 (oksygenaza NADP, ang.) i wzrost generowania RFT może prowadzić do nekroptozy (90;91). Internalizacja TNFR1 może prowadzić do utworzenia kompleksu IIa składającego się z białek RIP1, RIP3 (określany również jako RIPK3; ang. receptor interacting protein kinase 3), FADD, TRADD i kaspazy-8, który odpowiada za regulację zarówno apoptozy oraz nekroptozy (90;91). Aktywna kaspaza-8 może prowadzić do inhibicji RIP1 oraz drugiego istotnego w procesie nekroptozy białka RIP3 i skierować komórkę na drogę apoptozy (90;91). Wykazano także, że zablokowanie szlaku apoptozy promuje utworzenie pro-nekrotycznego kompleksu zwanego nekrosomem rekrutującego obie kinazy: RIP1 oraz RIP3 (90;92). Kompleks



ufosforylowanych białek RIP1-RIP3 może wpływać na aktywność licznych enzymów takich jak np. fosforylaza glikogenu czy dehydrogenaza glutaminianowa 1, a w efekcie prowadzić do nasilonej produkcji RFT (92;93). Stres oksydacyjny może następnie odpowiadać za zmiany przepuszczalności błony mitochondrialnej, zaburzać ich prawidłowe funkcjonowanie, prowadzić do spadku integralności błony komórkowej, uszkodzeń organelli komórkowych i śmierci komórek. W proces nekroptozy zaangażowane są także liczne mediatory: cytozolowa fosfolipaza A2 (cPLA<sub>2</sub>), lipooksygenazy (LOX), sfingomielinazy, kalpaina, kinaza białka c-Jun (JNK), polimeraza poli(ADP-rybozy)-PARP1, polimery poli(ADP-rybozy) (PAR) i oksydaza NADP (90;93;94). Procesy ilustrujące szlak wykonawczy kontrolowanej nekrozy przedstawiono na rycinie 5.



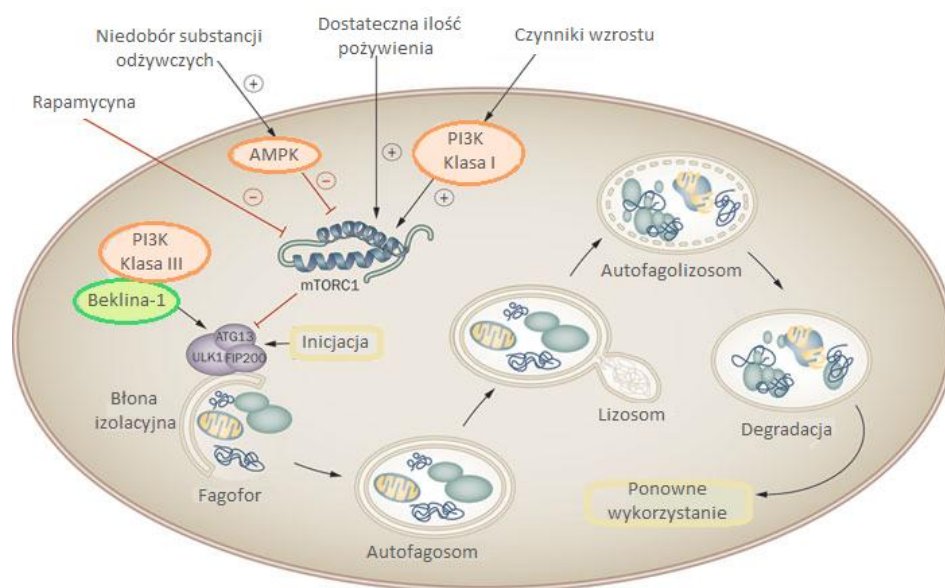
**Rycina 5.** Mechanizm regulacji nekrozy: a) nekroptoza regulowana przez receptory śmierci (TNFR1, TRAIL-R, Fas); b) nekroptoza indukowana za pośrednictwem receptorów Toll-podobnych TLR3, TLR4 c) śmierć na drodze nekrozy w wyniku czynników fizyczno-chemicznych; MNNG-N-metylo-N'-nitro-N-nitrozoguanidyna d) inicjowanie nekrozy przy udziale receptorów NOD-podobnych-NLR; NLRP3- (ang. NOD-like receptor family pyrin domain-containing protein 3); ASC- białko adaptorowe (ang. apoptosis-associated speck-like protein), RIG-I – receptor RIG-I (retinoic acid-inducible gene I); Nod-1 – białko cytozolowe (ang. nucleotide-binding oligomerization protein) (e) efekty aktywacji procesu nekrozy; LMP-spadek potencjału błony lizosomalnej (94).

Proces nekrozy indukowany podczas PDT zależy od licznych czynników w tym, właściwości fizykochemicznych fotouczulacza, użytego stężenia, wewnątrzkomórkowej lokalizacji, natężenia światła oraz rodzaju i stężenia RFT (7). Wyższe stężenia PS oraz dawka światła i czas naświetlania mogą prowadzić do nekrozy, natomiast niższe wartości powyższych parametrów mogą aktywować proces apoptozy (95-97). Nekroza podczas PDT może być związana z wolnorodnikowymi uszkodzeniami błony komórkowej prowadzącymi do spadku jej integralności (98;99). Uszkodzenie lizosomów, wzrost poziomu jonów wapnia w komórce, a także inaktywacja kaspaz pod wpływem RFT (100) to kolejne czynniki związane z uruchomieniem procesu nekrozy podczas PDT. Ponadto, wykazano, że nekroza podczas PDT może podlegać kontroli przez białka RIP3 oraz RIP1 i przebiegać z utworzeniem nekrosomu rekrutującego oba białka bez udziału kaspaz-8 oraz FADD (101).

### **1.2.3 Autofagia**

Autofagia jest procesem katabolicznym odpowiedzialnym za utrzymanie równowagi pomiędzy procesami syntezy i degradacji cząsteczek/organelli w komórce (53). Autofagia odpowiada za usuwanie nieprawidłowych białek, uszkodzonych organelli oraz eliminacji patogenów (102). W warunkach niekorzystnych dla komórki takich jak niedostateczne dostarczanie substancji odżywczych lub hipoksja autofagia spełnia funkcje cytoprotekcyjne, natomiast w sytuacji, kiedy uszkodzenia są bardzo znaczne lub też w przypadku sytuacji, w której z różnych przyczyn proces apoptozy jest zahamowany autofagia może prowadzić do śmierci komórek (103). Autofagia jest procesem przebiegającym w kilku etapach, w wyniku, których ma miejsce uformowanie fagoforu otaczającego przeznaczone do degradacji cząsteczki/organelle komórkowe. Następnie zostaje utworzony autofagosom, który w wyniku fuzji z lizosomem tworzy strukturę określaną jako autofagolizosom (autolizosom). Połączenie się autofagosomu z lizosomem skutkuje uwolnieniem enzymów hydrolitycznych niezbędnych do degradacji jego zawartości (103;104) (rycina 6).

Proces formowania autofagosomu obejmuje kilka etapów i przebiega pod kontrolą licznych białek, z których najważniejszą rolę odgrywa rodzina białek Atg. W pierwszym etapie tzw. inicjacji ma miejsce utworzenie kompleksu obejmującego białka ULK1 oraz ULK-2, Atg13, FIP200 oraz Atg101 (104), kompleks ten podlega regulacji przez białko mTOR, a mechanizm inhibicji prawdopodobnie polega na związaniu się kompleksu I (mTORC1) z kompleksem ULK1–Atg13–FIP200 i ufosforylowaniem przez mTOR białek ULK1 oraz Atg13 (105;106). W proces autofagii może być też zaangażowana kinaza AMPK, która może promować ten proces poprzez inhibicję mTORC1 oraz aktywację ULK1 (107). W dalszych etapach procesu autofagii zachodzi nukleacja kontrolowana przez kompleks Beklina-1-PI3KC3-Atg14L oraz WIPIs (ang. WD-repeat protein Interacting with PhosphoInosides) (108). W proces elongacji zaangażowane są dwa systemy o aktywności ubikwityno-podobnej. Pierwszy z nich składa się z białek Atg5, Atg12 oraz Atg16L, drugi z białka LC3 (ang. microtubule-associated protein 1 light chain 3; MAP1-LC3) związanego z fosfadytyloetanoloaminą (PE) (104;108). Elementy budulcowe dla tworzących się błon autofagosomu są dostarczane także przez białko transbłonowe Atg9 (103). Utworzony autofagosom przechodzi proces dojrzewania, któremu towarzyszy przyłączenie endosomów zarówno tzw. późnych jak i wczesnych (103). W następnym etapie autofagosom łączy się z lizosomem przy udziale białek LAMP-1 oraz LAMP-2, a obecne w lizosomach enzymy hydrolityczne odpowiadają za degradację cząstek zawartych w autofagosomie (103).



**Rycina 6.** Regulacja i przebieg procesu autofagii (109).

Autofagia indukowana pod wpływem terapii fotodynamicznej może, w zależności od rodzaju generowanych RFT i stopnia będących jej następstwem wolnorodnikowych uszkodzeń, prowadzić do śmierci komórek lub może też wykazywać działanie cytoprotekcyjne (53;110;111). W komórkach niezdolnych do indukcji apoptozy np. na skutek wyciszenia białek Bax i Bak PDT prowadziła do aktywacji autofagii i śmierci komórek (112;113). Wykazano jednak także, że wyciszenie genu Atg7 w komórkach niezdolnych do indukcji apoptozy skutkowało obniżeniem działania cytotoksycznego podczas PDT (114). PDT może wpływać na proces autofagii również bezpośrednio poprzez oddziaływanie na białka oraz organella komórkowe zaangażowane w ten proces (np. lizosomy oraz endosomy) (53). Zaobserwowano, że uszkodzenia lizosomów podczas PDT mogą hamować cytoprotekcyjny efekt autofagii. Wykazano, że fotouczulacz Pc4 gromadząc się w retikulum endoplazmatycznym (ER) może prowadzić do fotoksydacyjnych uszkodzeń ważnego w procesie autofagii białka IP3 (53). Natomiast, badania z zastosowaniem ALA wykazały wzrost AMPK podczas PDT i aktywację procesu autofagii i śmierci komórek (115).

### **1.3 Lokalizacja związków fotouczulających**

Jednym z czynników bardzo istotnie wpływających na mechanizm działania fotouczulaczy jest ich wewnątrzkomórkowa lokalizacja oraz będąca jej konsekwencją struktura docelowa. Generowane podczas PDT wolne rodniki i/lub reaktywne formy tlenu charakteryzują się krótkim czasem życia oraz, w zależności od rodzaju RFT, różną zdolnością do przechodzenia przez błony komórkowe i przemieszczania się w obrębie komórki (17). Powstający podczas reakcji typu II tlen singletowy uważany za główną przyczynę wolnorodnikowych uszkodzeń podczas PDT charakteryzuje się krótkim okresem półtrwania ( $\sim 3 \mu\text{s}$ ) i niskim współczynnikiem dyfuzji ( $\sim 2,4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ ), co sprawia, że może on pokonywać w komórce tylko stosunkowo niewielkie odległości (116). W związku z tym stopień i rodzaj wywołanych wolnorodnikowych uszkodzeń biologicznie ważnych molekuł jest ściśle związany ze strukturą/ strukturami, w których w najwyższym stężeniu gromadzi się fotouczulacz (18).

Istotnym czynnikiem, który wpływa na stopień przechodzenia związków przez błony komórkowe oraz na wewnątrzkomórkową lokalizację fotouczulacza jest budowa chemiczna w tym m.in: ładunek związku, hydrofobowość, stopień asymetrii i kształt cząsteczki (17;117). Obecność ładunków dodatnich może odpowiadać za wiązanie się z białkami osocza, co istotnie wpływa na dystrybucję fotouczulaczy *in vivo* i umożliwia osiągnięcie struktury docelowej (118;119). Stopień lipofilności fotouczulaczy ma kluczowe znaczenie dla ich zdolności przechodzenia przez błony biologiczne. Związki o charakterze lipofilnym wykazują zdolność do przechodzenia przez błony komórkowe, podczas gdy związki bardziej hydrofilne nie mogą swobodnie przenikać przez błony komórkowe i ich wchłanianie może zachodzić na drodze transportu aktywnego lub endocytozy (17;30;120). Jednocześnie związki hydrofilowe charakteryzuje mniejsza zdolność do tworzenia agregatów w przeciwieństwie do związków lipofilnych (121). Utworzone agregaty nie mogą przechodzić przez błony komórkowe i w zależności od ich rozmiarów mogą ulegać fagocytozie lub endocytozie i rozkładowi przez makrofagi (30;122). Najkorzystniejsze właściwości mogą wykazywać związki o charakterze amfifilowym, warunkującym ich optymalne przenikanie przez fosfolipidowe błony komórkowe (20).

Fotouczulacze stosowane w PDT mogą gromadzić się w różnych strukturach komórki: mitochondriach (123;124), lizosomach (125-127), retikulum endoplazmatycznym, aparatach Golgiego (128-130), błonie komórkowej (99), czy mikrotubulach (131;132), a lokalizacja w komórce w wielu przypadkach nie ogranicza się do jednej struktury. Ponadto, w wyniku naświetlania niektóre PS mogą ulegać delokalizacji w komórce (133;134). Zaobserwowano, że sulfonowane *mezo*-tetrafenyloporfiryny (TPPS<sub>1</sub>, TPPS<sub>2a</sub>, TPSS<sub>2o</sub>, TPPS<sub>4</sub>) kumulują się w lizosomach komórek NHIK 3025, natomiast po naświetlaniu pierwotna lokalizacja ulega zmianie. Dipodstawione TPPS<sub>2a</sub>, TPSS<sub>2o</sub>, ulegały dyfuzji do cytoplazmy natomiast TPPS<sub>4</sub> gromadziła się w pobliżu jądra komórkowego (135). Delokalizacja fotouczulaczy może wiązać się z także z fazą cyklu komórkowego. Wyniki badań uzyskane dla *mezo*-tetra(4-sulfofenylo)porfiryny (TPPS<sub>4</sub>) wykazały redystrybucję fotouczulacza z lizosomów do cytoplazmy, a następnie jądra komórkowego w komórkach znajdujących się w fazie wzrostu, natomiast w fazie stacjonarnej nie zaobserwowano zmiany lokalizacji TPPS<sub>4</sub> (136). Kationowe porfiryny w wyniku naświetlania uległy redystrybucji z błony komórkowej do cytozolu, gdzie następnie pod wpływem generowanych RFT następowała degradacja prokaspazy-3 i -9 (137).

Mitochondria to organelle niezbędne do funkcjonowania komórek, stanowiące ich centra energetyczne, w związku z tym uszkodzenia i zaburzenia funkcji mitochondriów mogą powodować poważne zakłócenia procesów metabolicznych prowadzące do śmierci komórki na drodze apoptozy lub nekrozy (138). Na skutek działania PDT w mitochondriach może dochodzić do zwiększonego generowania RFT, wzrostu przepuszczalności błony mitochondrialnej, wypływu cytochromu c i indukcji apoptozy (139), może też dojść do zaburzenia fosforylacji oksydacyjnej (140) oraz oddychania komórkowego (141). Przykładem fotouczulaczy gromadzących się w mitochondriach są ftalocyjanina glinowa Pc4 lub kwas-5-aminolewulinowy (ALA), które podczas PDT mogą wywołać fotoksydacyjne uszkodzenia białka kardiolipiny znajdującej się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej prowadząc do uwolnienia cytochromu c i indukcji apoptozy (142;143).

Lizosomy stanowią organelle komórkowe niezbędne w utrzymaniu homeostazy komórki uczestniczące w procesach degradacji cząstek pobieranych przez komórkę na drodze endocytozy lub fagocytozy, albo formowanych na drodze autofagii (144). Kwasowe środowisko we wnętrzu lizosomów warunkuje aktywność enzymów hydrolitycznych, z których najistotniejszą rolę przypisuje się katepsynom (145). Katepsyny mogą brać udział w śmierci komórek na drodze apoptozy między innymi poprzez aktywację białka Bid (146). Lizosomy stanowią także magazyn jonów żelaza w komórce, a niskie pH we wnętrzu lizosomów sprzyja występowaniu żelaza w postaci jonów  $Fe^{+2}$  zdolnymi do reakcji z  $O_2$  prowadząc do powstania  $O_2^{\cdot-}$  lub do homolitycznej reakcji rozkładu  $H_2O_2$  w wyniku której mogą powstawać  $OH^{\cdot}$  i  $OH^-$  (147;148). Wykazano, że uszkodzenia lizosomów podczas PDT mogą prowadzić do aktywacji procesu apoptozy (149;150), a jednym z możliwych mechanizmów jest aktywacja białka Bid pod wpływem uwolnionych z lizosomów katepsyn (150-154). Ponadto, uszkodzenia lizosomów podczas PDT mogą prowadzić do uwolnienia jonów żelaza, które za pomocą kanałów wapniowych zlokalizowanych w błonie mitochondrium oraz białka mitoferryny-2 dostają się do ich wnętrza, gdzie mogą katalizować reakcje oksydacyjno-redukcyjne prowadzące do nadmiernej produkcji RFT i śmierci komórek (150;155).

Retikulum endoplazmatyczne spełnia w komórce liczne funkcje związane z utrzymaniem homeostazy wapnia, syntezą białek i ich potranslacyjnych modyfikacjach i prawidłowym formowaniu ich struktury przestrzennej, syntezie steroli,

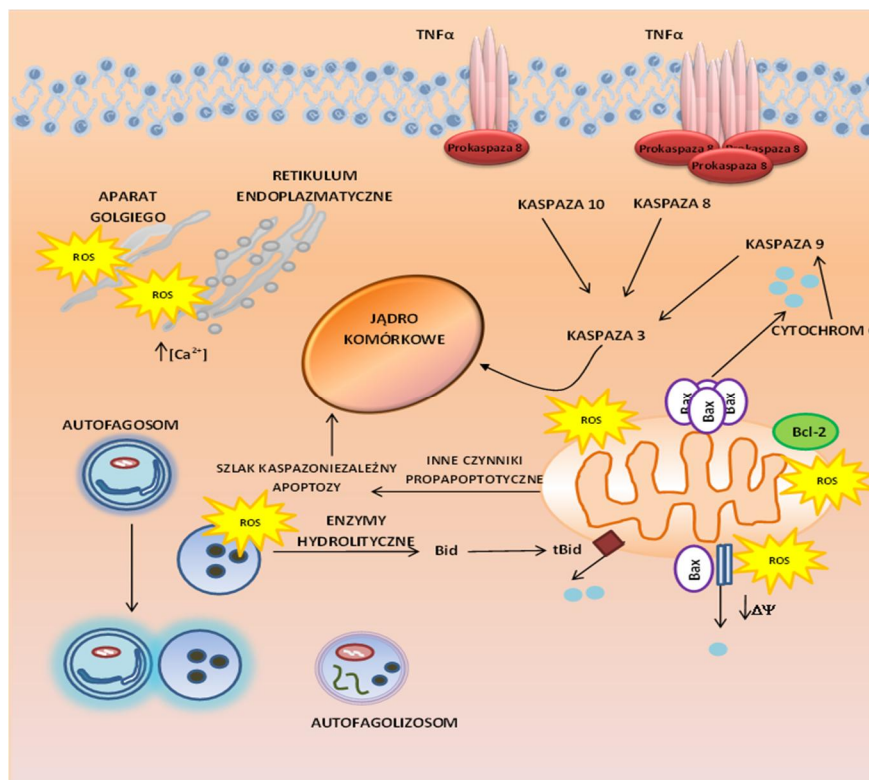
uwalnianiu kwasu arachidonowego oraz uczestniczy w procesie apoptozy (156). Gradient stężeń wapnia w komórce pomiędzy cytozolem (50–100 nM), a retikulum endoplazmatycznym (0,1mM) jest kontrolowany przez obecne w błonie ER pompy jonowe zależne od ATP – i określane skrótem: SERCA (ang. Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium transport ATPases). Białka te kodowane są przez 3 geny (ATP2A1, 2 and 3) i mogą występować w komórkach w trzech różnych izoformach (157).

Zaburzenie w funkcjonowaniu ER podczas PDT może prowadzić do uwalniania jonów wapnia  $Ca^{+2}$  do cytozolu komórek (158-160), a jedną z przyczyn mogą być fotoksydacyjne uszkodzenia SERCA-2 (112;161;162). Wzrost poziomu wapnia w komórce jest jednym z czynników regulujących proces apoptozy, autofagii, nekrozy oraz anoikis (163). Ponadto, uszkodzenia ER podczas PDT mogą prowadzić do utraty funkcji niektórych białek antyapoptotycznych takich jak np. Bcl-2 (164). Zaburzenie funkcji ER może również prowadzić do nagromadzenia się białek o nieprawidłowo uformowanej strukturze i uruchomienia procesu tzw. odpowiedzi na nieprawidłowo złożone białka UPR (ang. unfolded protein response, w polskim piśmiennictwie używana jest też nazwa „nieprawidłowo sfałdowane białka”) (27;165).

Fotouczulacze gromadzące się w błonie komórkowej mogą prowadzić do zaburzenia jej struktury i wypływu zawartości komórek. W związku z tym lokalizacja PS w błonie komórkowej może być związana ze śmiercią komórki na drodze nekrozy (53). Wykazano, że porfirmer sodu (Photofrin), dla którego błona komórkowa jest jednym z możliwych miejsc lokalizacji w niższych dawkach powodował zahamowanie proliferacji, natomiast wyższe dawki prowadziły do uszkodzenia błony komórkowej (17).

Cytoszkielec to struktura odgrywająca istotną rolę w zapewnieniu i utrzymaniu odpowiedniego środowiska wewnątrzkomórkowego poprzez wpływ między innymi na kształt komórek, proces migracji, podziały komórkowe, transport wewnątrzkomórkowy, szlaki sygnałowe czy funkcje błony komórkowej. W budowie cytoszkieletu komórek wyróżnia się trzy główne polimery: filamenty aktynowe, filamenty pośrednie oraz mikrotubule (166;167). Terapia fotodynamiczna może prowadzić do zmian w strukturze cytoszkieletu poprzez fotouszkodzenia jego elementów składowych (131). Ponadto, PDT może powodować zmiany w organizacji mikrotubul. Zaobserwowano, że PDT przy użyciu wysokich dawek Photofrinu powodowała nieodwracalną depolimeryzację

tubulin i śmierć komórek (132). Możliwe zmiany w komórce podczas PDT związane z miejscem lokalizacji przedstawiono na rycinie 7.



**Rycina 7.** Drogi śmierci komórki podczas PDT w wyniku uszkodzenia określonych struktur komórkowych (rycina wykonana na podstawie (32)).

#### 1.4 Mechanizmy oporności komórek na PDT

Istotnym zagadnieniem dotyczącym PDT są zjawiska obniżające efektywność działania fotouczulaczy w komórkach nowotworowych związane między innymi z hipoksją tkanki nowotworowej oraz z obecnością aktywnych układów chroniących komórkę przed RFT (7).

Z uwagi na fakt, że komórki nowotworowe w przeważającej liczbie przypadków znajdują się *in vivo* w stanie ciągłej hipoksji, PDT, radioterapia czy terapia z zastosowaniem chemioterapeutyków, których mechanizm działania jest związany z generowaniem RFT jest często związana z ryzykiem niepowodzenia (18). Dodatkowo



w przypadku terapii fotodynamicznej zjawisko oporności może nasilać niedotlenienie tkanki nowotworowej w wyniku uszkodzenia naczyń krwionośnych oraz zwiększonego zużycia tlenu niezbędnego w reakcji fotodynamicznej typu II (18;168). W rezultacie zmniejszone stężenie tlenu, może prowadzić do obniżenia efektywności PDT, a działanie cytoprotekcyjne może być związane z aktywacją takich czynników jak: AP-1 (activator protein 1), czynnika indukowanego hipoksją (HIF), czynnika transkrypcyjnego Nrf2 czy wzrostem aktywności hemoksygenazy-1 (HO-1), pozostającej pod kontrolą Nrf2 (7). W wyniku działania HO-1 może powstawać biliwerdyna, a następnie przy udziale reduktazy biliwerdyny (BVR) bilirubina o właściwości antyoksydacyjnych (169). Wzrost poziomu białka HIF-1 $\alpha$  i jego stabilizacja w warunkach hipoksji może prowadzić do nasilenia proliferacji komórek nowotworowych w wyniku procesu angiogenezy stymulowanej przez wzrost ekspresji czynnika VEGF (170). Badania *in vitro* przeprowadzone z wykorzystaniem kwasu 5-aminolewulinowego (ALA) wykazały spadek aktywności PDT w wyniku wzrostu ekspresji białka HIF-1 $\alpha$  w warunkach hipoksji wywoływanej chemicznie pod wpływem chlorku kobaltu (168). Rozwiązaniem problemu nieefektywności PDT w wyniku hipoksji mogą być fotouczulacze, których mechanizm działania opiera się głównie na I typie reakcji fotodynamicznej (171).

W odpowiedzi na czynniki stresogenne takie jak ciepło, czynniki toksyczne, stres oksydacyjny w komórkach może wzrastać poziom białek szoku cieplnego (ang. HSP – heat shock protein). HSPs ze względu na masę cząsteczkową dzieli się na pięć głównych rodzin: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 oraz drobnocząsteczkowe HSPs (masa pomiędzy 12-43 kDa). Jako tzw. molekularne chaperony odgrywają ważną rolę w procesach związanych z fałdowaniem białek i utrzymaniem odpowiedniej konformacji oraz biorą udział w szlakach sygnałowych (172-174). Ponadto, niektóre białka z rodziny HSPs wykazują działania antyapoptotyczne (175). Stres oksydacyjny podczas PDT może powodować wzrost ekspresji białek HSP27, HSP70, HSP60, HSP90, HSP110 (176-178). Sugeruje się, że poziom HSPs jest jednym z możliwych czynników wpływających na efektywność PDT jednakże dostępne w piśmiennictwie dane są niejednoznaczne (179;180).

Surwiwina jest przedstawicielem białek z rodziny AIP, który uczestniczy w procesach związanych z apoptozą, podziałami komórkowymi oraz działaniem cytoprotekcyjnym w odpowiedzi na stres (181). Działanie antyapoptotyczne jest

związane ze stabilizacją białka XIAP (bezpośredniego inhibitora kaspazy-9), oddziaływaniem z białkiem HBXIP (ang. Hepatitis B X-interacting protein) oraz wiązaniu białka Smac/DIABLO (181). W odpowiedzi na czynniki stresogenne surwiwina wykazuje działanie cytoprotekcyjne w wyniku interakcji z molekularnymi chaperonami takimi jak AIP, czy białka szoku cieplnego: HSP60, HSP90 (181). Wyniki badań dotyczące roli surwiwiny w modulowaniu aktywności fotouczulaczy sugerują, że poziom jej ekspresji w komórkach nowotworowych może być jednym z czynników odpowiedzialnych za obniżenie efektywności PDT (182;183).

Działanie cytoprotekcyjne podczas PDT może wiązać się także z poziomem tlenku azotu (NO) w warunkach *in vitro* (184-187) oraz *in vivo* (188;189). Tlenek azotu odgrywa istotną rolę w licznych procesach biologicznych: wywiera działanie rozszerzające naczynia krwionośne, bierze udział w procesach neurotransmisji jak również w mechanizmach obrony przed patogenami (190). W zależności od stężenia może wykazywać działanie ochronne na komórki (niższe stężenia), natomiast w wyższych stężeniach wykazywać działanie prooksydacyjne, a przez to aktywować procesy prowadzące do śmierci komórek (191). Mechanizm protekcyjnego działania niskich stężeń NO podczas PDT może być związany z hamowaniem aktywności kaspaz w wyniku S-nitozylacji, obniżenia ekspresji proapoptotycznego białka Bax i wzrostu ekspresji antyapoptotycznego białka Bcl<sub>xL</sub> i indukowanie hemooksygenazy-1 (187;191). Sugeruje się, że działanie protekcyjne może wynikać też z neutralizowania rodników lipidowych (191).

NO może ulegać konwersji do reaktywnych form azotu takie jak N<sub>2</sub>S<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub> czy bardzo reaktywnego nadtlenuazotynu ONOO<sup>-</sup>, które mogą prowadzić do wystąpienia wolnorodnikowych uszkodzeń biologicznie ważnych cząsteczek (17;191). Ponadto, wykazano, że wysokie stężenie tlenku azotu w komórkach może hamować czynnik NF-κB i prowadzić do wzrostu pro-apoptotycznego białka RKIP (ang. Raf kinase inhibitor protein; inhibitor kinazy Raf-1), natomiast niskie stężenia aktywować czynnik NF-κB promując przeżycie komórek (191). Wykazano, że zastosowanie donora NO prowadziło do modulacji szlaku NF-κB /SNAIL/RKIP poprzez wzrost proapoptotycznego białka RKIP i zahamowania białek NF-κB oraz SNAIL prowadząc do śmierci komórek (191;192). Korzystnym rozwiązaniem w PDT może być także projektowanie fotouczulaczy takich jak Ru(Pc)(pz)<sub>2</sub>{Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO)}<sub>2</sub>[(PF<sub>6</sub>)<sub>6</sub>] (gdzie Pc-ftalocyjanina, bpy-bipirydyna, pz-pirazyna) czy [Ru(NO)(ONO)(Pc)] (Pc-ftalocyjanina) zdolnych do

generowania tlenu singletowego i tlenku azotu w celu zapewnienia silnego, synergistycznego działania cytotoksycznego wobec komórek nowotworowych (193;194).

Mechanizm oporności komórek na PDT jest związany także z wewnątrzkomórkowymi systemami, które mają na celu ochronę komórek przed uszkodzeniami wolnorodnikowymi. Jeden z tych mechanizmów cytoprotekcyjnych jest związany ze wzrostem poziomu niskocząsteczkowych antyoksydantów zarówno hydrofilowych jak i lipofilowych w komórkach, co w znacznym stopniu może zmniejszać efektywność PDT (7). Podobny wpływ na obniżenie efektywności PDT posiada także aktywność enzymów stanowiących pierwszą linię obrony przed ROS w komórce takich jak: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), a szczególnie dwie jej formy obecne w komórce: mitochondrialna dysmutaza ponadtlenkowa (MnSOD) i cytoplazmatyczna dysmutaza ponadtlenkowa (CuZnSOD), jak również katalaza (CAT), reduktaza glutationowa (GR) i syntetaza glutationu (GS) (7). Wykazano także, że wysoki aktywność peroksydazy glutationu (GPx) i S-transferazy glutationu może odpowiadać za zmniejszenie efektywności PDT (195;196). Zahamowanie aktywności syntetazy glutationu za pomocą inhibitora sulfoksyminy L-butioniny (BSO) prowadziło do nasilenia efektu cytotoksycznego fotouczulacza AIPcS<sub>2</sub> wobec komórek nowotworu piersi MCF-7 (197). Podobny efekt miało zahamowanie aktywności mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej przy użyciu inhibitora MnSOD - 2-metoksyestradiolu, które prowadziło do uzyskania silniejszego działania cytotoksycznego podczas PDT w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* (198). Wysoka ekspresja MnSOD w komórkach Jurkat odpowiadała za zmniejszenie wrażliwości na apoptozę pod wpływem PDT prowadzonej przy użyciu fotouczulacza Pc4 (199). W badaniach nad aktywnością fotodynamiczną hiperycyny prowadzonych na komórkach czerniaka G361 oraz dwóch bezbarwnikowych liniach komórkowych pochodzących z nowotworów skóry M18 i M6 zaobserwowano, że komórki G361 charakteryzują się dużo większą opornością na PDT niż komórki M18 i M6, zjawisko to może mieć swoje wytłumaczenie w różnicach w aktywności GPx i CAT, a także w poziomie zredukowanej postaci glutationu w tych komórkach (200).

W świetle zacytowanych powyżej przykładów możliwość wpływu na wewnątrzkomórkowe systemy obrony antyoksydacyjnej w znacznym stopniu może przyczynić się do wzrostu skuteczności PDT.

## 1.5 Związki fotouczulające stosowane w PDT

Podstawowym i kluczowym elementem koniecznym do uzyskania efektu terapeutycznego w wyniku PDT są fotouczulacze, stąd jednym z kierunków badań z zakresu terapii fotodynamicznej zmierzają do uzyskania „idealnego” związku fotouczulającego. Pod pojęciem tym rozumie się taki fotouczulacz, który charakteryzowałby się między innymi:

- niskim poziom toksyczności w ciemności,
- absorpcją światła widzialnego w rejonie pasma czerwonego i podczerwonego (650 nm - 850 nm), co zapewnia głęboką penetrację światła w tkankach, a jednocześnie dostarcza wystarczającą ilość energii pozwalającą osiągnąć stan wzbudzony
- prostą i niedrogą syntezę pozwalającą na produkcję na dużą skalę oraz stałą i powtarzalną formułę
- rozpuszczalnością w wodzie lub niskotoksycznych wodnych roztworach
- niską tendencją do agregacji w układzie biologicznym
- korzystnymi parametrami farmakokinetycznymi (7;20;201)

Pomimo rozwoju wiedzy z zakresu terapii fotodynamicznej oraz metod syntezy osiągnięcie wszystkich cech idealnego fotouczulacza w jednym związku nadal pozostaje wyzwaniem dla współczesnej medycyny.

Fotouczulacze można podzielić w oparciu o różne kryteria: budowę chemiczną, strukturę docelową czy jednolitość struktury (8). Wyróżnia się także trzy generacje fotouczulaczy: I generacja (pochodne hematoporfiryny), II generacja (porfiryny, pochodne chlorofilu, barwniki i in.), III generacja (fotouczulacze I i II skoniugowane z nanocząsteczkami, przeciwciałami oraz inne systemy dostarczające fotouczulacze) (8;202). Większość fotouczulaczy stosowana w PDT opiera się na strukturze tetrapirołu, którą charakteryzuje szerokie pasmo absorpcji w zakresie 400 nm (tzw. pasmo Soreta) oraz szeregu niższych pasm absorpcji przesuniętych w kierunku dłuższych długości fal (tzw. pasma Q) (17). Podstawowe struktury związków fotouczulających opartych o strukturę tetrapirołu przedstawiono na rycinie 8. Bardzo ważną grupą związków w PDT opierających się na strukturze tetrapirołu są porfiryny, których najdłuższe pasmo

absorpcji znajduje się w zakresie 630 nm (17). Pierwszym fotouczulaczem, który znalazł zastosowanie w leczeniu była mieszanina rozpuszczalnych w wodzie porfiryn tzw. pochodne hematoporfiryny (HPD, ang. Hematoporphirin Derivatives). Oczyszczona postać HPD - porfirmer sodu została wprowadzona do leczenia pod nazwą Photofrin w Kanadzie w 1993 roku (203) i w dalszym ciągu należy do jednych z najczęściej stosowanych fotouczulaczy, pomimo takich wad jak bardzo długo utrzymujące się odczyny fototoksyczne u pacjentów oraz absorpcja światła przy stosunkowo niskiej długości fali (202).

Kolejne modyfikacje obejmujące II oraz III generację fotouczulaczy miały na celu przesunięcie absorpcji w zakres fali dłuższych oraz ograniczenie działań niepożądanych przy zapewnieniu wysokiej skuteczności. Bardzo interesującym fotouczulaczem jest kwas 5-aminolewulinowy, który jako pro-lek ulega w organizmie przekształceniu do protoporfiryny IX i jest akumulowany w obrębie zmiany chorobowej. ALA może być stosowany doustnie, dożylnie oraz trans-dermalnie (204;205). Do leczenia wprowadzono także pochodne ALA, które miały na celu zwiększenie lipofilności i wchłaniania (ester metylowy; Met-ALA) (206), czy zapewnienia fluorescencji (ester heksylowy; Hex-ALA) wykorzystywanej podczas zabiegów chirurgicznych czy diagnostycznych (207-209).

Kolejną klasę związków fotouczulających o strukturze tetrapirołu stanowią chloryny, które charakteryzują się zredukowanym wiązaniem podwójnym w jednym z pierścieni pirołu. Ta modyfikacja prowadzi do przesunięcia pasma absorpcji w zakres długości światła 650–690 nm (17). W leczeniu aktualnie znalazły zastosowanie następujące pochodne chloryn: benzoporfiryna (preparat Visudyne), *meta*-tetra(hydroksyfenylo)chloryna (*m*-THPC, preparat Foscan), czy *N*-aspartylo chloryna e6 (NPe6, Talaporfin, Ls11), wywodząca się ze struktury chlorofilu a (203).

Bakteriochloryny to grupa fotouczulaczy, które posiadają dwa zredukowane wiązania podwójne w dwóch pierścieniach pirołu, a maksimum absorpcji światła przypada na długość fali w zakresie 700-900 nm, w którym transmisja światła przez tkanki jest największa. Czynnikiem ograniczającym stosowanie tej klasy fotouczulaczy jest ich niestabilność oraz silna lipofilność w związku z czym wprowadza się liczne modyfikacje w celu poprawy ich właściwości farmakokinetycznych i fizykochemicznych (17;210).

Modyfikacje naturalnie występujących porfiryn oraz chloryn przyczyniły się do wprowadzenia kolejnych klas fotouczulaczy takich jak: purpuryny (211), feoforbidy, feofityny (212;213), pyrofeoforbidy (214;215) oraz forbiny (17).

Szczególną grupą fotouczulaczy stanowią ftalocyjaniny (Pcs), które absorbują światło o stosunkowo wysokiej długości fali (>650 nm), bardzo dobrą zdolność do generowania tlenu singletowego i innych RFT oraz stabilność chemiczną (17;216). Ponadto, ftalocyjaniny podstawione w pierścieniach bocznych charakteryzują się niską toksycznością w ciemności oraz minimalnym toksycznym działaniem systemowym, dodatkowo wykazują korzystne właściwości farmakokinetyczne (216). Modyfikowane ftalocyjaniny posiadają wiele korzystnych właściwości niemniej parametrem ograniczającym ich zastosowanie jest niska rozpuszczalność oraz zdolność do agregacji zwłaszcza w środowisku wodnym, co obniża ich efektywność w układach biologicznych (216;217). W związku z tym dąży się do zaprojektowania takich modyfikacji ftalocyjanin, które pozwolą wyeliminować problemy z rozpuszczalnością, a jednocześnie zachować korzystne właściwości fotochemiczne i biologiczne (216;218).

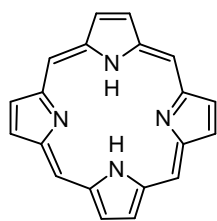
Kolejną szeroką grupą fotouczulaczy stanowią związki niewystępujące naturalnie posiadające w swojej strukturze pierścień pirolu. Zalicza się do nich: teksafiryny (219), porficyny (220) oraz safiryny (221;222). Bardzo obiecującym przedstawicielem teksafiryń znajdującym na się na etapie badań klinicznych jest moteksafina lutetu (Lu-*Tex*, *Lutrin*®), która charakteryzuje się korzystnymi parametrami takimi jak rozpuszczalność w wodzie oraz absorpcją światła z zakresu długości fali >700 nm (203).

Liczne fotouczulacze zawierają w swojej strukturze atom metalu, którego obecność może wpływać korzystnie na takie parametry jak: długość życia stanu trypletowego czy promowanie przejścia wewnątrzsystemowego. Generalnie, uważa się, że poprawa właściwości jest związana z zastosowaniem metali o właściwościach diamagnetycznych (np. Zn, Pd, In, Sn, Lu) (223).

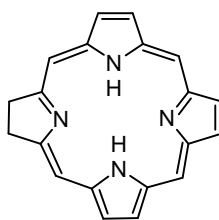
---

**Struktury podstawowe fotoczułaczy oparte na strukturze tetrapirołu**

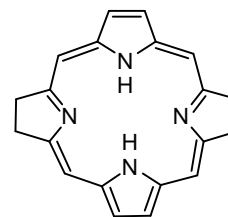
---



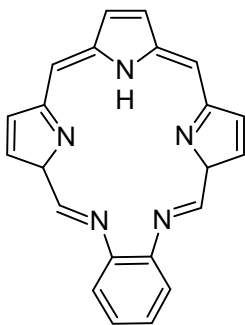
**PORFIRYNA**



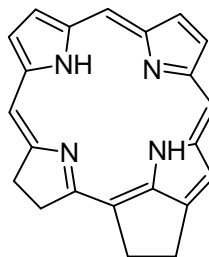
**CHLORYNA**



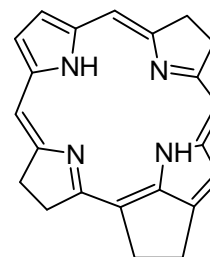
**BAKTARIOCHLORYNA**



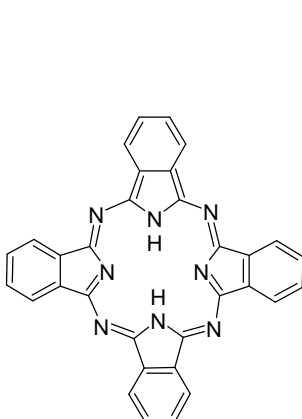
**TEKSAFIRYNA**



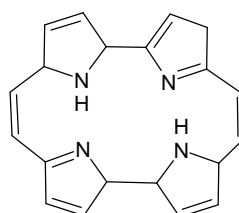
**FEOFORBID**



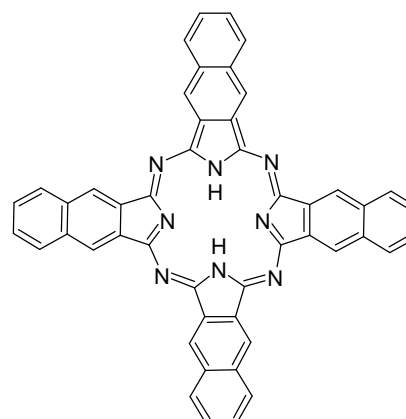
**BAKTARIOFEOFORBID**



**FTALOCYJANINA**



**PORFICYNA**



**NAFTYLOFTALOCYJANINA**

---

**Rycina 8.** Wzory podstawowych struktur związków fotoczułających.

Wśród fotouczulaczy nie posiadających struktury tetrapirołu wyróżnia się związki pochodzenia naturalnego oraz syntetyczne barwniki. Do pierwszej grupy zalicza się pochodne antrachinonów (w tej grupie znajduje się szeroko badana hiperycyna) (224;225), kurkuminoidy (kurkumina) (226) oraz pochodne hipokreliny (Hipokrelina A i B) (201;227). Wśród barwników syntetycznych wyróżnia się pochodne fenotiazyny- błękit metylenowy (228), toluidynę (229;230), barwniki cyjaninowe (231), pochodne ksantenu (np. róż bengalski) (232), barwniki oparte o strukturę 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenu (BODIPY) (201;233). Krótka charakterystyka powyższych związków została przedstawiona w tabeli 1. Zainteresowaniem naukowców w ciągu ostatnich lat skierowały się również na możliwości zastosowania fullerenów i ich pochodnych jako związków fotouczulających w PDT (234;235).

**Tabela 1.** Przykłady fotouczulaczy nieposiadających struktury pirołu (203).

Związek	Długość fali wzbudzenia [nm]	Kierunek badań
<b>Hiperycyna</b>	590	Rak podstawnocomórkowy i kolczystocomórkowy skóry
<b>Błękit metylenowy</b>	666	Choroby przyzębia, mięsak Kaposiego, nowotwory pęcherza moczowego, szyjki macicy (in vitro)
<b>Błękit toluidyny</b>	630	Choroby przyzębia
<b>Róż bengalski</b>	549	Nowotwory skóry i piersi
<b>Kurkumina</b>	420	Środek dezynfekcyjny
<b>Merocyjanina</b>	566	białaczki

Współczesne badania dotyczące nowych związków fotouczulających o potencjalnym zastosowaniu w PDT koncentrują się przede wszystkim na zwiększeniu skuteczności terapeutycznej, selektywności wobec tkanki nowotworowej i zminimalizowaniu działań niepożądanych. W ciągu ostatnich lat wprowadzono na rynek medyczny kilka fotouczulaczy, a niektóre bardzo obiecujące PS znajdują się na etapie badań klinicznych (tabela 2).



**Tabela 2.** Lista fotouczulaczy zarejestrowanych do stosowania oraz znajdujących się na etapie badań klinicznych i ich charakterystyka ( $\lambda$ -długość fali wyrażona w nm;  $\epsilon$ -molowy współczynnik absorpcji wyrażony w  $[M^{-1}cm^{-1}]$ ,  $\phi\Delta$ -wydajność kwantowa generowania tlenu singletowego- podana dla fotouczulaczy dla których dane te były dostępne) (203;236).

Związek	Nazwa handlowa	$\lambda$ [nm] $\epsilon$ [ $M^{-1}cm^{-1}$ ]	$\phi\Delta$	Wskazania
Porfirmer sodu	Photofrin	632 3000	0,89	Kanada (1993)- rak pęcherza moczowego; USA (1995)-nowotwory przełyku; USA (1998)-nowotwór płuca; USA (2003)-przełyk Barrett'a Japonia-nowotwory szyjki macicy Canada, Japonia,USA,UK- nowotwory oskrzeli
Kwas 5-aminolewulinowy (ALA)	Levulan	632 5000	0,56	USA (1999)- keratozy
Aminolewulinian metylu	Metvixia	-	-	USA (2004)- keratozy
Heksaaminolewulinian	Cysview	-	-	USA (2010)-diagnozowanie nowotworu pęcherza moczowego
Verteoporfina	Visudyne	689 34,000	0,84	USA (1999)- zwyrodnienie plamki żółtej związanej z wiekiem
Meta-tetra(hydroksyfenylo)chloryna na (m-THPC)	Foscan	652 35,000	0,87	Europa- nowotwory głowy i szyi
N-aspartylochloreina e6 (NPe6)	Laserphyrin Litx	664 40,000	0,77	Japonia 92003)-nowotwór płuc
Sn etyloetiopurputyna	Purlytin	664 30,000	-	Badania kliniczne-nowotwory piersi, rak podstawnokomórkowy, AMC
2-(1-heksyloetylo)-2-ddevinylopyrofeoforbid (HPPH)	Photochlor	665 47,000	-	Badania kliniczne-nowotwory przełyku, płuc, rak podstawnokomórkowy, przełyk Barretta

Pd bakteriofobid (WST09)	Tookad	763 88,000	0,5	Badania kliniczne –nowotwór prostaty
WST11	Stakel		-	Badania kliniczne –nowotwór prostaty
Moteksafina lutetu (Lu-TeX)	Lutrin Optin Antrin	732 42,000	-	Badania kliniczne –nowotwór prostaty, piersi, szyjki macicy, AMC
Mieszanina sulfonowanych ftalocyjanin glinowych	Photosens	676 20,000	0,38	Nowotwory skóry, płuc, głowy i szyi, piersi
Ftalocyjanina krzemowa (Pc4)		675 20,000	-	
Ftalocyjanina cynkowa	CGP55847	670 20,000	-	W trakcie badań klinicznych (faza I/II)/Szwajcaria; Nowotwory pochodzenia nabłonkowego górnych dróg oddechowych, górnego odcinka przewodu pokarmowego
Sól potasowa ftalocyjaniny cynkowej	Photocyanine	670	-	W trakcie badań klinicznych (faza I/II)/Szwajcaria Nowotwory pochodzenia nabłonkowego górnych dróg oddechowych, górnego odcinka

Istotnym problemem aktualnie dostępnych PS jest stosunkowo niska rozpuszczalność w wodzie większości fotouczulaczy, toksyczność w fazie ciemnej (Purlytin<sup>®</sup>), odczyny fototoksyczne (Photofrin<sup>®</sup>, Foscan<sup>®</sup>, Purlytin<sup>®</sup>), ból towarzyszący naświetlaniu (Lutrin<sup>®</sup>, Levulan<sup>®</sup>), a także wieloetapowa synteza (Lutrin<sup>®</sup>) (202). W celu zwiększenia biodostępności ograniczonej przez niską rozpuszczalność szczególną oraz zwiększenie selektywności i gromadzenia się w tkance nowotworowej uwagę poświęca się projektowaniu nowych systemów dostarczających fotouczulacze do komórek, takich jak z zastosowanie emulsji (237-239) miceli (240-243), liposomów (243-245), tworzeniu połączeń z lipoproteinami (246;247), polimerami(248), czy przeciwciałami (249;250).

## 2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Terapia fotodynamiczna (PDT) to mało inwazyjna metoda leczenia wielu schorzeń, w tym stanowiących jedno z największych wyzwań dla współczesnej medycyny - chorób nowotworowych. Podstawowym i kluczowym elementem koniecznym do uzyskania efektu terapeutycznego w wyniku PDT są fotouczulacze (PS), związki zdolne do selektywnego niszczenia komórek nowotworowych na drodze tzw. reakcji fotodynamicznej.

Celem prowadzonych badań jest ocena aktywności przeciwnowotworowe nowych fotouczulaczy z grupy ftalocyjanin. Badania wstępne przeprowadzone w modelu *in vitro* z wykorzystaniem ludzkich komórek nowotworowych, mające na celu ocenę cytotoksyczności i wchłaniania tych związków przez komórki nowotworowe stały się podstawą do wytypowania jednego związku do dalszych szczegółowych badań.

Kolejny etap pracy podejmuje próbę wyjaśnienia mechanizmu, w jaki sposób wybrany związek oddziałuje na komórki nowotworowe, oraz jakie procesy zachodzące na poziomie komórki warunkują jego aktywność biologiczną i efektywność działania. Założone cele prezentowanej pracy doktorskiej postanowiono zrealizować poprzez przeprowadzenie badań z zakresu:

- 1) określenia wpływu badanego związku na typ śmierci komórkowej** (detekcja apoptozy, analizę zmian morfologicznych – apoptotycznych, wpływ na cykl komórkowy i cytoskielet komórek, analiza potencjału błony mitochondrialnej, oznaczenie aktywności kaspazy-9 i -3, oznaczenie poziomu białek pro-apoptotycznych, wpływ inhibitorów nekrozy, autofagii i białka Bcl-2)
- 2) wolnorodnikowego mechanizmu działania** (detekcja stresu oksydacyjnego, wpływ inhibitorów enzymów antyoksydacyjnych, analiza zmian stężenia glutationu, detekcja wolnorodnikowych uszkodzeń DNA, poziom tlenu azotu)
- 3) lokalizacji badanego związku** (lokalizacja w mitochondrium, retikulum endoplazmatycznym oraz lizosomach)

### 3. MATERIAŁY I METODY

#### 3.1 Odczynniki

0,25% Trypsyna-EDTA, 2-metoksyestradiol, Acetonitryl, Błękit trypanu, Bufor fosforanowo-sodowy (PBS), Bydłęca albumina (BSA), Bydłęca surowica płodowa (FBS), Dietyloditiokarbaminian, Dimetylosulfotlenek, Dioctan 2',7'-dichlorofluoresceiny, dioctan 4-amino-5-metyloamino-2',7'-difluorofluoresceiny, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) bez czerwieni fenolowej, Hoechst 33258, Glutation (forma zredukowana), Jodek propidyny, sulfoksymina L-butioniny, 3-amino-1,2,4-triazol, Nukleaza P1, Fosfataza alkaliczna, Paraformaldehyd, RNAza A, przeciwciała monoklonalne anti- $\alpha$ -tubulin-FITC, RPMI 1640 medium bez czerwieni fenolowej, Inhibitory proteaz, Spautyna-1, Triton X-100, *GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kits* -**Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)**

*Bio-Rad Protein Assay Kit*- **Bio-Rad Laboratories** (Hercules CA, USA)

Dimetylosulfotlenek, Etanol 96% - **PoCH S.A.** (Gliwice, Poland)

*LDH Cytotoxicity Assay Kit, Caspase-3 Fluorescence Assay Kit, 8-hydroxy-2-deoxy Guanosine EIA Kit, JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit*- **Cayman Chemical** (Ann Arbor CA, USA)

Penicylina/streptomycyna/L-glutamina, DNA *Quant-iT dsDNA HS Assay Kit, Quant-iT™ Protein Assay Kit* - **Life Technologies** (Grand Island, NY, USA)

ABT199, *Caspase 9 Fluorometric Kit* – **BioVision**, (Milpitas, CA, USA)

Necrox-2- **Enzo Life Sciences** (Farmingdale, NY, USA)

Thioglo-1, Kamptotecyna- **Merck Millipore** (Darmstadt, Niemcy)

*Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup>*- **Roche** (Basel, Switzerland)

*Human Apoptosis Array*- **R&D System**, (Minneapolis, MN, USA)

### 3.2 Badane związki

Do badań cytotoksyczności zostały wybrane cztery związki:

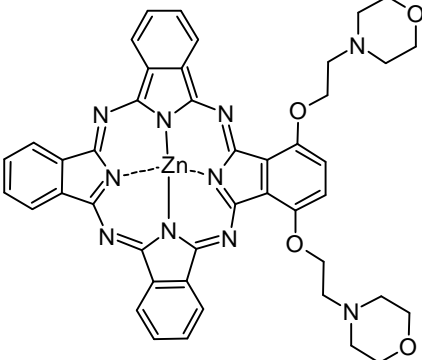
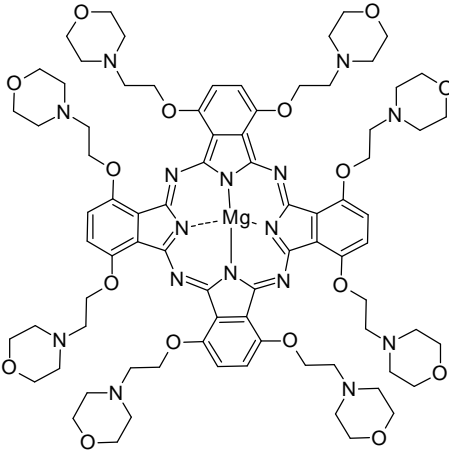
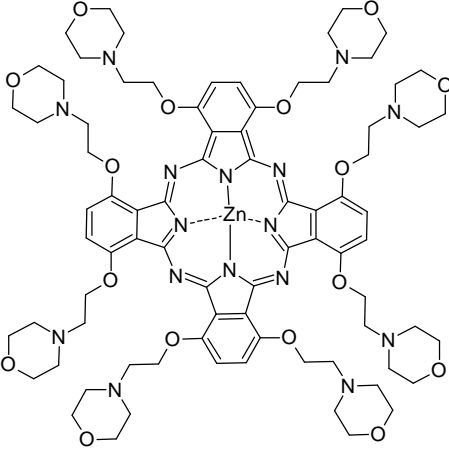
- Cynk(II)-1,4,-dis[2-(morfolin-4-ylo)etoksy]ftalocyjanina (**TG3**)
- Magnez(II)-1,4,8,11,15,18,22,25-oktakis[2-(morfolin-4-ylo)etoksy]ftalocyjanina (**TG4**)
- Cynk(II)-1,4,8,11,15,18,22,25-oktakis[2-(morfolin-4-ylo)etoksy]ftalocyjanina (**TG18**)
- Jodek magnez(II)-1,4,8,11,15,18,22,25-oktakis[2-(4-N-metylomorfolin-4-ylo)etoksy]ftalocyjaniny (**TG15**)

Wzory badanych związków zostały przedstawione w tabeli 3.

Badane związki zostały zsyntetyzowane w Katedrze Technologii Chemicznej Środków Leczniczych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu przez zespół dr hab. Tomasza Goślińskiego. Właściwości fotochemiczne badanych związków wykonane przez zespół prof. dr hab. Jadwigi Mielcarek w Katedrze Chemii Organicznej i Analitycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

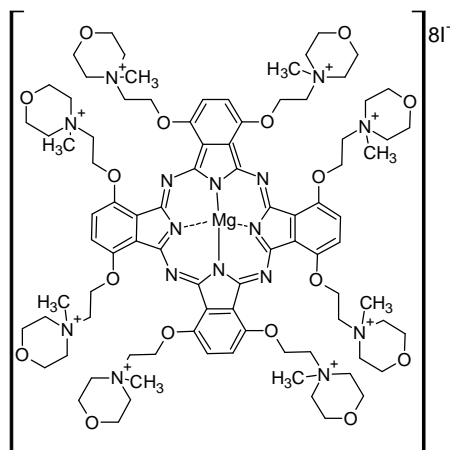
Związki zostały rozpuszczone w DMSO, a stężenie wyjściowe tak przygotowanych roztworów wynosiło 10 mM. Związki były przechowywane w temperaturze -20°C w warunkach chroniących przed dostępem światła i wilgoci.

**Tabela 3.** Wzory strukturalne, sumaryczne oraz masy molowe badanych związków.

Nazwa chemiczna	Wzór strukturalny/sumaryczny	Masa molowa [g/mol]
Cynk(II)1,4,-dis[2-(morfolin-4-ylo)etoksy]ftalocyjanina TG3	 $\text{C}_{44}\text{H}_{38}\text{N}_{10}\text{O}_4\text{Zn}$	836,25
Magnez(II)-1,4,8,11,15,18,22,25-oktakis[2-(morfolin-4-ylo)etoksy]ftalocyjanina TG4	 $\text{C}_{80}\text{H}_{104}\text{N}_{16}\text{O}_{16}\text{Mg}$	1540,06
Cynk(II)-1,4,8,11,15,18,22,25-oktakis[2-(morfolin-4-ylo)etoksy]ftalocyjanina TG18	 $\text{C}_{80}\text{H}_{104}\text{N}_{16}\text{O}_{16}\text{Zn}$	1611,19

---

**Jodek magnez(II)1,4,8,11,15,18,22,25**  
**-oktakis[2-(4-N-metylomorfolin-4 -**  
**yl)etoksy]ftalocyjaniny**  
**TG15**



**2705,56**



### 3.3 Linie komórkowe

Ocenę cytotoksyczności przeprowadzono dla dwóch linii nowotworu prostaty: LNCaP, PC3, dwóch linii nowotworu skóry: A375, MeWo oraz nowotworu płuc A549. Zdjęcia linii komórkowych wykorzystanych w badaniach cytotoksyczności fotouczulaczy z krótką charakterystyką przedstawiono w tabeli 4. Do dalszych szczegółowych badań mechanizmu działania związku TG3 wybrano linię LNCaP.

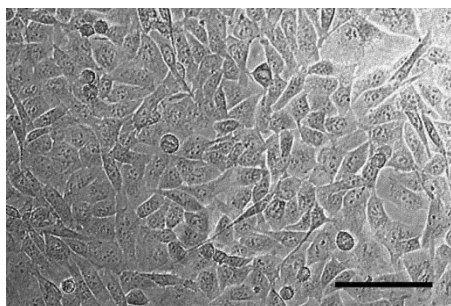
**Tabela 4.** Linie komórkowe wykorzystane w badaniach cytotoksyczności fotouczulaczy i ich krótka charakterystyka. Na wszystkich zdjęciach czarny pasek odpowiada długości 100µM.

---

**Linie nowotworu prostaty**

---

**LNCaP**



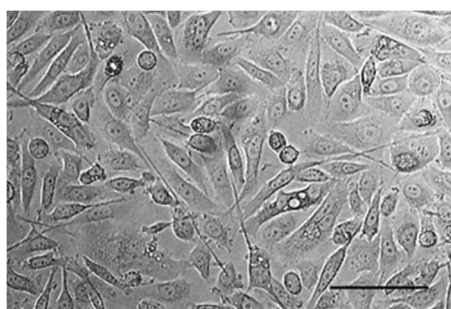
*Morfologia:* Komórki epitelialne, adherujące do podłoża

*Pochodzenie:* komórki pochodzące z lewego węzła chłonnego wyizolowane od 50-letniego mężczyzny rasy kaukaskiej

*Charakterystyka:* komórki androgenozależne

---

**PC3**



*Morfologia:* Komórki epitelialne, adherujące do podłoża

*Pochodzenie:* komórki pochodzące z nowotworu przerzutowego do kości wyizolowane od 62-letniego mężczyzny rasy kaukaskiej

*Charakterystyka:* komórki androgenoniezależne

---

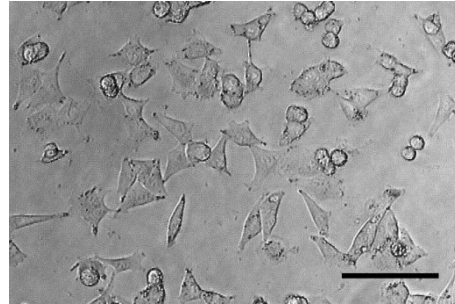


---

## Linie nowotworu skóry

---

**A375**



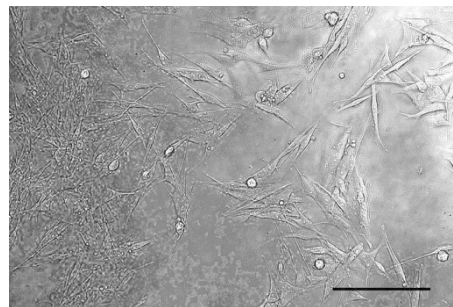
*Morfologia:* Komórki epitelialne, adherujące do podłoża

*Pochodzenie:* komórki pochodzące z lewego węzła chłonnego wyizolowane od 54-letniej kobiety

*Charakterystyka:* komórki nieprodukujące melaniny

---

**MeWo**



*Morfologia:* fibroblasty, adherujące do podłoża

*Pochodzenie:* komórki pochodzące z węzła chłonnego wyizolowane od 78-letniego mężczyzny rasy kaukaskiej

*Charakterystyka:* komórki produkujące melaninę

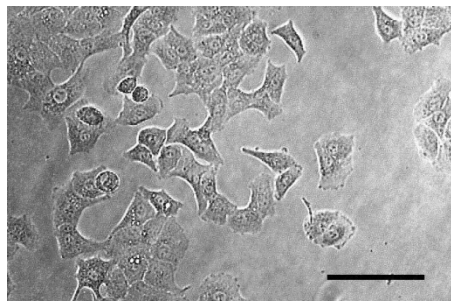
---

---

## Linia nowotworu płuc

---

**A549**



*Morfologia:* Komórki epitelialne, adherujące do podłoża

*Pochodzenie:* komórki wyizolowane od 58-letniego  
mężczyzny rasy kaukaskiej

*Charakterystyka:* komórki produkujące lecytynę

---

### *Hodowla komórek*

Eksperymenty z wykorzystaniem komórek nowotworowych oraz czynności związane z utrzymaniem hodowli komórkowej prowadzono w warunkach sterylnych, pod komorą z laminarnym przepływem powietrza oraz z użyciem sterylnego sprzętu jednorazowego użytku (BD Biosciences Franklin Lakes, NJ, USA). Komórki hodowano w inkubatorze w temperaturze 37°C, stężeniu 5% CO<sub>2</sub> i wilgotności 95%. Pożywki hodowlane wykorzystane w hodowli komórkowej przedstawiono w tabeli 5.

**Tabela 5.** Zastosowane pożywki hodowlane.

<b>Linia komórkowa</b>	<b>Medium</b>	<b>FBS</b>	<b>Glutamina 200 mM</b>	<b>Penicylina/streptomycyna 10 000 U penicyliny 10 mg/ml streptomycyny</b>
<b>LNCaP MeWo A375 A549</b>	DMEM	10%	1%	1%
<b>PC3</b>	RPMI-1640	10%	1%	1%

### *Pasażowanie komórek*

Po uzyskaniu 70-80% konfluencji przeprowadzano pasaż komórek. W celu odczepienia komórek od podłoża stosowano trypsynę i inkubowano w temperaturze 37<sup>0</sup>C. Następnie podano medium komórkowe i zawiesinę komórek przenoszono do sterylnych probówek i wirowano (1200 rpm, 3 minuty, temperatura pokojowa). Następnie komórki zawieszano w medium hodowlanym i dokładnie mieszano. Odpowiednią ilość zawiesiny przenoszono do sterylnych butelek (o powierzchni 25,75, 175 cm<sup>2</sup>, płytki Petriego w zależności od typu eksperymentu) i uzupełniano określoną ilością medium hodowlanego.

Określenie ilości komórek przeprowadzano z użyciem mikroskopu oraz komory Bürkera. W celu wybarwienia komórek martwych, podczas zliczania, wykorzystywano barwnik-błękit trypanu.

## **3.4 Źródło światła**

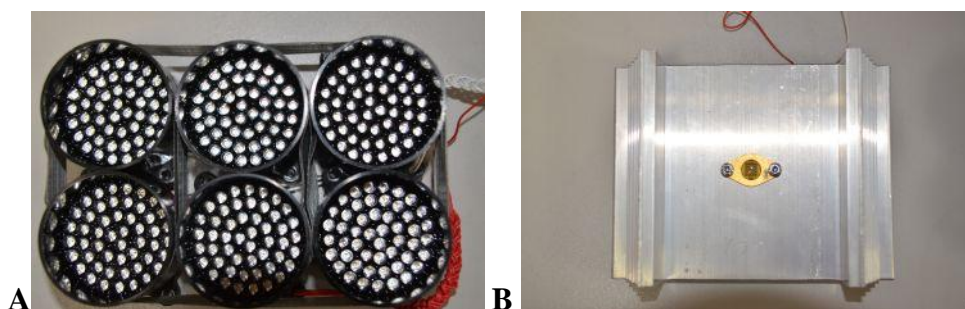
### **3.4.1 Lampa diodowa**

W przypadku związków TG3 i TG4 do naświetlania komórek wykorzystano lampę diodową, zaprojektowaną i skonstruowaną przez dr hab. Tomasza Goślińskiego z Katedry i Zakładu Technologii Chemicznej Środków Leczniczych UMP. Lampa zbudowana została 300 czerwonych diod (Kingbright Electronic Co, Ltd, Taiwan) połączonych w 6 klastrów generująca koherentne światło o długości fali 640 nm

i szerokości połówkowej 20 nm. Komórki naświetlano z odległości 6 cm uzyskując średnią gęstość mocy światła około  $2 \text{ mW/cm}^2$ . Pomiar gęstości mocy światła mierzono przed każdym eksperymentem za pomocą radiometru RD 0,2/2 z sondą TD (Optel).

### 3.4.2 Lampa laserowa

W przypadku związków TG15 i TG18 do naświetlania wykorzystano lampę laserową generującą światło o długości 735 nm (dioda laserowa AlGaAs, Roithner LaserTechnik GmbH, Vienna, Austria), zaprojektowaną i skonstruowaną przez zespół dr hab. Tomasza Goślińskiego z Katedry i Zakładu Technologii Chemicznej Środków Leczniczych UMP. Komórki naświetlano z odległości 9 cm uzyskując średnią gęstość mocy światła około  $2,9 \text{ mW/cm}^2$ . Pomiar gęstości mocy światła mierzono przed każdym eksperymentem za pomocą radiometru RD 0,2/2 z sondą TD (Optel).

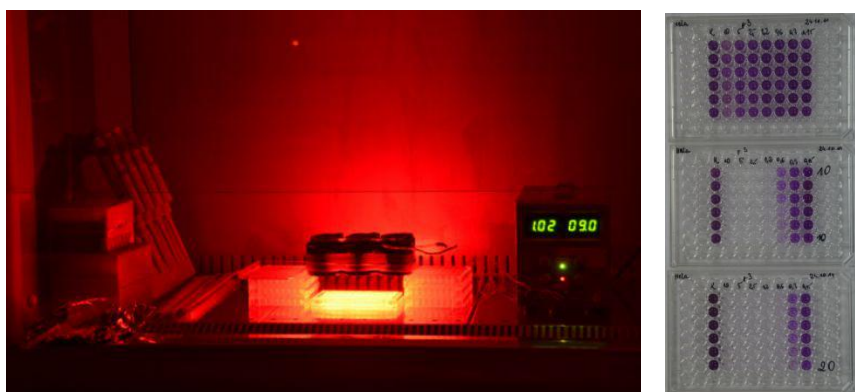


**Rycina 9.** Lampy użyte w eksperymentach PDT: A) lampa diodowa, B) lampa laserowa.

### 3.5 Eksperymenty PDT

Wszystkie eksperymenty przeprowadzone były dla komórek naświetlanych (tzw. faza jasna) oraz nienaświetlanych (tzw. faza ciemna). Komórki w określonej liczbie (w zależności od typu eksperymentu) wysiewano na płytki i umieszczano w inkubatorze do następnego dnia. Następnie komórki przemywano dwukrotnie jałowym roztworem PBS i podawano fotouczulacz w medium bez czerwieni fenolowej o obniżonej zawartości FBS wynoszącej 2,5%. Czas inkubacji z badanym związkiem wynosił 24 godziny, za wyjątkiem eksperymentów związanych z oceną wchłaniania i zależności czasu inkubacji-cytotoksyczność. Badania cytotoksyczności przeprowadzono w zakresie stężeń  $0,15 \mu\text{M}$ ;  $0,3 \mu\text{M}$ ;  $0,6 \mu\text{M}$ ;  $1,25 \mu\text{M}$ ;  $2,5 \mu\text{M}$ ;  $5 \mu\text{M}$  oraz  $10 \mu\text{M}$ . Do kolejnych eksperymentów związanych z oceną mechanizmu działania wybrano trzy stężenia:

0,6  $\mu$ M; 2,5  $\mu$ M oraz 5  $\mu$ M. Jako kontrolę negatywną zastosowano DMSO w stężeniu nie przekraczającym 0,1% w medium hodowlanym. Po inkubacji z badanym związkami, komórki przemywano dwukrotnie roztworem PBS i podawano medium komórkowe bez dodatku fotouczulacza. Następnie komórki naświetlano, w większości eksperymentów stosowano dwa czasy naświetlania: 10 oraz 20 minut (tzw. faza jasna, LT-ang. light-mediated toxicity). Do eksperymentu włączano także komórki nienaświetlane, którym podano te same co komórkom naświetlanym dawki fotouczulacza (tzw. faza ciemna, DT- ang. dark toxicity). Po naświetlaniu komórki inkubowano w zależności od typu eksperymentów od 30 minut do 24h.



**Rycina 10.** Naświetlanie komórek przy użyciu lampy diodowej oraz przykładowe płytki 96-dołkowe po wykonaniu testu MTT. Od góry: płytka, na której komórki zostały poddane działaniu fotouczulacza (oprócz skrajnej lewej kolumny), ale nie były naświetlane, poniżej komórki płytka, na której komórki zostały poddane działaniu fotouczulacza (oprócz skrajnej lewej kolumny), przez 10min, poniżej płytka przygotowana analogicznie do płytki środkowej jednak komórki naświetlane były przez 20 min.

### 3.6 Badania wstępne

#### 3.6.1 Ocena działania cytotoksycznego- test MTT

##### Zasada metody

Test MTT opiera się na zdolności metabolizowania przez komórki substratu-żółtej soli tetrazolowej do nierozpuszczalnego w wodzie purpurowego formazanu. Reakcja katalizowana jest przez enzym dehydrogenazę mitochondrialną, aktywną jedynie

w żywych komórkach. Intensywność zabarwienia jest wprost proporcjonalna do ilości aktywnych metabolicznie komórek (251;252).

### **Wykonanie**

Badanie przeprowadzono na liniach: LNCaP, PC3, A375 oraz MeWo dla związku **TG3**, LNCaP i A375 dla **TG4**; LNCaP i A549 dla związków **TG 15** oraz **TG18**. Dodatkowo wykonano badanie działania cytotoksycznego standardowej ftalocyjaniny cynkowej **ZnPc** dla linii LNCaP. Badanie prowadzono na płytkach 96 dołkowych, na które wysiewano komórki w ilości 20 000 komórek na dołek. Komórki inkubowano z badanymi związkami w zakresie stężeń: 0  $\mu$ M; 1,5  $\mu$ M; 0,3  $\mu$ M; 0,6  $\mu$ M; 2,5  $\mu$ M; 5  $\mu$ M oraz 10  $\mu$ M przez 24 godziny. Jako kontrolę negatywną zastosowano DMSO w stężeniu nie przekraczającym 0,1% w medium hodowlanym. Następnie komórki naświetlano i po 24 godzinach wykonano test MTT (81). W tym celu do komórek (naświetlanych i nienaświetlanych) podano 170  $\mu$ l roztworu MTT (20 $\mu$ l roztworu MTT o stężeniu 5mg/ml PBS) w medium hodowlanym i inkubowano przez 2h. Następnie płytki wirowano przez 3 minuty. W celu rozpuszczenia wytworzonych przez komórki i wytrąconych kryształów formazanu, podano 200  $\mu$ l DMSO i wytrząsano 10 minut. Absorbancję zmierzono przy użyciu czytnika płytek (Biotek Instruments, Elx-800) przy długości fali 570 nm.i fali referencyjnej 690 nm. Wyniki przedstawiono jako % kontroli (średnią wartość z dwóch niezależnych eksperymentów).

### **3.6.2 Ocena wchłaniania badanych fotouczulaczy przez komórki nowotworowe**

#### **Zasada metody**

Do oceny wchłaniania badanych związków TG3 i TG4 wykorzystano ich zdolność do emisji fluorescencji. Stopień wchłaniania oceniano poprzez pomiar stężenia badanych związków w medium hodowlanym oraz lizacie komórkowym (253). Badania tego nie przeprowadzono dla pozostałych związków z uwagi na brak aktywności cytotoksycznej.

## **Wykonanie**

Komórki linii LNCaP wysiano na płytki 96-dołkowe ( $2 \times 10^4$  komórek/dołek) i inkubowano do następnego dnia. Związek TG3 podano w stężeniach 10  $\mu\text{M}$  oraz 1,25  $\mu\text{M}$ , a następnie inkubowano przez: 2h, 4h, 6h oraz 24h. Jako kontrolę negatywną zastosowano DMSO w stężeniu nie przekraczającym 0,1% w medium hodowlanym. Następnie zebrano medium komórkowe i przeniesiono na nowe płytki. Komórki przepłukano dwukrotnie roztworem PBS, podano 200  $\mu\text{l}$  acetonitrylu i wytrząsano przez godzinę w ciemności, w temperaturze pokojowej. Pomiar fluorescencji wykonano na czytniku płytek Tecan Infinity 200 (Männedorf, Szwajcaria) przy następujących długościach fali wzbudzenia/emisji: związek TG3- 670/710 nm, związek TG4 733nm/763nm. Eksperyment wykonano również dla komórek naświetlanych (10 oraz 20 minut). Wyniki przedstawiono jako średnią wartość  $\pm$ SD z dwóch niezależnych eksperymentów.

## **Badania cytotoksyczności dla wybranego związku TG3 na linii komórkowej nowotworu prostaty LNCaP**

### **3.6.3 Wpływ czasu inkubacji z badanym związkiem na działanie cytotoksyczne**

#### **Zasada metody**

W celu sprawdzenia zależności pomiędzy czasem inkubacji z badanym związkiem, a jego działaniem cytotoksycznym przeprowadzono badanie przeżywalności komórek LNCaP za pomocą testu MTT. Badanie wykonano dla komórek inkubowanych 2h, 4h, 6h oraz 24h godzin z badanym związkiem i naświetlanych 10 i 20 minut oraz komórek nienaświetlanych.

#### **Wykonanie**

Komórki linii LNCaP wysiano na płytki 96-dołkowe ( $2 \times 10^4$  komórek/dołek). Następnego dnia podano fotouczulacz TG3 w zakresie stężeń: 0  $\mu\text{M}$ ; 1,5 $\mu\text{M}$ ; 0,3 $\mu\text{M}$ ;

0,6 μM; 1,2 μM; 2,5 μM; 5 μM; 10 μM i inkubowano przez czas: 2,4,6 oraz 24h. Jako kontrolę negatywną zastosowano DMSO w stężeniu nie przekraczającym 0,1% w medium hodowlanym. Po upływie każdego z czasów komórki naświetlano (10 oraz 20 minut) i po czasie 24 h przeprowadzono ocenę przeżywalności komórek za pomocą testu MTT. Wyniki przedstawiono jako średnią wartość+SD z dwóch niezależnych eksperymentów.

### **3.6.4 Test uwalniania dehydrogenazy mleczanowej**

#### **Zasada metody**

Ocenę zaburzenia integralności błony komórkowej pod wpływem badanego związku przeprowadzono za pomocą zestawu odczynników do oznaczania aktywności dehydrogenazy mleczanowej- *LDH Assay Kit* (Cayman Chemical, An Arbor, MI, USA). W wyniku uszkodzenia błony komórkowej następuje uwalnianie LDH do medium hodowlanego. Enzym ten w warunkach tego eksperymentu katalizuje utlenienie mleczanu do pirogronianu z jednoczesnym powstawaniem dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADH), który w obecności diaforazy bierze udział w redukcji soli tetrazolowej do barwnego formazanu. Intensywność powstającego zabarwienia jest wprost proporcjonalna do stopnia uszkodzenia komórek i może być mierzona spektrofotometrycznie przy długości fali 490-520 nm (254;255).

#### **Wykonanie**

Komórki linii LNCaP wysiano na płytki 96-dołkowe o gęstości  $2 \times 10^4$  komórek/dołek. Badany związek podano w zakresie stężeń 0,15 μM; 0,3 μM; 0,6 μM; 2,5 μM; 5 μM oraz 10 μM i inkubowano przez 24h. Analizę wykonano po 2h oraz 24h od naświetlania. Jako kontrolę negatywną zastosowano DMSO w stężeniu nie przekraczającym 0,1% w medium hodowlanym, natomiast kontrolę pozytywną stanowił 1% roztwór Tritonu X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), który powodował lizę 100% komórek. Po określonym czasie inkubacji (2 oraz 24h od naświetlania) płytki wirowano (400 x g, 5 minut, temperatura pokojowa), a następnie 100 μl medium z komórek przeniesiono na nową płytkę 96-dołkową. Do pobranego medium dodano 100 μl przygotowanej *ex tempore* mieszaniny reakcyjnej zawierającej: kwas mlekowy, NAD<sup>+</sup>, sól tetrazolową i diaforazę. Płytki wytrząsano przez 30 minut w temperaturze



pokojuj. Absorbancję zmierzono przy użyciu czytnika płytek (Biotek Instruments, Elx-800) przy długości fali 490 nm.

### **3.6.5 Barwienie błękitem trypanu**

#### **Zasada metody**

Barwnik błękit trypanu wybarwia jedynie martwe komórki o uszkodzonych błonach komórkowych lub komórki nie zdolne do usunięcia dyfundującego do ich wnętrza barwnika. Ilość zabarwionych komórek może świadczyć o stopniu działania cytotoksycznego badanego związku (256).

#### **Wykonanie**

Komórki linii LNCaP wysiano na płytce 12-dółkowe (gęstość komórek  $2,5 \times 10^5$  komórek/dółek). Następnego dnia podano związek TG3 o stężeniach: 0,6  $\mu\text{M}$ ; 2,5  $\mu\text{M}$  oraz 5  $\mu\text{M}$  i inkubowano przez 24h. Jako kontrolę negatywną zastosowano DMSO w stężeniu nie przekraczającym 0,1% w medium hodowlanym. Komórki naświetlano zgodnie z protokołem PDT (10 i 20 min naświetlania). Analizę wykonano po czasie 24 godzin od naświetlania. W tym celu usunięto medium i podano 0,4% roztwór błękitu trypanu (1:1 w PBS) i po 5 minutach wykonano zdjęcia przy użyciu mikroskopu (Nikon Eclipse TS100) wyposażonego w kamerę (Digital Sight Camera System, za pomocą oprogramowania NIS Elements Basic Research Nikon, Kawasaki, Japonia) zliczono także odsetek martwych komórek.

# **Badania z zakresu wpływu badanego związku na indukowanie w komórkach nowotworowych procesów apoptozy, nekrozy oraz autofagii**

## **3.7 Wpływ badanego związku na cykl komórkowy**

### **Zasad metody**

Wpływ związku TG3 na cykl komórkowy analizowano za pomocą metodą cytometrii przepływowej i barwienia jodkiem propidyny (257). Jodek propidyny wiąże się w stosunku stechiometrycznym z DNA, dlatego intensywność fluorescencji jest wprost proporcjonalna do ilości DNA w komórce. W trakcie poszczególnych faz cyklu komórkowego ilość DNA ulega zmianom: w fazie G<sub>1</sub> komórki posiadają dwie kopie chromosomów, w fazie G<sub>2</sub>/M ilość kwasów nukleinowych ulega podwojeniu, w fazie S fluorescencja osiąga poziom pośredni pomiędzy G<sub>1</sub> i G<sub>2</sub>/M co pozwala na zróżnicowanie poszczególnych faz cyklu komórkowego (258).

### **Wykonanie**

Komórki linii LNCaP wysiano na płytki 6-dółkowe w liczbie  $5 \times 10^5$  komórek/dolek. Po całonocnej inkubacji podano fotouczulacz w stężeniu 0,6  $\mu\text{M}$ ; 2,5  $\mu\text{M}$  oraz 5  $\mu\text{M}$  i po 24 godzinach naświetlano komórki (10 i 20 minut). Jako kontrolę negatywną zastosowano DMSO w stężeniu nie przekraczającym 0,1% w medium hodowlanym. Następnie po upływie 2, 6 i 24 godzin od naświetlania, komórki odczepiono od podłoża za pomocą trypsyny. Komórki odwirowano (5000 rpm, temperatura pokojowa), przemyto dwukrotnie PBS i utrwalono w 70% etanolu (POCH, Gliwice, Polska) w temperaturze 4°C przez 30 minut. Następnie, komórki ponownie odwirowano, przemyto dwukrotnie roztworem PBS i podano jodek propidyny (50  $\mu\text{g/ml}$ ) oraz roztwór RNA-zy A o stężeniu 100  $\mu\text{g/ml}$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Komórki inkubowano w ciemności przez 30 minut. Analizę faz cyklu komórkowego przeprowadzono za pomocą cytometru przepływowego FACSCalibur (BD Biosciences Franklin Lakes, NJ, USA).

### **3.8 Analiza zmian morfologicznych - apoptotycznych i nekrotycznych metodą podwójnego barwienia Hoechst 33342/jodek propidyny**

#### **Zasada metody**

Morfologiczne zmiany zachodzące w komórkach poddanych PDT przy użyciu związku TG3 (PDT-TG3) oceniono metodą podwójnego barwienia jodek propidyny/Hoechst 33258 przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego (Nikon Eclipse TS100 z lampą fluorescencyjną C-SHG) wyposażonego w kamerę (Digital Sight Camera System, za pomocą oprogramowania NIS Elements Basic Research Nikon, Kawasaki Japonia). Hoechst 33258 to barwnik fluorescencyjny barwiący skondensowaną chromatynę w komórkach apoptotycznych (intensywne niebieskie zabarwienie) i wolną chromatynę w komórkach zdrowych (niebieskie zabarwienie). Jodek propidyny to czerwony barwnik fluorescencyjny, który przenika przez błonę komórkową jedynie martwych komórek, a następnie wiąże się z DNA (259).

#### **Wykonanie**

Komórki linii LNCaP (o gęstości  $2,5 \times 10^5$ ) inkubowano z badanym związkiem o stężeniu: 0,6  $\mu\text{M}$ ; 2,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  przez czas 24 godzin. Jako kontrolę negatywną zastosowano DMSO w stężeniu nie przekraczającym 0,1% w medium hodowlanym. Następnie komórki naświetlano i po czasie 2, 6, 24 h wybarwiono przy użyciu barwnika Hoechst 33258 o stężeniu 10  $\mu\text{g/ml}$  oraz jodku propidyny o stężeniu 10  $\mu\text{g/ml}$ . Płytki inkubowano przez 30 minut w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$ . Następnie komórki przemyto dwukrotnie roztworem PBS and i utrwalono przy użyciu 4% roztworu PFA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Następnie komórki przepłukano dwukrotnie roztworem PBS, dodano 200  $\mu\text{l}$  PBS i wykonano zdjęcia przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego (Nikon Eclipse TS100 z lampą fluorescencyjną C-SHG wyposażonego w kamerę Digital Sight Camera System oprogramowanie NIS Elements Basic Research Nikon, Kawasaki Japonia). Do zdjęć użyto filtrów odpowiednich dla jodku propidyny (G2-A) oraz dla barwnika Hoechst 33258 (UV-2A) oraz w świetle widzialnym (VS). Zdjęcia były poddawane obróbce w programie Adobe Photoshop CS5 polegającej na konwersji zdjęć z kanału czerwonego do postaci czarno-białej przy użyciu wysokonastawowego filtra czerwonego

oraz nałożeniu ich na zdjęcia uzyskane z kanału UV. Tak uzyskane fotografie pozwalały na ocenę komórek oraz policzenie komórek w każdej z populacji. W tym celu użyto narzędzia zliczania obiektów zawartego w programie Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems Inc, Sain Jose CA USA).

### **3.9 Detekcja apoptozy w komórkach nowotworowych w oparciu o test immunoenzymatyczny ELISA**

#### **Zasada metody**

Ocenę zdolności badanego związku do indukcji apoptozy przeprowadzono z wykorzystaniem testu ELISA (*Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup>*, Roche) zgodnie z protokołem producenta. Test opiera się na detekcji mono i oligonukleosmów powstających w wyniku fragmentacji DNA w procesie apoptozy (260).

#### **Wykonanie**

Komórki linii LNCaP ( $2 \times 10^4$  komórek/dołek) inkubowano z fotouczulaczem TG3 o stężeniu: 0,6; 2,5 oraz 5  $\mu\text{M}$  przez 24h. Eksperyment przeprowadzono 24 godziny po naświetlaniu komórek (10 oraz 20 minut) oraz dla komórek nienaświetlanych. Jako kontrolę negatywną zastosowano DMSO w stężeniu nie przekraczającym 0,1% w medium hodowlanym, natomiast kontrolę pozytywną stanowił roztwór kamptotecyny o stężeniu 5  $\mu\text{M}$  (Merck Millipore). Komórki zlizowano roztworem buforu lizującego (30 minut, temperatura pokojowa) i odwirowano  $3000 \times g$  przez 10 min. Następnie pobrano 20  $\mu\text{l}$  lizatu i naniesiono na płytkę opłaszczoną streptawidyną i podano mieszaninę przeciwciał (monoklonalne mysie przeciwciała biotynowane skierowane przeciw histonom oraz monoklonalne mysie przeciwciała skierowane przeciw DNA i skoniugowane z peroksydazą chrzanową). Płytki wytrząsano przez 2h w temperaturze pokojowej. Po czasie inkubacji płytki przepłukano trzykrotnie buforem. W celu wywołania barwy dodano roztwór ABTS (sulfonian 2,2'-azyno-bis-3-etylobenzotiazolowy,  $\text{H}_2\text{O}_2$  w buforze glicynowo/ cytynianowym) i wytrząsano przez 20 minut. Następnie podano roztwór zatrzymujące reakcję i zmierzono absorbancję przy długości fali 405 nm z użyciem czytnika płytek (Biotek Instruments, Elx-800).

### 3.10 Analiza ilościowa zmian potencjału błony mitochondrialnej za pomocą barwnika fluorescencyjnego JC-1

#### Zasada metody

Zmiany potencjału błony mitochondrialnej zostały zmierzone przy użyciu zestawu odczynników *JC-1 Assay Kit* (Cayman Chemical, An Arbor, MI) zgodnie z protokołem producenta.

JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetylobenzoimidazolokarbocyjanek) to barwnik, który wykazuje zdolność do selektywnej akumulacji w mitochondriach. Kiedy potencjał błony mitochondrialnej jest wysoki barwnik tworzy tzw. agregaty emitujące czerwoną fluorescencję, natomiast jego spadek skutkuje utworzeniem tzw. monomerów charakteryzujących się zieloną fluorescencją. Wzajemny stosunek obu tych form pozwala na ocenę zmian potencjału błony mitochondrialnej (261).

#### Wykonanie

Komórki linii LNCaP (o gęstości  $2 \times 10^4$  komórek/dolek) inkubowano przez 24 godziny z badanym związkiem o stężeniu: 0,6  $\mu\text{M}$ ; 2,5  $\mu\text{M}$ ; and 5  $\mu\text{M}$ . Jako kontrolę negatywną zastosowano DMSO w stężeniu nie przekraczającym 0,1% w medium hodowlanym. Następnie po naświetlaniu, komórki inkubowano przez 45 minut w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$ , dodano 10  $\mu\text{l}$  roztworu JC-1 i ponownie umieszczono płytki w inkubatorze na 30 minut. Po zakończeniu inkubacji płytki wirowano przez 5 minut (400 x g, temperatura pokojowa) i przemyto dwukrotnie roztworem dostarczonym przez producenta zestawu (Assay Buffer). Odczytu fluorescencji dokonano przy użyciu czytnika Tecan Infinity 200 (Männedorf, Szwajcaria). Zastosowane długości fali to: wzbudzenie/emisja dla monomerów: 560 /595 nm, oraz odpowiednio 485/535 nm dla agregatów JC-1. Wyniki przedstawiono jako średnią wartość z trzech niezależnych eksperymentów.

### 3.11 Aktywność kaspazy-9

#### **Zasada metody**

Aktywność kaspazy-9 zbadano za pomocą zestawu odczynników *Caspase 9 Fluorometric Assay Kit* (BioVision) zgodnie z instrukcją producenta. Metoda opiera się na pomiarze fluorescencji 7-amino-4-trifluorometylokumaryny produktu powstającego w wyniku reakcji rozkładu specyficznego dla kaspazy-9 substratu N-Acetyl-Leu-Glu-His-Asp-7-amido-4-trifluorometylokumaryny.

#### **Wykonanie**

Komórki linii LNCaP wysiano na płytce 12-dołkowej ( $2 \times 10^5$  komórek na dołek) i po całonocnej inkubacji podano fotouczulacz o stężeniu: 0,6  $\mu\text{M}$ ; 2,5  $\mu\text{M}$  i 5  $\mu\text{M}$  i inkubowano przez 24h (jako kontrole negatywną użyto DMSO). Następnie komórki traktowano zgodnie z protokołem eksperymentu PDT (komórki nienaświetlane, 10 i 20 min naświetlania). Pomiar aktywności enzymu wykonano po czasie 2 i 4h od naświetlania. W tym celu komórki zlizowano buforem lizującym ( $4^{\circ}\text{C}$ , 15 minut), 50  $\mu\text{l}$  lizatu przeniesiono na nową płytkę 96-dołkową i podano 50  $\mu\text{l}$  buforu reakcyjnego zawierającego 10 mM ditiotreitola. Następnie podano 5  $\mu\text{l}$  roztworu substratu dla kaspazy-9 LEHD-AFC (stężenie końcowe substratu 50  $\mu\text{M}$ ). Płytki wytrząsano i inkubowano w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$  przez 2 h. Pomiar fluorescencji wykonano za pomocą czytnika płytek Tecan Infinity 200 (Männedorf, Szwajcaria) przy długościach fali: wzbudzenie-400 nm, emisja-505 nm. Uzyskane wartości fluorescencji przeliczono na ilość białka i przestawiono jako % kontroli (średnia wartość z dwóch niezależnych eksperymentów).

### 3.12 Aktywność kaspazy-3

#### **Zasada metody**

Aktywność kaspazy-3 została zmierzona przy użyciu zestawu odczynników *Caspase-3 Fluorescence Assay Kit* (Cayman Chemical, An Arbor, MI) zgodnie z instrukcją producenta. Metoda opiera się na pomiarze fluorescencji produktu powstającego w wyniku reakcji rozkładu przez kaspazę 3 specyficznego dla niej

substratu N-Ac-DEVD-N'-MC-R110. Ilość powstającego fluorescencyjnego produktu może być zmierzona przy długości fali wzbudzenia 485nm i emisji 535 nm (262).

### **Wykonanie**

Komórki linii LNCaP ( $2 \times 10^4$  komórek/dolek) wysiano na płytki 96-dolekowe i inkubowano przez 24h. Następnie, podano związek TG3 w stężeniach: 0,6  $\mu\text{M}$ ; 2,5  $\mu\text{M}$  i 5  $\mu\text{M}$  i komórki poddano 24 godzinnej inkubacji. Jako kontrolę negatywną zastosowano DMSO w stężeniu nie przekraczającym 0,1% w medium hodowlanym. Komórki traktowano zgodnie z protokołem eksperymentu PDT (komórki nienaświetlane, 10 i 20 min naświetlania). Oznaczenie aktywności enzymu w lizacie komórkowym wykonano po dwóch czasach od naświetlania: 12h oraz 24h. W tym celu, płytki odwirowano (800xg, 5 min, temperatura pokojowa) i ściągnięto medium komórkowe. Następnie komórki przepłukano buforem i zlizowano za pomocą umieszczonego w zestawie buforu (30 minut na wytrząsarce, temperatura pokojowa). Płytki wirowano przy 800x g (10 min, temperatura pokojowa) i przeniesiono 90  $\mu\text{l}$  lizatu na nową czarną płytkę 96-dolekową do pomiaru fluorescencji. Następnie podano mieszaninę reakcyjną (substrat kaspazy3-N-Ac-DEVD-N'-MC-R110, ditiotreitól oraz bufor) i inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37°C. W celu oceny specyficzności substratu użytego w eksperymencie wykorzystano również inhibitor kaspazy-3. Pomiar fluorescencji wykonano za pomocą czytnika płytek Tecan Infinity 200 (Männedorf, Szwajcaria) przy długościach fali: wzbudzenie: 485 nm emisja: 535 nm. Stężenie produktu obliczono za pomocą wykonanej krzywej standardowej i przeliczono na ilość białka. Wynik przedstawiono jako procent kontroli, z dwóch niezależnych eksperymentów.

### **3.13 Wpływ inhibitora Bcl-2, ABT199 na cytotoksyczność związku TG3**

#### **Zasada metody**

Analizę wpływu ABT199- selektywnego inhibitora białka Bcl-2 (263) na działanie cytotoksyczne TG3 wykonano oceniając przeżywalność komórek za pomocą testu MTT.

## **Wykonanie**

### *Ocena działania cytotoksycznego ABT-199*

W pierwszym etapie wykonano eksperymenty mające na celu sprawdzenie działania cytotoksycznego samego inhibitora. Komórki linii LNCaP wysiano na płytce 96-dołkowe (gęstość  $2 \times 10^4$  komórek/dołek). Następnego dnia podano ABT-199 w zakresie stężeń: 1  $\mu\text{M}$ ; 0,5  $\mu\text{M}$ ; 0,25  $\mu\text{M}$ ; 0,12  $\mu\text{M}$ ; 0,06  $\mu\text{M}$ ; 0,03  $\mu\text{M}$ ; 0,0015  $\mu\text{M}$ . Badanie wykonano zarówno w fazie ciemnej oraz w połączeniu z naświetlaniem (20 minut; 2 godziny po podaniu inhibitora). Jako kontrolę użyto DMSO w stężeniu nieprzekraczającym 0,1%. Wpływ inhibitora nekrozy na cytotoksyczność związku TG3 oceniono w oparciu o test MTT po 24 godzinach. Wyniki przedstawiono jako procent kontroli (średnia wartość z dwóch niezależnych eksperymentów).

### *Wpływ ABT199 na cytotoksyczne działanie TG3*

Komórki linii LNCaP wysiano na płytce 96-dołkowe (gęstość  $2 \times 10^4$  komórek/dołek). Następnego dnia podano fotouczulacz o stężeniach: 0,6  $\mu\text{M}$ ; 2,5  $\mu\text{M}$  i 5  $\mu\text{M}$  i inkubowano przez 24h. Jako kontrolę użyto DMSO w stężeniu nieprzekraczającym 0,1%. ABT199 (1 $\mu\text{M}$  w DMSO) podano 24h i 2 godziny przed naświetlaniem. Wpływ inhibitora Bcl-2 na cytotoksyczność związku TG3 zbadano w oparciu o test MTT. Wyniki przedstawiono jako średnia wartość z dwóch niezależnych eksperymentów (jako procent kontroli).

## **3.14 Panel apoptotyczny *Human Apoptosis Array***

### **Zasada metody**

Analizę ekspresji 35-białek pro- i antyapoptotycznych przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu odczynników *Human Apoptosis Array* (R&D Systems, UK) zgodnie z protokołem producenta. Przygotowane lizaty komórkowe nakładane są na gotowe membrany nitrocelulozowe z naniesionymi przeciwciałami. Po całonocnej inkubacji i odpłukaniu niezwiązanych białek, membrany inkubowane są z biotynowanymi przeciwciałami. Wizualizację białek przeprowadza się metodą chemiluminescencji z wykorzystaniem kompleksu streptawidyna-peroskydaza chruzanowa. Uzyskany sygnał utrwała się na kliszy rentgenowskiej zgodnie z technikami używanymi w klasycznej metodzie Western Blot.



## **Wykonanie**

### **3.14.1 Uzyskanie lizatów komórkowych**

Komórki linii LNCaP wysiano na płytki Petriego o średnicy 10 cm i poddano całonocnej inkubacji. Następnie podano fotouczulacz o stężeniu 0,6  $\mu\text{M}$  i 2,5  $\mu\text{M}$ . Jako kontrolę negatywną zastosowano DMSO w stężeniu nie przekraczającym 0,1% w medium hodowlanym. Komórki z badanym związkiem inkubowano przez 24h, a następnie naświetlano zgodnie z protokołem PDT (czas naświetlania 20 minut). Po 24h od naświetlania komórki zlizowano buforem lizującym z dodatkiem inhibitorów proteaz (30 minut w temperaturze 4°C). Następnie lizaty komórkowe odwirowano (15000 RPM, 4°C, 10 minut), zebrano supernatant i zmierzono stężenie białka. Uzyskane lizaty komórkowe przechowywano w temperaturze -80°C.

### **3.14.2 Analiza ekspresji białek**

Analizę ekspresji białek pro- i antyapoptotycznych prowadzono zgodnie z instrukcją producenta. W tym celu, po zablokowaniu membran (roztwór producenta, jedna godzina na wytrząsarce) podano przygotowane lizaty komórkowe (400 $\mu\text{g}$  białka/membranę) i inkubowano przez całą noc w temperaturze 4°C. Następnie membrany przepłukano 3-krotnie roztworem buforu i podano przeciwciała II-rzędowe. Membrany ponownie umieszczono na wytrząsarce i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę. Membrany wytrząsano 3-krotnie po 10 min z roztworem buforu, podano roztwór streptawidyny i inkubowano przez 30 min w temperaturze pokojowej, na wytrząsarce. Po przepłukaniu membran (3-krotnie 10 min roztwór buforu) podano mieszaninę odczynników służących do wywołania chemiluminescencji i wykonano serię zdjęć na kliszy rentgenowskiej stosując następujące czasy naświetlania: 1, 3, 5 oraz 10 minut. Uzyskane zdjęcia zanalizowano za pomocą programu Image J (NIH, USA).

### 3.15 Wpływ inhibitora autofagii Spautyny-1 na cytotoksyczność związku TG3

#### Zasada metody

Analizę wpływu inhibitora spautyny-1 na działanie cytotoksyczne związku TG3 przeprowadzono w oparciu o test MTT. Spautyna-1 inhibitorem peptydaz: USP10 i USP13 które odpowiadają za degradację kompleksu Vps34/kinazy fosfatydyloinozytolu klasy III z białkiem Bekliną-1, uważaną za kluczowe białko w procesie autofagii (264).

#### Wykonanie

##### *Ocena działania cytotoksycznego Spautyny-1*

W pierwszym etapie wykonano eksperymenty mające na celu sprawdzenie działania cytotoksycznego samego inhibitora. Komórki linii LNCaP wysiano na płytki 96-dółkowe (gęstość  $2 \times 10^4$  komórek/dółek). Następnego dnia podano spautynę-1 w zakresie stężeń: 20  $\mu\text{M}$ ; 10  $\mu\text{M}$ ; 5  $\mu\text{M}$ ; 2,5  $\mu\text{M}$ ; 1,25  $\mu\text{M}$ ; 0,6  $\mu\text{M}$ ; 0,3  $\mu\text{M}$ . Jako kontrolę negatywną zastosowano DMSO w stężeniu nie przekraczającym 0,1% w medium hodowlanym. Badanie wykonano zarówno w fazie ciemnej oraz w połączeniu z naświetlaniem (20 minut; 1 godzina po podaniu inhibitora). Jako kontrolę użyto DMSO w stężeniu nieprzekraczającym 0,1%. Wpływ inhibitora autofagii na cytotoksyczność związku TG3 zbadano po 24 godzinach w oparciu o test MTT. Wyniki przedstawiono jako procent kontroli (średnia wartość z dwóch niezależnych eksperymentów).

### *Wpływ Spautyny-1 na cytotoksyczne działanie TG3*

Komórki linii LNCaP wysiano na płytki 96-dółkowe i po całonocnej inkubacji podano związek TG3 w stężeniach: 0,6  $\mu\text{M}$ ; 2,5  $\mu\text{M}$  i 5  $\mu\text{M}$  a następnie inkubowano przez 24h. Jako kontrolę negatywną zastosowano DMSO w stężeniu nie przekraczającym 0,1% w medium hodowlanym. Spautynę-1 o stężeniu 2,5;5 oraz 10  $\mu\text{M}$  (w DMSO) podano 1 godzinę przed naświetlaniem. Następnie komórki naświetlano a wpływ zastosowanego inhibitora na efektywność PDT oceniano testem MTT 24h po naświetlaniu. Wynik przedstawiono jako średnią wartość z dwóch niezależnych eksperymentów (jako procent kontroli).

### **3.16 Wpływ Necrox-2 inhibitora nekrozy na działanie cytotoksyczne badanego związku**

#### **Zasada metody**

Do oceny wpływu inhibitora nekrozy Necrox-2 na działanie cytotoksyczne badanego związku wykorzystano test MTT. Necrox-2 jest antyoksydantem uważanym jest za selektywny inhibitor nekrozy i/lub nekroptozy. Mechanizm działania jest związany z ochroną komórki przed nadtlenoazotynami i reaktywnymi formami tlenu generowanymi w mitochondriach (265).

#### **Wykonanie**

##### *Ocena działania cytotoksycznego Necrox-2*

W pierwszym etapie wykonano eksperymenty mające na celu sprawdzenie działania cytotoksycznego samego inhibitora. Komórki linii LNCaP wysiano na płytki 96-dółkowe (gęstość  $2 \times 10^4$  komórek/dółek). Następnego dnia podano Necrox-2 w zakresie stężeń: 30  $\mu\text{M}$ ; 15  $\mu\text{M}$ ; 7,5  $\mu\text{M}$ ; 3,8  $\mu\text{M}$ ; 1,9  $\mu\text{M}$ ; 0,9  $\mu\text{M}$ ; 0,45  $\mu\text{M}$ . Jako kontrolę negatywną zastosowano DMSO w stężeniu nie przekraczającym 0,1% w medium hodowlanym. Badanie wykonano zarówno w fazie ciemnej oraz w połączeniu z naświetlaniem (20 minut; 2 godziny po podaniu inhibitora). Wpływ inhibitora nekrozy na cytotoksyczność związku TG3 zbadano po 24 godzinach w oparciu o test MTT. Wyniki przedstawiono jako procent kontroli (średnia wartość z dwóch niezależnych eksperymentów).

### *Wpływ Necrox-2 na cytotoksyczne działanie TG3*

Komórki linii LNCaP wysiano na płytce 96-dołkowej (gęstość  $2 \times 10^4$  komórek/dołek). Następnego dnia podano fotouczulacz o stężeniach:  $0,6 \mu\text{M}$ ;  $2,5 \mu\text{M}$  i  $5 \mu\text{M}$  i inkubowano przez 24h. Jako kontrolę użyto DMSO w stężeniu nieprzekraczającym 0,1%. Necrox-2 ( $5 \mu\text{M}$  w DMSO) podano 24h i 2 godziny przed naświetlaniem. Wpływ inhibitora nekrozy na cytotoksyczność związku TG3 zbadano w oparciu o test MTT. Wyniki przedstawiono jako procent kontroli (średnia wartość z dwóch niezależnych eksperymentów).

### **3.17 Wpływ TG3 na cytoszkielet komórek**

#### **Zasada metody**

Cytoszkielet to struktura odgrywająca istotną rolę w zapewnieniu i utrzymaniu odpowiedniego środowiska wewnątrzkomórkowego poprzez wpływ między innymi na kształt komórek, proces migracji, podziały komórkowe, transport wewnątrzkomórkowy, szlaki sygnałowe czy funkcje błony komórkowej. W budowie cytoszkieletu komórek wyróżnia się trzy główne polimery: filamenty aktynowe, filamenty pośrednie oraz mikrotubule. Spośród podstawowych składowych cytoszkieletu strukturą o największej sztywności, a jednocześnie bardzo intensywnej dynamice są mikrotubule zbudowane z białek:  $\alpha$  i  $\beta$ -tubuliny. W ocenie wpływu badanego związku na cytoszkielet komórek wykorzystano przeciwciała monoklonalne przeciwko  $\alpha$ -tubulinie znakowane fluoresceiną oraz metodę mikroskopii fluorescencyjnej (266).

#### **Wykonanie**

Komórki linii LNCaP wysiano (gęstość  $2,5 \times 10^5$  komórek/dołek) na płytce 24-dołkowej i wykonano eksperyment PDT dla trzech stężeń  $0,6 \mu\text{M}$ ;  $2,5 \mu\text{M}$  i  $5 \mu\text{M}$ . Jako kontrolę negatywną zastosowano DMSO w stężeniu nie przekraczającym 0,1% w medium hodowlanym. Po czasie 24h od naświetlania komórki utrwalono 4% roztworem formaldehydu (PBS) przez 15 min w temperaturze pokojowej. Następnie komórki przepłukano dwukrotnie roztworem PBS, a w celu permeabilizacji błony komórkowej podano 1% Triton X-100 i inkubowano przez 1h w temperaturze pokojowej w obecności roztworu blokującego (2% BSA w PBS). Następnie komórki przepłukano i podano przeciwciała monoklonalne anti- $\alpha$ -tubulin-FITC (1:50) i inkubowano przez noc. Zdjęcia wykonano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego

(Nikon Eclipse TS100 z lampą fluorescencyjną C-SHG, zastosowano filtr zielony G-2A, mikroskop był wyposażony w kamerę Digital Sight Camera System, zdjęcia zrobiono za pomocą oprogramowania NIS Elements Basic Research Nikon, Kawasaki Japonia).

## **Badania z zakresu wolnorodnikowych mechanizmów działania**

### **3.18 Detekcja stresu oksydacyjnego za pomocą 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (mikroskop fluorescencyjny)**

#### **Zasada metody**

Detekcję stresu oksydacyjnego przeprowadzono z użyciem diocjanu 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny, który w wyniku deacetylacji pod wpływem wewnątrzkomórkowych esteraz prowadzi do utworzenia 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (DCFH). W wyniku reakcji pomiędzy DCFH, a reaktywnymi formami tlenu powstaje fluorescencyjny produkt 2',7'-dichlorofluoresceina (DCF) (267).

#### **Wykonanie**

Komórki linii LNCaP ( $5 \times 10^5$ ) wysiano na płytce 6-dółkowej i po 24 godzinach podano fotouczulacz o stężeniu 0,6;2,5;5  $\mu\text{M}$ . Komórki naświetlano (10, 20 minut) po 24 godzinnej inkubacji komórki i badanie generowania ROS w komórkach wykonano po czasie 0h; 0,5h; 2h; 4h; 6h oraz 24h od naświetlania. W tym celu komórki przepłukano roztworem PBS i podano roztwór diocjanu 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (10  $\mu\text{M}$ ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) w PBS. Komórki inkubowano 30 minut w temperaturze 37°C. Następnie komórki przepłukano dwukrotnie roztworem PBS i wykonano zdjęcia za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego (Nikon Eclipse TS100, lampa fluorescencyjna C-SHG, zastosowano filtr G2A, mikroskop był wyposażony w kamerę Digital Sight Camera System, zdjęcia zrobiono za pomocą oprogramowania NIS Elements Basic Research (Nikon, Kawasaki Japonia) przy użyciu filtra zielonego G2-A oraz w świetle widzialnym. Histogramy obrazujące intensywność pikseli w kanale zielonym w wybranych zdjęciach uzyskanych w świetle fluorescencyjnym uzyskano za pomocą programu ImageJ 2.0.0-beta-7.6 w wersji Fiji 64bit for Windows (NIH, USA), a następnie skopiowano do programu

GraphPad Prism 6.04 for Windows, (GraphPad Software, La Jolla California USA) i zobrazowano na wykresie po zastosowaniu funkcji wygładzania uśredniającego 5 sąsiednich wartości. Zdjęcia uzyskane w świetle widzialnym przeprowadzono do formy czarno-białej za pomocą programu Adobe Photoshop CS 5 za pomocą samodzielnie skonfigurowanego filtra (czerwień 38%, żółcie 36%, zielenie 55%, niebieskozielony 151%, niebieskości 0%, karmazyny 0%) i nałożono na nie zdjęcia uzyskane w świetle fluorescencyjnym. Z warstwy zdjęcia uzyskanego za pomocą światła fluorescencyjnego usunięto czarne piksele za pomocą narzędzia selekcyjnego, dla którego parametr tolerancji został ustawiony na wartość 30 (metoda została opracowana na potrzeby tej pracy).

### **3.19 Detekcja wolnorodnikowych uszkodzeń materiału genetycznego- oznaczanie produktu uszkodzenia DNA - 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyny**

#### **Zasada metody**

Do najczęściej stosowanych markerów wolnorodnikowego uszkodzenia jądrowego oraz mitochondrialnego DNA należą 8-hydroksy-2' -deoksyguanozyna oraz 8-okso-7,8-dihydro-2'-deoksyguanozyna.

W celu oceny wpływu związku TG3 na powstawanie wolnorodnikowych uszkodzeń materiału genetycznego oznaczono stężenie 8-hydroksy-2-deoksyguanozyny po 24 godzinach od naświetlania komórek (10 oraz 20 minut) oraz komórek nienaświetlanych wykorzystując test ELISA za pomocą zestawu odczynników zgodnie z instrukcją producenta (Cayman Chemical, USA).

#### **Wykonanie**

Komórki linii LNCaP ( $5 \times 10^5$  komórek/dołek) wysiano na płytce 6-dółkowe i inkubowano do następnego dnia. Badany związek podano w stężeniach 0,6;  $\mu\text{M}$  2,5  $\mu\text{M}$ ; 5  $\mu\text{M}$  i inkubowano przez 24h. Jako kontrolę negatywną zastosowano DMSO w stężeniu nie przekraczającym 0,1% w medium hodowlanym. Następnie komórki naświetlano i po 24h wyizolowano DNA za pomocą zestawu odczynników *GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kits* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Po

izolacji DNA zostało poddane trawieniu za pomocą Nukleazy P<sub>1</sub> pochodzącej z *Penicillium citrinum* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) w obecności fosfatazy alkalicznej (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) przez 30 minut. Następnie próby podgrzewano w temperaturze 100°C przez 10 minut. Badane próby umieszczono na lodzie i wykonano pomiar stężenia DNA.

Analizę stężenia 8-OH-2dG w badanych próbach przeprowadzono za pomocą zestawu odczynników ELISA *DNA/RNA oxidative damage EIA kit* (Cayman Chem, An Arbor, MI, USA), zgodnie z protokołem producenta. Na płytkę z naniesionymi przeciwciałami umieszczono określone objętości DNA, roztwory wzorcowe i podano mieszaninę reakcyjną zawierającą przeciwciała monoklonalne. Płytkę inkubowano przez 18 godzin w temperaturze 4°C. Następnie płytkę przepłukano trzykrotnie buforem i podano odczynnik Ellman'a. Wytrząsano przez 2 godziny i wykonano pomiar absorbancji przy długości fali 405 nm za pomocą czytnika płytek (Biotek Instruments, Elx-800). Stężenie 8-OH-2dG oznaczono za pomocą wykonanej krzywej standardowej i przeliczono na ilość DNA (pg 8-OH-2dG/ $\mu$ g DNA). Uzyskane wyniki przedstawiono jako średnia wartość z dwóch niezależnych eksperymentów +SD.

### **3.20 Wpływ inhibitorów enzymów antyoksydacyjnych na cytotoksyczność związku TG3**

#### **Zasada metody**

Wpływ inhibitorów enzymów antyoksydacyjnych zostało wykonane dla następujących inhibitorów (tabela 6): dietyloditiokarbaminianu (DDC), 2-metoksyestradiolu (2-ME), sulfoksyminy L-butioniny (BSO,) oraz 3-amino-1,2,4-triazolu (3-AT) w oparciu o test MTT.

**Tabela 6.** Inhibitory enzymów antyoksydacyjnych użyte w eksperymencie.

Nazwa	Rodzaj inhibitora
DDC	inhibitor cynkowo-miedziowej dystmutazy ponadtlenkowej (ZnCuSOD)
2-ME	inhibitor mitochondrialnej dystmutazy ponadtlenkowej (MnSOD)
BSO	inhibitor syntetazy glutationu (GS)
3-AT	inhibitor katalazy (CAT)

### **Wykonanie**

#### *Ocena działania cytotoksycznego inhibitorów*

W pierwszym etapie wykonano eksperymenty mające na celu sprawdzenie działania cytotoksycznego inhibitorów. Komórki linii LNCaP wysiano na płytki 96-dółkowe (gęstość  $2 \times 10^4$  komórek/dolek). Następnego dnia podano DDC, 2-ME, BSO 3-AT w stężeniach podanych w tabeli 7.

**Tabela 7.** Stężenie inhibitorów zastosowane w ocenie działania cytotoksycznego

Inhibitor	Zakres stężeń
DDC	40 $\mu$ M; 20; $\mu$ M 10 $\mu$ M; 5 $\mu$ M; 2,5 $\mu$ M; 1,2 $\mu$ M; 0,6 $\mu$ M
2-ME	12 $\mu$ M; 6 $\mu$ M; 3 $\mu$ M; 1,5 $\mu$ M; 0,75 $\mu$ M; 0,3 $\mu$ M; 0,15 $\mu$ M
BSO	6 mM; 3 mM; 1,5 mM; 0,75 mM; 0,3 mM; 0,15 mM; 0,07mM
3-AT	10 mM; 5 mM; 2,5 mM; 1,2 mM; 0,6 mM; 0,3 mM; 0,15 mM

Badanie wykonano zarówno w fazie ciemnej oraz w połączeniu z naświetlaniem (20 minut). Jako kontrolę użyto DMSO w stężeniu nieprzekraczającym 0,1%. Wpływ inhibitorów na cytotoksyczność związku TG3 zbadano po 24 godzinach w oparciu o test MTT. Wyniki przedstawiono jako procent kontroli (średnia wartość z dwóch niezależnych eksperymentów).



### *Wpływ na cytotoksyczne działanie TG3*

Komórki linii LNCaP ( $2 \times 10^4$  komórek/dołek) wysiano na płytki 96-dołkowe. Następnego dnia komórki eksponowano na działanie inhibitorów: DDC ( $10 \mu\text{M}$ ), BSO ( $1,5 \text{ mM}$ ) oraz 3-AT ( $5 \text{ mM}$ ) oraz związku TG3 ( $0,6 \mu\text{M}$ ) 24 godzin przed naświetlaniem. Jako kontrolę negatywną zastosowano DMSO w stężeniu nie przekraczającym 0,1% w medium hodowlanym. Następnie komórki naświetlano zgodnie z protokołem PDT (10 oraz 20 minut). Wpływ zastosowanych inhibitorów na cytotoksyczność związku TG3 został zbadany przy użyciu testu MTT, wykonanego 24h po naświetlaniu oraz dla komórek nienaświetlanych. Wyniki przedstawiono jako średnią wartość z dwóch niezależnych eksperymentów (jako % kontroli).

### **3.21 Ilościowa analiza zmian stężenia glutationu w komórce z wykorzystaniem barwnika fluorescencyjnego Thioglo-1**

#### **Zasada metody**

Metoda opiera się na pomiarze fluorescencji adduktów powstających w wyniku reakcji barwnika Thioglo-1 (amid kwasu maleinowego) z grupami sulfhydryłowymi białek (268).

#### **Wykonanie**

Zmiany stężenia glutationu w komórkach po 0h, 0,5h; 2h; 4h; 6h i 24h od naświetlania zostały zmierzone za pomocą barwnika fluorescencyjnego Thioglo-1 (Calbiochem, San Diego, CA, USA). W tym celu komórki linii LNCaP zostały wysiane na płytki 96-dołkowe w ilości  $2 \times 10^4$  komórek/dołek. Następnego dnia podano fotouczulacz w stężeniach  $0,6 \mu\text{M}$ ;  $2,5 \mu\text{M}$ , oraz  $5 \mu\text{M}$ . Czas inkubacji z badanym związkiem wynosił 24h. Jako kontrolę negatywną zastosowano DMSO w stężeniu nie przekraczającym 0,1% w medium hodowlanym. Po dwukrotnym przemyciu płytek roztworem PBS podano inhibitor syntetazy glutationu o stężeniu  $1,5 \text{ mM}$ . Po czasie 1 godziny od podania BSO komórki naświetlano zgodnie z protokołem eksperymentu PDT (dwa czasy naświetlania 10 i 20 min, komórki nienaświetlane). Następnie komórki zlizowano przy użyciu buforu PBS przez 24h w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ . Uzyskane lizaty komórkowe ( $50 \mu\text{l}$ ) oraz przygotowane roztwory standardowe glutationu (zakres stężeń

0,3  $\mu\text{M}$ -1,0  $\mu\text{M}$ ) przeniesiono na płytki do pomiaru fluorescencji i dodano 50  $\mu\text{l}$  świeżo przygotowanego roztworu ThioGlo 1 (5 $\mu\text{M}$  w PBS). Płytki wytrząsnęto i inkubowano 5 min bez dostępu światła. Pomiar fluorescencji wykonano na czytniku płytek Tecan Infinity 200 (Männedorf, Szwajcaria) przy długości fali: wzbudzenie 384 nm, emisja 513 nm. Wyniki przedstawiono jako średnia ilość glutationu z dwóch eksperymentów przeliczona na białko (jako % kontroli).

### **3.22 Generowanie tlenu azotu**

#### **Zasada metody**

Do oznaczenia stężenia tlenu azotu wykorzystano znacznik fluorescencyjny diocyan 4-amino-5-metyloamino-2',7'-difluorofluoresceiny (DAF-FM DA). W komórkach pod wpływem estera zachodzi deacetylacja DAF-FM DA do 4-amino-5-metyloamino-2',7'-difluorofluoresceiny (DAF-FM), która w obecności NO przechodzi w fluorescencyjny produkt triazolofluoresceinę (269).

#### **Wykonanie**

Komórki linii LNCaP wysiano na płytki 96-dółkowe (gęstość  $2 \times 10^4$  komórek/dółek). Następnego dnia podano fotouczulacz o stężeniach: 0,6  $\mu\text{M}$ ; 2,5  $\mu\text{M}$  oraz 5  $\mu\text{M}$  i inkubowano przez 24h. Jako kontrolę negatywną zastosowano DMSO w stężeniu nie przekraczającym 0,1% w medium hodowlanym. Komórki naświetlono i po czasie: 2, 6 godzin podano DAF-FM DA (10 $\mu\text{M}$  w DMSO) w medium bez zawartości surowicy i umieszczono w inkubatorze na czas 30 minut. Następnie komórki dwukrotnie przepłukano roztworem PBS i ponownie umieszczono w inkubatorze czas 15 min. Fluorescencję zmierzono na czytniku Tecan Infinity 200 (Männedorf, Szwajcaria) płytek przy następujących długościach fali: wzbudzenie: 485 nm, emisja: 535 nm.

### 3.23 Badanie subkomórkowej lokalizacji związku TG3

#### Zasada metody

Mechanizm działania fotouczulaczy jest ściśle związany z ich wewnątrzkomórkową lokalizacją, w związku z krótkim czasem życia tlenu singletowego, a także innych reaktywnych form tlenu. Określenie lokalizacji PS w komórce pozwala wytypować struktury szczególnie narażone na działanie wolnych rodników oraz może dostarczyć informacji związanych z wpływem lokalizacji na rodzaj drogi śmierci komórkowej.

W celu określenia lokalizacji badanego związku w komórce zaplanowano eksperymenty z użyciem znaczników fluorescencyjnych (barwiących mitochondria, lizosomy oraz retikulum endoplazmatyczne) w oparciu o mikroskopię konfokalną. W badaniu użyto znaczników fluorescencyjnych barwiących mitochondria (Mitotracker), lizosomy (Lysotracker) oraz retikulum endoplazmatyczne (ER-tracker). Mitotracker to barwnik, który na drodze transportu biernego przenika przez błonę komórkową i gromadzi się w mitochondriach. Obecność ugrupowań chlorometylowych w cząsteczce umożliwia zwiążanie się znacznika z cysteiną obecną w grupach tiolowych białek mitochondrialnych (270). Lysotracker to znacznik, który w swojej strukturze zawiera ugrupowanie aminowe nadające charakter zasadowy w związku z tym może gromadzić się w selektywny sposób w strukturach wykazujących niższe pH (271). ER-tracker to selektywny i fotostabilny barwnik gromadzący się w retikulum endoplazmatycznym, który w przeciwieństwie do stosowanego w barwieniu ER- 3,3'-heksylokarbocyjanianu jodowego (DiOC<sub>6</sub>) nie wybarwia także mitochondriów (272).

#### Wykonanie

W celu wykonania zdjęć obrazujących subkomórkową lokalizację związku TG3 w komórkach: LNCaP, komórki wysiano na czterokompartimentowe szalki Petriego do mikroskopii o średnicy 35mm (Greiner Bio One, Frickenhausen Austria) w gęstości  $12 \times 10^4$  komórek na szalkę, w eksperymencie tym zastosowano medium DMEM bez czerwieni fenolowej. Następnego dnia podano związek TG3 w stężeniu 10  $\mu$ M i inkubowano przez 1 godzinę.

Do wybarwienia organelli komórkowych użyto następujących odczynników oraz zastosowano następujące parametry inkubacji:

Mitotracker Green FM (wzbudzenie 490 nm/ emisja 516nm): stężenie końcowe 100 nM czas barwienia: 30 min

ER-Tracker Blue-White DPX (wzbudzenie 374 nm/ emisja 430-640 nm): stężenie końcowe: 100 nM, czas barwienia: 30 min

LysoTracker Yellow Hck-123 (wzbudzenie 465 nm/ emisja 535 nm): stężenie końcowe: 70 nM, czas barwienia: 1h

Wszystkie znaczniki zostały zakupione w firmie (Life Technologies, Grand Island, NY, USA).

Dla związku TG3 wartości wzbudzenia i emisji wyniosły odpowiednio: 670 i 710 nm.

Po określonym czasie barwienia komórki były płukane trzykrotnie buforem PBS i poddane analizie mikroskopowej.

Do wykonania zdjęć użyto systemu Leica TCS SP5 II w skład, którego wchodził: mikroskop odwrócony: DMI 6000 CS Trino Inverted Research Microscope with motorized Focus and motorized Objective revolver wyposażony w lasery: laser biały: (White Light Laser (WLL) 470 nm - 670 nm with AOTF (Acousto-Optical-Tunable- Filter)), laser argonowy: (Argon Ion Laser with 5 fixed laser lines: 458 nm, 476 nm, 488 nm, 496 nm and 514 nm), Laser 405: 405 Laser Option CW with AOTF.

System skanujący: Conventional SP5 Scanning System

Detektory: Three Internal Detector Channels (PMT), two Internal Detector Channels (HyD)

Kamera cyfrowa: Leica DFC450 C digital camera

Do wykonania zdjęć użyto obiektywu immersyjnego 63x o aperturze 1.4 (HCX PL APO 63x/1.40-0.60 Oil Lbd.- bl CS Lbd.- blue)

System kontrolowany był przez komputer PC wyposażony w oprogramowanie: Leica LAS Application Software.

Po eksperymencie zdjęcia zostały poukładane w zestawy obrazujące poszczególne barwienie i poddane obróbce za pomocą programu Adobe Photoshop CS w celu uwidocznienia różnic sygnału fluorescencyjnym uzyskanym z zastosowanych fluoroforów i związku TG3.

### **3.24 Pomiar białka**

#### **3.24.1 Metoda kolorymetryczna**

Stężenie białka (dla następujących eksperymentów: aktywność kaspazy-9, panel apoptotyczny, pomiar stężenia glutationu) zostało oznaczone metodą Lowry'ego za pomocą zestawu odczynników *Bio-Rad Protein Assay Kit* (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA). Zasada metody opiera się na modyfikacji reakcji biuretowej i przebiega w dwóch etapach. Pierwsza reakcja zachodzi w środowisku zasadowym i opiera się na tworzeniu przez jony  $\text{Cu}^{2+}$  kompleksu z białkami, reakcji tej towarzyszy redukcja  $\text{Cu}^{2+}$  do jonów  $\text{Cu}^+$ . W kolejnym etapie dodawany się odczynnik Folina-Ciocalteu będący kompleksem kwasów fosfomolibdenowego i fosfowolframowego. W wyniku redukcji obu kwasów przez aminokwasy aromatyczne w obecności jonów miedzi powstaje produkt o niebieskim zabarwieniu (273). Intensywność zabarwienia jest wprost proporcjonalna do stężenia białka w próbce. Do oznaczenia stężenia białka w badanych próbach wykonano krzywą wzorcową. Jako standardy zostały użyte roztwory albuminy bydlęcej w zakresie stężeń 2;1;0,5;0,25;0,125;0,06 0,06-2 mg/ml. Absorbancję zmierzono przy użyciu czytnika płytek (Biotek Instruments, Elx-800) przy długości fali 750 nm.

#### **3.24.2 Metoda fluorescencyjna**

Stężenie białka podczas analizy aktywności kaspazy-3 zostało wykonane za pomocą fluorescencyjnego zestawu do oznaczania białka *Quant-iT™ Protein Assay Kit* za pomocą fluorymetru Qubit (Life Technologies, Grand Island, NY, USA).

### **3.25 Pomiar DNA**

Pomiar stężenia DNA wykonano za pomocą zestawu odczynników *DNA Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit* (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) z wykorzystaniem fluorymetru Qubit (Life Technologies, Grand Island, NY, USA).

### 3.26 Analiza statystyczna

Obliczenia wartości  $IC_{50}$  oraz analizę statystyczną wykonano za pomocą programu GraphPad Prism 5.02 oraz GraphPad Prism 6.04 (GraphPad Software, San Diego California USA) posługując się testem analizy wariancji dla powtórzonych pomiarów (repeated measures **ANOVA**) oraz testem post-hoc: **testem Dunnett'a** (test uwalniania LDH, analiza faz cyklu komórkowego, barwienie błękitem trypanu, barwienie podwójne Hoechst/jodek propidyny, indukcji apoptozy testem ELISA, analiza poziomu białek pro-i antyapoptotycznych aktywność kaspazy-3 i kaspazy-9, potencjał błony mitochondrialnej, poziom glutationu, wpływ enzymów antyoksydacyjnych, generowanie tlenku azotu) oraz **testem Tukey'a** (wpływ spautyny-1, inhibitora białka Bcl-2 oraz inhibitora nekrozy). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  odchylenie standardowe ( $\pm SD$ ). Za istotne statystycznie przyjęto różnice z wartością współczynnika  $P < 0,05$  i oznaczono na wykresach symbolem \*, różnice z wartością współczynnika  $P < 0,01$  i oznaczono na wykresach symbolem \*\*, podczas gdy różnice z wartością współczynnika  $P < 0,001$  oznaczono na wykresach symbolem \*\*\*.

## 4. WYNIKI

### 4.1 Cytotoksyczność związków TG3, TG4, TG15, TG18

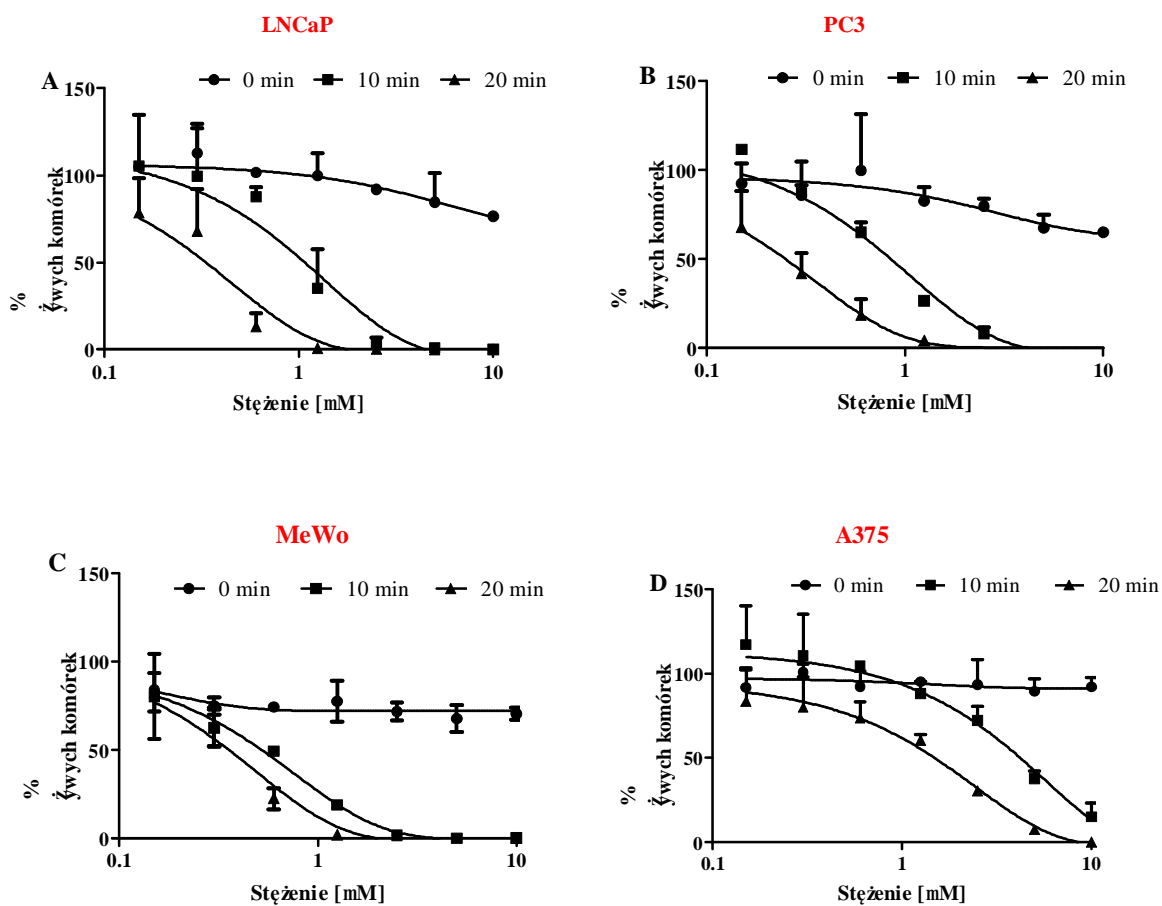
Ocenę cytotoksycznego działania badanych ftalocyjanin przeprowadzono wykorzystując test MTT. Badanie wykonano dla czterech związków: **TG3** (dla linii komórkowych: LNCaP, PC3, MeWo, A375), **TG4** (dla linii komórkowych: LNCaP, A375), **TG15** i **TG18** (linia LNCaP oraz A549) oraz komercyjnie dostępnej ftalocyjaniny cynkowej **ZnPc** (linia komórkowa LNCaP).

Wyniki uzyskane w fazie ciemnej (dla komórek nienaświetlanych) wykazały brak działania toksycznego wszystkich badanych związków za wyjątkiem standardowej ftalocyjaniny cynkowej ( $IC_{50} < 0,5 \mu M$ ). Spośród badanych związków działanie cytotoksyczne w połączeniu z naświetlaniem wykazał jedynie związek TG3 (ftalocyjanina cynkowa z dwiema grupami morfolinowymi w pierścieniach bocznych) oraz standardowa ftalocyjanina cynkowa. Istotny wpływ na siłę działania cytotoksycznego miał czas naświetlania komórek. Najsilniejsze działanie związek TG3 wykazał po 20 minutach naświetlania w przypadku wszystkich użytych w eksperymencie linii komórkowych (wartości  $IC_{50} < 1 \mu M$  obliczono w dla linii komórkowych LNCaP, PC3 oraz MeWo; natomiast wartość  $IC_{50} < 2 \mu M$  dla linii A375). Najmniej wrażliwą linią okazała się linia nowotworu skóry A375 ( $IC_{50} > 4 \mu M$  dla 10 minut naświetlania;  $IC_{50} > 1 \mu M$  dla 20 minut naświetlania), a najbardziej wrażliwą po 10 min naświetlania okazała się linia nowotworu skóry MeWo natomiast po 20 minutach naświetlania najmniejszą przeżywalność odnotowano w linii PC3. Wyniki uzyskane dla ZnPc wykazały silne działanie cytotoksyczne tego związku w połączeniu z naświetlaniem, jednak związek wykazał bardzo silne działanie cytotoksyczne również w fazie ciemnej, działanie cytotoksyczne tego związku ujawniło się dopiero w zakresie wyższych zastosowanych stężeń, co spowodowało, że obliczona wartość  $IC_{50}$  dla fazy ciemnej jest niższa niż wartość uzyskana dla komórek naświetlanych przez 10 i 20 minut. Uzyskane wartości  $IC_{50}$  dla badanych fotouczulaczy przedstawiono w tabeli 8. Wykresy przedstawiające wpływ badanych związków na przeżywalność komórek nowotworowych przedstawiono na rycinach 11-15. Na podstawie wyników cytotoksyczności do dalszych badań związanych z mechanizmem działania wybrano związek TG3 oraz linię nowotworu prostaty LNCaP.

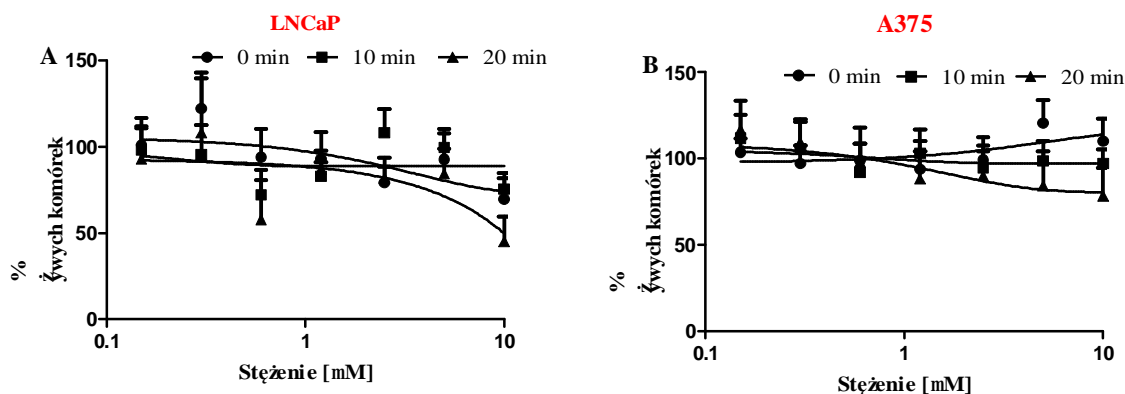
**Tabela 8.** Wartości IC<sub>50</sub> dla związków: **TG3** (dla linii komórkowej LNCaP, PC3, MeWo and A375), **TG4** (linie komórkowe: nowotworu prostaty LNCaP, nowotworu skóry A375), **TG15** oraz **TG18** (linie komórkowe: nowotworu prostaty LNCaP oraz płuc A549), oraz ftalocyjaniny cynkowej ZnPc (linia komórkowa nowotworu prostaty LNCaP). Wyniki przedstawiono jako średnią wartość+SD z dwóch niezależnych eksperymentów.

Linia komórkowa/związek	IC <sub>50</sub> [μM]		
	Czas naświetlania		
	0	10	20
<b>LNCaP/TG3</b>	>10	1,08 ±0,1	0,33±0,14
<b>PC3/ TG3</b>	>10	0,85±0,11	0,25±0,09
<b>A375/ TG3</b>	>10	4,19±0,02	1,47±0,2
<b>MeWo/ TG3</b>	>10	0,52±0,1	0,36±0,08
<b>LNCaP/TG4</b>	>10	>10	9,98±1,4
<b>A375/ TG4</b>	>10	>10	>10
<b>LNCaP/TG15</b>	>10	>10	>10
<b>A549/ TG15</b>	>10	>10	>10
<b>LNCaP/TG18</b>	>10	>10	>10
<b>A549/ TG18</b>	>10	>10	>10
<b>LNCaP/ZnPc</b>	0,38±0,21	0,61±2,2	0,72±0,07

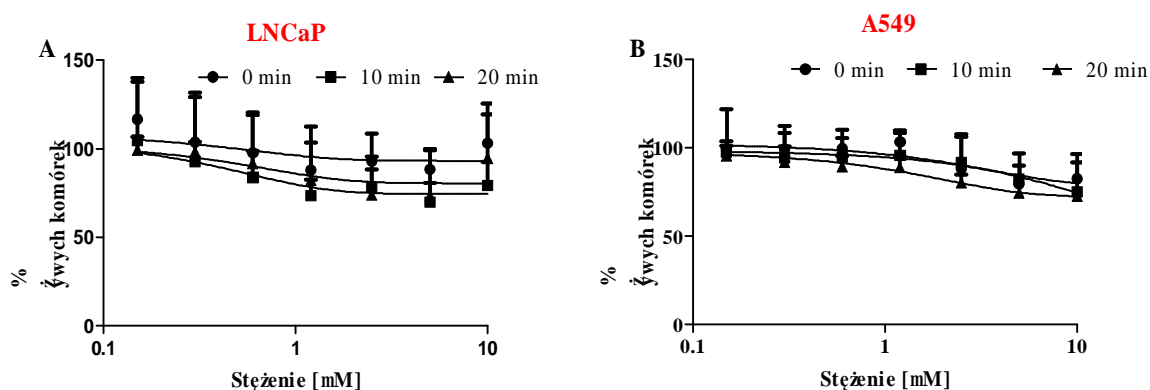




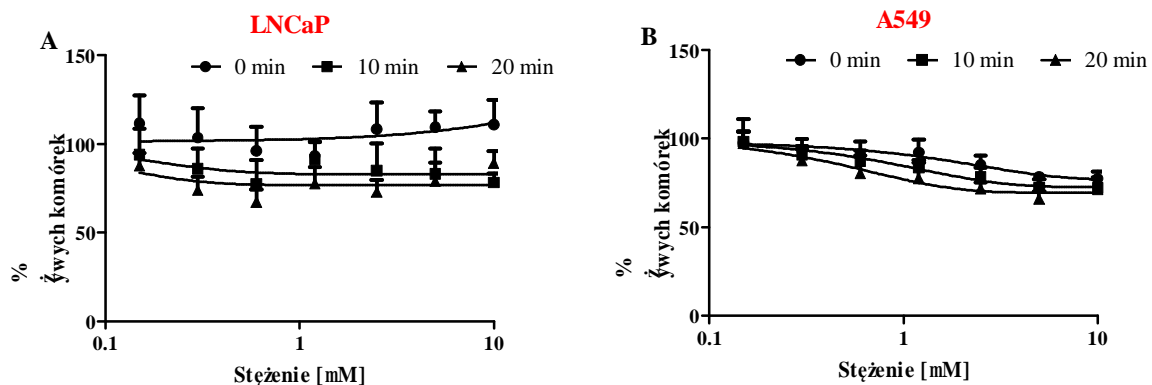
**Rycina 11.** Cytotoksyczność związku TG3 wobec komórek linii LNCaP (A), PC3 (B), MeWo (C) oraz A375 (D). Eksperyment wykonano dla komórek nienaświetlanych oraz naświetlanych przez 10 oraz 20 minut. Test MTT wykonano 24h po naświetlaniu komórek. Wyniki przedstawiono jako % kontroli (średnia wartość z dwóch niezależnych eksperymentów).



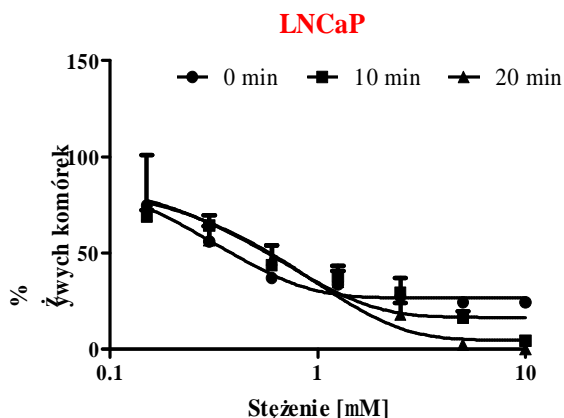
**Rycina 12.** Cytotoksyczność związku TG4 wobec komórek linii LNCaP (A) oraz A375 (B). Eksperyment wykonano dla komórek nienaświetlanych oraz naświetlanych przez 10 oraz 20 minut. Test MTT wykonano 24h po naświetlaniu komórek. Wyniki przedstawiono jako % kontroli (średnia wartość z dwóch niezależnych eksperymentów).



**Rycina 13.** Cytotoksyczność związku TG15 wobec komórek linii LNCaP (A) oraz A549 (B). Eksperyment wykonano dla komórek nienaświetlanych oraz naświetlanych przez 10 oraz 20 minut. Test MTT wykonano 24h po naświetlaniu komórek. Wyniki przedstawiono jako % kontroli (średnia wartość z dwóch niezależnych eksperymentów).



**Rycina 14.** Cytotoksyczność związku TG18 wobec komórek linii LNCaP (A) oraz A549 (B). Eksperyment wykonano dla komórek nienaświetlanych oraz naświetlanych przez 10 oraz 20 minut. Test MTT wykonano 24h po naświetlaniu komórek. Wyniki przedstawiono jako % kontroli (średnia wartość z dwóch niezależnych eksperymentów).

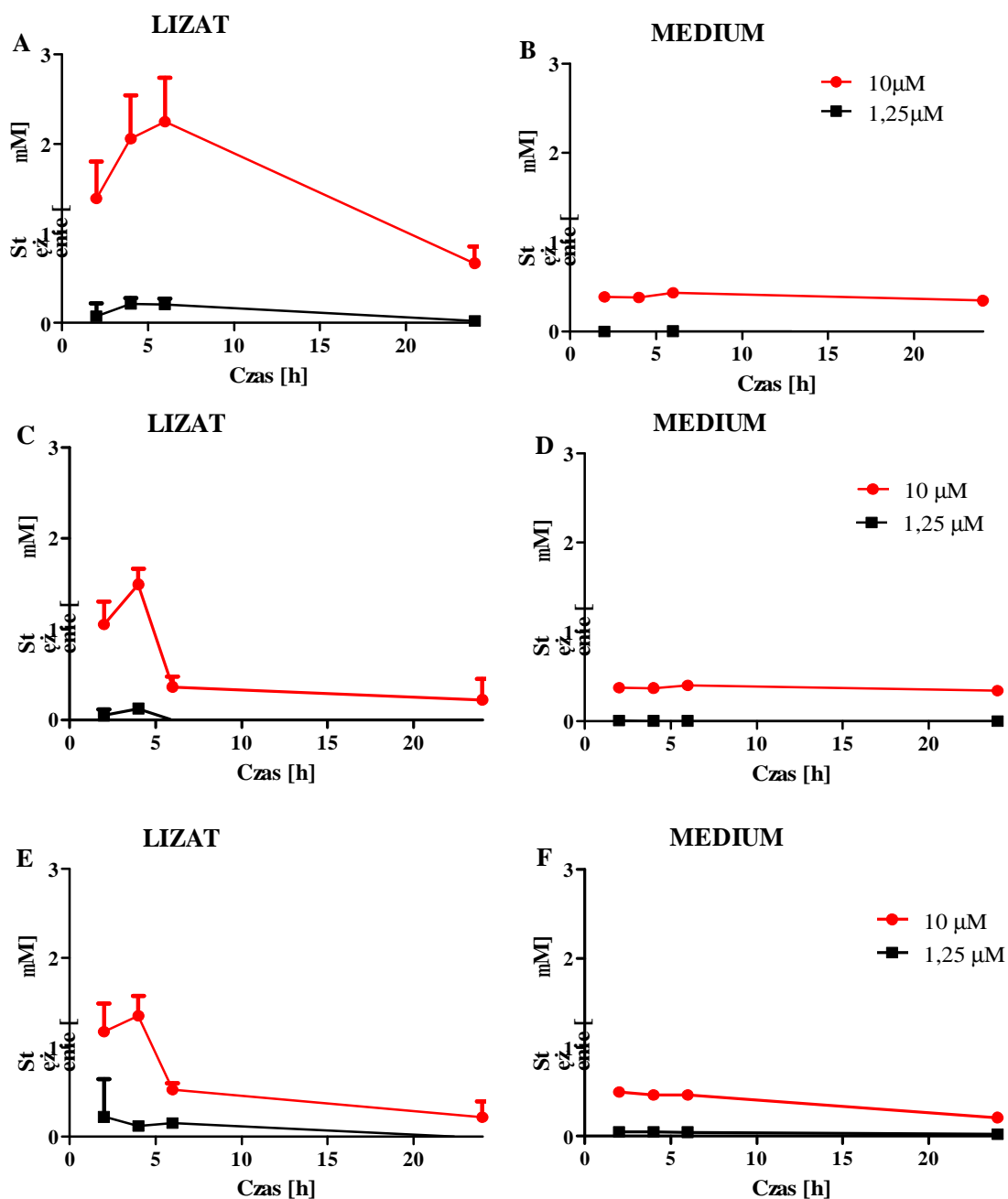


**Rycina 15.** Cytotoksyczność ZnPc wobec komórek linii LNCaP. Eksperyment wykonano dla komórek nienaświetlanych oraz naświetlanych przez 10 oraz 20 minut. Test MTT wykonano 24h od naświetlania komórek. Wyniki przedstawiono jako % kontroli (średnia wartość z dwóch niezależnych eksperymentów).

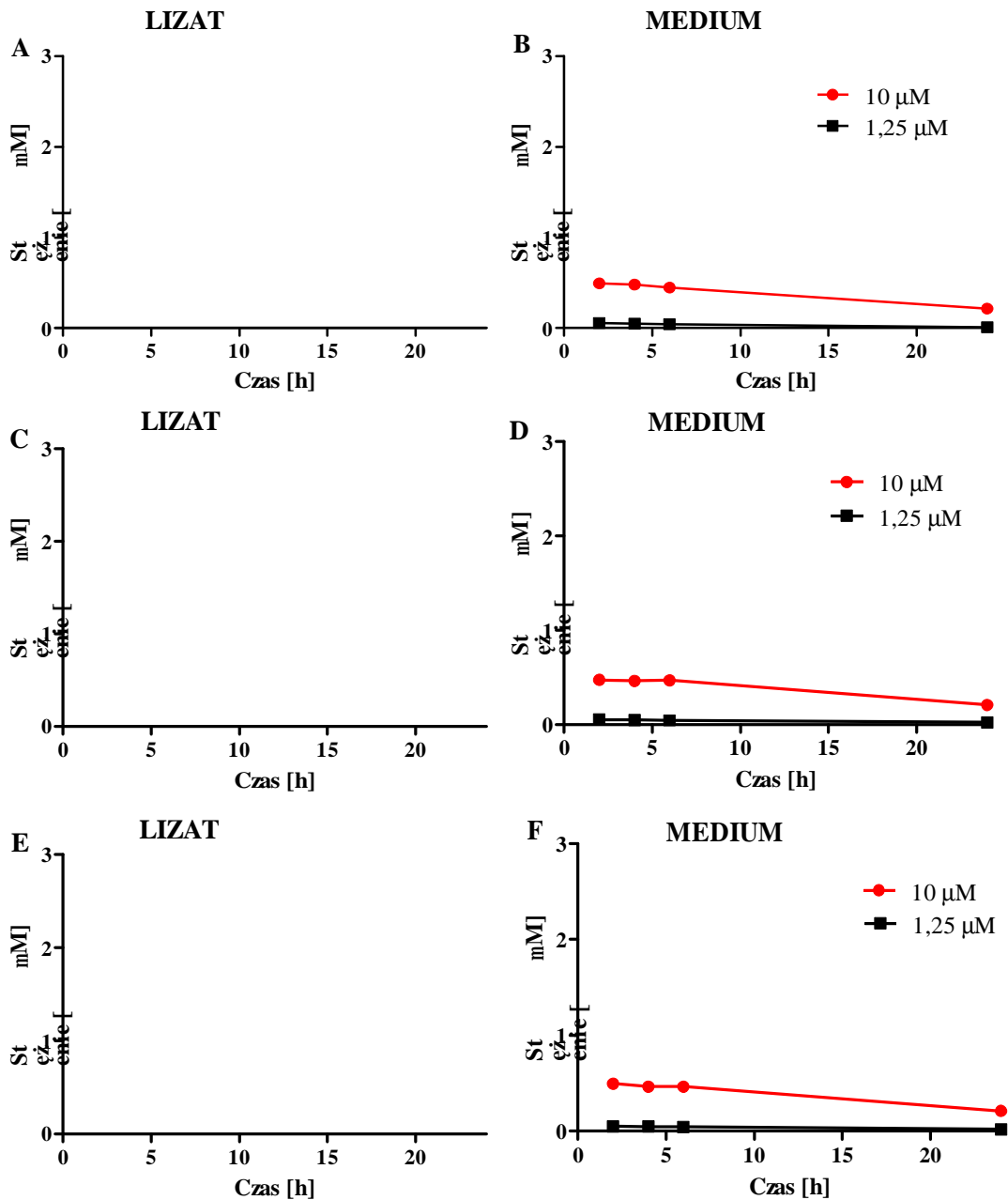
## 4.2 Badanie wchłaniania związku TG3 i TG4

Wprowadzenie dodatkowych grup morfolinowych miało na celu poprawę rozpuszczalności związków w wodzie, co mogłoby ułatwić ich dystrybucję zarówno w warunkach eksperymentalnych jak i *in vivo*, a w wyniku zapewnienia amifilowego charakteru prowadzić do zwiększenia stopnia wchłaniania tych związków przez komórki. W celu sprawdzenia wchłaniania badanych związków przez komórki nowotworowe przeprowadzono testy z użyciem dwóch związków: związku o najsilniejszym działaniu cytotoksycznym (związek TG3) oraz związku wykazującego niską toksyczność (związek TG4). W badaniu wykorzystano zdolność obu związków do fluorescencji. Badanie przeprowadzono po 2, 4, 6 oraz 24 godzinach inkubacji, badane związki użyto w stężeniach: 10  $\mu\text{M}$  oraz 1,25  $\mu\text{M}$ . Badanie wykonano także dla komórek naświetlanych 10 oraz 20 minut. Stężenia obu związków oznaczono w lizacie komórkowym oraz medium hodowlanym.

Uzyskane wyniki wykazały obecność w lizacie komórkowym jedynie związku TG3, a najwyższe stężenie zostało oznaczone po czasie 6 godzin inkubacji (rycina 16). W wyniku naświetlania komórek stężenie związku TG3 w lizacie uległo zmniejszeniu proporcjonalnie do czasu naświetlania. Związek TG4 (posiadający osiem grup morfolinowych) został oznaczony jedynie w medium hodowlanym jego obecności nie stwierdzono w lizacie komórkowym co sugeruje, że związek ten nie jest wchłaniany przez komórki, nie może więc wywierać działania cytotoksycznego (rycina 17).



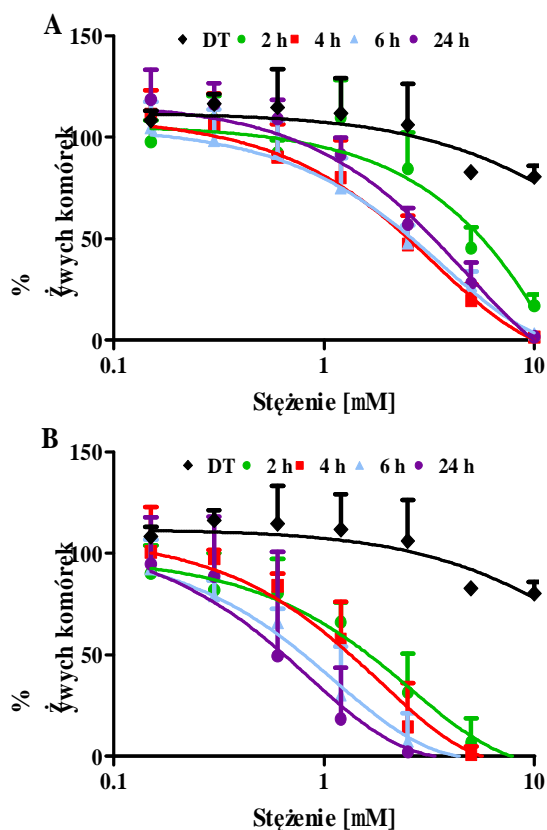
**Rycina 16.** Wchłanianie związku TG3 przez komórki nowotworowe. Badany związek inkubowano w stężeniach 10 μM oraz 1,25 μM przez czas 2,4,6 oraz 24h. Stężenie związku TG3 oznaczono w lizacie (A) oraz medium komórkowym (B) w fazie ciemnej oraz dla komórek naświetlanych 10 minut w lizacie komórkowym (C), medium (D) i 20 minut naświetlania w lizacie (E) i medium (F). Wyniki przedstawiono jako średnią wartość+SD z dwóch niezależnych eksperymentów.



**Rycina 17.** Wchłanianie związku TG4 przez komórki nowotworowe. Badany związek inkubowano w stężeniach 10  $\mu\text{M}$  oraz 1,25  $\mu\text{M}$  przez czas 2,4,6 oraz 24h. Stężenie związku TG4 oznaczono w lizacie (A) oraz medium komórkowym (B) w fazie ciemnej oraz dla komórek naświetlanych 10 minut w lizacie komórkowym (C), medium (D) i 20 minut naświetlania w lizacie (E) i medium (F). Wyniki przedstawiono jako średnią wartość+SD z dwóch niezależnych eksperymentów.

### 4.3 Zależność czasu inkubacji z badanym związkiem, a działaniem toksycznym

W celu sprawdzenia związku pomiędzy czasu inkubacji z badanym fotouczulaczem, a jego działaniem cytotoksycznym przeprowadzono badanie przeżywalności komórek po 2h, 4h, 6h oraz 24h inkubacji po dwóch czasach naświetlania 10 oraz 20 minut. Wykonano również eksperyment dla komórek nienaświetlanych. Wykresy obrazujące zależność czasu inkubacji z TG3 - przeżywalność komórek przedstawiono na rycinie 18. Wartości  $IC_{50}$  dla każdego z czasów inkubacji oraz czasu naświetlania przedstawiono w tabeli 9.



**Rycina 18.** Wpływ czasu inkubacji ze związkiem TG3 na jego działanie cytotoksyczne, A) 10 minut naświetlania, B) 20 minut naświetlania. Czarnymi symbolami oraz czarną linią zobrazowane są na obu rycinach wyniki uzyskane w fazie ciemnej. Wyniki przedstawiono jako średnią wartość+SD z dwóch eksperymentów (jako % kontroli).

Uzyskane wyniki wykazały, że czas inkubacji ze związkiem TG3 wpływa na działanie cytotoksyczne. Najsilniejsze działanie cytotoksyczne wykazano po inkubacji wynoszącej 24 godziny w połączeniu z 20 minutowym naświetlaniem ( $IC_{50}$  0,48 $\mu$ M) oraz 6 godzin ( $IC_{50}$  2,63 $\mu$ M) w przypadku czasu naświetlania wynoszącego 10 minut. Na podstawie uzyskanych wyników do dalszych eksperymentów wybrano czas inkubacji wynoszący 24 godziny.

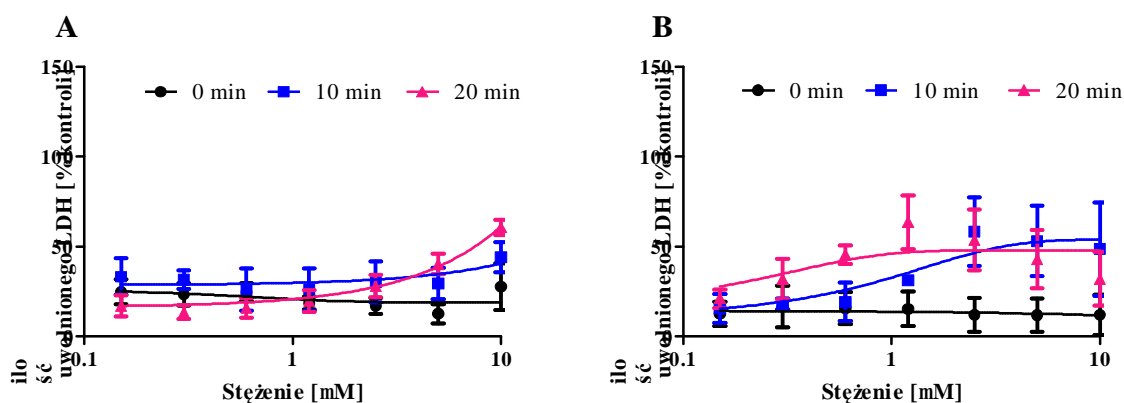
**Tabela 9.** Wartości  $IC_{50}$  wyznaczone dla różnych czasów inkubacji z badanym związkiem i czasem naświetlania. Wyniki przedstawiono jako średnią wartość+SD z dwóch eksperymentów.

Czas inkubacji	Czas naświetlania [min]		
	0	10	20
		$IC_{50}$ [ $\mu$ M]	
2	>10	5,64 $\pm$ 1,78	1,39 $\pm$ 0,35
4	>10	2,52 $\pm$ 0,53	1,18 $\pm$ 0,23
6	>10	2,63 $\pm$ 0,36	0,7 $\pm$ 0,15
24	>10	3,34 $\pm$ 0,98	0,48 $\pm$ 0,24



#### 4.4 Analiza uwalniania LDH

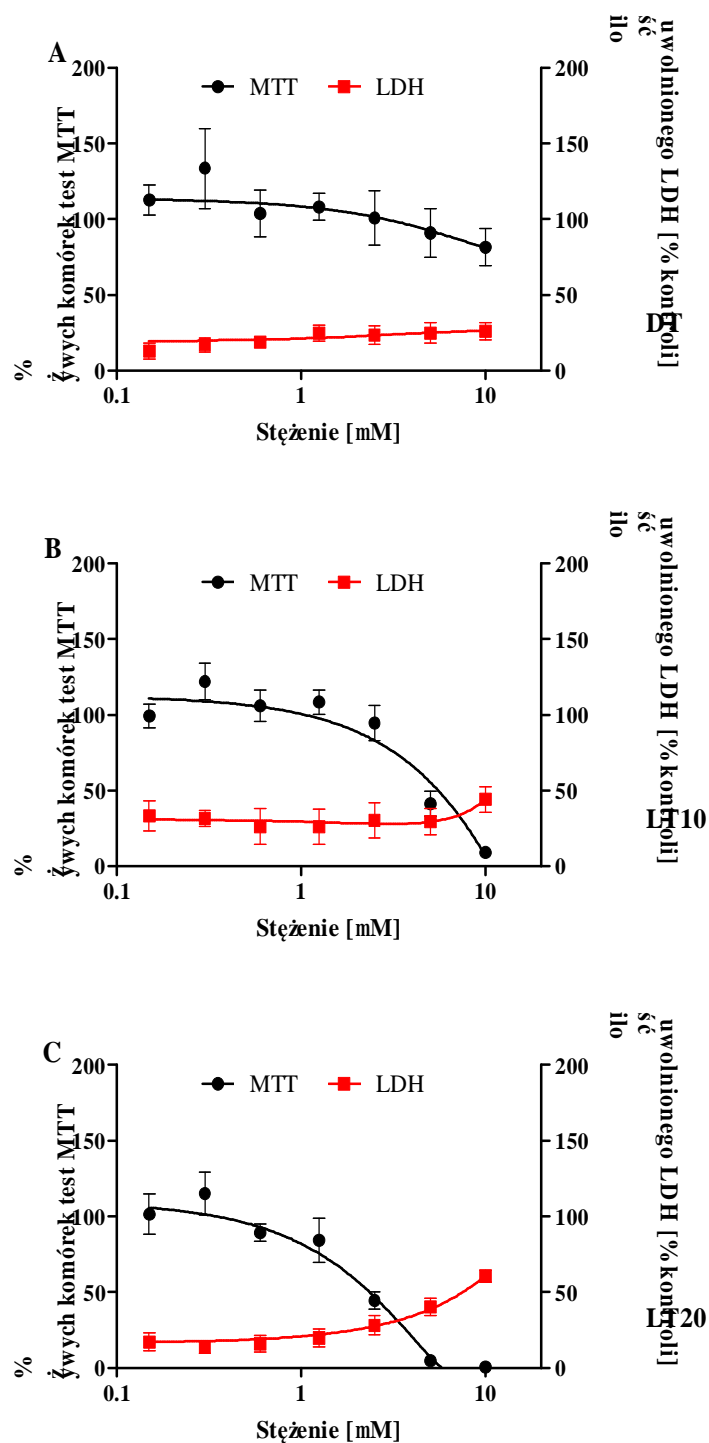
W celu sprawdzenia stopnia uszkodzeń błony komórkowej pod wpływem związku TG3 wykonano test uwalniania LDH. Ilość uwolnionego enzymu dostarcza informacji na temat integralności błon komórkowych zawartych w badanej próbie komórek, a pośrednio również odsetku komórek uszkodzonych na skutek bezpośredniego działania RFT/wolnych rodników generowanych w czasie PDT. Badanie wykonano po czasie 2 godzin oraz 24 godzin od naświetlania komórek (rycina 19). Uzyskane wyniki sugerują, że badany związek w połączeniu z naświetlaniem powoduje uszkodzenia błony komórkowej w zależności od użytego stężenia oraz czasu naświetlania. W eksperymencie zastosowano Triton X-100 niejonowy surfaktant, który w krótkim czasie lizuje wszystkie komórki obecne w układzie doświadczalnym, jednocześnie nie wpływa na aktywność LDH (badania przeprowadzone wcześniej w KiZ Toksykologii UMP).



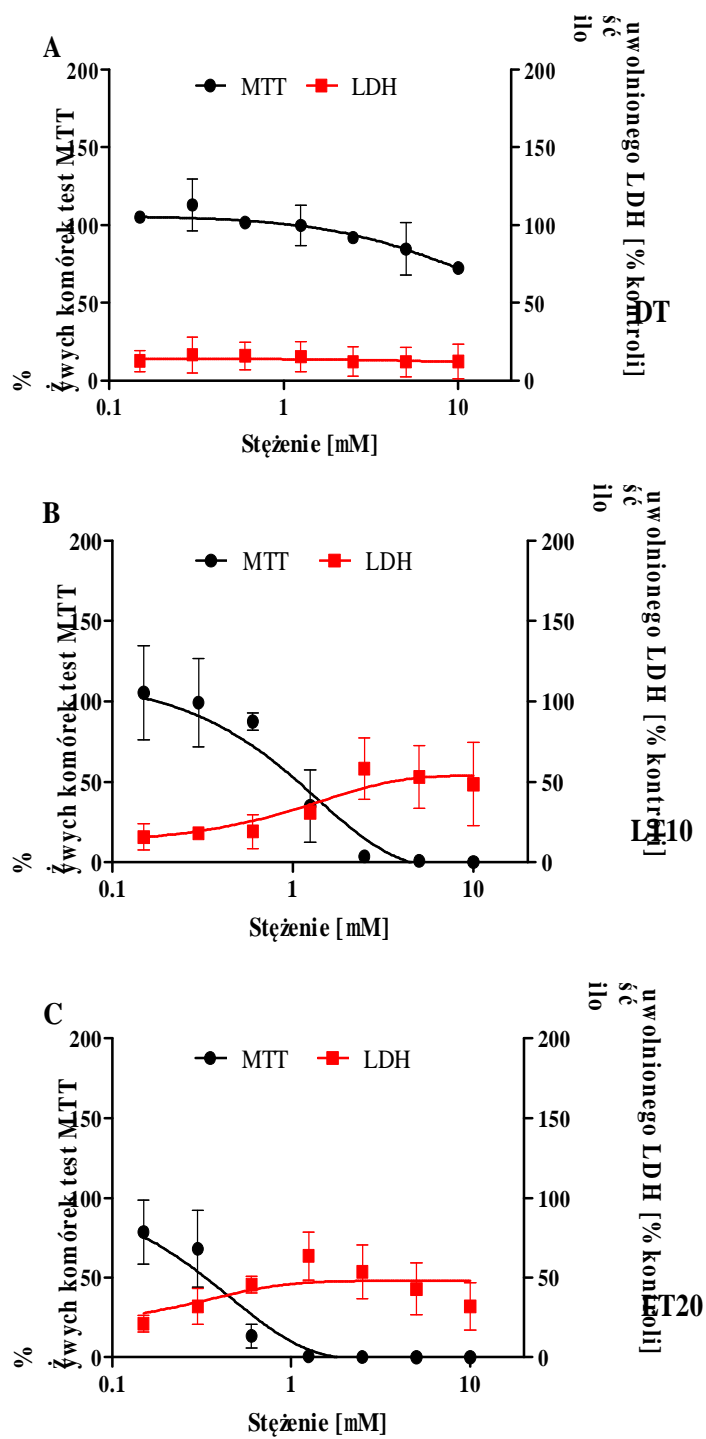
**Rycina 19.** Analiza uwalniania enzymu LDH po czasie 2 godzin (A) oraz 24h (B) od naświetlania. Komórki linii LNCaP inkubowano ze związkiem TG3 przez czas 24 h, następnie naświetlano 10 oraz 20 minut. Eksperyment wykonano także dla komórek nienaświetlanych. Wyniki przedstawiono jako średnią wartość +SD z dwóch eksperymentów.

Aktywność LDH zmierzona w medium pobranego z komórek traktowanych Tritonem X-100 oznaczono jako 100%. Istotnie statystycznie zmiany aktywności enzymu w medium hodowlanym obserwowano już po 2h od naświetlania w przypadku komórek inkubowanych ze związkiem TG3 w najwyższych stężeniach (5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M)

i naświetlanych 20 minutach (ilość LDH > 40%). Natomiast wyniki uzyskane po 24 godzinach od naświetlania wykazały istotny statystycznie wzrost aktywności LDH zarówno po 10 i 20-minutowej ekspozycji na światło o długości fali 640 nm. Po krótszym czasie naświetlania (10 minut) najwyższą aktywność LDH zmierzono po inkubacji komórek ze związkami TG3 w stężeniach 2,5  $\mu\text{M}$  i 5  $\mu\text{M}$  (>50%), natomiast po 20 minutach naświetlania dla stężenia 1,2 i 2,5  $\mu\text{M}$  (>50%). Na rycinach 20 i 21 przedstawione zestawione wyniki przeżywalności komórek zmierzone testem MTT oraz testem uwalniania LDH. Uzyskane wyniki wskazują, że zmniejszona przeżywalność komórek nowotworowych pod wpływem fotouczulacza TG3 w połączeniu z naświetlaniem zmierzona testem MTT koreluje ze zmianami stężenia LDH oznaczonego w medium hodowlanym w zakresie niższych stężeń użytych w eksperymencie, natomiast w przypadku wyższych stężeń (takich które w teście MTT wskazywały na brak żywych komórek w układzie doświadczalnym) nie obserwowano wzrostu poziomu LDH > 50% (względem tritonu).



**Rycina 20.** Analiza uwalniania enzymu LDH oraz przeżywalność komórek zbadana testem MTT po czasie 2 godzin od naświetlania. Analizę wykonano dla komórek nienaświetlanych (A) oraz naświetlanych: 10 (B), 20 (C) minut. Wyniki przedstawiono jako średnią wartość +SD z dwóch eksperymentów; istotność statystyczna: \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.



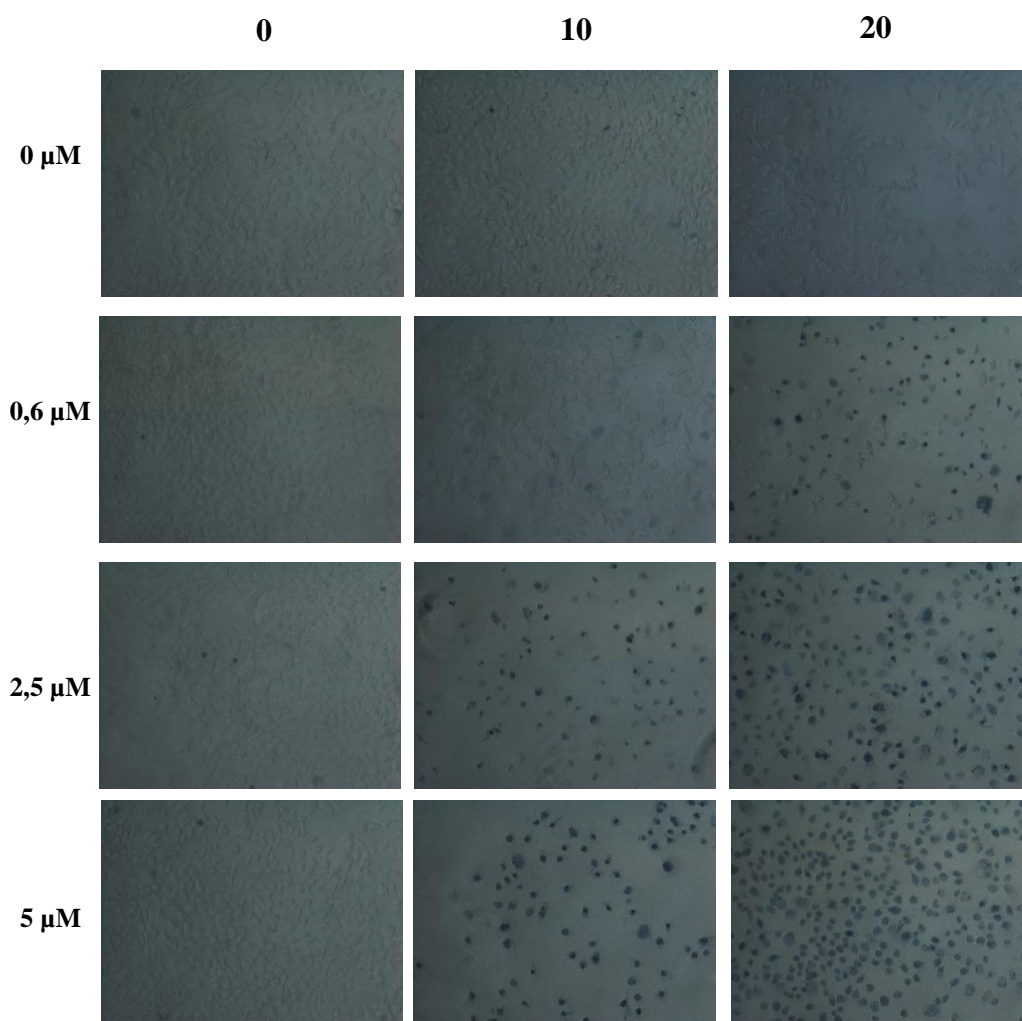
**Rycina 21.** Analiza uwalniania enzymu LDH oraz przeżywalność komórek zbadana testem MTT po czasie 24 godzin od naświetlania. Analizę wykonano dla komórek nienaświetlanych (A) oraz naświetlanych: 10 min (B) i 20 min (C). Wyniki przedstawiono jako średnią wartość +SD z dwóch eksperymentów.

## 4.5 Barwienie błękitem trypanu

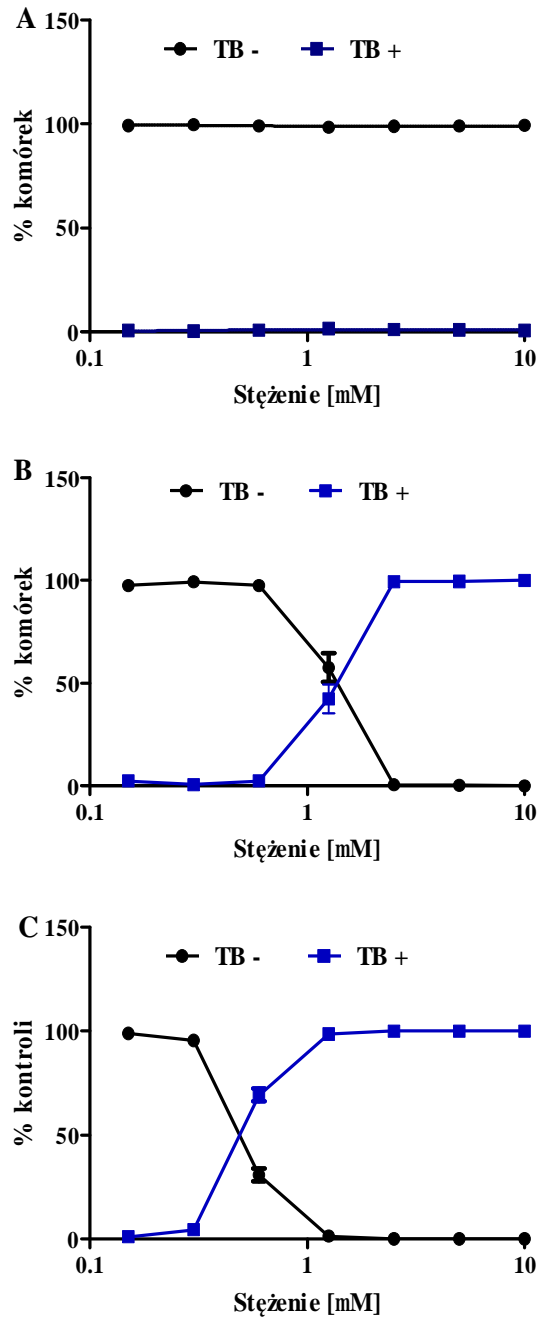
Barwienie błękitem trypanu to kolejny test cytotoksyczności wykorzystany w ocenie działania związku TG3. Komórki inkubowano przez 24h ze związkiem TG3 w stężeniach: 0  $\mu\text{M}$ ; 0,15  $\mu\text{M}$ ; 0,3  $\mu\text{M}$ ; 0,6  $\mu\text{M}$ ; 1,2  $\mu\text{M}$ ; 2,5  $\mu\text{M}$ ; 5 oraz 10  $\mu\text{M}$ . Komórki naświetlano (10 i 20 minut) i po czasie 24 godzin wybarwiono błękitem trypanu. Analiza uzyskanych zdjęć opierała się na policzeniu komórek wybarwionych i niewybarwionych. Wzrost liczby komórek zabarwionych przez błękit trypanu świadczy o stopniu działania cytotoksycznego. Uzyskane w eksperymentach wyniki wykazały, że badany związek w fazie ciemnej nie wykazuje działania cytotoksycznego (rycina 22 i 23). Po 10 minutowym naświetlaniu znaczący wzrost zabarwionych komórek zaobserwowano już przy stężeniu wynoszącym 1,2 $\mu\text{M}$  (~42%). Przy kolejnych stężeniach: 2,5  $\mu\text{M}$ ; 5  $\mu\text{M}$  oraz 10  $\mu\text{M}$  ilość zabarwionych komórek wynosiła ~100% (rycina 23). Po 20 minutach naświetlania istotny wzrost zabarwionych komórek obserwowano przy stężeniu 0,6 $\mu\text{M}$  (~69%). Przy wyższych stężeniach ilość zabarwionych komórek wynosiła ~100% (rycina 23). Otrzymane wyniki potwierdziły silne działanie cytotoksyczne związku TG3 wobec komórek nowotworowych, jednak porównanie wyników uzyskanych przy użyciu trzech różnych i opartych na różnych mechanizmach metod określania działania cytotoksycznego wskazuje jak ważny jest dobór metody określania działania cytotoksycznego.

Na rycinie 22 przedstawiono wybrane zdjęcia z barwienia błękitem trypanu. Pozostałe zdjęcia zostały umieszczone w suplemencie fotograficznym.

### CZAS NAŚWIETLANIA [min]



**Rycina 22.** Cytotoksyczność związku TG3 wobec komórek linii LNCaP zbadana za pomocą barwienia błękitem trypanu. Eksperyment wykonano dla komórek nienaświetlanych oraz naświetlanych 10 oraz 20 minut po czasie 24 godzin po naświetlaniu komórek.



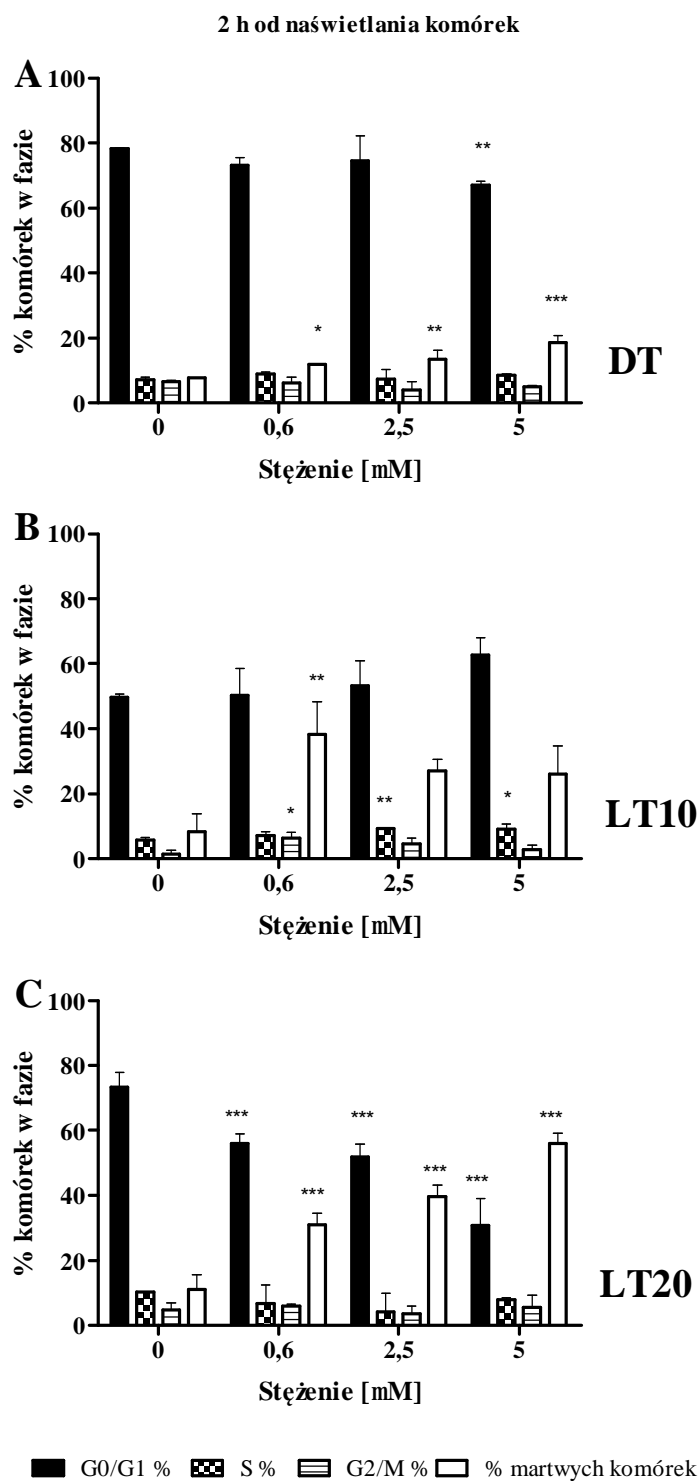
**Rycina 23.** Cytotoksyczność związku TG3 wobec komórek linii LNCaP zbadana za pomocą barwienia błękitem trypanu. Eksperyment wykonano dla komórek nienaświetlanych (A) oraz naświetlanych 10 minut (B) oraz 20 minut (C) po czasie 24 godzin po naświetlaniu komórek. Wyniki przedstawiają średnią wartość  $\pm$ SD z dwóch eksperymentów.

#### 4.6 Analiza faz cyklu komórkowego

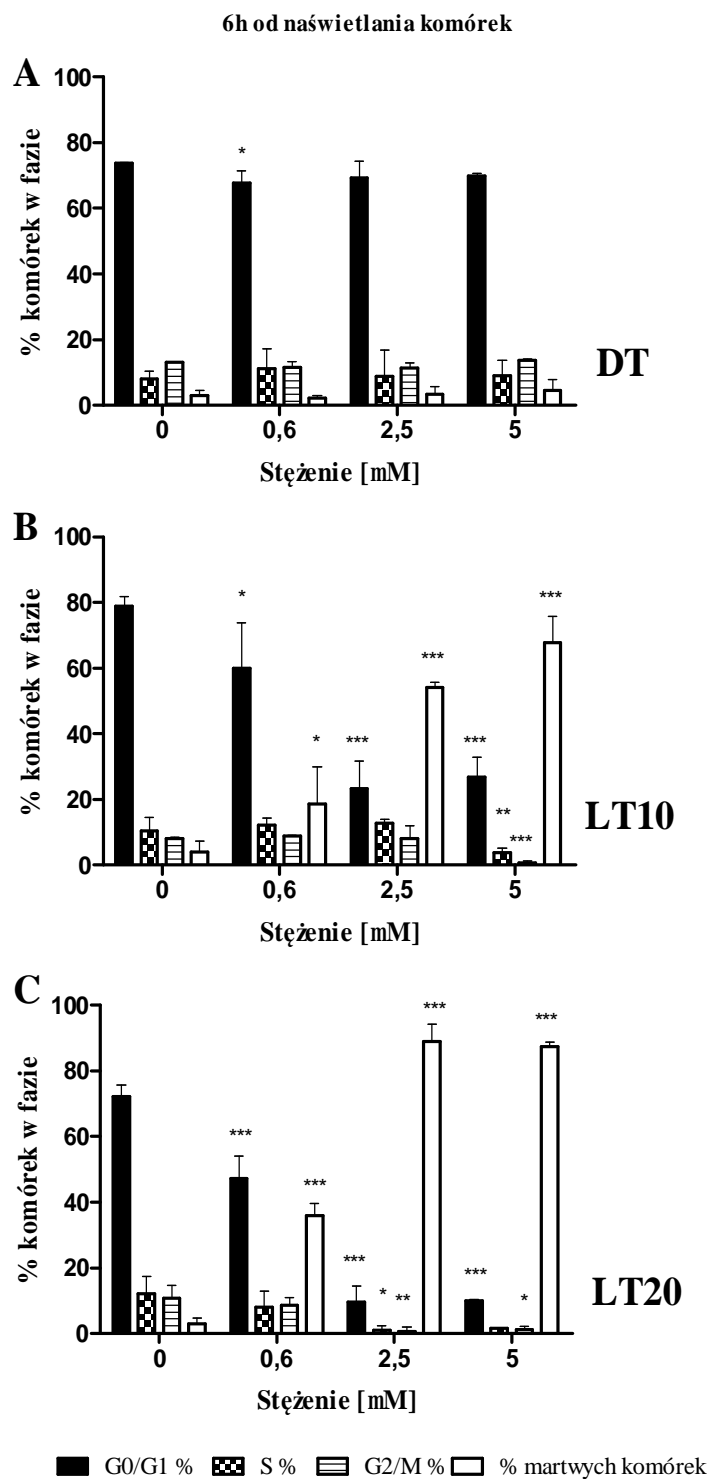
W celu zbadania wpływu badanego związku na cykl komórkowy posłużono się metodą barwienia jąder komórkowych jodkiem propidyny z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Analizy wykonano po 2h, 6h oraz 24 h od naświetlania komórek (10 i 20 minut naświetlania) oraz dla komórek nienaświetlanych.

Po 2h, 6h, 24h od naświetlania komórek nie zaobserwowano zahamowania przez badany związek TG3 cyklu komórkowego w żadnej z faz (rycina 24, 25, 26). Zmniejszeniu liczby komórek w fazie G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> towarzyszył jednoczesny wzrost populacji komórek martwych/późno apoptotycznych (wybarwionych jodkiem propidyny). Dla czasu 2h od naświetlania zaobserwowano również istotny statystycznie wzrost ilości komórek wybarwionych jodkiem propidyny w populacjach komórek nienaświetlanych w całym zakresie użytych stężeń: odpowiednio dla stężenia 0,6 μM-11%; 2,5 μM -13%; 5 μM -18% (rycina 24). Dla pozostałych punktów czasowych nie wykazano istotnie statystycznego wzrostu komórek wybarwionych jodkiem propidyny w komórkach nienaświetlanych

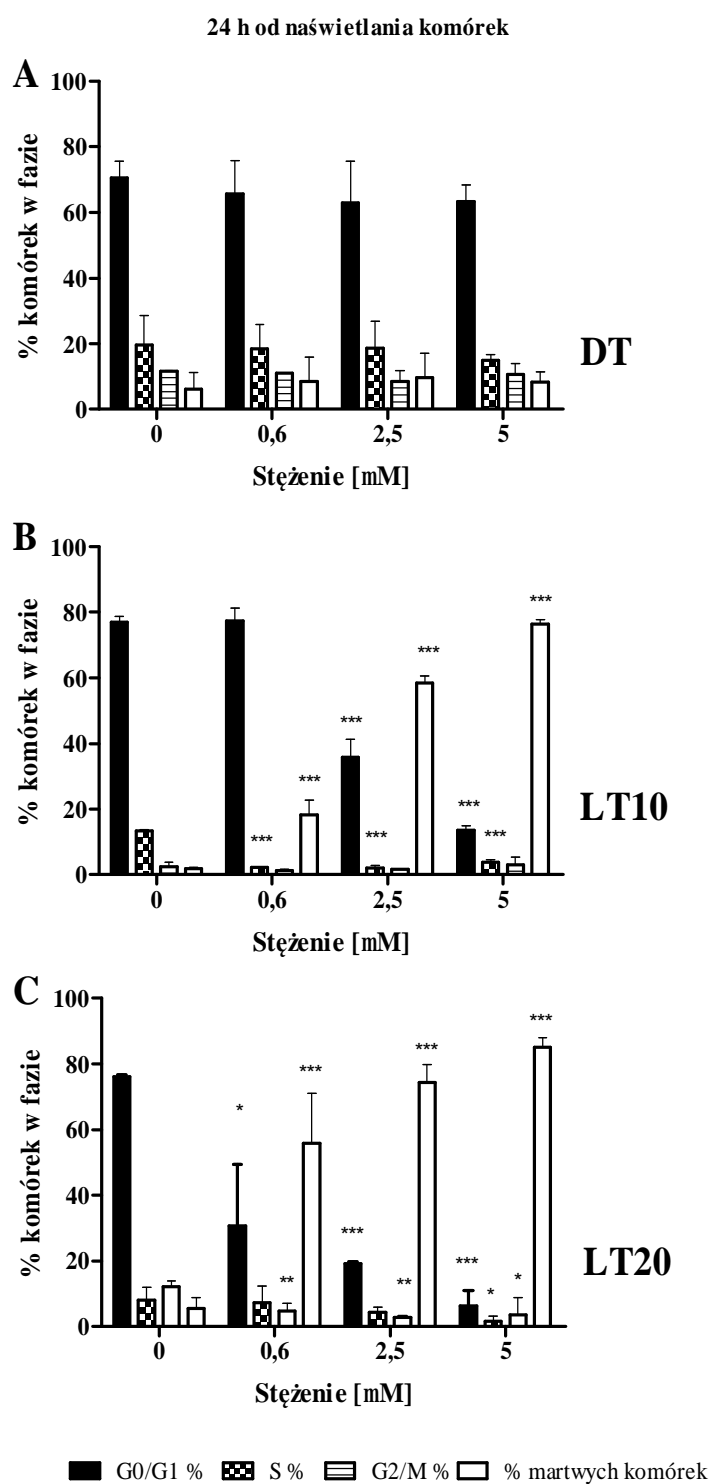




**Rycina 24.** Analiza cytometryczna faz cyklu komórkowego po czasie 2 godzin od naświetlania. Komórki linii LNCaP inkubowano ze związkiem TG3 przez czas 24 h. Analizę wykonano dla komórek nienaświetlanych oraz naświetlanych: 10 (B), 20 (C) minut. Wyniki przedstawiono jako średnią wartość +SD z dwóch eksperymentów. Istotność statystyczna: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .



**Rycina 25.** Analiza cytometryczna faz cyklu komórkowego po czasie 6 godzin od naświetlania. Komórki linii LNCaP inkubowano ze związkem TG3 przez czas 24 h. Analizę wykonano dla komórek nienaświetlanych oraz naświetlanych: 10 (B), 20 (C) minut. Wyniki przedstawiono jako średnią wartość +SD z dwóch eksperymentów. Istotność statystyczna: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .



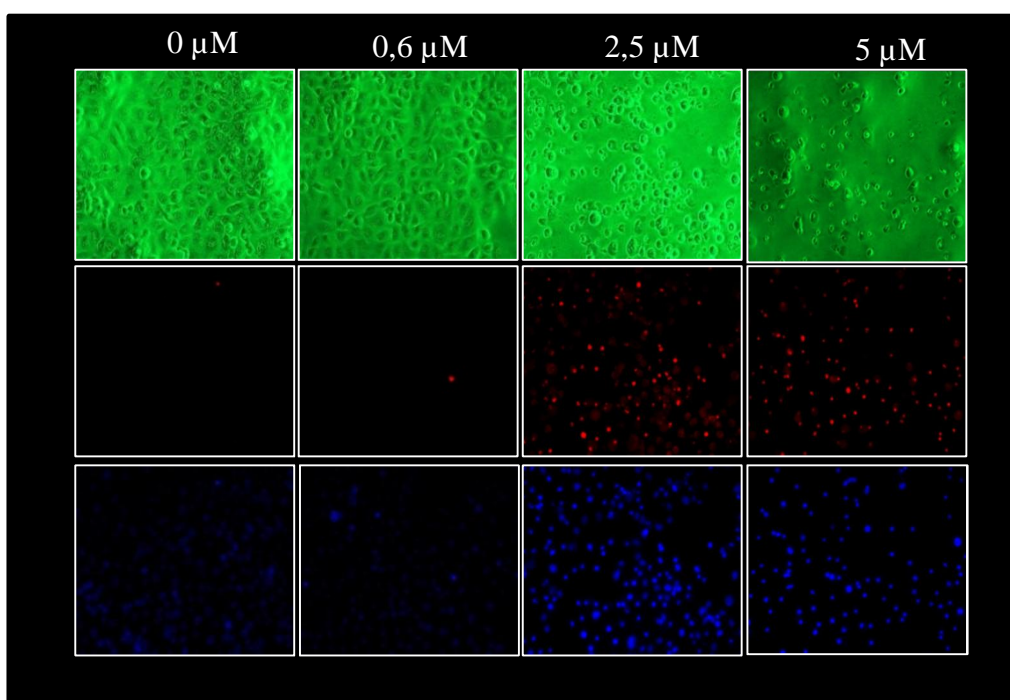
**Rycina 26.** Analiza cytometryczna faz cyklu komórkowego po czasie 24 godzin od naświetlania. Komórki linii LNCaP inkubowano ze związkem TG3 przez czas 24 h. Analizę wykonano dla komórek nienaświetlanych oraz naświetlanych: 10 (B), 20 (C) minut. Wyniki przedstawiono jako średnią wartość +SD z dwóch eksperymentów; istotność statystyczna: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### **4.7 Analiza zmian apoptotyczno-nekrotycznych metoda podwójnego barwienia Hoechst/Jodek propidyny**

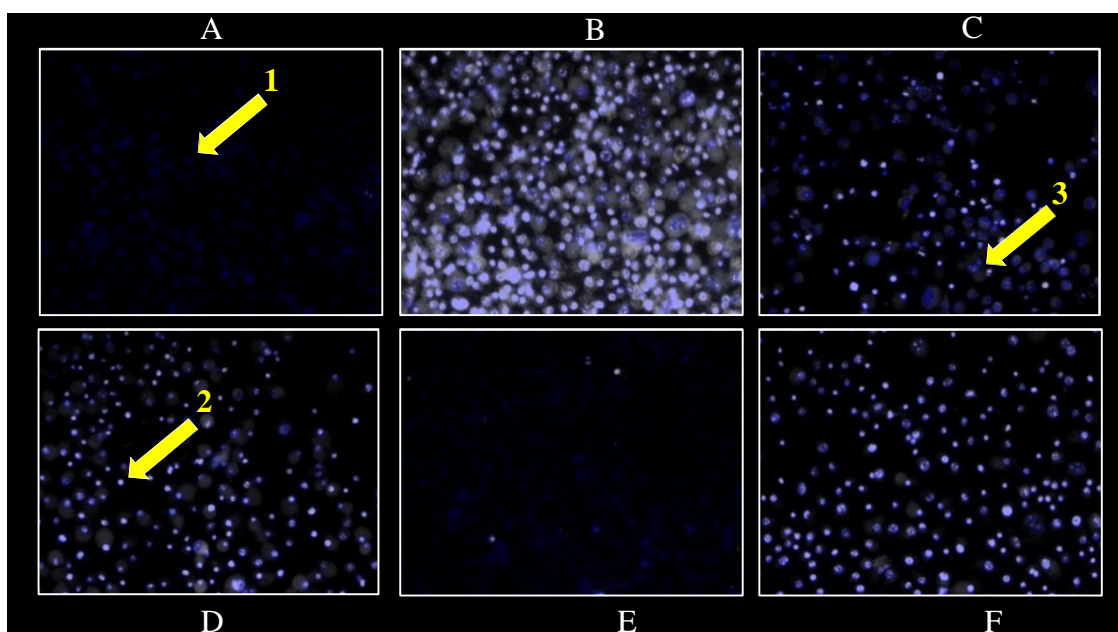
W celu oceny dynamiki zmian zachodzących w badanych komórkach, pod wpływem PDT, a także w celu oceny ich natury zastosowano barwienie przy pomocy znaczników fluorescencyjnych Hoechst 33258 oraz jodek propidyny. Hoechst 33258 barwi jądra komórkowe pozwalając jednocześnie na obserwację zmian zachodzących w chromatynie takich jak kondensacja lub fragmentacja. Jodek propidyny natomiast jest aktywnie usuwany z żywych komórek dlatego też jego pojawienie się w komórce wskazuje na utratę integralności jej błony lub (oraz) utratę aktywności systemów enzymatycznych odpowiedzialnych za jego usuwanie, co pozwala na uwidocznienie komórek nekrotycznych lub znajdujących się w późnej fazie procesu apoptozy. Mikroskopia fluorescencyjna i użycie tego sposobu barwienia pozwala na uwidocznienie dynamiki zmian związanych ze śmiercią komórek. Komórki poddane PDT oraz barwieniu Hoechst 33258/jodek propidyny były fotografowane po 0, 2, 6 i 24h od naświetlania, przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Nikon Eclipse oraz filtrów odpowiednich dla jodku propidyny (kanał czerwony B-2A) oraz dla barwnika Hoechst 33258 (kanał niebieski UV-2A) oraz w świetle widzialnym (VS). Zdjęcia były poddawane obróbce w programie Adobe Photoshop CS5 polegającej na konwersji zdjęć z kanału czerwonego do postaci czarno-białej przy użyciu wysokonastawowego filtra czerwonego oraz nałożeniu ich na zdjęcia uzyskane z kanału UV. Tak uzyskane fotografie pozwalały na ocenę komórek oraz policzenie komórek w każdej z populacji. W komórkach inkubowanych ze związkami TG3 i nienaświetlanych nie stwierdzono obecności komórek barwiących się jodkiem propidyny nawet w przypadku użycia najwyższego stężenia fotouczulaczy i inkubacji badanych komórek przez 24h. Zdjęcia wykonane po 2h od naświetlania uwidaczniają znaczny odsetek komórek apoptotycznych w populacji inkubowanej ze związkami TG3 w stężeniu 5  $\mu\text{M}$  i naświetlanych przez 10 min, w populacji komórek naświetlanych przez 20 min, zmiany w tych komórkach pogłębiają się przechodząc w komórki nekrotyczne wraz ze wzrostem czasu naświetlania i stężenia fotouczulacza. Po 6 godzinach od naświetlania w populacji komórek inkubowanych ze związkami TG3 w stężeniu 2,5  $\mu\text{M}$  i naświetlanych zarówno przez 10 jak i 20 minut zaczynają przeważać komórki nekrotyczne/późno apoptotyczne. Indukcję apoptozy w komórkach inkubowanych ze związkami TG3 w stężeniu 0,6  $\mu\text{M}$  zaobserwowano przy użyciu tej

metody dopiero po 24h od naświetlania, po tym czasie w próbach inkubowanych ze związkiem TG3 w stężeniach 2,5  $\mu\text{M}$  i 5  $\mu\text{M}$  obserwowano w przeważającej większości komórki w późnej fazie apoptozy/nekrozy.

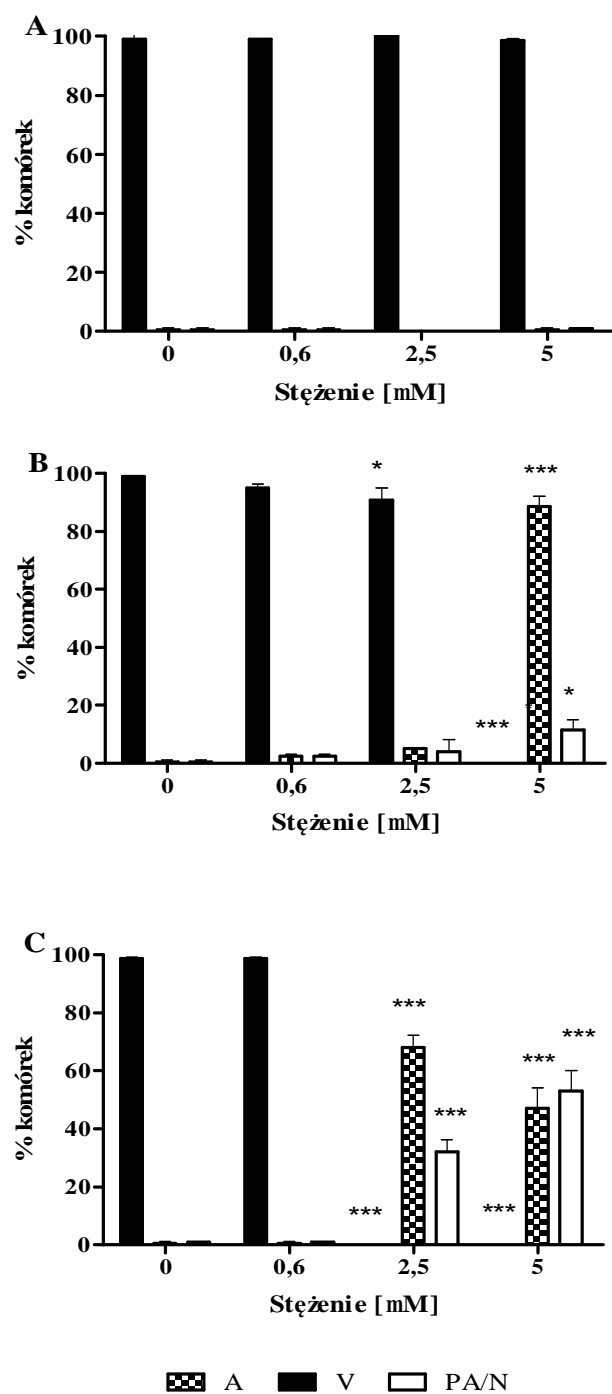
Przykładowy zestaw zdjęć uzyskanych w poszczególnych kanałach i obrazujących zmiany zachodzące w badanych komórkach przedstawiono na rycinie 27. Na zdjęciach pokazane są zmiany zachodzące w komórkach poddanych PDT po 6h od naświetlania trwającego 10 min, natomiast na rycinie 28 pokazane zostały fotografie uzyskane po nałożeniu fotografii uzyskanych w kanale niebieskim i czerwonym i po ich przekonwertowaniu do formy czarno-białej (filtr wysokonastrowy czerwony). Rozkład liczby komórek w poszczególnych (żywe (V) apoptotyczne (A) i późne apoptotyczne /nekrotyczne (PA/N) został przedstawiony na rycinach 29-31. Pełny zestaw fotografii uzyskany tą techniką został zamieszczony w suplemencie fotograficznym.



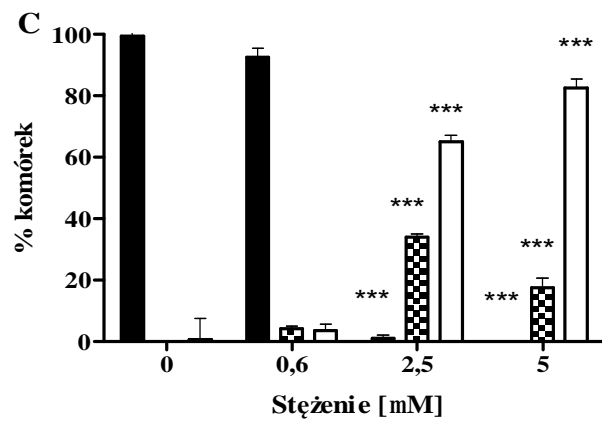
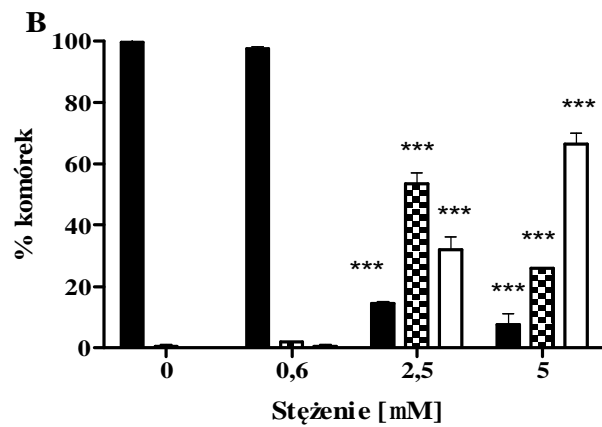
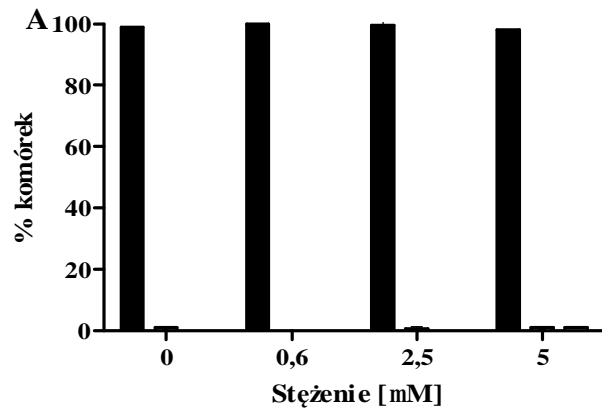
**Rycina 27.** Przykładowy zestaw zdjęć z barwienia podwójnego Hoechst 33258/jodek propidyny.



**Rycina 28.** Zdjęcia uzyskane po nałożeniu fotografii uzyskanych w kanale niebieskim i czerwonym po przekonwertowaniu do formy czarno-białej (filtr wysokonastrowy czerwony) w celu uwidocznienia zmian zachodzących pod wpływem PDT w komórkach wybarwionych barwnikiem Hoechst 33258; A: (2h, DT, 0 $\mu$ M), B: (2h, LT20, 5 $\mu$ M), C: (6h, LT10, 2,5 $\mu$ M), D: (6h, LT20, 2,5 $\mu$ M), E: (24h, LT 20, 0 $\mu$ M), F: (24h, LT20, 5 $\mu$ M), strzałki pokazują odpowiednio: 1- komórka żywa, 2- komórka nekrotyczna/późno apoptotyczna, 3- komórka apoptotyczna.



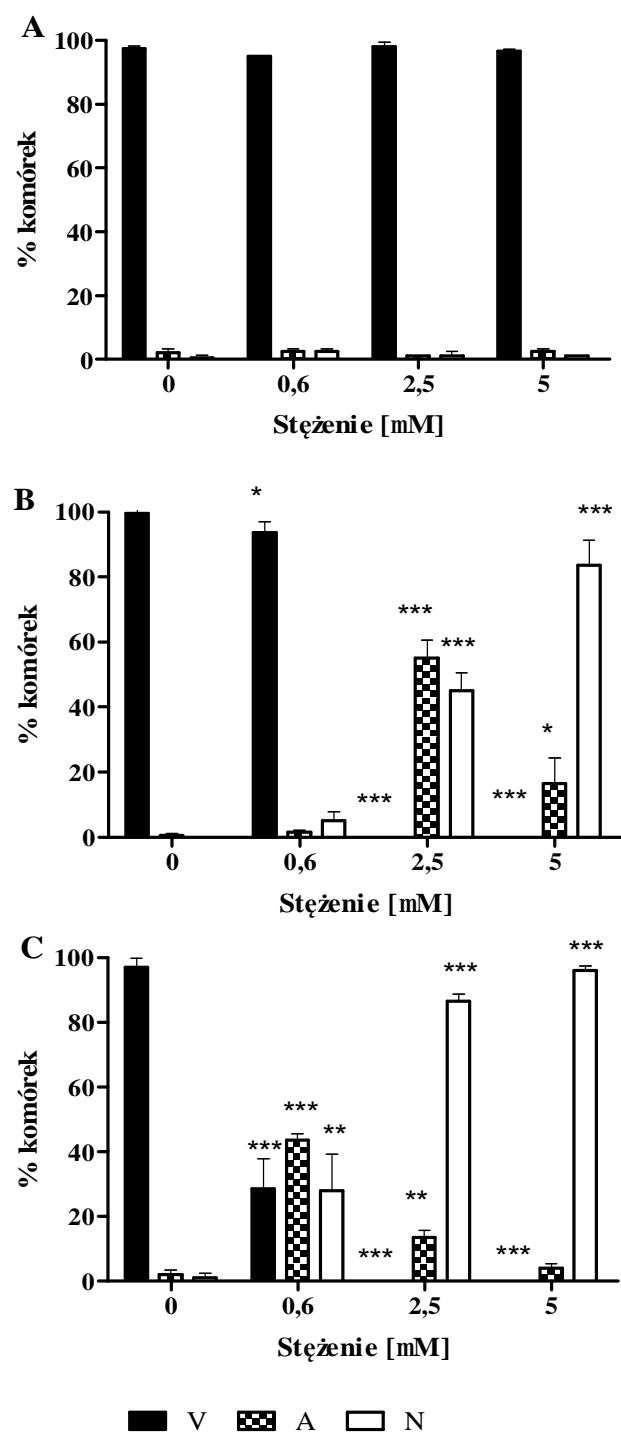
**Rycina 29.** Analiza komórek apoptotycznych i nekrotycznych metoda podwójnego barwienia Hoechst 33258/jodek propidyny, po 2 godzinach od naświetlania komórek; komórki nienaświetlane (A), naświetlane 10 minut (B), naświetlane 20 minut (C). Wyniki przedstawiono jako średnią wartość +SD z dwóch eksperymentów; istotność statystyczna: \*  $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ .



■ V    ▣ A    □ PA/N

**Rycina 30.** Analiza komórek apoptotycznych i nekrotycznych metoda podwójnego barwienia Hoechst 33258/jodek propidyny, po 6 godzinach od naświetlania komórek; komórki nienaświetlane (A), naświetlane 10 minut (B), naświetlane 20 minut (C). Wyniki przedstawiono jako średnią wartość +SD z dwóch eksperymentów; istotność statystyczna: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .



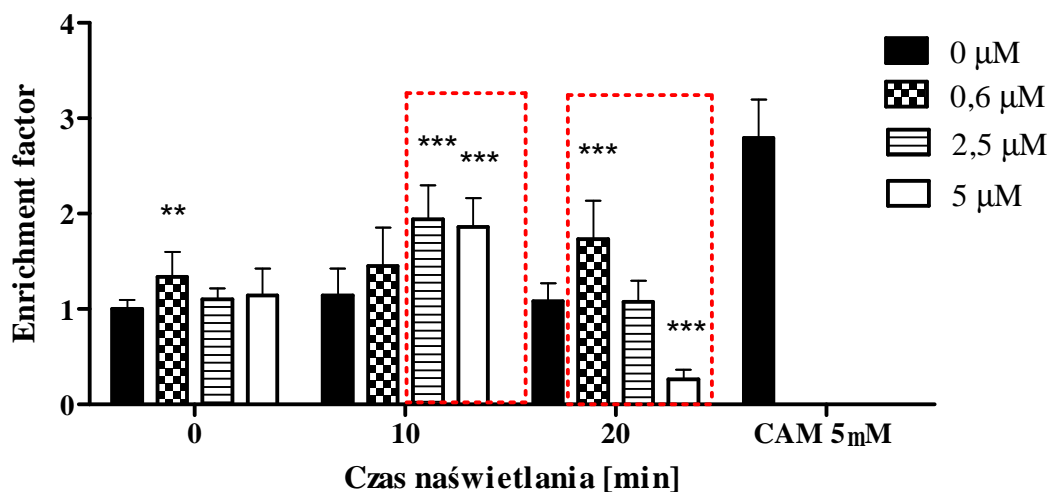


**Rycina 31.** Analiza komórek apoptotycznych i nekrotycznych metoda podwójnego barwienia Hoechst 33258/jodek propidyny, po 24 godzinach od naświetlania komórek; komórki nienaświetlane (A), naświetlane 10 minut (B), naświetlane 20 minut (C). Wyniki przedstawiono jako średnią wartość +SD z dwóch eksperymentów; istotność statystyczna: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.8 Zdolność badanego związku do indukcji procesu apoptozy

Badanie zdolności związku TG3 do zainicjowania procesu apoptozy wykonano w oparciu o test immunoenzymatyczny ELISA. Komórki w tym eksperymencie zostały zebrane po 24 godzinach od naświetlania (10 i 20 minut). Eksperyment wykonano także dla komórek nienaświetlanych. Uzyskane wyniki wskazują, że badany związek indukuje proces apoptozy w zależności od czasu naświetlania i zastosowanej dawki (rycina 32).

W przypadku wyższych testowanych stężeń (2,5  $\mu\text{M}$  oraz 5  $\mu\text{M}$ ) wzrost stężenia badanych markerów apoptozy obserwowano w komórkach naświetlanych przez 10 minut. W przypadku dłuższego czasu naświetlania wynoszącego 20 minut wzrost ilości powstających nukleosomów został zanotowany tylko w przypadku najniższego użytego w tym eksperymencie stężenia fotouczulacza wynoszącego 0,6  $\mu\text{M}$ . W próbach uzyskanych z komórek poddanych działaniu związku TG3 w stężeniu 2,5  $\mu\text{M}$  zmierzony poziom nukleosomów był zbliżony do poziomu zmierzonego w komórkach kontrolnych. Ponadto, przy najwyższym stężeniu 5  $\mu\text{M}$  obserwowano istotne statystycznie zmniejszenie liczby komórek apoptotycznych. Uzyskane wyniki sugerują, że wyższe stężenia związku w połączeniu z dłuższą ekspozycją na światło powodują śmierć komórek na drodze innej niż apoptoza. Natomiast krótszy czas naświetlania w zakresie stężeń 2,5  $\mu\text{M}$  oraz 5  $\mu\text{M}$  może prowadzić do zainicjowania procesu apoptozy.



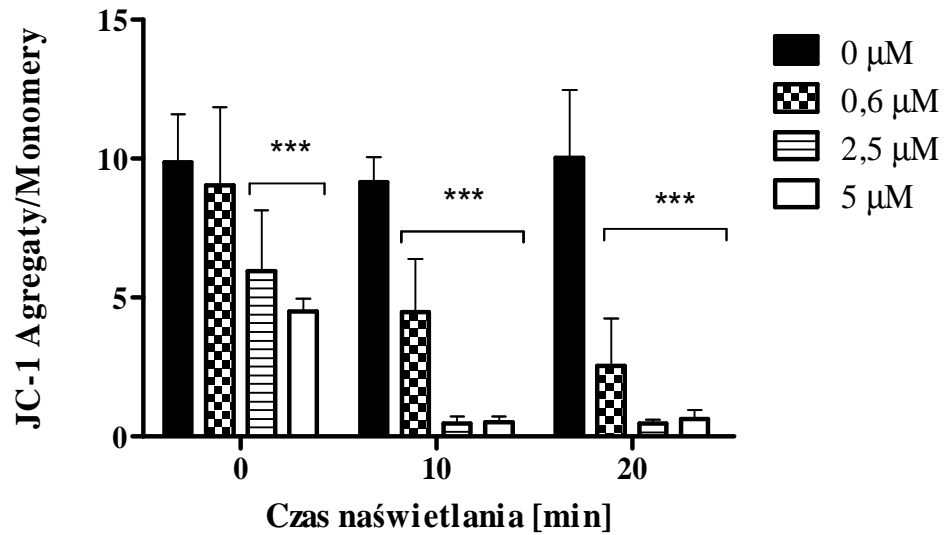
**Rycina 32.** Zdolność badanego związku TG3 do indukcji apoptozy w linii LNCaP oznaczona przy użyciu Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup>, 24 godziny po naświetlaniu. Wyniki przedstawiono, zgodnie z sugestią producenta, jako "Enrichment factor", a wartość uzyskaną dla komórek kontrolnych (niepoddanych inkubacji z badanym związkiem i nienaświetlonych określono jako 1.0). Jako kontrolę pozytywną użyto roztwór kamptotecyny o stężeniu 5 μM. Wyniki przedstawiono jako średnią +SD z dwóch eksperymentów; istotność statystyczna: \* p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

#### **4.9 Wpływ badanego związku na zmiany potencjału błony mitochondrialnej**

Jednym z możliwych szlaków apoptozy jest szlak wewnętrzny zwany również mitochondrialnym. W tym procesie istotną rolę odgrywają zmiany potencjału błony mitochondrialnej, które są uznawane za bardzo wczesny marker procesu apoptozy. Wzrost przepuszczalności błony mitochondriów w dalszej kolejności może prowadzić do uwolnienia do cytozolu białek proapoptotycznych takich jak Smac/DIABLO, AIF, oraz cytochromu *c* i w konsekwencji do wyzwolenia całej kaskady procesów biochemicznych związanych z przebiegiem procesu apoptozy (61).

W celu sprawdzenia czy badany związek wpływa na potencjał błony mitochondrialnej wykonano eksperymenty z wykorzystaniem fluorescencyjnego barwnika JC-1. Pomiar wykonano po czasie 45 minut od naświetlania komórek (10 oraz 20 minut) oraz dla komórek nienaświetlanych.

Uzyskane wyniki wykazały, że związek PDT-TG3 wpływa na potencjał błony mitochondrialnej (rycina 33). Istotny statystycznie spadek potencjału zaobserwowano zarówno po czasie 10 minut (0,6 $\mu$ M spadek o ~50%; 2,5  $\mu$ M~95%; 5  $\mu$ M~94%) i 20 minut (0,6 $\mu$ M spadek o ~75%; 2,5  $\mu$ M~95%; 5  $\mu$ M~94%) naświetlania dla każdego z użytych stężeń. Ponadto, zaobserwowano spadek potencjału błony również dla stężenia 5 (~54%) oraz 2,5  $\mu$ M (~40) w nienaświetlanych komórkach.



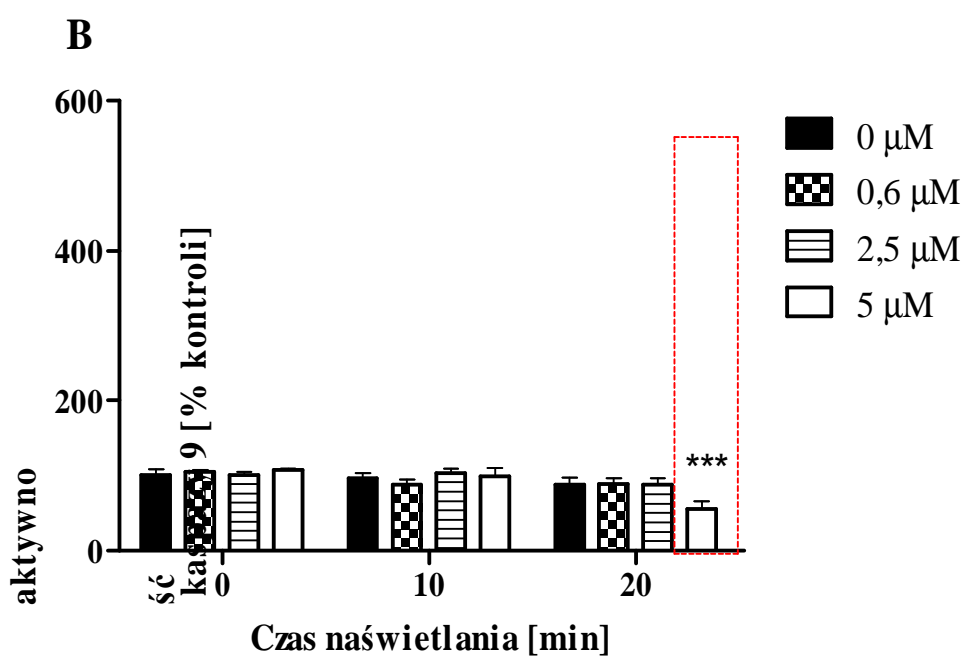
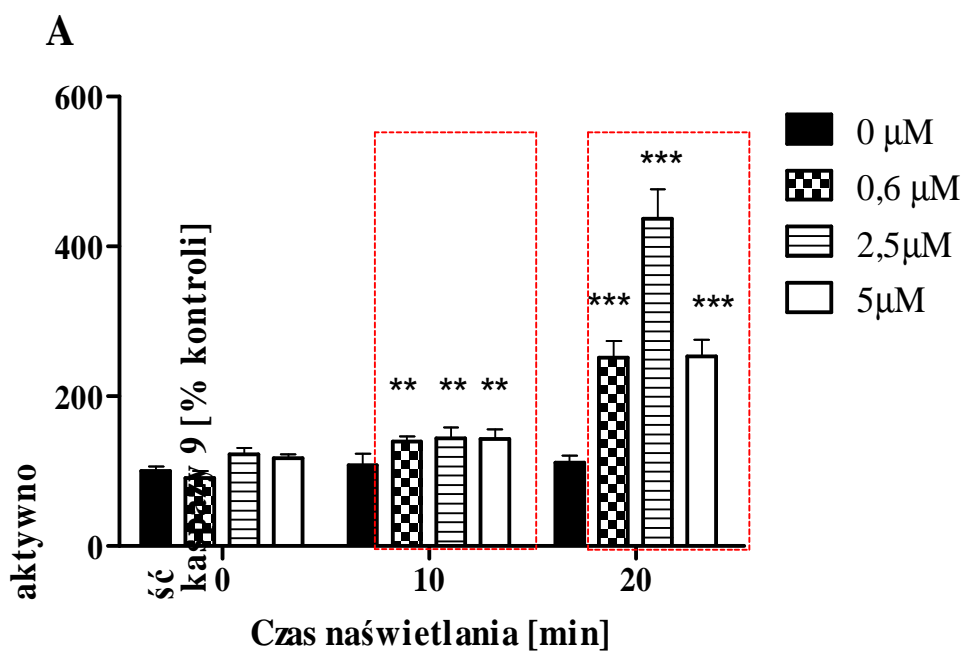
**Rycina 33.** Zmiany potencjału błony mitochondrialnej po 45 minutach od naświetlania komórek linii LNCaP. Komórki inkubowano 24h ze związkiem TG3 o stężeniach: 0,6 μM; 2,5 μM oraz 5 μM. Wyniki przedstawiono jako średnią wartość z trzech eksperymentów+SD; istotność statystyczna (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

#### 4.10 Wpływ TG3 na aktywność kaspazy-9

Istotnym enzymem wewnętrznego (mitochondrialnego) szlaku apoptozy jest kaspaza-9. Kaspaza-9 zaliczana jest do tzw. kaspaz-inicjatorowych i odpowiedzialna jest za aktywację kaspaz wykonawczych. Cytosolowa prokaspaza-9 ulega aktywacji w wyniku utworzenia kompleksu zwanego apoptosomem, który powstaje z uwalnianego z mitochondrium cytochromu c oraz białka Apaf-1(61). W celu sprawdzenia wpływu związku na aktywność kaspazy-9 wykonano pomiar aktywności tego enzymu po 2 oraz 4 godzinach od naświetlania komórek.

Uzyskane wyniki wykazały zmiany aktywności kaspazy-9 pod wpływem PDT z użyciem TG3 w zależności od zastosowanej dawki i czasu naświetlania (rycina 34).

Wzrost aktywności kaspazy-9 zaobserwowano po 2 godzinach od naświetlania zarówno w przypadku komórek naświetlanych 10 min (0,6  $\mu\text{M}$  ~139% kontroli; 2,5  $\mu\text{M}$ ~144% kontroli; 5  $\mu\text{M}$ ~142% kontroli) oraz komórek naświetlanych przez 20 minut dla każdego z użytych w badaniu stężeń (0,6  $\mu\text{M}$  ~251% kontroli; 2,5  $\mu\text{M}$ ~436% kontroli; 5  $\mu\text{M}$ ~253% kontroli). Po 4 godzinach od naświetlania nie wykazano istotnej statystycznej wzrostu aktywności enzymu.



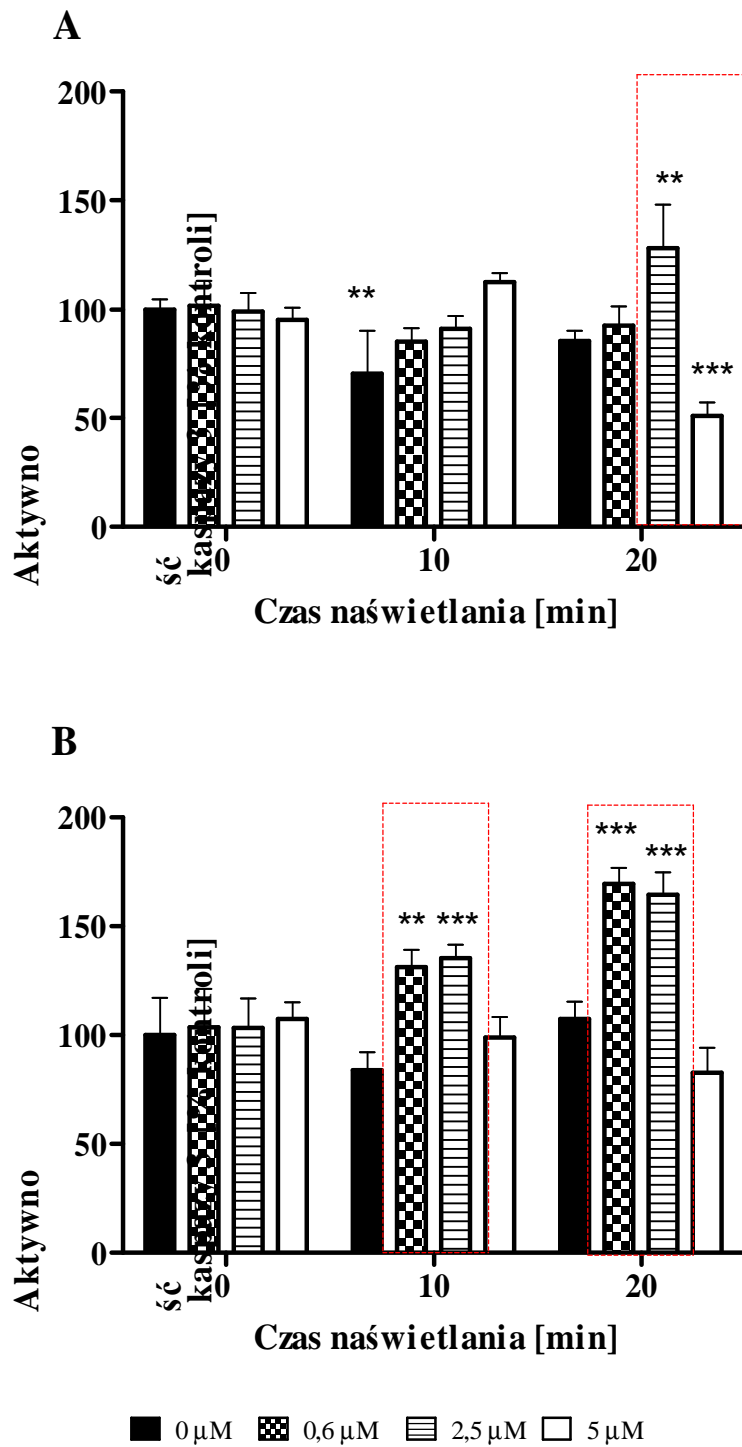
**Rycina 34.** Aktywność kaspazy-9 mierzona po 2 h (A) oraz 4 h (B) od naświetlania komórek. Wyniki przedstawiono jako średnią wartość z dwóch eksperymentów+SD.

#### 4.11 Aktywność kaspazy-3

Wyniki uzyskane w testach badania zdolności związku TG3 do indukcji procesu apoptozy, spadku potencjału błony mitochondrialnej oraz wzrost aktywności kaspazy-9 sugerują, że jedną z możliwych dróg śmierci komórek pod wpływem PDT z użyciem związku TG3 jest mitochondrialny szlak apoptozy. Kluczowym enzymem zaangażowanym w wewnętrzny szlak apoptozy jest kaspaza-3, która prowadzi do szeregu zmian biochemicznych (fragmentacji DNA, degradacji jądrowych i cytozolowych, reorganizacji cytoszkieletu) prowadzących do śmierci komórek (274). W związku z tym zaplanowano eksperyment mający na celu ocenę wpływu związku TG3 na aktywność kaspazy-3. Badanie aktywności enzymu przeprowadzono po 12 oraz 24 godzinach od naświetlania komórek przy użyciu komercyjnego zestawu odczynników zgodnie z instrukcją producenta (Cayman Chemical, Ann Arbor CA, USA).

Uzyskane wyniki wykazały zmiany aktywności kaspazy-3 dla obu przedziałów czasowych w zależności od dawki oraz czasu naświetlania (rycina 35) Po 12 godzinach od naświetlania komórek istotny statystycznie wzrost aktywności kaspazy-3 obserwowano w komórkach naświetlanych przez 20 minut i inkubowanych z badanym związkiem w stężeniu 2,5  $\mu\text{M}$ . Po 24 godzinach od naświetlania istotny statystycznie wzrost aktywności enzymu obserwowano po 10 minutach naświetlania dla stężeń 0,6  $\mu\text{M}$  oraz 2,5  $\mu\text{M}$  oraz po 20 minutach naświetlania dla stężeń 0,6 oraz 2,5  $\mu\text{M}$ . Zarówno po 12 oraz 24 godzinach od naświetlania aktywność kaspazy-3 w komórkach naświetlanych przez 20 minut przy najwyższym badanym stężeniu związku 5  $\mu\text{M}$  obserwowano spadek aktywności w porównaniu z kontrolą. Zmniejszenie aktywności kaspazy-3 może być związane z degradacją tego białka przez RFT generowanych podczas PDT w badanych komórkach (275).





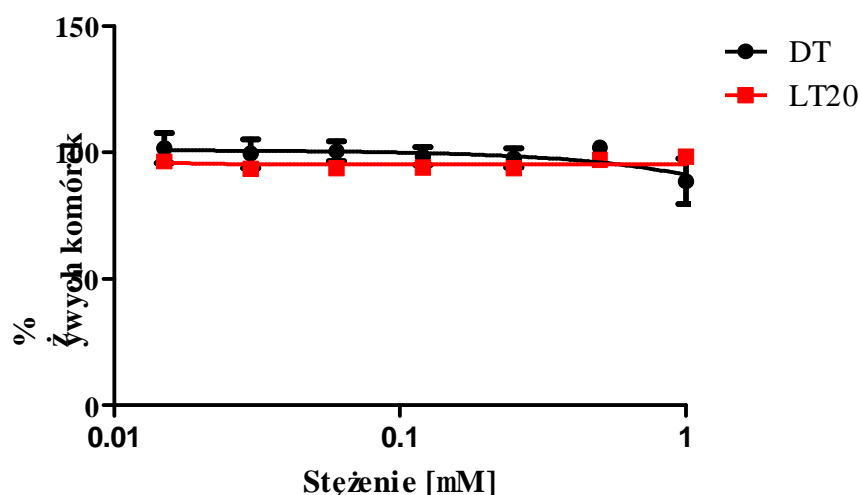
**Rycina 35.** Aktywność kaspazy-3 po 12h (A) i 24h (B) od naświetlania. Wyniki przedstawiono jako średnią wartość+SD (jako procent kontroli) z dwóch eksperymentów.

#### 4.12 Wpływ ABT199 (inhibitora białka Bcl-2) na działanie cytotoksyczne związku TG3

W celu sprawdzenia wpływu zahamowania aktywności białka Bcl-2 na działanie cytotoksyczne związku TG3 wykonano eksperyment mający na celu ocenę działania cytotoksycznego związku TG3 w połączeniu z ABT199 - związku uznawanego za inhibitor kluczowego w procesie apoptozy antyapoptocznego białka Bcl-2.

W pierwszym etapie sprawdzono aktywność cytotoksyczną samego inhibitora w modelu hodowli komórek linii LNCaP *in vitro*. W celu upewnienia się czy badany inhibitor nie posiada działania fototoksycznego eksperyment wykonano zarówno dla komórek nienaświetlanych jak i naświetlanych przez 20 minut. Komórki inkubowano zbadanym związkiem w zakresie stężeń od 0,015  $\mu\text{M}$  do 1  $\mu\text{M}$ .

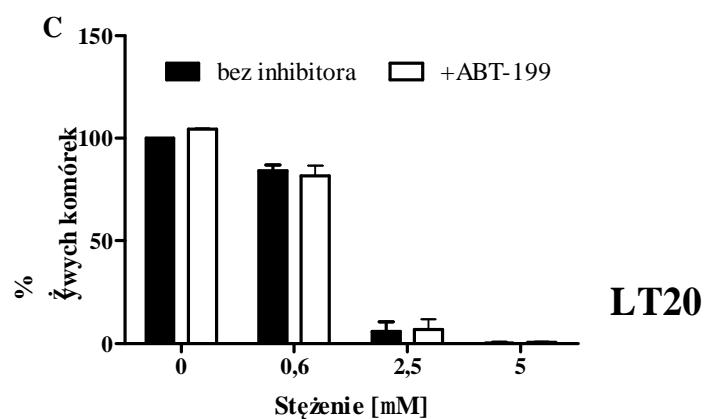
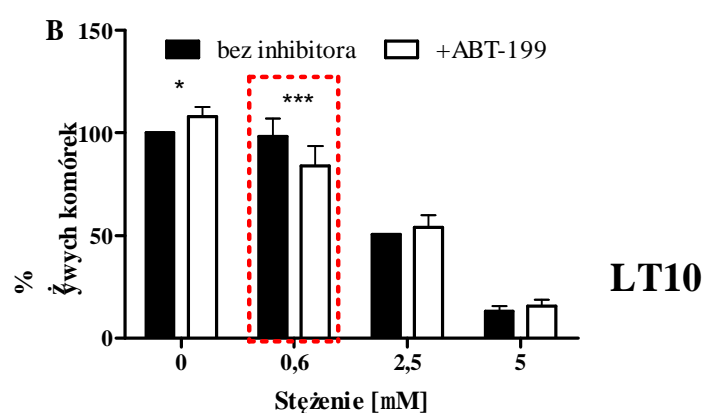
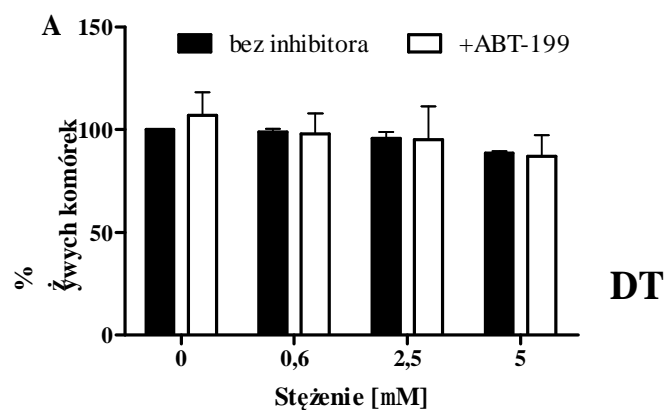
Uzyskane wyniki wykazały, że związek ABT199 nie wykazuje działania cytotoksycznego zarówno w przypadku komórek nienaświetlanych jak i w połączeniu z naświetlaniem (rycina 36) Na podstawie analizy uzyskanych w tym doświadczeniu wyników do kolejnych eksperymentów wybrano stężenie ABT199 wynoszące 1  $\mu\text{M}$ .



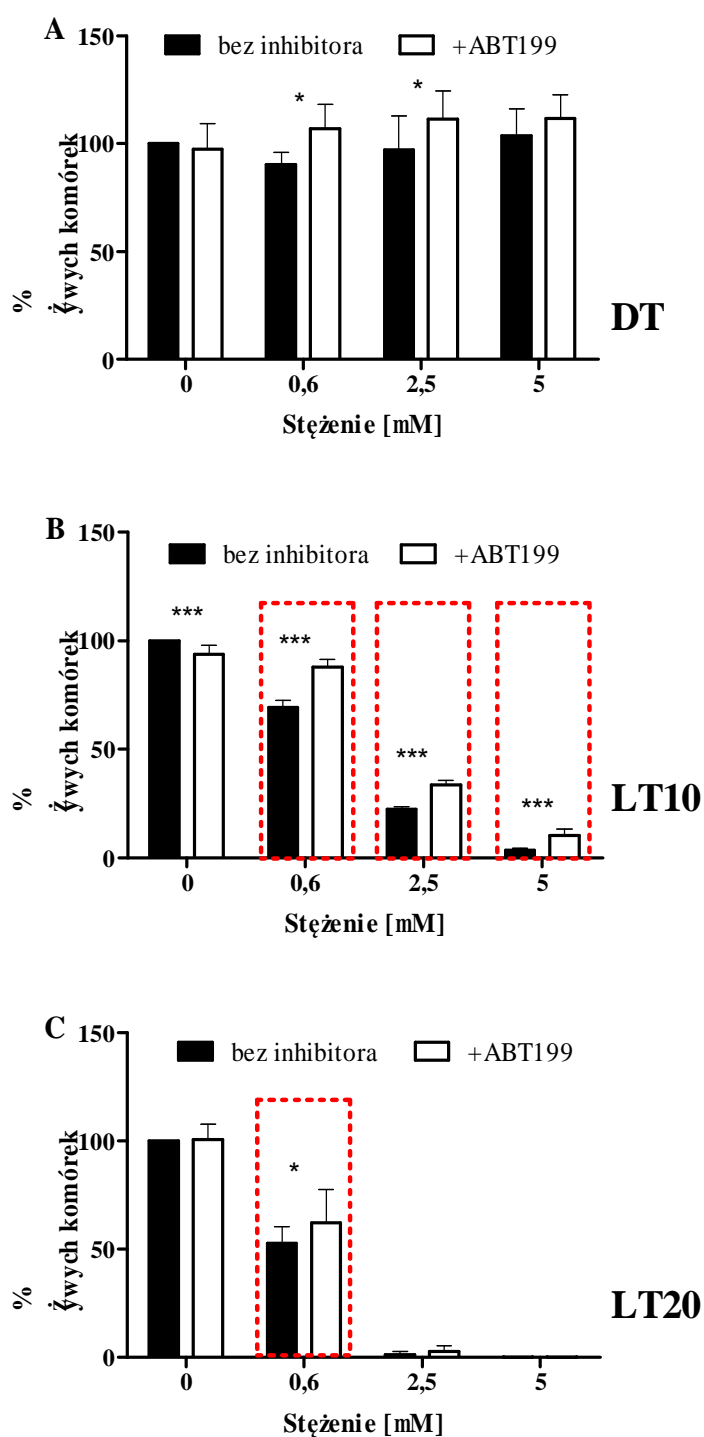
**Rycina 36.** Cytotoksyczność związku ABT199 wobec komórek linii LNCaP w fazie ciemnej oraz w połączeniu z naświetlaniem.

Właściwe eksperymenty wykonano w dwóch schematach. W pierwszym z nich ABT199 podawano do badanych komórek nowotworowych na 2 godziny przed ich naświetlaniem. Drugi schemat eksperymentów opierał się na podaniu ABT199 24 godziny przed naświetlaniem, w tym drugim przypadku, badany fotouczulaczy został podany razem z ABT199.

W eksperymencie w którym inhibitor podano 2 godziny przed naświetlaniem istotny statystycznie wpływ ABT199 na fototoksyczność związku TG3 zaobserwowano jedynie w przypadku stężenia fotouczulacza równego 0,6  $\mu\text{M}$  oraz w połączeniu z 10 minutowym naświetlaniem (rycina 37). Po 20 minutach naświetlania nie wykazano istotnych zmian w przeżywalności komórek inkubowanych jednocześnie z badanym fotouczulaczem i inhibitorem (rycina 37). Natomiast w sytuacji kiedy inhibitor podawano 24 godziny przed naświetlaniem zaobserwowano wzrost przeżywalności komórek w całym zakresie stężeń (0,6  $\mu\text{M}$ ; 2,5  $\mu\text{M}$ ; 5 $\mu\text{M}$ ) naświetlanych 10 minut. Dla komórek naświetlanych 20 minut istotny statystycznie wzrost przeżywalności komórek zaobserwowano dla stężenia 0,6  $\mu\text{M}$  (rycina 38).



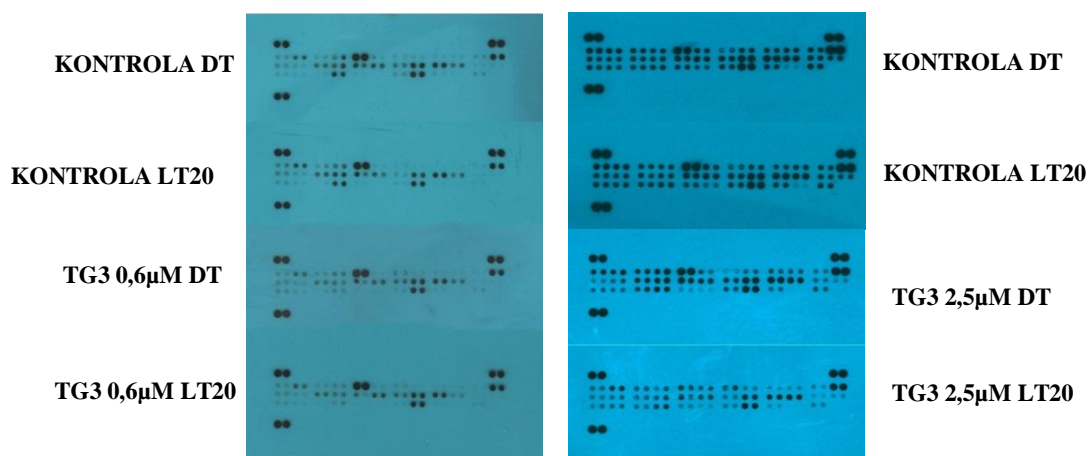
**Rycina 37.** Wpływ ABT199 po 2-godzinnej inkubacji przed naświetlaniem na fototoksyczne działanie związku TG3. Analizę wykonano za pomocą testu MTT dla komórek nienaświetlanych (A) oraz naświetlanych 10 minut (B) oraz 20 minut (C). Wyniki przedstawiono jako średnią wartość+SD (jako % kontroli) z dwóch niezależnych eksperymentów; istotność statystyczna (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).



**Rycina 38.** Wpływ ABT199 po 24-godzinnej inkubacji ze związkiem TG3 przed naświetlaniem światłem o długości fali 640 nm na cytotoksyczne działanie związku TG3. Analizę wykonano za pomocą testu MTT dla komórek nienaświetlanych (A) oraz naświetlanych przez 10 minut (B) oraz 20 minut (C). Wyniki przedstawiono jako średnią wartość+SD (jako % kontroli) z dwóch niezależnych eksperymentów.

#### 4.13 Wpływ związku TG3 na poziom wybranych białek pro i antyapoptotycznych

Analizę ekspresji białek pro – i antyapoptotycznych przeprowadzono po 24h inkubacji komórek ze związkiem TG oraz po 24 h po naświetlaniu komórek lampą emitującą światło o długości fali 640 i moc  $\sim 2 \text{ mW/cm}^2$ . W przypadku tego eksperymentu wybrano dwa stężenia związku TG3:  $0,6 \mu\text{M}$  oraz  $2,5 \mu\text{M}$  oraz jeden czas naświetlania wynoszący 20 minut. Uzyskane wyniki zmian ekspresji poszczególnych białek zestawiono w tabeli 10, a zdjęcia pokazujące utrwalone na kliszy fotograficznej prążki reprezentujące poziomy poszczególnych białek przedstawiono na rycinie 39.



**Rycina 39.** Przykładowe zdjęcia kliszy uzyskanych podczas badania.

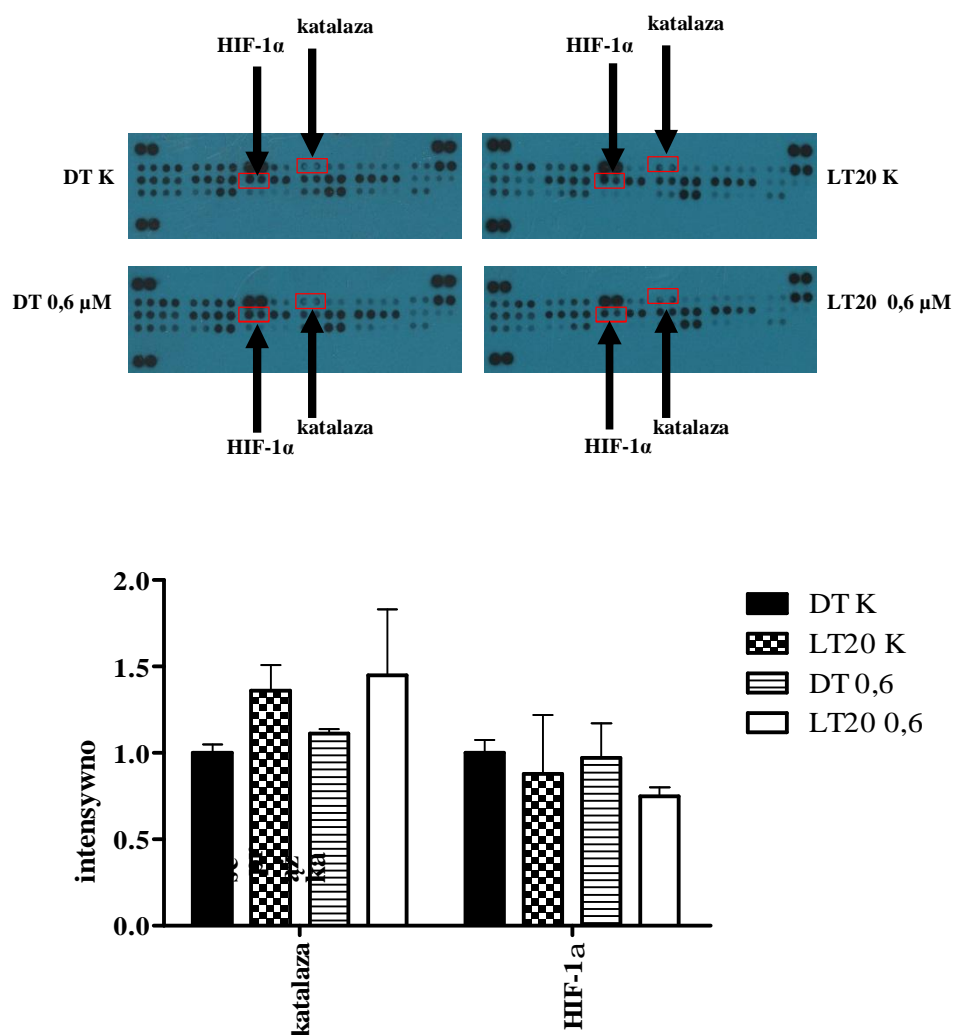
**Tabela 10.** Poziom białek pro i antyapoptotycznych w komórkach eksponowanych na TG3 w stężeniach 0,6  $\mu$ M oraz 2,5  $\mu$ M po 24h godzinach od naświetlania.

Białko	K DT	K LT20	0,6 DT	0,6 LT20	K DT	K LT20	2,5 DT	2,5 LT20
Bad	1	0,61±0,13	1,08±0,01	0,88±0,03	1	0,94±0,04	0,75±0,08	0,37±0,05
TRAIL R1/DR4	1	0,58±0,09	0,90±0,03	0,83±0	1	1,01±0,02	0,29±0,06	0,42±0,05
PON2	1	0,9±0,05	1,00±0,02	0,77±0,15	1	1,05±0	0,39±0,02	0,41±0,22
Bax	1	0,88±0,04	0,94±0,03	0,9±0,06	1	0,91±0,13	0,98±0,12	0,97±0,08
TRAIL R2/DR5	1	0,3±0,06	0,74±0,01	0,67±0,01	1	0,98±0,14	0,74±0,12	0,69±0,08
p21/CIP1/CDKN1A	1	0,55±0,09	0,67±0,19	0,35±0,05	1	1,14±0,11	0,51±0,05	0,78±0,05
Bcl-2	1	0,69±0,02	1,02±0,1	0,59±0,02	1	0,86±0,03	0,96±0,09	0,67±0,11
FADD	1	0,88±0,01	0,96±0,03	0,91±0,01	1	0,88±0,14	1,05±0,02	0,59±0,1
p27/Kip1	1	0,65±0,51	0,92±0,28	0,25±0	1	1,15±0,04	0,93±0,12	0,63±0,03
Bcl-x	1	0,8±0,01	1,10±0,01	0,66±0,02	1	0,97±0,02	1,63±0,23	0,55±0,26
Fas/TNFRSF6/CD95	1	0,77±0	1,12±0,06	0,85±0,04	1	0,9±0,01	1,44±0,07	0,72±0,12
Phospho-p53 (S15)	1	0,49±0,03	1,05±0,01	0,56±0,15	1	1,01±0,09	1,14±0,17	1,02±0,04
Pro-Caspase-3	1	0,97±0,05	0,97±0,03	0,95±0,03	1	1,02±0,04	0,94±0	0,37±0,04
HIF-1 $\alpha$	1	0,88±0,34	0,97±0,2	0,75±0,05	1	1,05±0,12	1,12±0,22	0,62±0,23
Phospho-p53 (S46)	1	0,28±0,03	1,17±0,68	0	1	0,91±0,09	0,12±0,06	0,46±0,04
Cleaved Caspase-3	1	0,12±0,06	0,57±0,21	0,37±0,05	1	1,26±0,55	0,77±0,27	0,66±0,01
HO-1/HMOX1/HSP32	1	0,86±0,06	0,90±0	0,91±0,01	1	1,12±0,17	1,01±0,06	0,77±0,08
Phospho-p53 (S392)	1	0	0,12±0,17	0	1	0,78±0,24	0,05±0,05	0,29±0,03
Catalase	1	1,36±0,15	1,11±0,03	1,45±0,38	1	0,95±0,04	0,37±0,03	1,61±0,3
HO-2/HMOX2	1	0,9±0,04	0,78±0,01	1,17±0,04	1	0,84±0,02	0,79±0,01	0,32±0,01
Phospho-Rad17 (S635)	1	0,46±0,12	0,68±0,08	0,34±0,06	1	0,8±0,04	0,7±0,01	0,33±0,08
cIAP-1	1	0,42±0,05	0,53±0,01	0,34±0,07	1	0,90±0,12	0,62±0,03	0,42±0
HSP27	1	1,27±0,02	1,18±0,02	1,32±0,02	1	0,98±0,06	0,97±0,08	0,68±0,04
SMAC/Diablo	1	1,58±0,11	1,36±0,02	1,58±0,01	1	0,97±0,01	0,92±0,08	0,77±0,04
cIAP-2	1	0,68±0,17	0,95±0,12	0,49±0,06	1	0,88±0,06	0,76±0,17	0,17±0
HSP60	1	0,99±0,06	1,15±0,03	1,01±0	1	0,99±0,03	1,05±0,05	0,74±0,01
Survivin	1	0,55±0,22	0,74±0	0,29±0,12	1	1,05±0,05	0,48±0,02	0,14±0,04
Claspin	1	0,36±0,03	0,79±0,01	0,28±0,12	1	1,05±0,03	0,62±0,04	0,24±0,07
HSP70	1	0,89±0,06	1,07±0,01	0,85±0	1	1,11±0,02	1,05±0,14	0,98±0,03
TNF RI/TNFRSF1A	1	0	0,43±0,04	0	1	0	0	0
Clusterin	1	0,49±0,09	0,85±0,05	0,39±0,16	1	0,91±0,08	0,46±0,04	0,27±0,08
HTRA2/Omi	1	0,7±0,25	1,05±0,05	0,33±0,05	1	0,91±0,15	0,5±0,07	0,12±0,06
XIAP	1	0,94±0,2	0,87±0,03	0,73±0,13	1	0,89±0,07	0,58±0,09	0,34±0,02
Cyt c	1	1,14±0,02	1,12±0,02	1,13±0,02	1	1,07±0,03	1,21±0,09	0,94±0,03
Livin	1	0,43±0,03	0,80±0,19	0	1	0,83±0,07	0,35±0,12	0,31±0,1

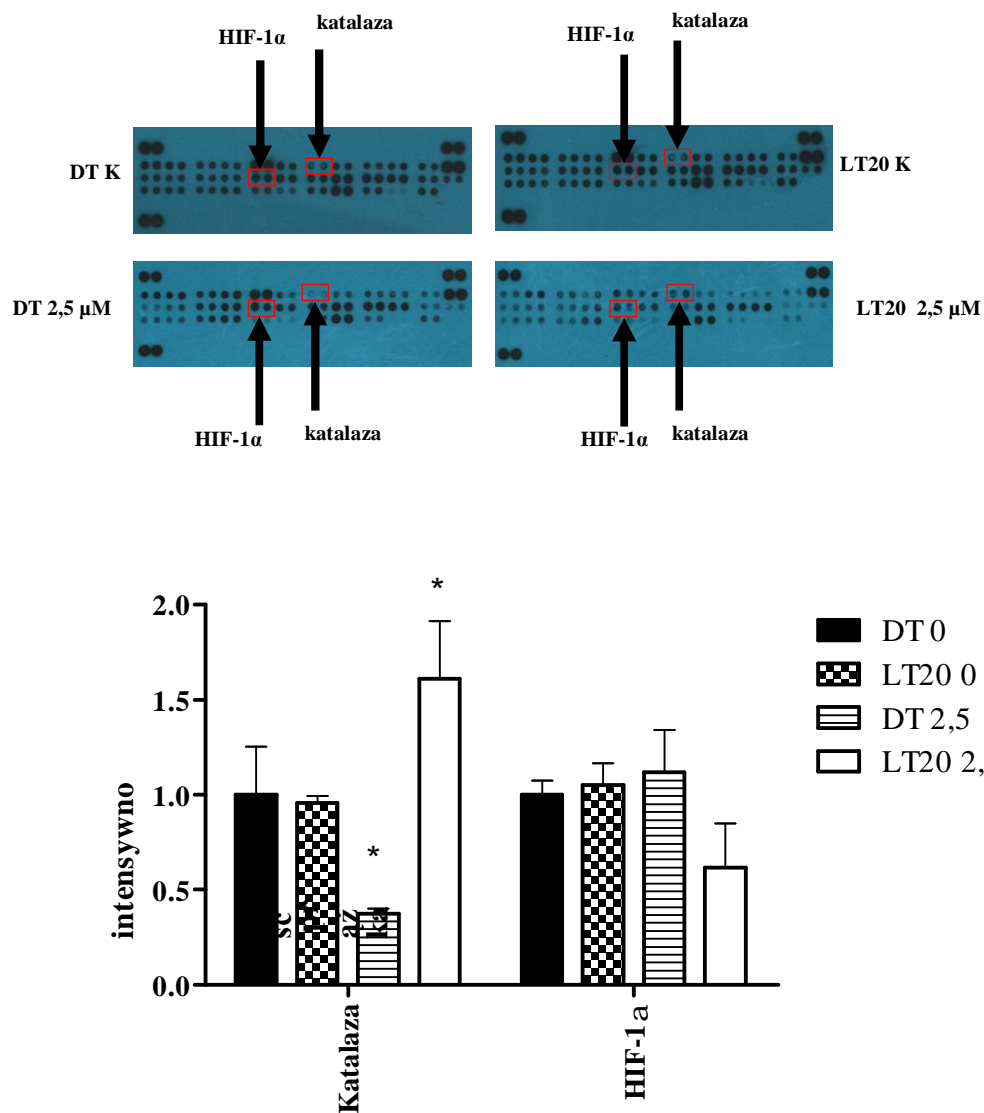
Procesom związanym z PDT może towarzyszyć wzrost poziomu białka HIF-1 $\alpha$  (276), w wyniku uszkodzenia naczyń krwionośnych oraz w wyniku zużycia tlenu w procesach fotochemicznych (168). Ponadto, liczne eksperymenty wskazują na istotną rolę generowanych w komórce RFT na stabilizację białka HIF-1 $\alpha$  (277;278). Wzrost poziomu białka HIF-1 $\alpha$  jest uważany za negatywny czynnik prognostyczny, odpowiedzialny za wzrost oporności komórek na stosowane leczenie (279). Uzyskane w tym doświadczeniu wyniki wskazały, że badany związek TG3 zarówno w stężeniu 0,6 $\mu$ M oraz 2,5 $\mu$ M spowodował widoczny, choć nieistotny statycznie spadek poziomu białka HIF-1 $\alpha$  (rycina 38, rycina 39).

Jednym z oznaczanych białek była katalaza, enzym odpowiedzialny za rozkład powstającego w komórkach nadtlenu wodoru. Uzyskane wyniki wykazały, że badany związek TG3 zarówno w stężeniu 0,6  $\mu$ M oraz 2,5  $\mu$ M spowodował widoczny wzrost poziomu białka, istotny statycznie jedynie dla stężenia 2,5  $\mu$ M, natomiast dla nienaświetlanych komórek inkubowanych z TG3 w stężeniu 2,5  $\mu$ M zaobserwowano spadek poziomu białka (rycina 40, rycina 41).



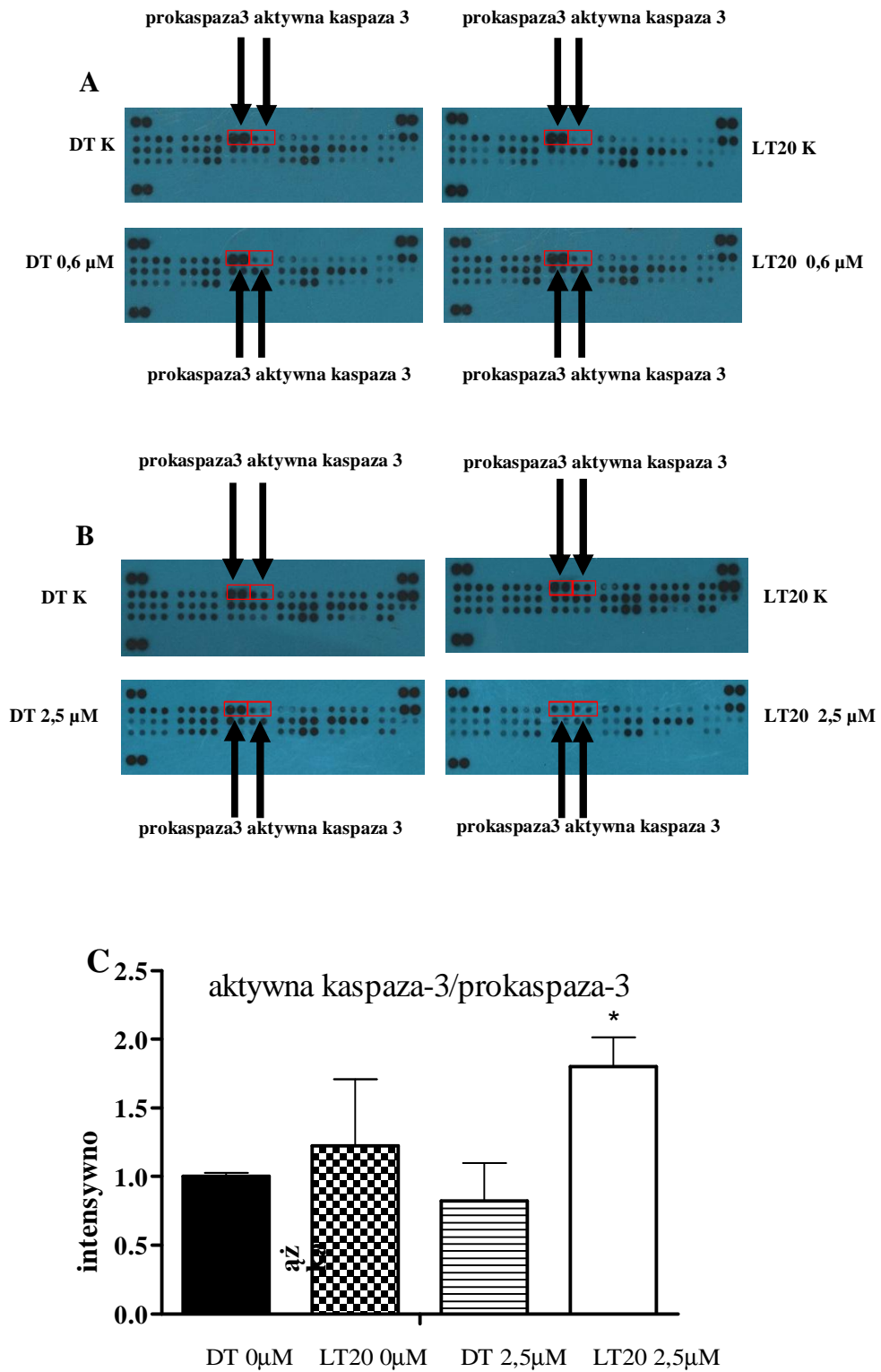


**Rycina 40.** Ekspresja białek HIF-1 $\alpha$  oraz katalazy w kontroli nienaświetlanej, naświetlanej przez 20 minut oraz w komórkach traktowanych związkiem TG3 w stężeniu 0,6  $\mu$ M w połączeniu z naświetlaniem oraz nienaświetlanych. Wyniki przedstawiają średnią wartość+SD z dwóch powtórzeń.



**Rycina 41.** Ekspresja białek HIF-1 $\alpha$  oraz katalazy w materiale uzyskanym z komórek kontroli nienaświetlanej, naświetlanej 20 minut oraz w komórkach traktowanych związkiem TG3 w stężeniu 2,5  $\mu$ M w połączeniu z naświetlaniem oraz nienaświetlanymi. Wyniki przedstawiają średnią wartość+SD z dwóch powtórzeń.

Analiza wyników przeprowadzonych doświadczeń nie wykazała podwyższenia poziomu białek proapoptotycznych takich jak: Htra2/Omi, Smac/DIABLO oraz Bad. W procesie apoptozy niektóre z tych białek ulegają translokacji z mitochondriów do cytozolu tak jak w przypadku białka SMAC/DIABLO, cytochromu c, Htra2/Omi. Należy zwrócić uwagę na fakt, że poziom białek w opisywanym eksperymencie został oznaczony w lizacie komórkowym, który nie uwzględniał podziału jego na poszczególne frakcje (cytozolową, mitochondrialną, jądrową). W związku z tym należy podczas analizy prezentowanych tutaj wyników wziąć pod uwagę, że one dostarczają informacji na temat ogólnego poziomu białka, nie pozwalają natomiast stwierdzić w którym kompartmente komórki ilość danego białka była najwyższa. W opisywanym tutaj eksperymencie, nie wykazano istotnych różnic w poziomie prokaspazy-3 i aktywnej formy enzymu w komórkach inkubowanych z TG3 w stężeniu 0,6  $\mu\text{M}$  i naświetlanych 20 minut (rycina 42). Natomiast w przypadku stężenia 2,5  $\mu\text{M}$  zaobserwowano spadek poziomu prokaspazy-3 o 63% (w porównaniu do nienaświetlanej kontroli bez związku TG3 przy poziomie aktywnej formy kaspazy-3 na poziomie ~59 % (w porównaniu do nienaświetlanej kontroli bez związku TG3) (rycina 42).

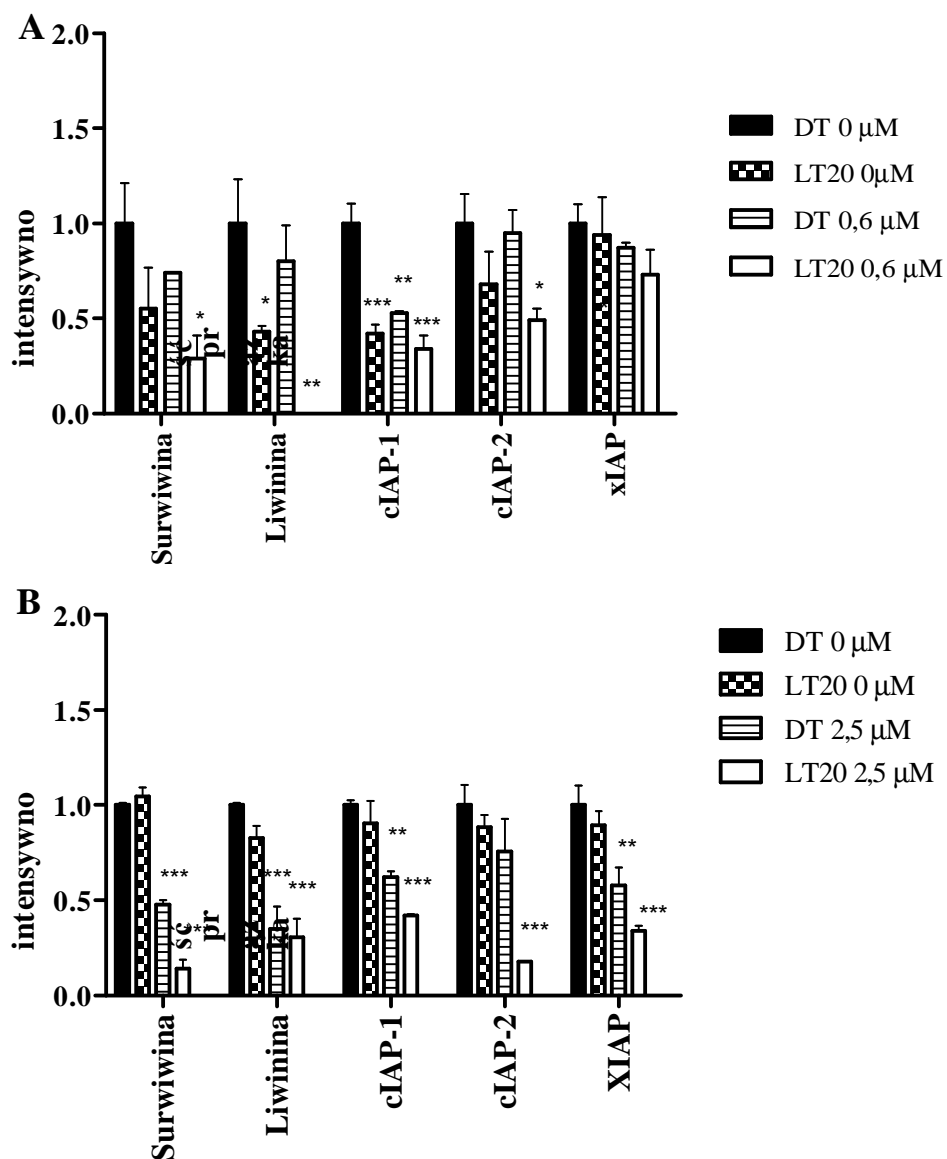


**Rycina 42.** Poziom prokaspazy-3 i aktywnej formy kaspazy-3 w eksperymencie wykonanym dla stężenia 0,6  $\mu$ M (A) i 2,5  $\mu$ M (B) oraz stosunek aktywności aktywnej postaci kaspazy-3 do prokaspazy-3 w eksperymencie wykonanym dla stężenia 2,5  $\mu$ M (C).

W eksperymencie oznaczono poziom antyapoptotycznych białek z rodziny IAP określanych w piśmiennictwie jako: surwiwina, liwinina, cIAP-1, cIAP-2 oraz XIAP. Uzyskane w moim eksperymencie wyniki wykazały istotny statystycznie spadek poziomu białek: surwiwiny (~71% względem nienaświetlanej kontroli), cIAP-1 (~66% względem nienaświetlanej kontroli), cIAP-2 (~51% względem nienaświetlanej kontroli) w przypadku komórek naświetlanych i inkubowanych ze związkiem TG3 w stężeniu 0,6  $\mu\text{M}$ . Poziom białka XIAP uległ zmniejszeniu o ~27% (brak istotności statystycznej), natomiast poziom białka liwininy był poniżej progu detekcji i nie został oznaczony (rycina 43).

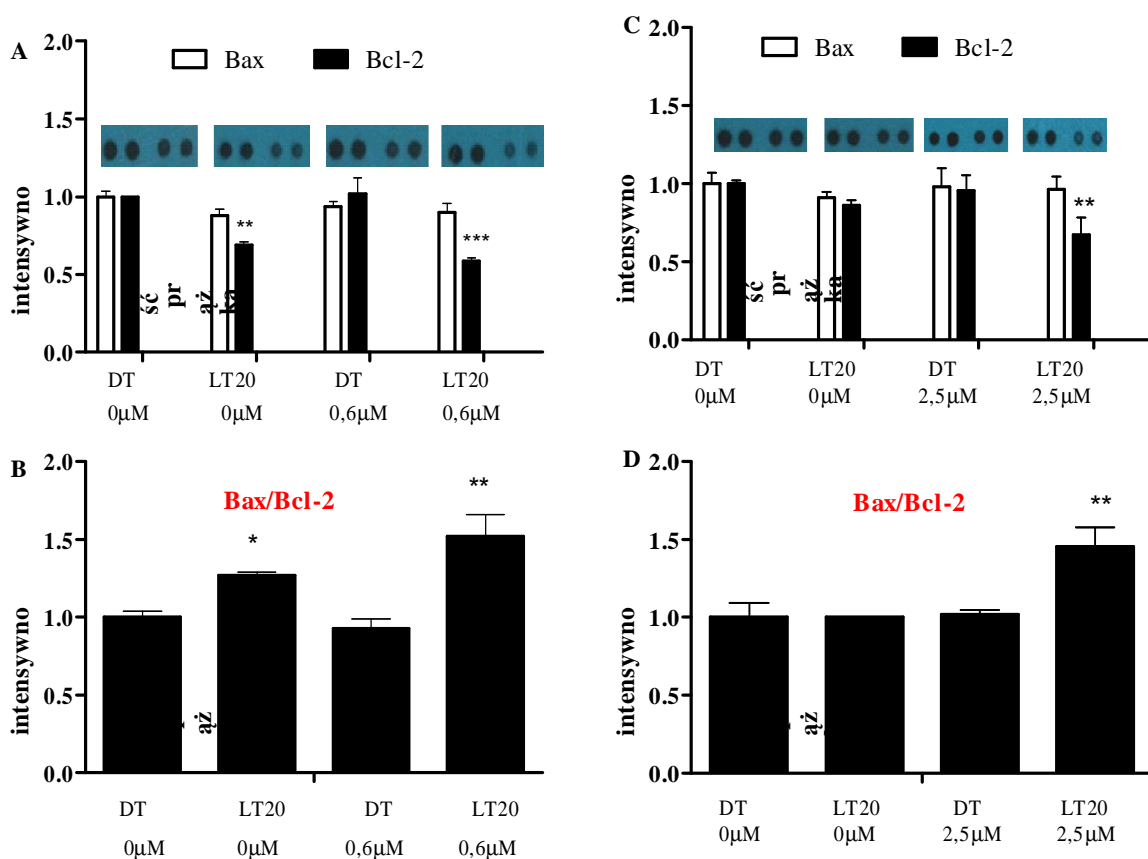
Dla komórek naświetlanych po inkubacji ze związkiem TG3 w stężeniu 2,5  $\mu\text{M}$  zaobserwowano istotny statystycznie spadek poziomu białek: surwiwiny (~86% względem nienaświetlanej kontroli), cIAP-1 (~58% względem nienaświetlanej kontroli), cIAP-2 (~83% względem nienaświetlanej kontroli) oraz XIAP (~66% względem nienaświetlanej kontroli) oraz liwininy (~69% względem nienaświetlanej kontroli) (rycina 43).

Uzyskane wyniki sugerują, że badany związek powoduje obniżenie poziomu białek z rodziny IAP. Zjawisko to może być wynikiem degradacji białka pod wpływem powstających RFT w komórkach i/lub wzrostem ekspresji białek odpowiedzialnych za ich degradację.



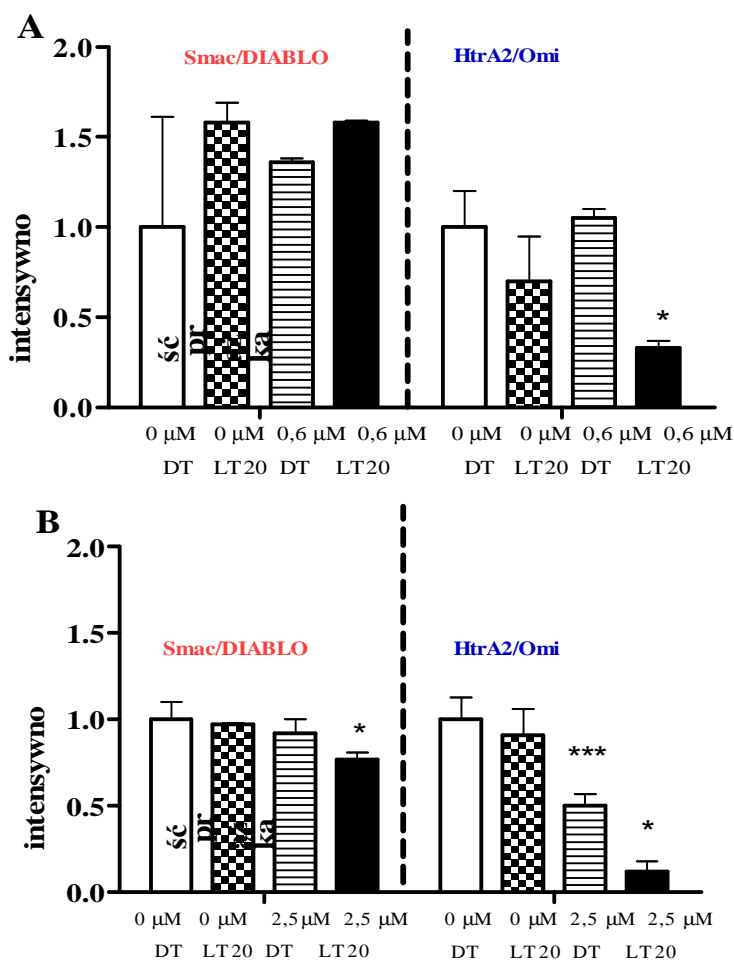
**Rycina 43.** Ekspresja białek antyapoptotycznych: surwiwiny, liwininy, cIAP-1, cIAP-2, XIAP w lizatach uzyskanych z kontroli nienaświetlanej, naświetlanej 20 minut oraz w komórkach traktowanych związkiem TG3 w stężeniu 0,6 μM (A) 2,5 μM (B) w połączeniu z naświetlaniem oraz nienaświetlanymi. Wyniki przedstawiają średnią wartość+SD z dwóch powtórzeń.

W przypadku wielu prac opisujących przeciwnowotworowe działanie zarówno naturalnych jak i syntetycznych związków o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym zwracano uwagę na będący wynikiem ekspozycji na badane związki stosunek białka Bax i Bcl-2, który pozwala ocenić aktywność pro- lub antyapoptotyczną badanego związku. W naświetlanych komórkach traktowanych TG3 w stężeniu 0,6  $\mu\text{M}$  i 2,5  $\mu\text{M}$  nie zaobserwowano istotnie statystycznego wzrostu poziomu białka Bax. Natomiast należy podkreślić, że poziom antyapoptotycznego białka Bcl-2 uległ zmniejszeniu, które może zostać uznane za istotne statystycznie (rycina 44). Obliczony stosunek obu białek w naświetlanych komórkach inkubowanych z badanym związkiem w stężeniu 0,6  $\mu\text{M}$  oraz 2,5  $\mu\text{M}$  sugeruje aktywność proapoptotyczną badanego związku.



**Rycina 44.** Poziom białek Bax oraz Bcl-2 w eksperymencie wykonanym dla stężenia 0,6  $\mu\text{M}$  (A) oraz 2,5  $\mu\text{M}$  (C) oraz stosunek białka Bax/Bcl-2 (B i D); istotność statystyczna (\* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

Wyniki uzyskane dla białek proapoptycznych Smac/DIABLO oraz HtrA2/Omi wykazały istotny statystycznie spadek białka Smac/DIABLO w komórkach inkubowanych z TG3 w stężeniu 2,5 $\mu$ M i naświetlanych oraz istotny statystycznie spadek poziomu białka HtrA2/Omi dla obu badanych stężeń w połączeniu z naświetlaniem (rycina 45).



**Rycina 45.** Poziom białek Smac/Diablo oraz HtrA2/Omi w eksperymencie wykonanym dla stężeń 0,6  $\mu$ M (A) oraz 2,5  $\mu$ M (B); istotność statystyczna (\* $p$ <0,05; \*\*  $p$ <0,01; \*\*\* $p$ <0,001).

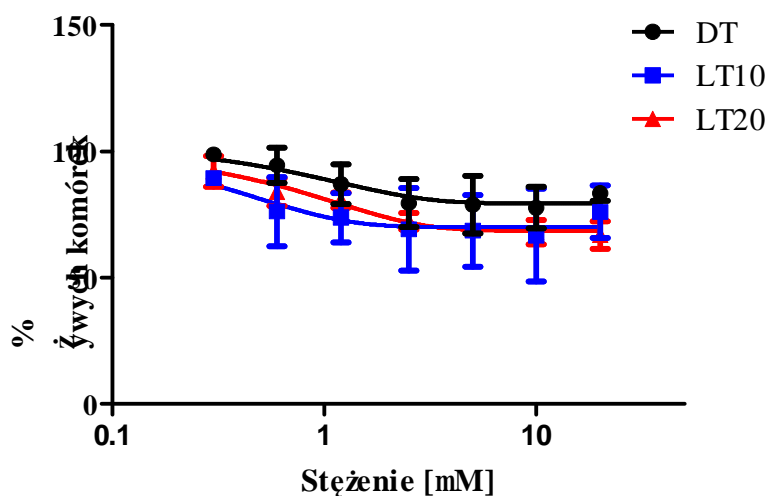


#### 4.14 Wpływ inhibitora autofagii- spautyny-1

W proces śmierci komórek podczas PDT mogą być zaangażowane różne szlaki: apoptozy, nekroza, autofagii. Skierowaniu komórek na określoną drogę śmierci zależy od licznych czynników, między innymi właściwości samego związku, miejsca lokalizacji, użytego stężenia czy mocy światła. W celu sprawdzenia w jaki sposób zahamowanie procesu autofagii wpłynie za działanie cytotoksyczne związku TG3 wykonano badanie z zastosowaniem inhibitora autofagii spautyny-1.

W pierwszym etapie sprawdzono cytotoksyczność samego inhibitora wobec komórek linii LNCaP testem MTT (rycina 46). Na podstawie uzyskanych wyników wyznaczono wartość  $IC_{50}$  dla inhibitora, która wyniosła  $\sim 20 \mu\text{M}$  dla komórek nienaświetlanych oraz naświetlanych (zarówno 10 oraz 20 minut).

Na podstawie uzyskanych danych do właściwego eksperymentu wybrano trzy stężenia inhibitora:  $10 \mu\text{M}$ ,  $5 \mu\text{M}$  oraz  $2,5 \mu\text{M}$ .



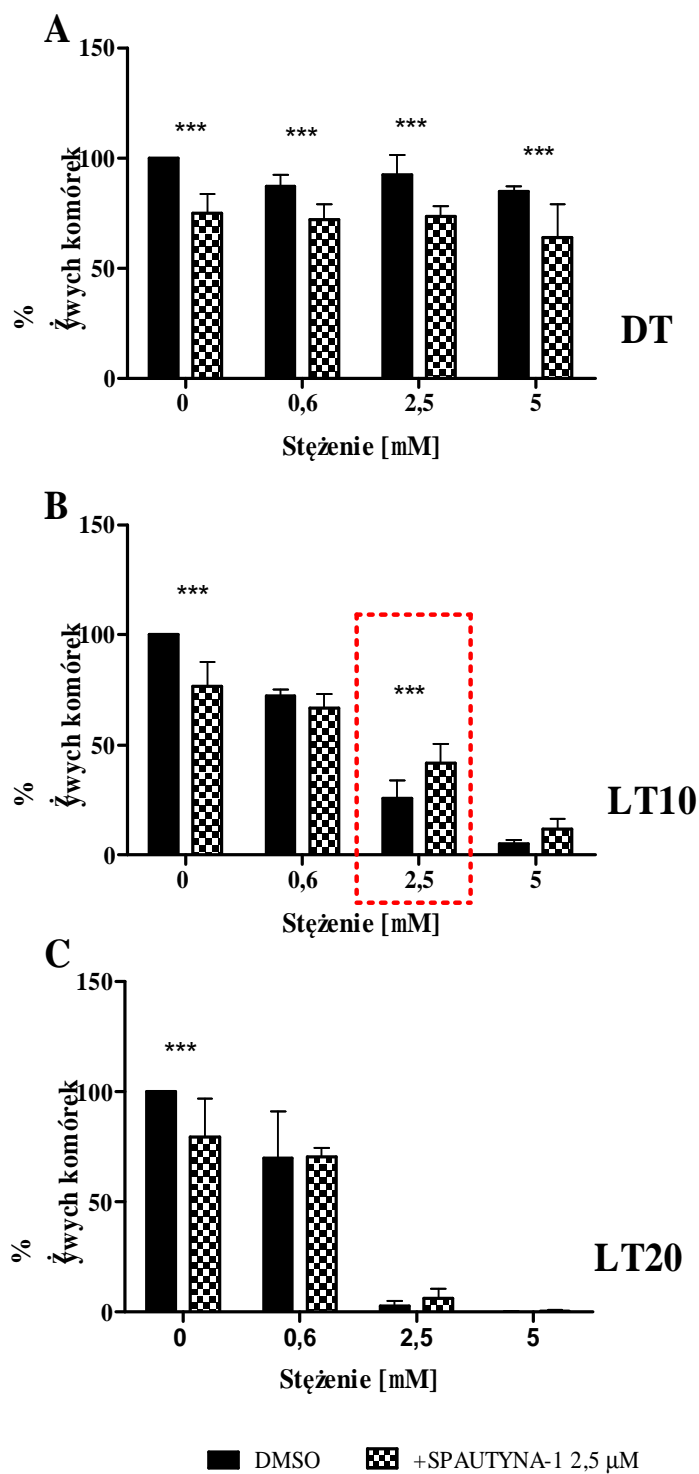
**Rycina 46.** Wpływ spautyny -1 na przeżywalność komórek linii LNCaP. Komórki inkubowano z badanym inhibitorem 1 godzinę przed naświetlaniem, następnie komórki naświetlano 10 i 20 minut. Wykonano także kontrole w fazie ciemnej. Po 24 godzinach wykonano test MTT. Wyniki przedstawiono jako średnią wartość  $\pm$ SD z trzech eksperymentów.

Uzyskane wyniki wykazały istotny statystycznie wpływ spautyny-1 użytej w stężeniu 2,5  $\mu\text{M}$  na wzrost przeżywalności komórek inkubowanych z TG3 w stężeniu wynoszącym 2,5  $\mu\text{M}$  po czasie 10 minut naświetlania (rycina 47). Przy dłuższym czasie naświetlania nie wykazano istotnego statystycznie wpływu inhibitora.

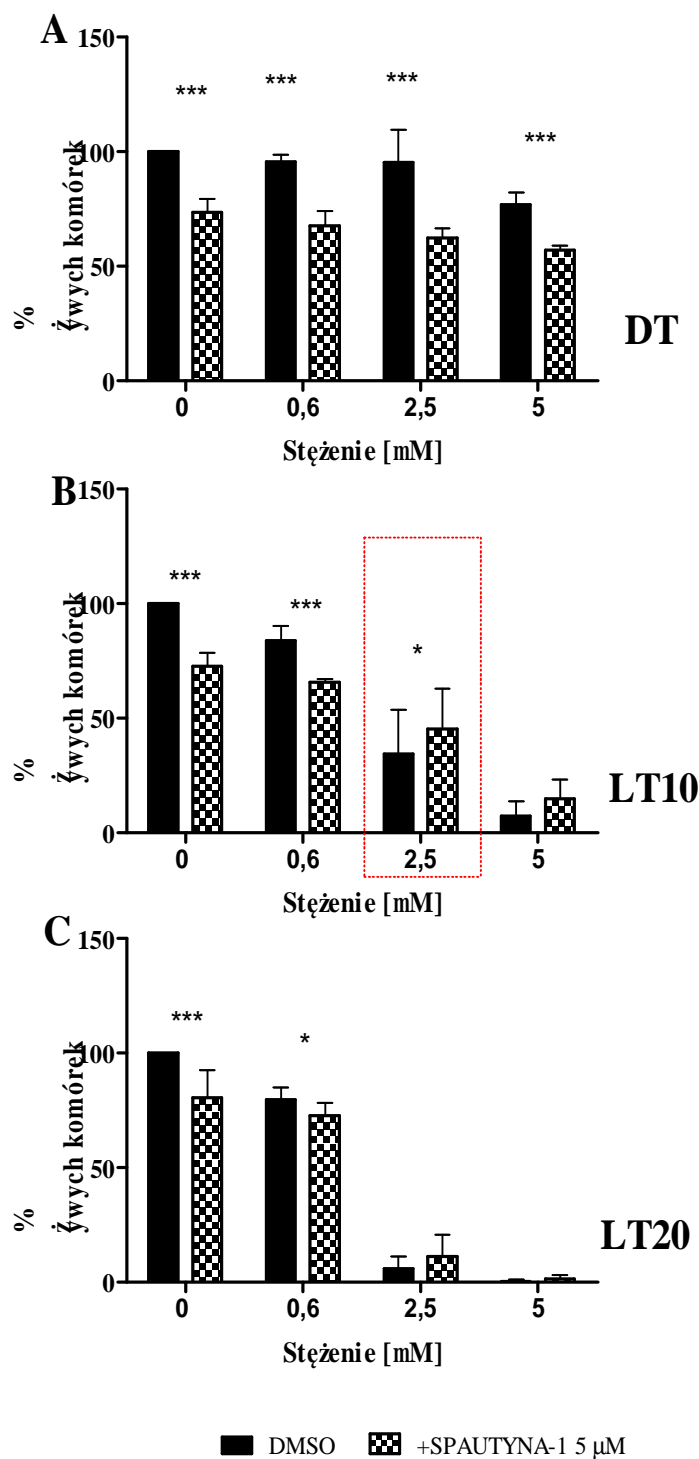
Inkubacja z inhibitorem autofagii w stężeniu 5  $\mu\text{M}$  skutkowała zwiększeniem przeżywalności komórek inkubowanych ze związkiem TG3 w stężeniu 2,5 $\mu\text{M}$  i naświetlanych 10 minut (rycina 48).

Inhibitor autofagii w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  spowodował wzrost przeżywalności komórek inkubowanych ze związkiem TG3 w stężeniu 2,5 $\mu\text{M}$  i naświetlanych 10 minut (rycina 49).

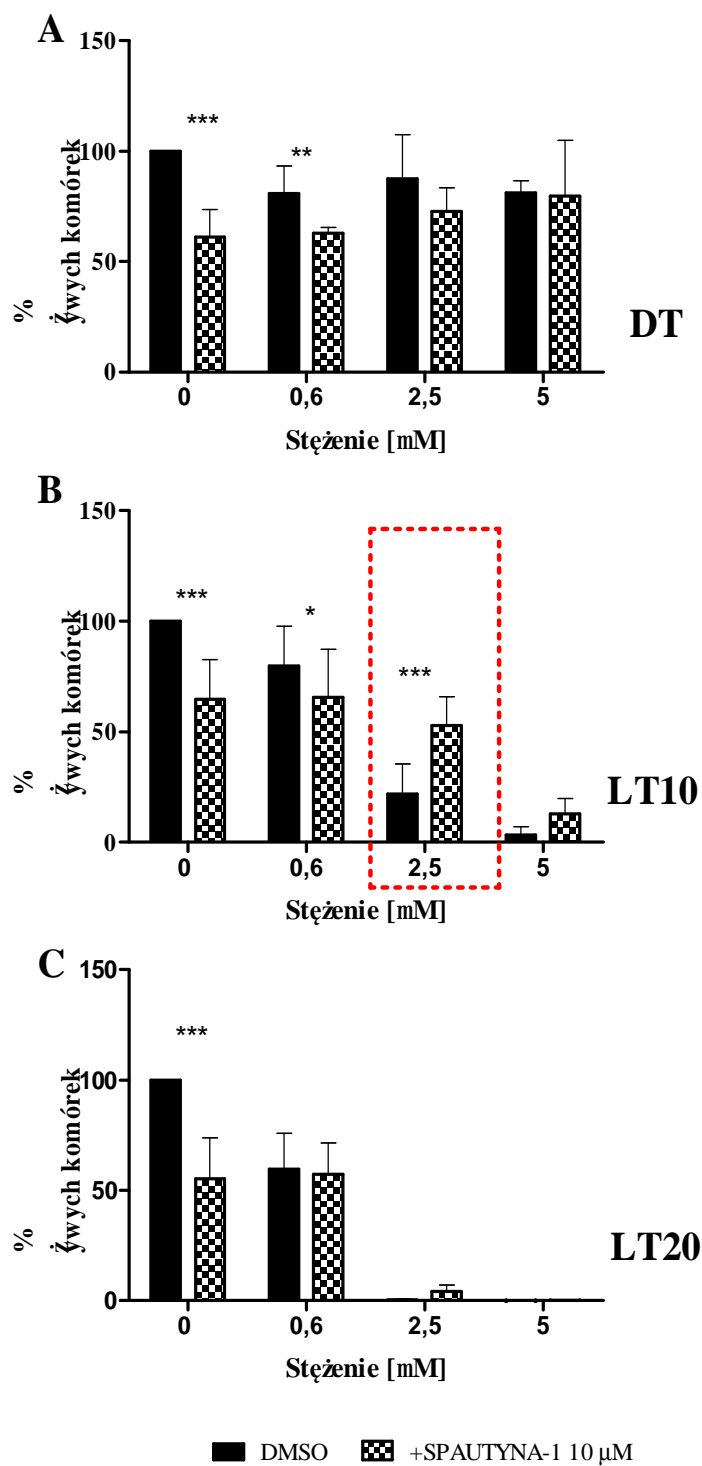
Nie wykazano wpływu spautyny-1 na zmniejszenie cytotoksyczności związku TG3 w stężeniu 0,6  $\mu\text{M}$  dla każdego z użytych stężeń inhibitora i czasów naświetlania. Nie wykazano istotnego wpływu spautyny-1 w żadnym badanym stężeniu na aktywności związku TG3 o stężeniu 5  $\mu\text{M}$ . Ponadto, wykazano zmniejszenie przeżywalności komórek nienaświetlanych inkubowanych ze związkiem oraz kontroli. Uzyskane wyniki mogą wynikać z istotnej roli procesu autofagii w prawidłowym funkcjonowaniu prawidłowych komórek, zgodnie z założeniem że proces ten pozwala na utrzymanie równowagi pomiędzy procesami degradacji oraz syntezy istotnych dla komórki białek czy całych organelli komórkowych.



**Rycina 47.** Wpływ spautyny-1 o stężeniu 2,5μM na cytotoksyczność związku TG3. Spautyna-1 została podana na jedną godzinę przed naświetlaniem. Po 24h od naświetlania wykonano test MTT. Wyniki przedstawiono jako % kontroli (średnia z dwóch eksperymentów); istotność statystyczna (\*p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\*p<0,001).



**Rycina 48.** Wpływ spautyny-1 o stężeniu 5μM na cytotoksyczność związku TG3 wobec komórek nienaświetlanych (A), oraz naświetlanych 10 minut (B) i 20 minut (C). Spautyna-1 została podana na jedną godzinę przed naświetlaniem. Po 24h od naświetlania wykonano test MTT; istotność statystyczna (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).



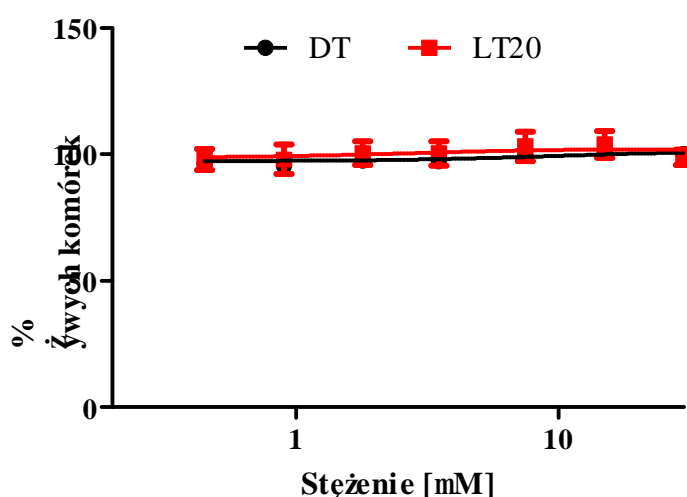
**Rycina 49.** Wpływ spautyny-1 o stężeniu 10 μM na cytotoksyczność związku TG3 wobec komórek nienaświetlanych (A), oraz naświetlanych 10 minut (B) i 20 minut (C). Spautyna-1 została podana na jedną godzinę przed naświetlaniem. Po 24h od naświetlania wykonano test MTT. Wyniki przedstawiono jako % kontroli (średnia z trzech eksperymentów); istotność statystyczna (\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\*p<0,001).

#### 4.15 Wpływ inhibitora nekrozy na działanie cytotoksyczne związku TG3

Jedną z możliwych dróg śmierci podczas PDT jest nekroza. Dotychczas przeprowadzone eksperymenty (cytometria przepływowa, mikroskopia fluorescencyjna) wykazały zależny od czasu naświetlania oraz dawki fotouczulacza wzrost populacji komórek nekrotycznych w próbach poddanych PDT z użyciem związku TG3. Ponadto zaobserwowano w tych próbach wzrost uwalniania dehydrogenazy mleczanowej, który może sugerować zaburzenia integralności błony komórkowej towarzyszące nekrozie.

Wpływ zahamowania nekrozy na działanie cytotoksyczne związku zbadano przy użyciu inhibitora nekrozy/nekroptozy - Necrox-2, związku o jednoczesnym działaniu antyoksydacyjnym.

W pierwszym etapie sprawdzono działanie cytotoksyczne samego inhibitora w zakresie stężeń 0,45-30  $\mu\text{M}$  wobec komórek naświetlanych oraz nienaświetlanych za pomocą testu MTT. Uzyskane wyniki wykazały, że inhibitor w badanym zakresie stężeń nie wpływa na przeżywalność komórek ( $\text{IC}_{50} > 30 \mu\text{M}$ ) (rycina 50). Do kolejnych eksperymentów wybrano stężenie inhibitora wynoszące 5  $\mu\text{M}$ .

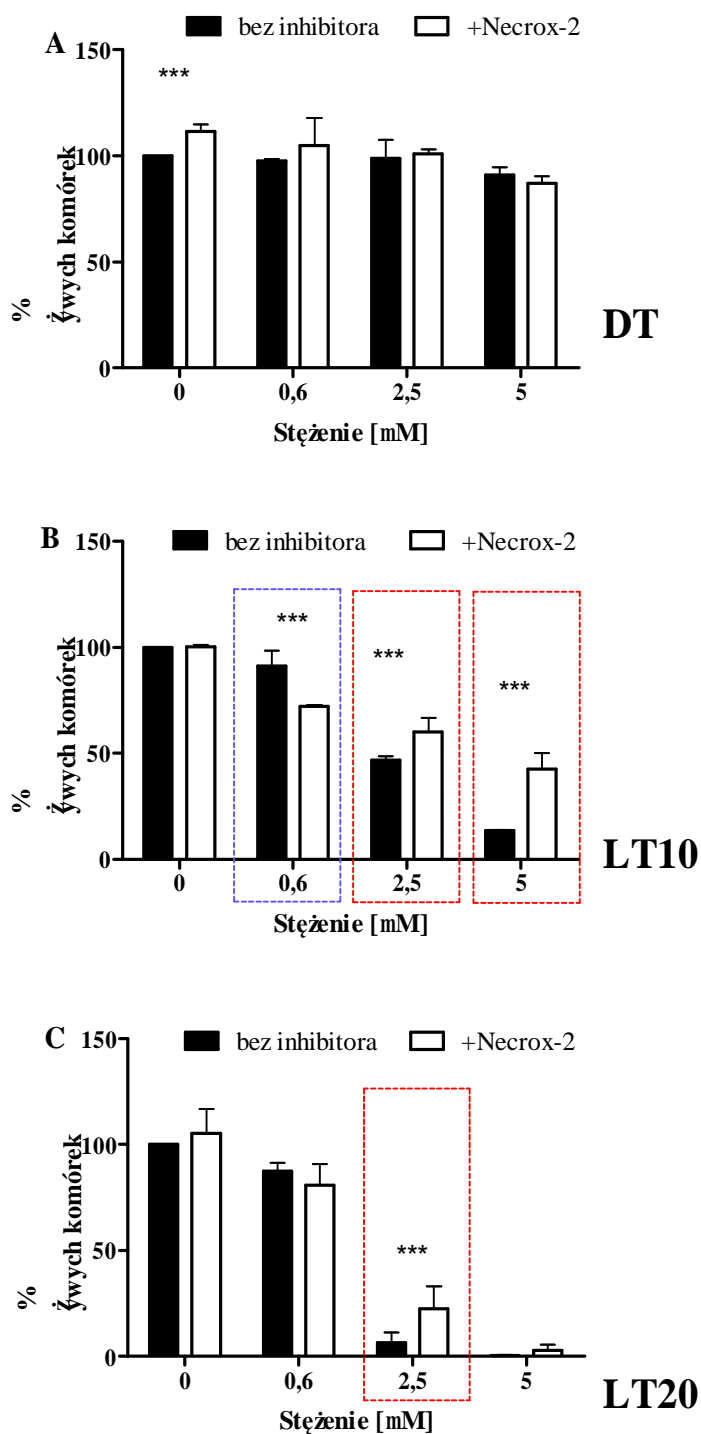


**Rycina 50.** Wpływ Necrox-2 na przeżywalność komórek LNCaP po czasie 24 godzin. Badanie wykonano dla komórek naświetlanych 20 minut oraz nienaświetlanych. Wyniki przedstawiają średnia z dwóch eksperymentów  $\pm\text{SD}$ .

Właściwy eksperyment opierał się na dwóch schematach postępowania. W pierwszym typie eksperymentów inhibitor podano dwie godziny przed naświetlaniem, w drugim 24 godziny przed naświetlaniem. Wyniki eksperymentu wykazały, że użycie inhibitora nekrozy zwiększa przeżywalność komórek w zależności od dawki fotouczulacza, czasu inkubacji z inhibitorem oraz czasu ekspozycji na światło

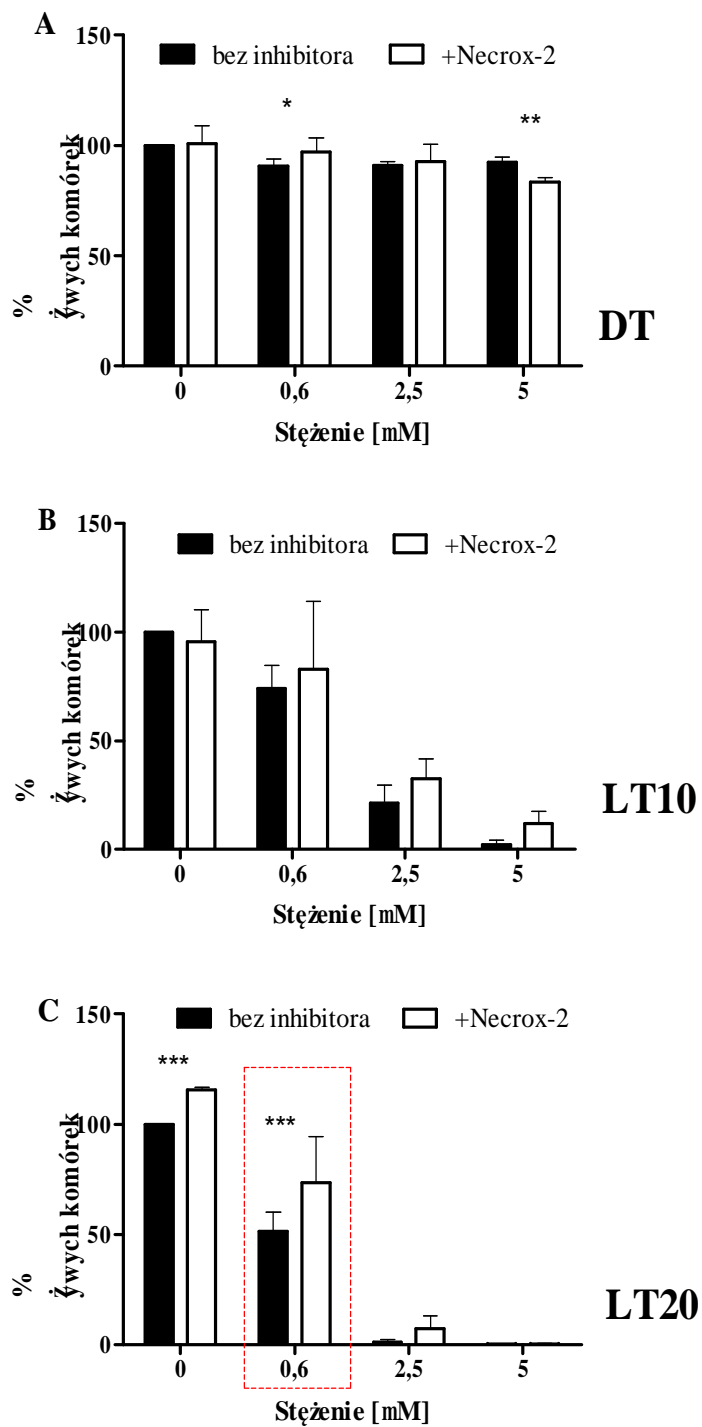
W eksperymentach w których inhibitor podano 2h przed naświetlaniem istotny statystycznie wzrost przeżywalności komórek wykazano dla stężenia 2,5  $\mu\text{M}$  oraz 5  $\mu\text{M}$  po 10-minutowym naświetlaniu. Natomiast dla stężenia 0,6  $\mu\text{M}$  zaobserwowano spadek przeżywalności komórek. Dla komórek naświetlanych 20 minut istotne statystyczny wzrost liczby żywych komórek zaobserwowano jedynie przy stężeniu 2,5  $\mu\text{M}$  (wzrost liczby żywych komórek z 6% do 22%) (rycina 51).

W eksperymentach w których inhibitor podano 24 h przed naświetlaniem (10 minut) zaobserwowano wzrost przeżywalności komórek w całym zakresie stężeń pomimo braku istotności statystycznej (rycina 52). Po 20 minutowym naświetlaniu inhibitor istotnie statystycznie zwiększył przeżywalność komórek inkubowanych z TG3 w stężeniu 0,6 $\mu\text{M}$ .



**Rycina 51.** Wpływ Necrox-2 po 2-godzinnej inkubacji przed naświetlaniem na fototoksyczne działanie związku TG3. Analizę wykonano za pomocą testu MTT dla komórek nienaświetlanych (A) oraz naświetlanych 10 minut (B) oraz 20 minut (C). Wyniki przedstawiono jako średnią wartość+SD (jako % kontroli) z dwóch niezależnych eksperymentów; istotność statystyczna (\*\*\*) $p < 0,001$ .





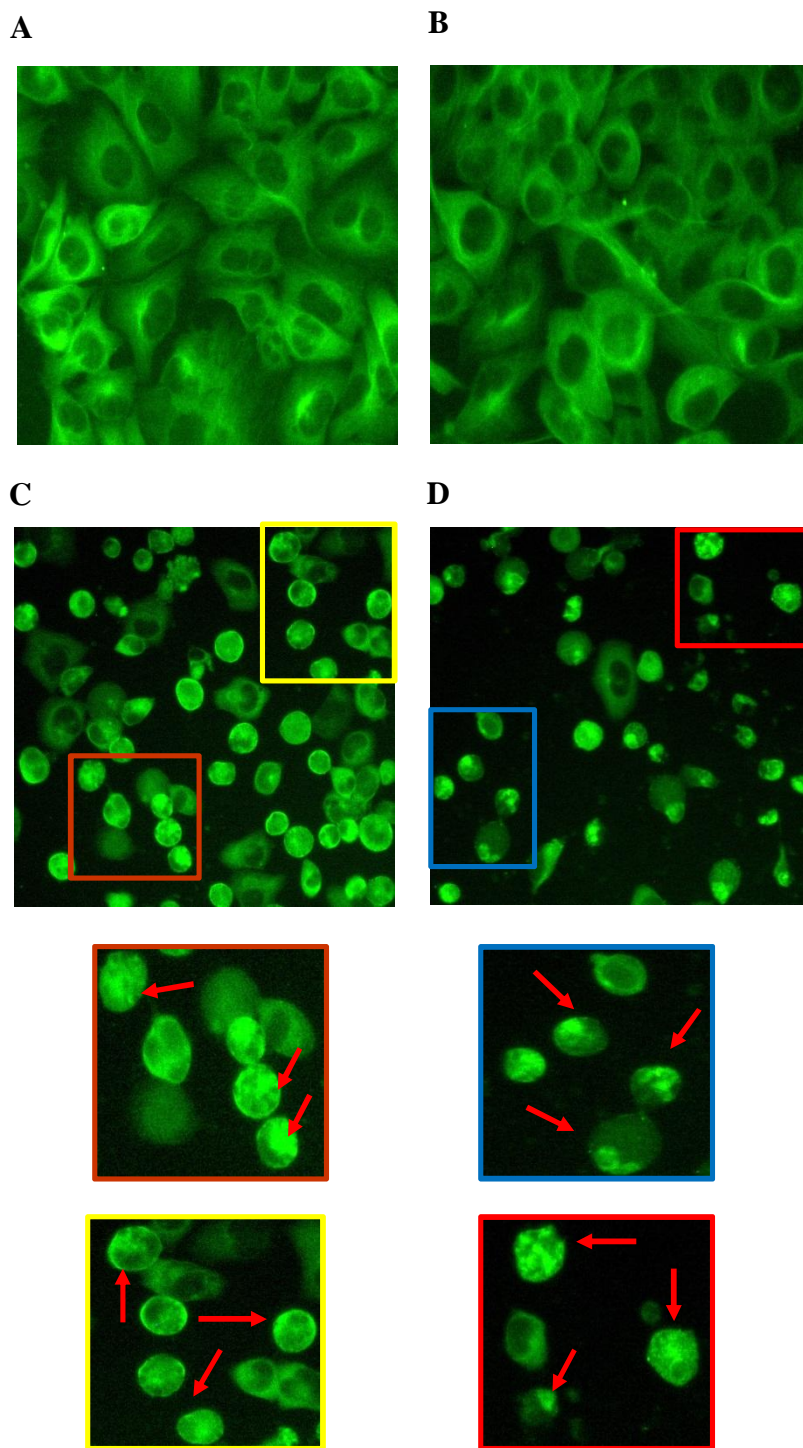
**Rycina 52.** Wpływ Necrox-2 po 24-godzinnej inkubacji przed naświetlaniem na fototoksyczne działanie związku TG3. Analizę wykonano za pomocą testu MTT dla komórek nienaświetlanych (A) oraz naświetlanych 10 minut (B) oraz 20 minut (C). Wyniki przedstawiono jako średnią wartość+SD (jako % kontroli) z dwóch niezależnych eksperymentów; istotność statystyczna (\*\*\*) $p < 0,001$ ).

#### 4.16 Wpływ związku TG3 na cytoszkielet komórek

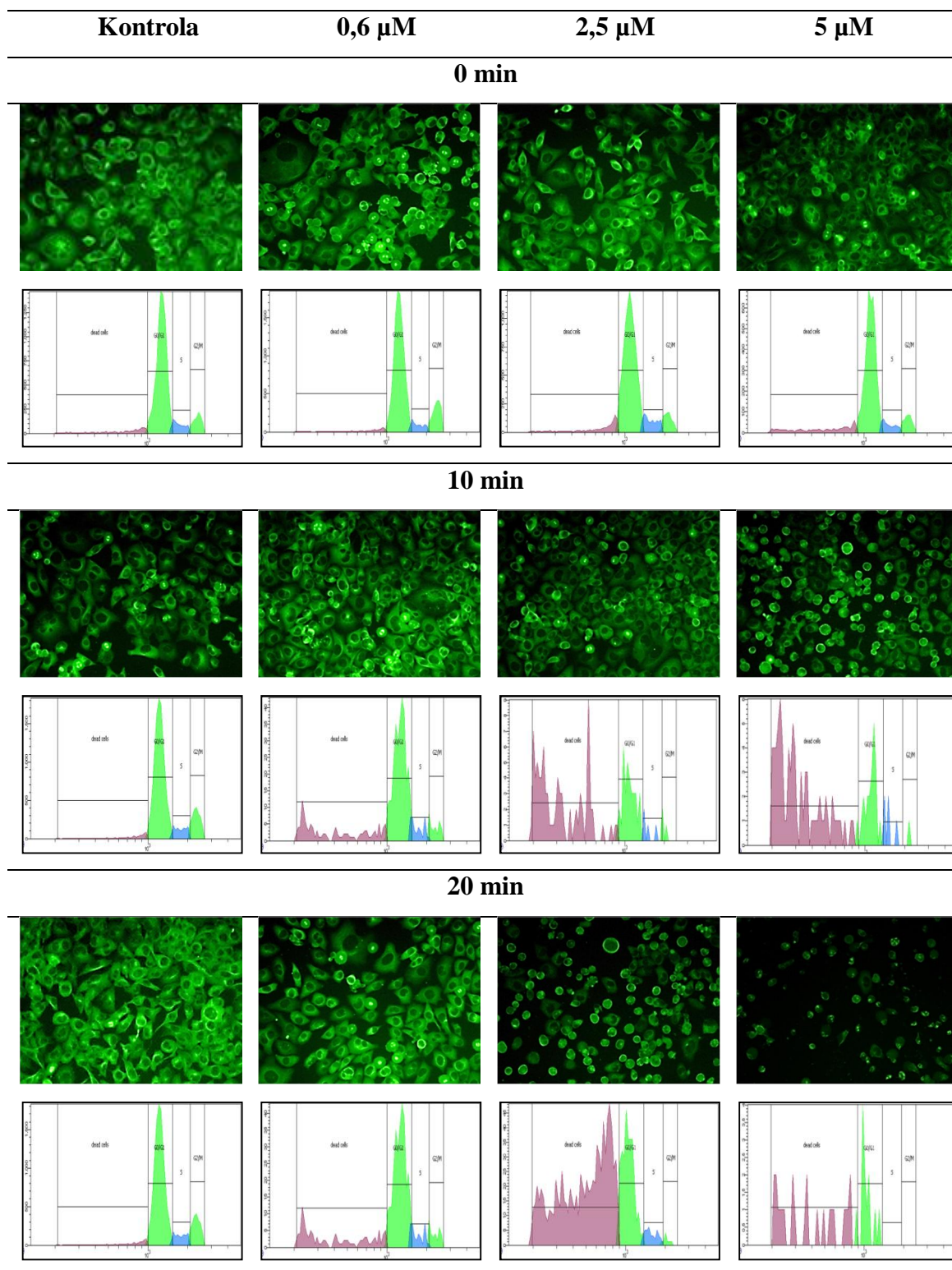
Niezwykle istotną funkcją mikrotubul oprócz współdziałania z filamentami pośrednimi oraz aktynowymi w celu utrzymania odpowiedniego rusztowania wewnętrznego komórek niezbędnego do ich prawidłowego funkcjonowania jest wpływ na podziały komórkowe. Mikrotubule wchodzą w skład tworzącego się wrzeciona kariokinetycznego podczas mitozy oraz mejozy. W związku z tym zaburzenia struktury mikrotubul w komórkach mogą zaburzać liczne procesy komórkowe prowadząc w efekcie do śmierci komórek. W celu oceny wpływu badanego fotouczulacza na cytoszkielet komórek zbadano wpływ PDT prowadzonej z udziałem TG3 na jedno z białek budujące mikrotubule:  $\alpha$ -tubulinę. Eksperyment przeprowadzono techniką mikroskopii fluorescencyjnej wykorzystując znakowane fluoresceiną przeciwciała przeciwko  $\alpha$ -tubulinie. Badanie wykonano po 6 godzinach od naświetlania komórek (10 oraz 20 minut) oraz dla komórek nienaświetlanych.

W obrazie mikroskopowym w zdrowych komórkach mikrotubule widoczne są w postaci zielonych struktur o kształcie wydłużonych włókienek rozciągających się w cytoplazmie. Analiza mikroskopowa opierała się na ocenie stopnia zmian w strukturze  $\alpha$ -tubuliny.

Wyniki eksperymentu wykazały, że badany związek wpływa na cytoszkielet komórek w zależności od dawki fotouczulacza i czasu ekspozycji na promieniowanie (rycina 53). W komórkach nienaświetlanych zarówno kontroli oraz w komórkach traktowanych TG3 w stężeniach: 0,6  $\mu$ M; 2,5  $\mu$ M oraz 5  $\mu$ M nie zaobserwowano zmian w strukturze cytoszkieletu. Pierwsze istotne zmiany zaobserwowano w przypadku komórek inkubowanych z TG3 w wyższych stężeniach: 2,5  $\mu$ M oraz 5  $\mu$ M i naświetlanych 10 minut. Zaburzeniu struktury cytoszkieletu zwłaszcza przy stężeniu 5  $\mu$ M towarzyszyła zmiana kształtu komórek. Dłuższy czas naświetlania (20 minut) przy stężeniu 2,5  $\mu$ M oraz 5  $\mu$ M spowodował wzrost liczby komórek z zaburzona strukturą i agregacją  $\alpha$ -tubuliny (rycina 53). Ponadto, oprócz zmiany morfologii komórek zaobserwowano zmniejszenie adherencji komórek do powierzchni na której były hodowane. Na rycinie 54 przedstawiono wyniki uzyskane z badania faz cyklu komórkowego po 6 godzinach i zmiany w strukturze cytoszkieletu.



**Rycina 53.** Kontrola nienaświetlana (A) oraz kontrola naświetlana 20 (B) minut- prawidłowa struktura cytoszkieletu, zachowana morfologia komórek. Związek TG3 w stężeniu 2,5μM (C) oraz 5 μM (D) w połączeniu z 20-minutowym naświetlaniem; widoczne zaburzenie struktury cytoszkieletu; zmiana morfologii, prawidłowa struktura α-tubuliny ulega zaburzenia (widoczna dezintegracja białka).

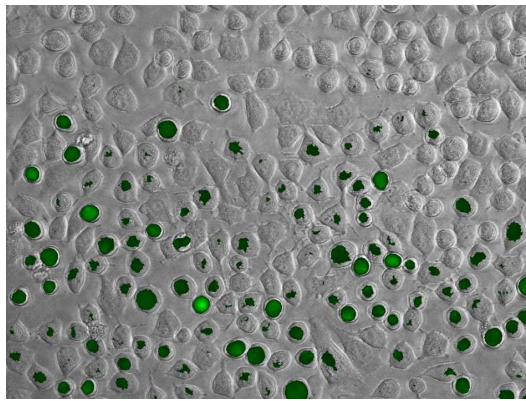


**Rycina 54.** Wpływ związku TG3 na strukturę  $\alpha$ -tubuliny oraz na fazy cyklu komórkowego po czasie 6 godzin od naświetlania komórek 10 i 20 minut oraz komórek nienaświetlanych.

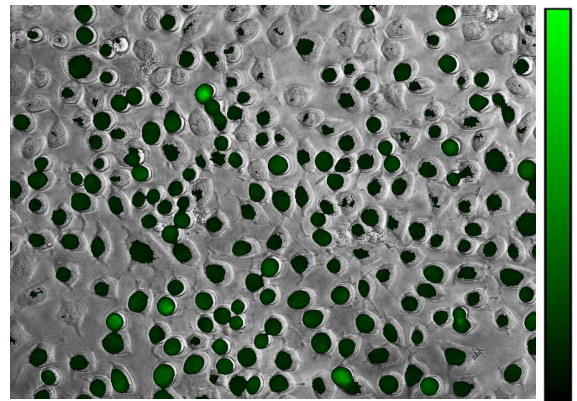
#### 4.17 Ocena indukcji stresu oksydacyjnego

Zdolność badanego związku do indukcji stresu oksydacyjnego zbadano za pomocą barwienia dioctanem 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny. Badanie wykonano bezpośrednio po naświetlaniu oraz po 0,5h ; 2h ; 4h ; 6h oraz 24h od naświetlania. Zdjęcia reprezentatywne dla każdego czasu naświetlania, użytego stężenia związku TG3 oraz czasu jaki upłynął od naświetlania badanych komórek przedstawiono w suplemencie fotograficznym. W przypadku komórek nienaświetlanych obserwowano jedynie bardzo nieznaczny proporcjonalny do czasu inkubacji z badanym związkiem wzrost fluorescencji (Suplement fotograficzny: DCFH-DA). Istotny wzrost fluorescencji zaobserwowano w komórkach inkubowanych ze związkiem TG3 w stężeniu 0,6  $\mu\text{M}$  i naświetlanych 10min, jak również w komórkach inkubowanych ze związkiem TG3 w stężeniu 2,5  $\mu\text{M}$  obserwowanych natychmiast po naświetlaniu i 30 min od jego zakończenia. W komórkach obserwowanych w świetle widzialnym po 4h i dłuższym od naświetlania trwającego 10min można dostrzec pogłębiające się proporcjonalnie do czasu i zastosowanego stężenia zmiany morfologiczne świadczące o ich stopniowej degradacji, w zdjęciach wykonanych za pomocą techniki fluorescencyjnej w komórkach tych obserwowano tylko nieznaczny w porównaniu z komórkami kontrolnymi naświetlanymi 10 min wzrost fluorescencji (Suplement fotograficzny: DCFH-DA 10 min). Podobnie do zmian obserwowanych w świetle widzialnym w komórkach naświetlanych przez 10 min w komórkach naświetlanych przez 20 min można zaobserwować silniej zaznaczone i również nasilające się wraz ze wzrostem stężenia związku TG3 zmiany morfologiczne, dodatkowo, zwłaszcza w komórkach inkubowanych z DHCF dłużej niż 4h po naświetlaniu w zdjęciach uzyskanych za pomocą fluorescencji zaobserwować można pojawienie się pojedynczych komórek charakteryzujących się wyjątkowo silną fluorescencją. Porównanie zdjęć uzyskanych w świetle widzialnym i fluorescencji pozwala także na zaobserwowanie komórek, których obecności zupełnie nie można dostrzec na zdjęciach wykonanych za pomocą techniki fluorescencyjnej. W celu uwidocznienia tych zmian wybrano 8 reprezentatywnych fotografii i po obróbce w programie Photoshop CS5 polegającej na odpowiednim złożeniu zdjęcia uzyskanego w świetle widzialnym i fluorescencji zaprezentowano na rycinie 55. Dodatkowo dla tych samych fotografii wykonano analizę rozkładu jasności zielonych pikseli (histogramy) i zaprezentowano ją na rycinie 56. Bardzo znaczny w porównaniu do komórek kontrolnych wzrost jasnych zielonych

pikseli widoczny jest w przypadku histogramu obliczonego dla zdjęcia wykonanego zaraz po 10 minutowym naświetlaniu dla komórek inkubowanych ze związkami TG3 w stężeniu 0,6  $\mu\text{M}$  oraz pomimo, że dużo słabiej zaznaczony, dla komórek nienaświetlanych i inkubowanych ze związkami TG3 w stężeniu 5  $\mu\text{M}$ . Znacznie poniżej linii histogramu komórek kontrolnych znalazły się linie obrazujące dystrybucję jasnozielonych pikseli w zdjęciach komórek uzyskanych 6h i 24h po naświetlaniu komórek inkubowanych ze związkami TG3 odpowiednio w stężeniach 2,5  $\mu\text{M}$  i 5  $\mu\text{M}$ .

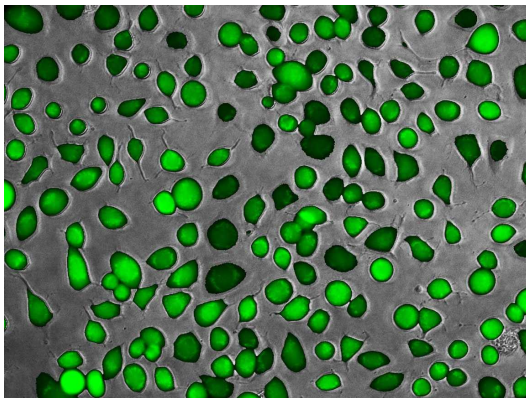


DT, 0min po naświetlaniu, 0μM

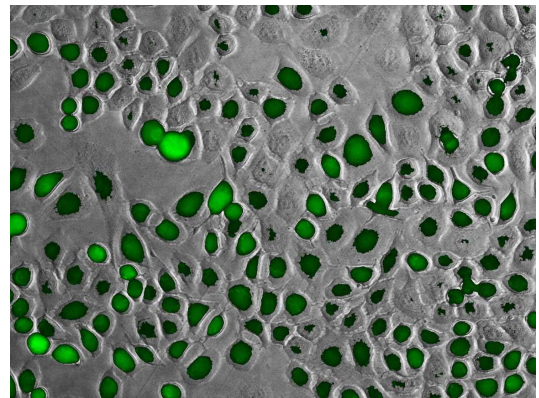


DT, 0min po naświetlaniu, 5μM

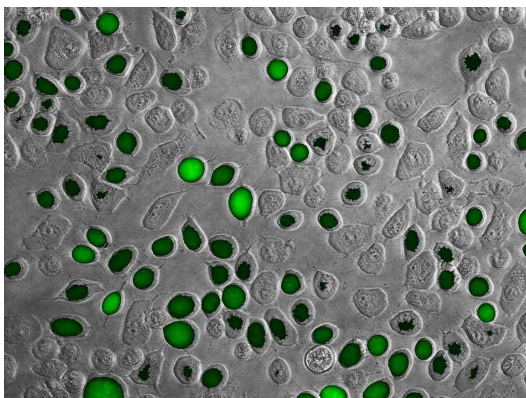
0



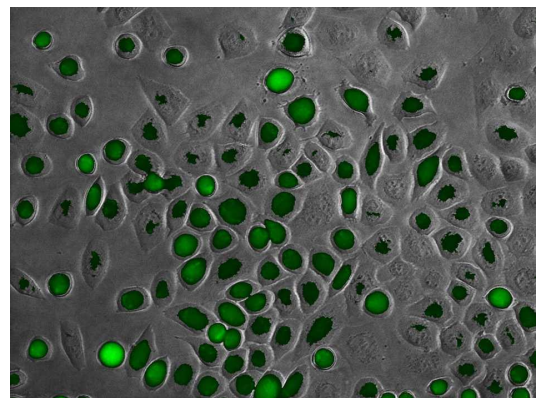
LT10, 0min po naświetlaniu, 0,6μM



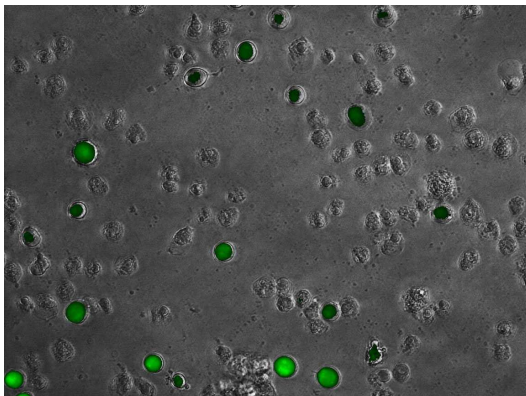
LT20, 0min po naświetlaniu, 0,6μM



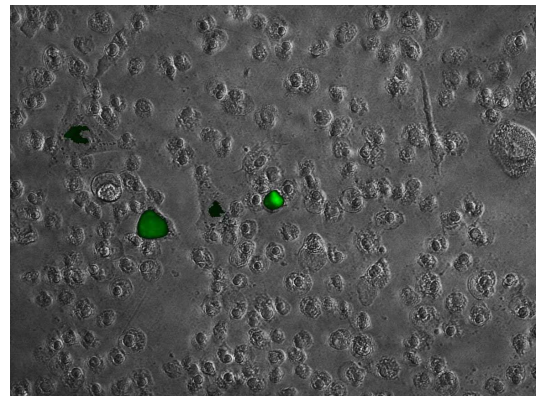
LT20, 0min po naświetlaniu, 5μM



LT10, 30min po naświetlaniu, 0,6μM

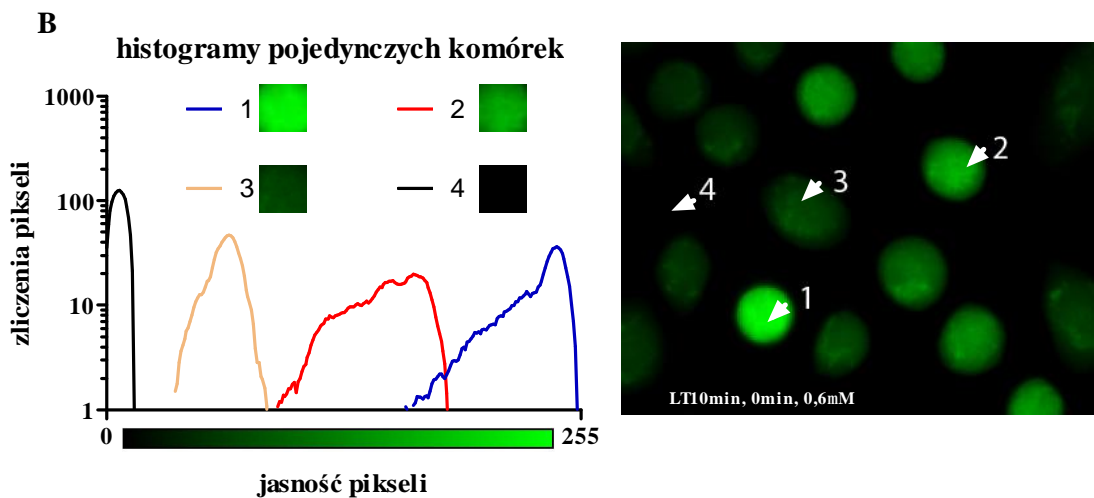
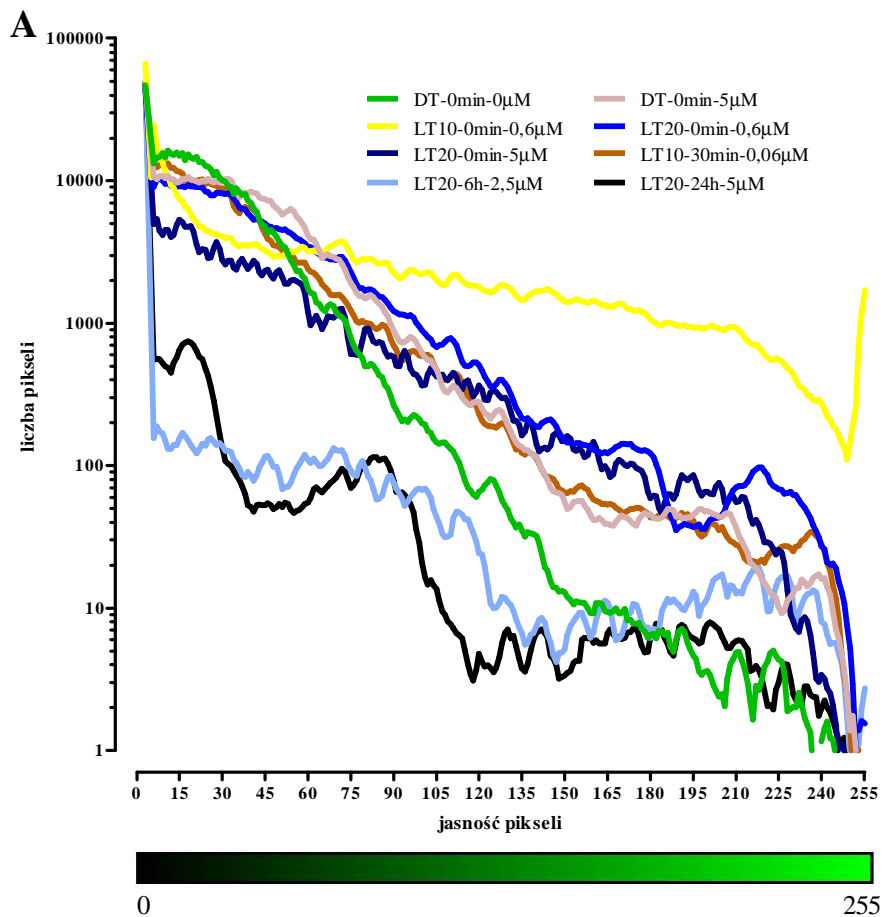


LT20, 6h po naświetlaniu, 2,5μM



LT20, 24h po naświetlaniu, 5μM

Rycina 55. Stres oksydacyjny w komórkach LNCaP poddanych PDT przy użyciu TG3.



**Rycina 56.** A) Histogram obrazujący zmiany w intensywności zielonych pikseli na zdjęciach uzyskanych za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego, w wybranych do analizy próbach (oryginalne zdjęcia zostały zaprezentowane w suplemencie fotograficznym). W legendzie podano informacje w porządku: czas naświetlania – czas, jaki upłynął od zakończenia naświetlania do początku eksperymentu - zastosowana dawka fotouczulacza w mikromolach. B) Histogramy wybranych komórek o różnym nasyceniu koloru zielonego.



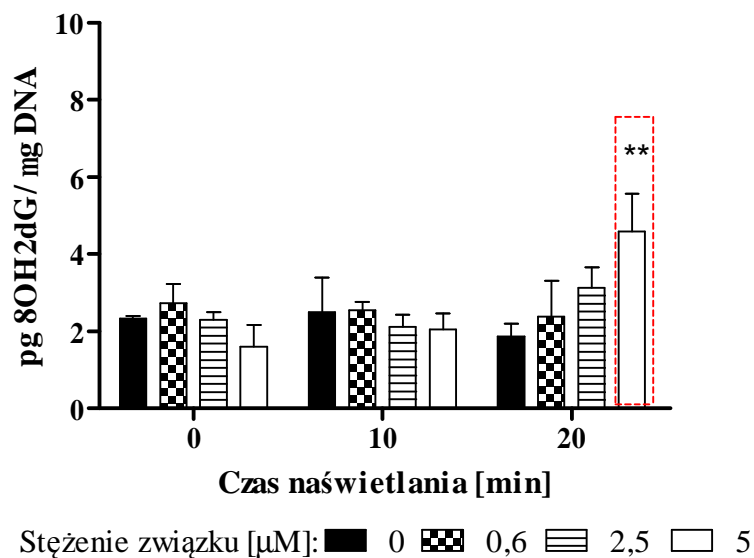
#### **4.18 Ocena wolnorodnikowych uszkodzeń materiału genetycznego pod wpływem związku TG3**

Reaktywne formy tlenu powstające podczas PDT mogą reagować z istotnymi dla prawidłowego funkcjonowania komórek biocząsteczkami takimi jak lipidy, białka oraz DNA. W przypadku niskiej selektywności związku chemicznego/leku uszkodzenia materiału genetycznego w komórkach niezmienionych nowotworowo mogą nasilać ryzyko wystąpienia mutacji, a tym samym zwiększać prawdopodobieństwo indukcji procesu nowotworowego oraz zaburzać prawidłowe funkcjonowanie komórek.

Wpływ związku TG3 na generowanie oksydacyjnych uszkodzeń DNA został oceniony za pomocą pomiaru 8-hydrokso-2-deoksyguanozyny- markera wolnorodnikowych uszkodzeń materiału genetycznego testem ELISA za pomocą komercyjnego zestawu odczynników zgodnie z instrukcją producenta (rycina 57).

Uzyskane wyniki wykazały, że badany związek w stężeniu 5  $\mu\text{M}$  w połączeniu z 20 minutową ekspozycją na światło powoduje istotny statystycznie ( $p < 0,01$ ) wzrost ilości 8-hydrokso-2-deoksyguanozyny. Nie wykazano istotnie statystycznie zmian w stężeniu markera w fazie ciemnej oraz po 10 minutowym naświetlaniu.

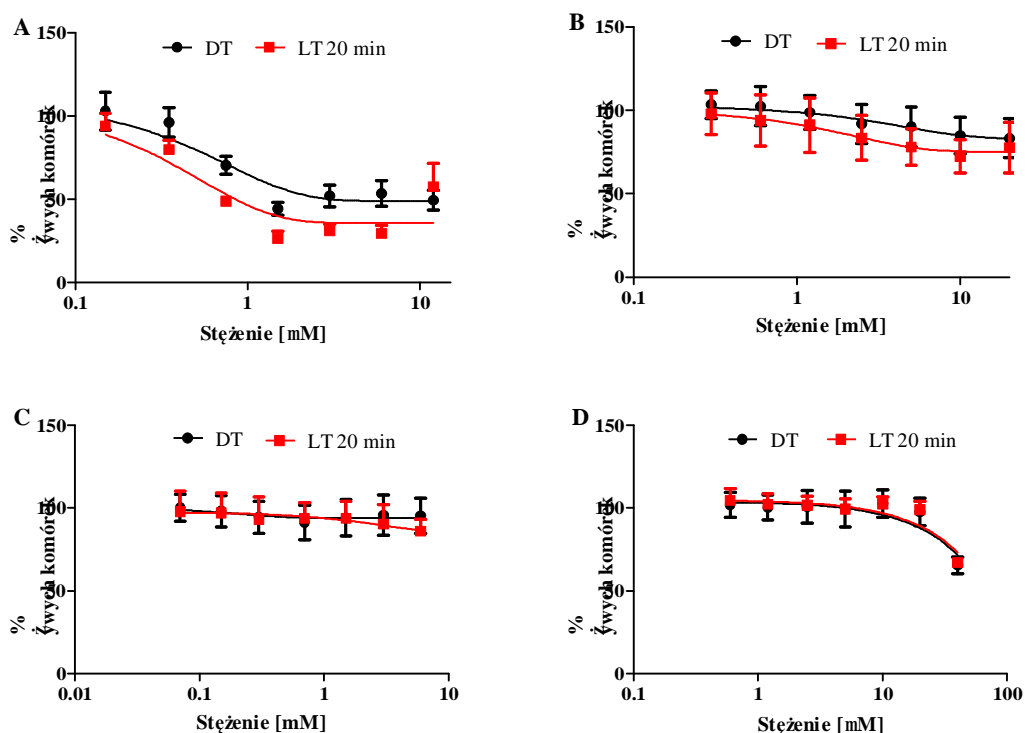
Przeprowadzone badanie wskazuje na badany związek w zakresie efektywnych stężeń nie powoduje uszkodzeń materiału genetycznego. Ponadto wyniki eksperymentu sugerują, że jądro komórkowe nie stanowi struktury docelowej dla badanego fotouczulacza.



**Rycina 57.** Stężenie 8-OH-2dG w lizacie komórkowym uzyskanym z komórek LNCaP po czasie 24h od naświetlania. Komórki inkubowano 24 godziny z badanym związkiem o stężeniach: 0 μM; 0,6 μM; 2,5 μM; 5 μM. Wyniki przedstawiono jako średnią wartość+SD uzyskaną z dwóch niezależnych eksperymentów; istotność statystyczna (\*\* p<0,01).

#### 4.19 Wpływ inhibitorów enzymów antyoksydacyjnych na działanie cytotoksyczne związku TG3

Mechanizm działania fotouczulaczy podczas terapii fotodynamicznej opiera się przede wszystkim na generowaniu reaktywnych form tlenu i/lub wolnych rodników. W związku z tym efektywność fotouczulaczy może być modulowana przez aktywność układów antyoksydacyjnych zwłaszcza enzymów stanowiących tzw. pierwszą linię obrony przed ROS w komórce takich jak: dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, czy syntetaza glutationu. W celu sprawdzenia wpływu zahamowania enzymów antyoksydacyjnych na działanie cytotoksyczne TG3 wykonano eksperyment z wykorzystaniem: inhibitora dysmutazy cytozolowej - DDC, dysmutazy mitochondrialnej 2-ME, katalazy - 3-AT oraz syntetazy glutationu - BSO. W pierwszym etapie sprawdzono działanie cytotoksyczne inhibitorów w celu ustalenia stężenia które będzie mogło być użyte w dalszych eksperymentach.

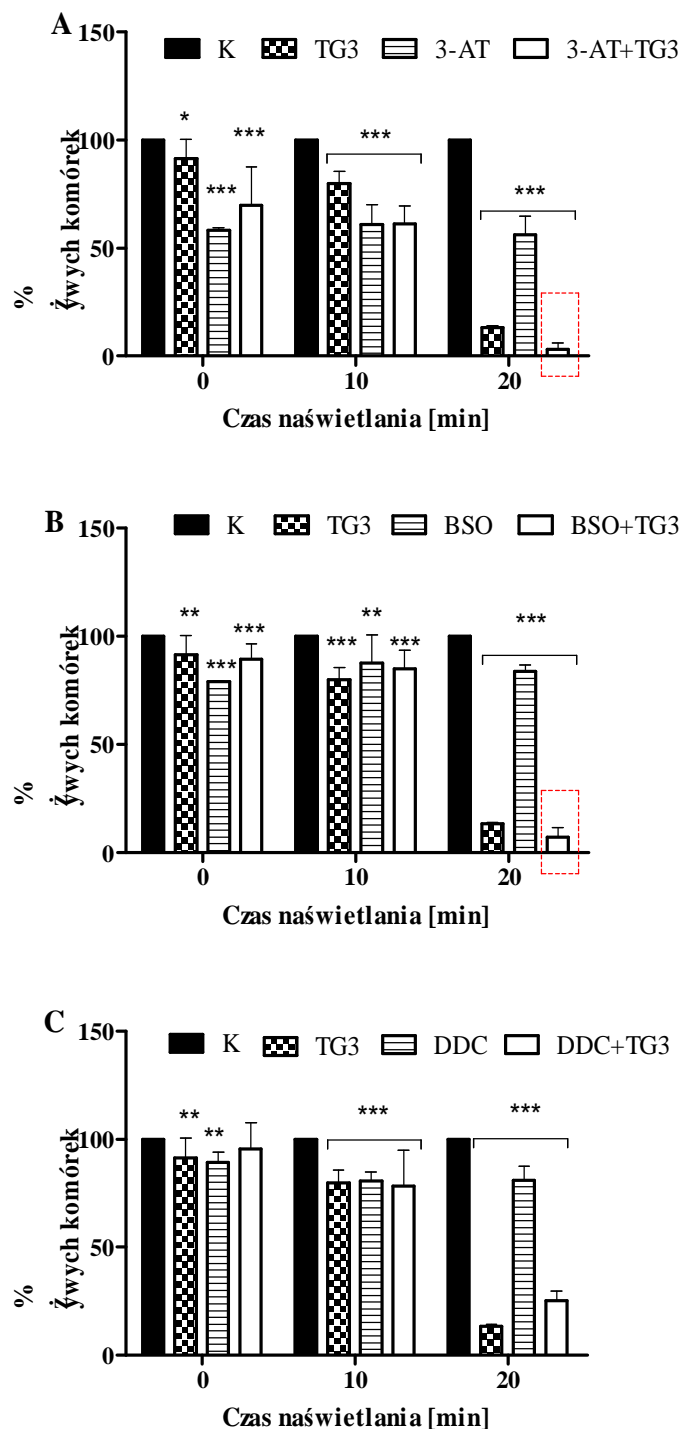


**Rycina 58.** Cytotoksyczność inhibitorów enzymów antyoksydacyjnych: 2-metoksyestradiolu (A), 3-amino-1,2,4-triazolu (B), sulfoksyminy L-butioniny (C) oraz dietyloditiokarbaminianu (D). Wyniki przedstawiono jako średnią wartość +SD z dwóch eksperymentów.

Na podstawie uzyskanych wyników cytotoksyczności do właściwego eksperymentu wybrano następujące inhibitory: DDC-5  $\mu\text{M}$ ; BSO-1,5 mM; 3-AT-5 mM (rycina 58). Uzyskane wyniki wykazały silne działanie cytotoksyczne 2-metoksyestradiolu wobec komórek LNCaP ( $\text{IC}_{50} < 1\mu\text{M}$  dla komórek naświetlanych 20 minut,  $\text{IC}_{50} \sim 3\mu\text{M}$  dla komórek nienaświetlanych) zarówno w fazie ciemnej jak i po naświetlaniu. Wyniki sugerują, że 2-metoksyestradiol wykazuje działanie fototoksyczne w związku z tym zrezygnowano z oceny wpływu 2-ME na działanie cytotoksyczne związku TG3. Badany związek TG3 w stężeniu 0,6  $\mu\text{M}$  oraz wybrane inhibitory enzymów antyoksydacyjnych podano na 24 godziny przed naświetlaniem. Uzyskane wyniki przedstawiono na rycinie 59 oraz w tabeli 11.

Związek TG3 obniżył przeżywalność komórek do  $\sim 79\%$  po 10-minutowym naświetlaniu i do  $\sim 13\%$  po czasie naświetlania 20 minut. Inkubacja z 3-amino-1,2,4-triazolem skutkowała obniżeniem przeżywalności komórek do  $\sim 60\%$ . Inhibitor katalazy w połączeniu z badanym związkiem obniżył przeżywalność komórek do  $\sim 61\%$  po 10-minutowym naświetlaniu oraz do  $\sim 3\%$  w połączeniu z 20-minutowym naświetlaniem. W przypadku krótszego czasu naświetlania (10 minut) nie zaobserwowano istotnego spadku przeżywalności w porównaniu z wynikami uzyskanymi dla samego inhibitora. Zaobserwowane działanie cytotoksyczne inhibitora katalazy, może sugerować istotną rolę enzymu w utrzymaniu homeostazy w komórkach podczas eksperymentu.

Inhibitor syntetazy glutationu w połączeniu z badanym związkiem i 20 minutowym naświetlaniem obniżył przeżywalność komórek do  $\sim 7\%$ . Po 10-minutowym naświetlaniu nie zaobserwowano znaczących zmian. Natomiast wyniki uzyskane dla inhibitora cytozolowej dysmutazy ponadtlenkowej wykazały wzrost przeżywalności do  $\sim 25\%$  po 20 minutowym naświetlaniu.



**Rycina 59.** Wpływ inhibitorów enzymów antyoksydacyjnych: dietylotiotiokarbaminian (A), sulfoksymina L-butioniny (B) oraz 3-amino-1,2,4-triazol (C). Czas inkubacji z inhibitorami i związkem wynosił 24h przed naświetlaniem. Wyniki przedstawiono jako średnią wartość +SD z dwóch eksperymentów; istotność statystyczna (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

**Tabela 11.** Wpływ inhibitorów enzymów antyoksydacyjnych na cytotoksyczność związku TG3.

Inhibitor	TG3 0,6 $\mu$ M	Czas inkubacji [h]	Przeżywalność komórek		
			Czas naświetlania		
			0	10	20
-	-	-	100	100	100
-	+	24	<b>91,25+9,22</b>	<b>79,82+5,76</b>	<b>13,1+0,92</b>
3-AT 5 mM	-	24	58,28+1,19	60,78+9,27	56,07+8,70
3-AT 5 mM	+	24	69,88+17,82	61,04+8,54	<b>3,14+3,05</b>
BSO 1,5 mM	-	24	79,1+0,23	87,63+13	83,73+3,07
BSO 1,5 mM	+	24	89,25+7,20	85,08+8,36	<b>8,81+7,07</b>
DDC 5 $\mu$ M	-	24	89,31+4,78	80,74+4,07	80,95+6,30
DDC 5 $\mu$ M	+	24	95,44+12,12	78,23+16,40	<b>25,124+4,51</b>

#### 4.20 Zmiany poziomu glutationu pod wpływem związku TG3

Glutation należy do niskocząsteczkowych endogennych antyoksydantów, który odgrywa istotną rolę w ochronie komórki przed wolnymi rodnikami. Ponadto, glutation uczestniczy w procesach związanych z regeneracją innych antyoksydantów. Badania z użyciem inhibitora syntetazy glutationu- wykazały obniżenie przeżywalności komórek podczas PDT z zastosowaniem związku TG3, co wskazuje na istotny udział glutationu w mechanizmach antyoksydacyjnych uruchamianych w komórkach pod wpływem zwiększonej produkcji RFT. Ocenę wpływu związku TG3 na stężenie glutationu przeprowadzono z wykorzystaniem znacznika fluorescencyjnego Thioglo-1. Badanie wykonano dla komórek inkubowanych z badanym związkiem w stężeniu 0,6  $\mu\text{M}$ ; 2,5  $\mu\text{M}$  oraz 5  $\mu\text{M}$  oraz z badanym związkiem w tym samym zakresie stężeń i inhibitorem syntetazy glutationu o stężeniu 1,5 mM. Badanie przeprowadzono bezpośrednio po naświetlaniu oraz po upływie: 0,5 h; 2 h; 4 h; 6 h oraz 24 h od naświetlania.

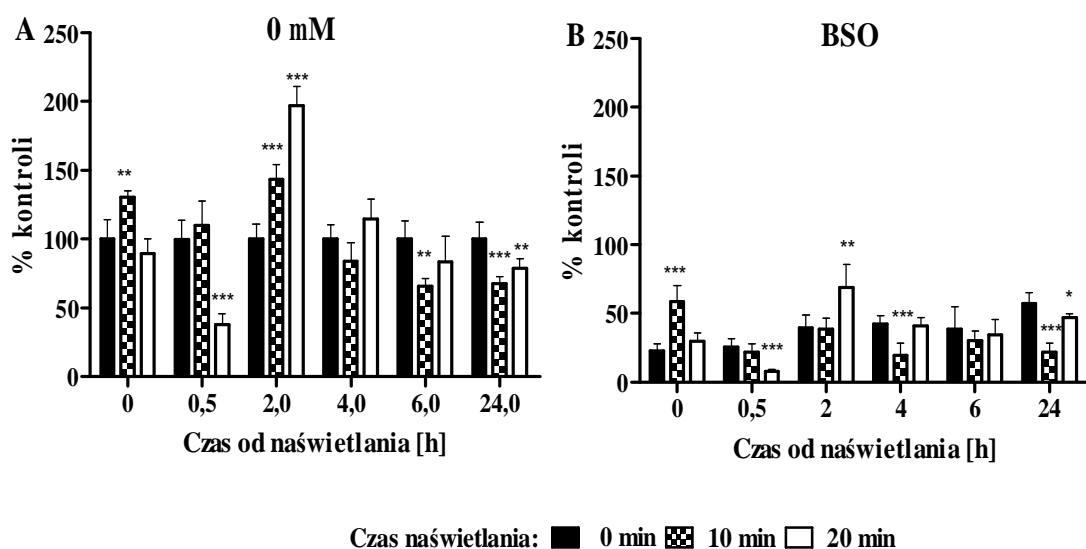
Uzyskane wyniki wykazały istotne statystycznie zmiany stężenia glutationu w wyniku PDT z zastosowaniem TG3 w zależności od dawki fotouczulacza, czasu naświetlania oraz czasu pomiaru.

Dla naświetlanej kontroli oraz najniższego badanego stężenia 0,6  $\mu\text{M}$  zaobserwowano spadek stężenia glutationu po 30 minutach od naświetlania (kontrola ~37%-LT20; 0,6 $\mu\text{M}$  ~31%- LT20). Natomiast po 2 h od naświetlania zaobserwowano istotny statystycznie wzrost glutationu w kontroli (~150% -LT10, ~200%-LT20) oraz stężenia 0,6  $\mu\text{M}$  (~200%-LT20). Pomiar poziomu glutationu w kolejnych punktach czasowych ulegał stopniowemu zmniejszeniu osiągając po 24 h następujące wartości: dla kontroli ~70%-LT10; ~80%-LT20 oraz dla stężenia 0,6 $\mu\text{M}$  ~70% -DT, LT10, LT20 (rycina 60-61).

PDT z zastosowaniem TG3 w stężeniu 2,5  $\mu\text{M}$  skutkowałą spadkiem stężenia glutationu po czasie 30 minut od naświetlania (~66%-DT, ~58%-LT10, ~24%-LT20). Następnie po upływie 2 godzin zaobserwowano wzrost (~85%-DT; ~98%-LT10; ~81-LT20) (rycina 62). Dla kolejnych punktów czasowych obserwowano spadek stężenia glutationu wraz z upływem czasu, co może sugerować zużycie glutationu w procesach

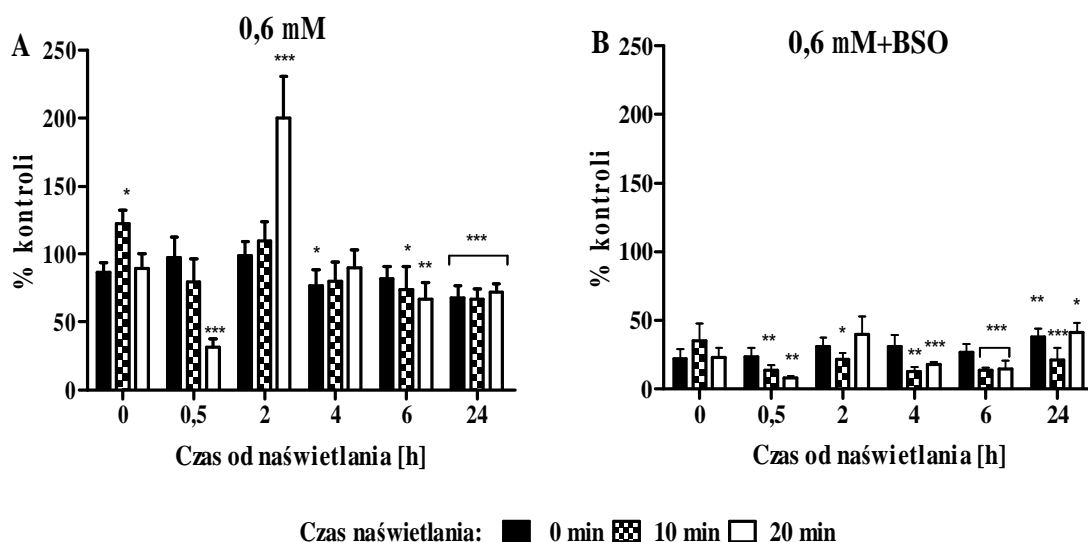
antyoksydacyjnych przy jednoczesnym zaburzeniu prawidłowego funkcjonowania systemu antyoksydacyjnego w komórce odpowiedzialnego za syntezę glutationu.

PDT z zastosowaniem TG3 w stężeniu 5  $\mu\text{M}$  skutkowała spadkiem stężenia glutationu proporcjonalnie do czasu jaki upłynął od naświetlania komórek (po 24h: 74%-DT; ~12%-LT10; ~0,4% -LT20) (rycina 63). Uzyskane wyniki sugerują, bardzo szybkie zużycie rezerw glutationu w obronie komórek przed RFT, a także świadczą o poważnych wolnorodnikowych uszkodzeniach komórek, którym towarzyszy niewydolność mechanizmów odpowiedzialnych za syntezę i "recycling" glutationu zużytego w procesach antyoksydacyjnych.

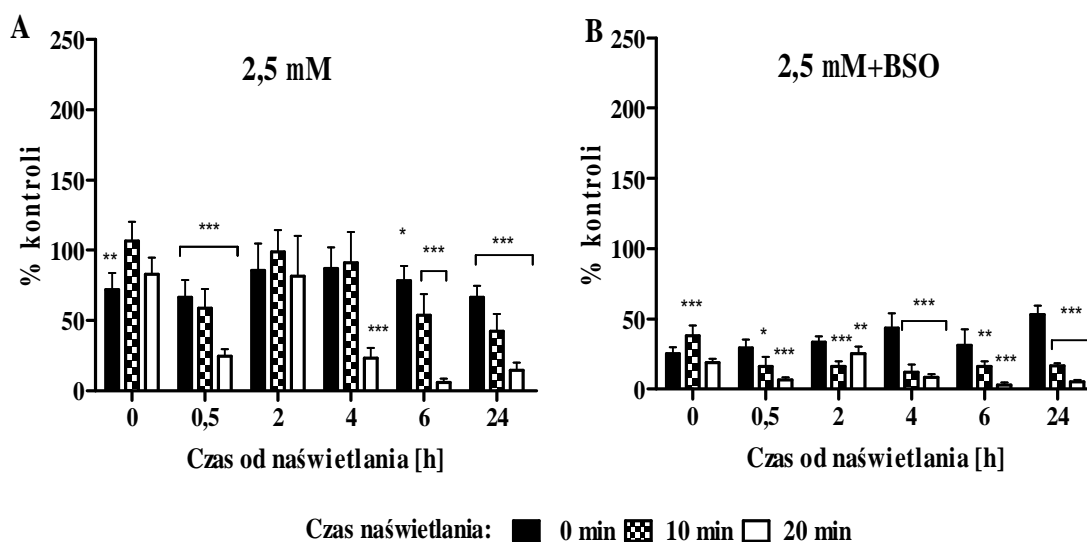


**Rycina 60.** Poziom glutationu w komórkach kontrolnych (A) oraz komórkach preinkubowanych z BSO w stężeniu 1,5 mM (B). Wyniki przedstawiają średnią wartość z dwóch eksperymentów +SD (wyrażone jako % kontroli); istotność statystyczna (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

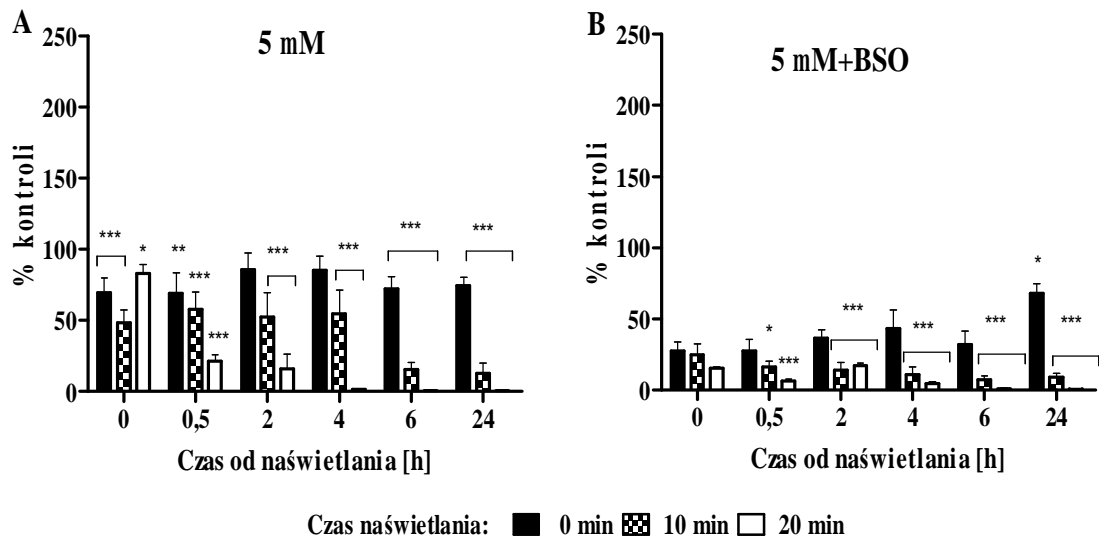




**Rycina 61.** Poziom glutationu w komórkach inkubowanych z TG3 w stężeniu 0,6 $\mu$ M (A) oraz ) oraz komórkach preinkubowanych z BSO w stężeniu 1,5 mM oraz TG3 (B). Wyniki przedstawiają średnią wartość z dwóch eksperymentów +SD (wyrażone jako % kontroli); istotność statystyczna (\* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001).



**Rycina 62.** Poziom glutationu w komórkach inkubowanych z TG3 w stężeniu 2,5  $\mu$ M (A) oraz komórkach preinkubowanych z BSO w stężeniu 1,5 mM oraz TG3 (B). Wyniki przedstawiają średnią wartość z dwóch eksperymentów +SD (wyrażone jako % kontroli); istotność statystyczna (\* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001).



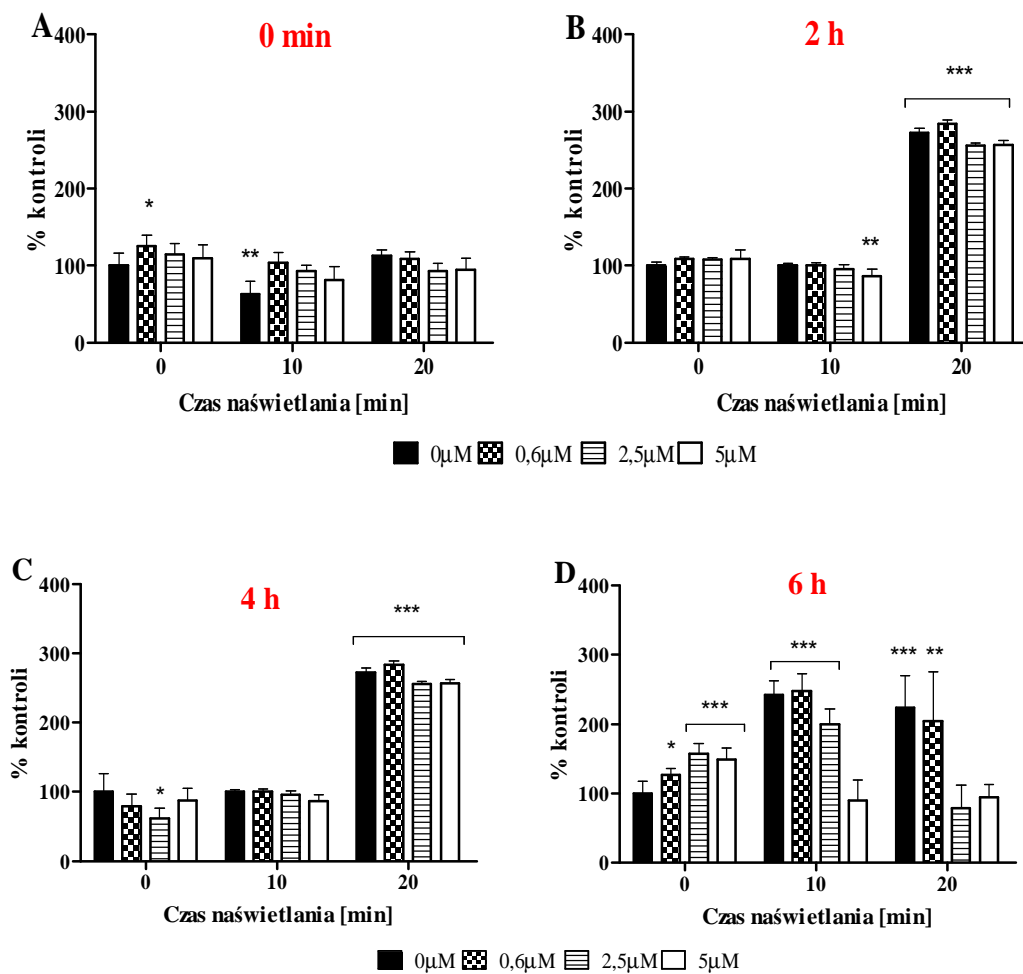
**Rycina 63.** Poziom glutationu w komórkach inkubowanych z TG3 w stężeniu 5  $\mu\text{M}$  (A) oraz komórkach preinkubowanych z BSO w stężeniu 1,5 mM oraz TG3 (B). Wyniki przedstawiają średnią wartość z dwóch eksperymentów +SD (wyrażone jako % kontroli); istotność statystyczna (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

#### **4.21 Poziom tlenu azotu podczas PDT z zastosowaniem związku TG3**

Pomiar stężenia tlenu azotu wykonano za pomocą barwnika DAF-FM DA bezpośrednio po naświetlaniu oraz po 2 h, 4h oraz 6h od naświetlania komórek.

Uzyskane wyniki wykazały, że poziom tlenu azotu zmierzony bezpośrednio po naświetlaniu nie ulega istotnym zmianom. Po 2h oraz 4h zaobserwowano wzrost stężenia NO w komórkach naświetlanych 20 minut (kontroli oraz w całym zakresie stężeń) (rycina 64).

Po 6h od naświetlania zmierzony poziom tlenu azotu uległ istotnie statystycznemu wzrostowi w komórkach nienaświetlanych inkubowanych ze związkiem TG3. W komórkach naświetlanych 10 minut istotny statystycznie wzrost poziomu NO zaobserwowano w kontroli oraz w stężeniu 0,6  $\mu$ M i 2,5 $\mu$ M (rycina 64).

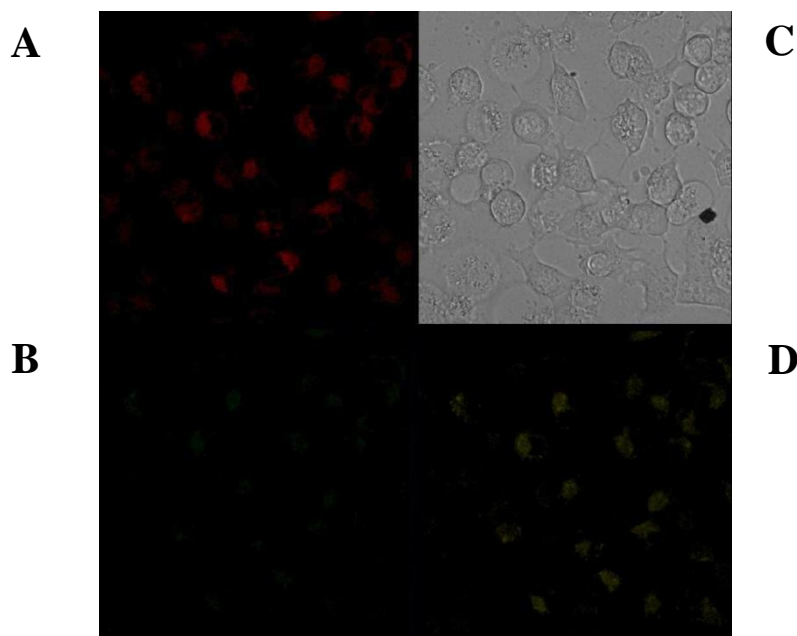


**Rycina 64.** Poziom tlenku azotu zmierzony od razu po naświetlaniu (A), po 2h (B), 4h (C), 6h (D). Wyniki przedstawiają średnią wartość z dwóch eksperymentów +SD (wyrażone jako % kontroli); istotność statystyczna (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

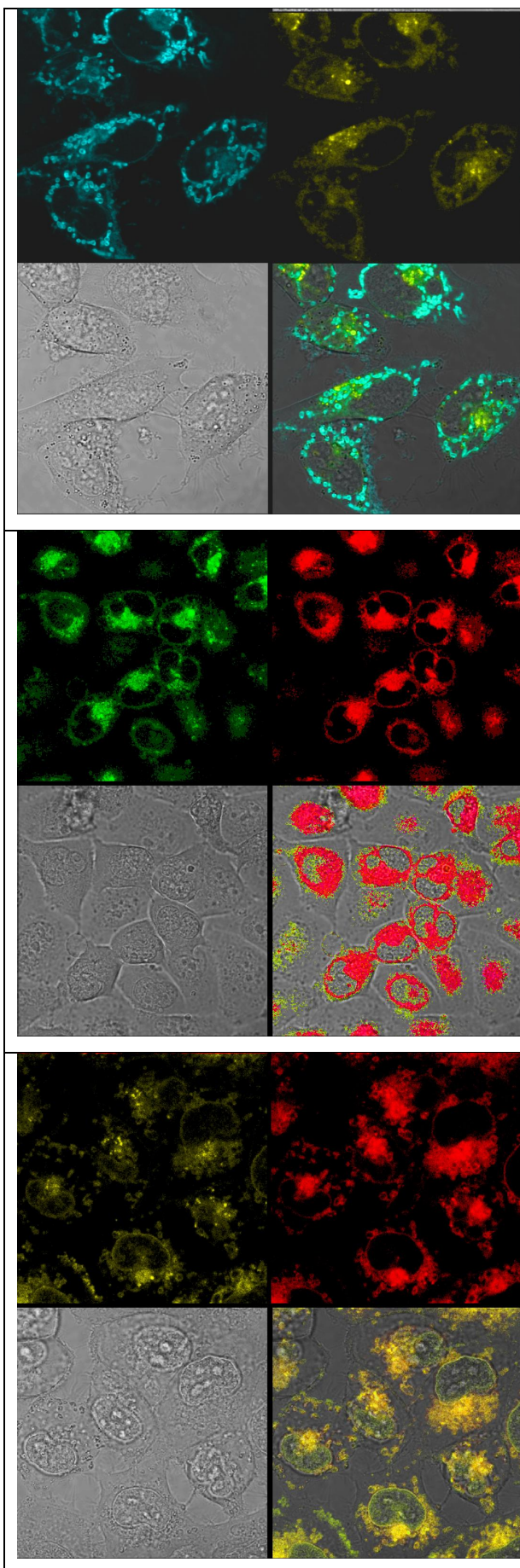
#### 4.22 Subkomórkowa lokalizacja związku TG3

Z celu określenia subkomórkowej lokalizacji związku TG3 komórki LNCaP inkubowano ze znacznikami fluorescencyjnymi pozwalającymi na uwidocznienie odpowiednio mitochondriów – Mitotracker, lizosomów – LysoTracker oraz retikulum endoplazmatycznego- ER-tracker.

Podczas ustalania warunków barwienia zaobserwowano fluorescencję badanego związku TG3 również w kanałach przeznaczonych do obrazowania lizosomów i ER. W efekcie może mieć miejsce wzmocnienie sygnału fluorescencji dla tych organelli podczas barwienia podwójnego: związek TG3-Tracker (rycina 65). W przypadku Mitotrackera związek TG3 nie emitował fluorescencji przy charakterystycznej dla tego znacznika wartości wzbudzenia. Uzyskane wyniki wykazały, że badany związek nie gromadzi się w lizosomach oraz mitochondriach. Otrzymane zdjęcia sugerują natomiast, że po czasie 1 godzinnej inkubacji związek lokalizuje się w cytoplazmie komórek, jak również najprawdopodobniej w retikulum endoplazmatycznym (rycina 66).



**Rycina 65.** Fluorescencja związku obserwowana przy wzbudzeniu: charakterystycznym dla TG3 (A), dla LysoTrackera (B), światło widzialne, (C), dla ER-trackera (D).



**Rycina 66.** Subkomórkowa lokalizacja związku TG3, od góry zestawy zawierają barwienia:

Mitotracker (mitochondria)

Lysotracker (lizosomy)

ER-tracker (retikulum endoplazmatyczne)

Każdy z zestawów zawiera zdjęcie obrazujące wybarwione odpowiednie organelle komórkowe (**lewy górny panel**) zdjęcie obrazujące dystrybucję związku TG3 w komórce (**prawy górny panel**), zdjęcie obrazujące komórki w świetle widzialnym (**lewy dolny panel**) zdjęcie zawierające złożenie wszystkich pozostałych zdjęć (**prawy dolny panel**).

## 5. DYSKUSJA

Intensywny rozwój nauk medycznych prowadzi do coraz lepszego zrozumienia patomechanizmu i czynników wpływających na proces nowotworowy. Coraz pełniejsza wiedza niesie za sobą możliwości opracowywania nowych metod leczenia zapewniających wysoką skuteczność, selektywność i zminimalizowanie działań niepożądanych, poprawiając jednocześnie jakość życia pacjentów. Jedną z metod budzących duże nadzieje jest terapia fotodynamiczna. PDT opiera się na wykorzystaniu związków chemicznych tzw. fotouczulaczy, które w wyniku reakcji fotodynamicznej zainicjowanej pod wpływem zastosowania światła najczęściej z zakresu podczerwieni generują reaktywne formy tlenu i/lub wolne rodniki, prowadząc w efekcie do śmierci komórek nowotworowych (7). Intensywne badania z zakresu PDT w ciągu ostatnich lat przyniosły wiele informacji wyjaśniających mechanizm działania fotouczulaczy, możliwości modulowania ich aktywności oraz wykorzystania w terapii skojarzonej, jednak wiele pytań dotyczących tej obiecującej metody terapeutycznej pozostaje bez odpowiedzi. Określenie możliwości ingerencji w procesy biochemiczne w komórkach nowotworowych jak i ich skutki, są niezbędne dla zrozumienia mechanizmu działania przeciwnowotworowego fotouczulaczy. Bardzo istotne jest poznanie zależności pomiędzy szlakami śmierci komórki będących następstwem zastosowania terapii fotodynamicznej, jak również dostarczenie pełniejszych informacji z zakresu wolnorodnikowych procesów indukowanych podczas reakcji fotodynamicznych. Celem prezentowanej pracy doktorskiej jest ocena mechanizmu działania nowej ftalocyjaniny cynkowej. Prezentowany związek stanowi nową oryginalną strukturę która dotychczas nie była badana, dlatego niezwykle ważne jest poznanie mechanizmu jej działania w komórkach nowotworowych, a uzyskane informacje staną się podstawą do skierowania związku do badań *in vivo* i możliwością oceny potencjalnego zastosowania jako fotouczulacza w PDT.

W początkowej fazie eksperymentów do wstępnych badań cytotoksyczności wybrano cztery związki makrocykliczne z grupy ftalocyjanin (Pcs) zsyntetyzowane w Katedrze Technologii Chemicznej Środków Leczniczych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Testowane ftalocyjaniny klasyfikowane są jako fotouczulacze drugiej generacji i charakteryzują się korzystnymi właściwościami fotochemicznymi takimi jak długi czas życia stanu trypletowego czy wysoka wydajność kwantowa generowania tlenu singletowego (216). Badane związki posiadają skoordynowane jony metali (cynku

lub magnezu), których obecność ma na celu wydłużenie długości życia stanu trypletowego oraz promowanie przejścia międzysystemowego (223). Czynnikiem ograniczającym stosowanie Pcs w wielu przypadkach jest ich niska rozpuszczalność w roztworach wodnych i tendencja do agregacji, a przez to zmniejszenie aktywności fotodynamicznej w układach biologicznych (216;218). W celu poprawy rozpuszczalności badane związki wyposażono w peryferyjne ugrupowania morfolinowe w pozycjach nieperyferyjnych (tj. 1,4) pierścieni ftalocyjaninowych: TG3 (dwie grupy morfolinowe; jon cynku, TG4 (8 grup morfolinowych; jon magnezu), TG18 (8 grup morfolinowych; jon cynku); TG15 (8 grup morfolinowych; jon magnezu; w postaci soli). Uzyskane wyniki badań cytotoksyczności wykazały, że badane związki nie wykazują działania cytotoksycznego w fazie ciemnej (komórki nienaświetlane). Natomiast aktywność cytotoksyczną w połączeniu z naświetlaniem zaobserwowano jedynie dla związku TG3, a siła jego działania cytotoksycznego zależała od czasu naświetlania i zastosowanego stężenia związku.

Istotnym parametrem decydującym o sile działania cytotoksycznego związku chemicznego jest stopień przechodzenia przez błony biologiczne. Badania przeprowadzone dla ftalocyjaniny glinowej AIPs2 w linii komórkowej białaczki CCRF-CEM wykazały najwyższe stężenie związku po 6 godzinach inkubacji. Po 24 godzinach stężenie badanego fotouczulacza nieznacznie się zmniejszyło, natomiast w badaniu cytotoksyczności ten czas inkubacji okazał się być optymalny z punktu widzenia jego skuteczności, co może mieć związek z faktem, że dłuższy czas inkubacji przed naświetlaniem pozwala na osiągnięcie i związanie się ze strukturą docelową (284). Badania zależności pomiędzy dawką AIPs2, a jej wchłanianiem przez komórki nowotworowe w linii komórkowej glejaka BMG-1 wykazały, że wraz ze wzrostem jej stężenia działanie cytotoksyczne i obserwowana fluorescencja uległy zmniejszeniu, co może być związane z tworzeniem agregatów w komórkach (285). Uważa się, że jedynie związki w postaci monomerów są zdolne do emisji fluorescencji i efektywnego generowania tlenu singletowego (122).

Ocenę wchłaniania dwóch związków: TG3 oraz TG4 przez komórki nowotworowe wykonano wykorzystując zdolność obu związków do emisji fluorescencji. Związek TG4 był praktycznie niewykrywalny w lizacie komórkowym, co koreluje z wynikami testu MTT na podstawie, których, stwierdzono jego niską aktywność fototoksyczną. Uzyskane wyniki wskazują, że podstawienie 8 grup



morfolinowych może odpowiadać za bardzo silne właściwości hydrofilowe cząsteczki, zmniejszające jej zdolność do przechodzenia przez błony biologiczne. Interesujące wyniki eksperymentu mającego na celu określenia wchłaniania badanych fotouczulaczy przez komórki nowotworowe uzyskano dla związku TG3, który został oznaczony w lizacie uzyskanym z komórek inkubowanych z tym związkiem w stężeniu 10  $\mu\text{M}$ . Najwyższe stężenie związku TG3 w badanych lizatach komórkowych zmierzono po 6h od podania fotouczulacza. Obecność związku stwierdzono już po najkrótszym czasie inkubacji (2 godzinach), a badania z użyciem mikroskopu konfokalnego wykazały, że związek ulega wchłonięciu już po 60 minutach od podania do medium hodowlanego. Jednocześnie badanie działania cytotoksycznego po różnych czasach inkubacji wynoszących: 2h, 4h, 6h oraz 24h wykazały najsilniejsze działanie po 24-godzinnej inkubacji dla komórek naświetlanych przez 20 minut oraz po 6-godzinnej inkubacji dla komórek naświetlanych przez 10 minut. Znaczny spadek stężenia związku TG3 w badanych komórkach nowotworowych po 24h inkubacji wydaje się sprzecznym wynikiem w odniesieniu do jego aktywności cytotoksycznej zaobserwowanej po tym czasie inkubacji. Biorąc pod uwagę wyniki przedstawione w cytowanych powyżej pracach, można zasugerować, że spadek fluorescencji związku TG3 zmierzony w komórkach LNCaP po 24h może nie wynikać ze zmniejszonego stężenia związku TG3 w komórkach po tym czasie inkubacji, ale może być wynikiem osłabieniem sygnału na skutek związania się związku TG3 z białkami lub innymi biomolekułami. Jednocześnie uzyskane wyniki nie wskazują na agregację związku TG3 wewnątrz komórki, o czym świadczy silne działanie cytotoksyczne po tym czasie inkubacji. Na uwagę zasługują ponadto znaczne różnice w ubytku związku TG3 na skutek naświetlania. Poziom związku TG3 w komórkach inkubowanych z tym fotouczulaczem w stężeniu 10 $\mu\text{M}$  i naświetlanych 10 min obniżył się w stosunku do komórek nienaświetlanych odpowiednio: po 2h o 24%, po 4h o 27%, po 6h o 83% po 24h o 66%.

Badania działania cytotoksycznego związku TG3 rozszerzono o kolejne dwa testy cytotoksyczności: uwalnianie dehydrogenazy mleczanowej (LDH) oraz barwienie błękitem trypanu. Test MTT opiera się na ocenie aktywności dehydrogenazy mitochondrialnej, a spadek aktywności tego enzymu może świadczyć o zaburzeniach aktywności metabolicznej komórek. Test LDH pozwala ocenić integralność błony komórkowej, w wyniku utraty, której enzym ten może zostać uwolniony do medium hodowlanego (254). Po 2h od naświetlania wzrost aktywności LDH zaobserwowano w zakresie wyższych stężeń związku TG3 po 20-minutowym naświetlaniu.

Przeżywalność komórek zmierzona testem MTT dla tych samych stężeń i punktu czasowego była zbliżona do zera, co może sugerować poważne uszkodzenia komórek i spadek integralności błon komórkowych już po 2h od naświetlania w przypadku zastosowania wysokich dawek fotouczulacza. Natomiast wyniki uzyskane po 24 godzinach od naświetlania wskazują, że zmniejszona przeżywalność komórek nowotworowych pod wpływem badanego fotouczulacza w połączeniu z naświetlaniem zmierzona testem MTT koreluje ze zmianami stężenia LDH oznaczonego w medium hodowlanym w zakresie niższych stężeń użytych w eksperymencie, jednak w przypadku wyższych stężeń (takich, które w teście MTT wskazywały na całkowity brak żywych komórek w układzie doświadczalnym) poziom uwolnionego LDH pozostawał w granicach 50% aktywności zmierzonej w próbach zawierających całkowicie zlizowane komórki. Może to być spowodowane zarówno przez zamknięcie cząsteczek enzymu w zdegenerowanych na skutek działania PDT komórkach, (degenerację komórek poddanych PDT, polegającą na tworzeniu kulistych struktur można zauważyć na zdjęciach uzyskanych przy pomocy mikroskopu w świetle widzialnym) lub na skutek degradacji LDH podczas PDT. Za tą drugą hipotezą przemawiać może obserwowany w przypadku komórek naświetlanych przez 20 min zależny od stężenia TG3, wzrost aktywności uwolnionego do pożywki LDH, a następnie spadek aktywności tego enzymu obserwowany po przekroczeniu dawki 2,5  $\mu\text{M}$ . Uzyskane w tej części wyniki sugerują zatem, że błona komórkowa nie jest strukturą docelową dla badanego fotouczulacza, a wolnorodnikowy atak na biologicznie ważne biomolekuły następuje najprawdopodobniej wewnątrz komórki.

Barwienie błękitem trypanu to kolejny wykonany dla TG3 test cytotoxyczności. Wykorzystany barwnik barwi jedynie martwe komórki o uszkodzonych błonach komórkowych lub komórki, które nie są zdolne do usunięcia dyfundującego do ich wnętrza barwnika (256). Uzyskane wyniki sugerują bardzo silne działanie cytotoxyczne, zależne od dawki TG3 i czasu ekspozycji na światło. Badanie wykonane po 24h od naświetlania wykazało wzrost liczby zabarwionych komórek >50% dla stężenia 1,25  $\mu\text{M}$  (10 minut naświetlania) i >50% dla stężenia 0,6  $\mu\text{M}$  (20 minut naświetlania), co odpowiada przeżywalności komórek ocenionej za pomocą testu MTT. Jednocześnie należy zwrócić uwagę, że wzrost liczby wybarwionych komórek może nie świadczyć jedynie o śmierci komórek na drodze nekrozy, ale może być związany z późną fazą apoptozy. Podobna do zastosowanej w tej pracy strategię oceny cytotoxyczności (barwienie komórek przy użyciu błękitu trypanu „na plastiku”

bez przenoszenia ich do hemocytometru) zastosowali Ruiz-Gonzalez i wsp. w badaniu działania cytotoksycznego fotouczulacza  $\text{Py}_3\text{MeO-TB}$  (pochodna porficyny) na komórki HeLa. Zastosowane przez nich barwienie błękitem trypanu wykazało, że w dawce ( $0,5 \mu\text{M}$ ), po dłuższym czasie od naświetlania (18h) komórki były zabarwione pomimo, że ta dawka i czas który upłynął od naświetlania prowadziła do śmierci komórek na drodze apoptozy (220). Analiza tych danych prowadzi do wniosku, że komórki umierające na drodze apoptozy będącej wynikiem działania PDT bardzo szybko tracą zdolność do usuwania błękitu trypanu ze swojego wnętrza, a zjawisko to zachodzi prawdopodobnie szybciej niż utrata aktywności dehydrogenaz mitochondrialnych odpowiedzialnych za redukcję MTT, dodatkowo uwalnianie LDH również nie koreluje z poziomem martwych komórek w badanej populacji. Wyniki uzyskane w testach cytotoksyczności wskazują na silne działanie fototoksyczne związku TG3. Jednocześnie wykazano, istotne różnice w wynikach uzyskanych za pomocą metod opartych na różnych zasadach, co wskazuje jak niezwykle ważny jest wybór testu w badaniach cytotoksyczności podstawowej i prowadzi do wniosku, że w ocenie działania cytotoksycznego fotouczulaczy nie powinno się ograniczać do jednej metody oceny cytotoksyczności. Różnice w wynikach uzyskiwanych po zastosowaniu różnych testów określania cytotoksyczności oraz ograniczenia możliwości stosowania niektórych testów w odniesieniu do czynników działających toksycznie są często podnoszone w piśmiennictwie naukowym (280), a szczególnym problemem okazuje się być w ostatnich latach określanie działania cytotoksycznego nanocząstek (281). Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane w testach MTT, LDH i barwieniu błękitem trypanu zdecydowano się określić wpływ związku TG3 na cykl komórkowy. Badanie wpływu pochodnej ftalocyjaniny cynkowej (suftalan cynku, Photosense) na fazy cyklu komórkowego wykazały zahamowanie cyklu komórkowego w fazie  $G_2/M$  w komórkach linii nowotworu wątroby HepG2 (282). Podobne wyniki uzyskano również dla ftalocyjaniny cynkowej (ZnPc) dla tej samej linii komórkowej (283). PDT z zastosowaniem tetra- $\alpha$ -(4-karboksyfenoksy)ftalocyjaniny cynkowej prowadziło do zahamowania cyklu komórkowego w fazie S w linii nowotworu wątroby Bel-7402 (284). PDT może wpływać na cykl komórkowy w wyniku oddziaływania na białka związane z jego regulacją, w tym białek p53 i p21. PDT z zastosowaniem feoforbidu prowadziła do zahamowania cyklu komórkowego w fazie  $G_2/M$  oraz wzrost poziomu białka p53 (285). Natomiast badania *in vivo* aktywności cytotoksycznej ftalocyjaniny Pc4 wykazały, że powoduje ona śmierć komórek na drodze niezależnej od poziomu

białek p53 i p21 (286). Wyniki uzyskane dla związku TG3 sugerują, że nie wpływa on na poszczególne fazy cyklu komórkowego. Analiza faz cyklu komórkowego wykazała wzrost liczby komórek wybarwionych jodkiem propidyny wraz ze wzrostem dawki fotouczulacza, czasu naświetlania i czasu, który upłynął od naświetlania. Ahmad i wsp. zaobserwowali zahamowanie cyklu komórkowego w komórkach nowotworu skóry A431 w fazie G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> poddanych PDT przy użyciu ftalocyjaniny krzemowej Pc4, czemu towarzyszyło zahamowanie aktywności dwóch kinaz: CDK2 oraz CDK6, które najprawdopodobniej było wynikiem wzrostu poziomu białka p21 (287). Badania poziomu białka p53 i p21 w komórkach LNCaP poddanych PDT przy użyciu związku TG3 wykonane za pomocą opisanego powyżej i zastosowanego w tej pracy panelu apoptotycznego nie wykazały wzrostu poziomu obu białek. Aktywacja białka p53 może być wynikiem: podwyższenia jego poziomu lub stabilizacji struktury, przejścia z formy nieaktywnej do postaci aktywnej, oraz translokacji białka z cytoplazmy do jądra komórkowego (288). Zmierzony poziom białka p53 po 24h od naświetlania nie wyklucza jego udziału w procesach związanych ze śmiercią komórek podczas PDT-TG3, biorąc pod uwagę, że białko p53 mogło być aktywowane wcześniej oraz z upływem czasu ulec degradacji. Ocena udziału białka p53 w PDT-TG3 wymaga przeprowadzenia kolejnych, bardziej szczegółowych eksperymentów.

Terapia fotodynamiczna może prowadzić do śmierci komórek na drodze kilku, istotnie różniących się od siebie szlaków śmierci: apoptozy, nekrozy, nekroptozy (regulowanej nekrozy) oraz autofagii, a typ śmierci komórki, zależy do właściwości zastosowanego związku chemicznego, zastosowanej dawki, mocy promieniowania świetlnego oraz czasu naświetlania (53). Badania fotouczulacza purpuryny-18 (Pu18) wykazały jej zdolność do indukcji apoptozy w zakresie stężeń oscylujących wokół 0,5  $\mu$ M i nekrozy przy użyciu stężenia fotouczulacza zbliżonego do 2  $\mu$ M podczas PDT wobec komórek białaczki promielocytarnej HL-60 (289). Fabris i wsp. wykazali, że ftalocyjanina cynkowa ZnPc podana do medium hodowlanego 2 godziny przed naświetlaniem prowadziła do nekrozy komórek charakteryzującej się utratą integralności błony komórkowej i spadkiem poziomu ATP w komórkach fibroblastów w linii R4. Natomiast 24-godzinna preinkubacja skutkowałą aktywacją procesu apoptozy jako dominującej drogi śmierci komórek (290). Biorąc pod uwagę pytania o mechanizm działania cytotoksycznego związku TG3 jakie powstały po analizie danych uzyskanych w eksperymentach testach MTT, LDH, barwieniu błękitem trypanu oraz badaniu jego wpływu na cykl komórkowy, celowe wydało się użycie dodatkowych

metod pozwalających na określenie mechanizmu śmierci komórek nowotworowych na skutek PDT prowadzonej z użyciem związku TG3. Zdolność badanego związku do indukcji apoptozy oceniono za pomocą dwóch metod: podwójnego barwienia Hoechst 33258/jodek propidyny oraz testem ELISA. Wyniki uzyskane metodą barwienia fluorescencyjnego wykazały obecność komórek apoptotycznych już po 2h od naświetlania (10 minut) w hodowli do której podano związek TG3 najwyższym badanym w tej pracy stężeniu 5  $\mu\text{M}$ , natomiast w kolejnych ocenianych punktach czasowych: 6h i 24h oraz przy czasie naświetlania 20 minut obserwowano stopniowy spadek liczby komórek apoptotycznych i pojawianie się komórek które mogły być ocenione jako nekrotyczne/późno apoptotyczne. Po zastosowaniu związku TG3 w stężeniu 2,5  $\mu\text{M}$  wzrost komórek apoptotycznych zaobserwowano po 6h i naświetlaniu 10 minut, natomiast po 24h ilość komórek apoptotycznych była zbliżona do liczby komórek nekrotycznych dla tego czasu naświetlania. Natomiast użycie związku TG3 w stężeniu 2,5  $\mu\text{M}$  przy 20 minut naświetlania prowadziło do wzrostu ilości komórek apoptotycznych po 2h i następnie wraz z upływem czasu po 6h i 24h zaobserwowano podwyższenie liczby komórek nekrotycznych/późno apoptotycznych. Najniższe stężenie związku TG3- 0,6  $\mu\text{M}$  prowadziło do indukcji apoptozy jedynie po 24h i dłuższym naświetlaniu (20 min).

Wyniki uzyskane za pomocą testu ELISA wykonanego po 24h od naświetlania komórek inkubowanych ze związkiem TG3 wykazały korelację z wynikami uzyskanymi metodą podwójnego barwienia fluorescencyjnego: dłuższy czas naświetlania (20 min) indukował apoptozę w najniższym stężeniu (0,6  $\mu\text{M}$ ), natomiast 10 minut naświetlania w zakresie wyższych stężeń (2,5  $\mu\text{M}$ ; 5  $\mu\text{M}$ ). Wyniki uzyskane za pomocą obu metod wskazują, że wraz ze wzrostem czasu naświetlania i stężenia fotouczulacza oraz czasu, który upłynął od naświetlania rodzaj śmierci komórek ulega przesunięciu w kierunku śmierci na drodze innej niż apoptoza. Jest to prawdopodobnie związane z faktem, że wysokie stężenie fotouczulacza przy dłuższym czasie naświetlania prowadzi do bardzo poważnych dysfunkcji komórek i fotoksydacyjnych uszkodzeń białek zaangażowanych w proces apoptozy, czy autofagii.

Proces apoptozy podczas PDT może przebiegać szlakiem wewnętrznym (mitochondrialnym) oraz zewnętrznym (receptorowym) (53). W szlaku wewnętrznym apoptozy można zaobserwować spadek potencjału błony mitochondrialnej, uwolnienie cytochromu *c*, wzrost aktywności kaspazy-9 oraz kaspazy-3 (59). Mechanizm działania

licznych fotouczulaczy jest związany z aktywacją mitochondrialnego szlaku apoptozy (53). Badania pochodnych ftalocyjaniny krzemowej Chol-O-SiPc wykazały spadek potencjału błony mitochondrialnej, uwolnienie cytochromu *c* oraz wzrost aktywności kaspazy-9 po naświetlaniu komórek nowotworu skóry SK-MEL-2 (291). PDT z zastosowaniem pochodnej ftalocyjaniny cynkowej- ZnPcS<sub>2</sub>P<sub>2</sub> w linii komórkowej HL60 (292), pochodnej chloryny NeP6 w komórkach 1c1c7 (293) i komórkach nowotworu płuc ASTC-a-1 (294), jak również pochodnej hipokreliny EAHB w komórkach HeLa (295) prowadziła do aktywacji wewnętrznego szlaku apoptozy. W celu oceny zdolności związku TG3 do skierowania komórek na drogę apoptozy związanej z aktywacją szlaku wewnętrznego wykonano badanie zmiany potencjału błony mitochondrialnej, pomiar aktywności kaspazy-9 oraz kaspazy-3.

Utrata potencjału transbłonowego mitochondriów ( $\Delta\psi$ ) jest uważana za wczesny marker apoptozy (296). Zakaria i wsp. opisali utratę  $\Delta\psi$ , która wystąpiła w komórkach raka piersi MCF-7 poddanych PDT za pomocą kwasu 5-aminolewulinowego po 4 h od naświetlania (297), natomiast He i wsp wykazali spadek  $\Delta\psi$  w komórkach U937 poddanych działaniu PDT z użyciem hydroksyfeoforbidu już po 60 min po naświetlaniu (160). Alexandratou i wsp. zaobserwowali spadek  $\Delta\psi$  w ciągu 15 minut od naświetlania fibroblastów linii HFFF2 poddanych działaniu ZnPc (298).

Uzyskane wyniki dla związku TG3 wykazały, że już po 45 min. od naświetlania potencjał błony mitochondrialnej uległ obniżeniu w zależności od dawki i czasu naświetlania. Dla czasu naświetlania 10 min i 20 min dla stężeń 2,5  $\mu$ M oraz 5  $\mu$ M potencjał błony mitochondrialnej uległ obniżeniu o prawie 100% w stosunku do kontroli i ponad 50% dla stężenia 0,6  $\mu$ M. Następstwem utraty  $\Delta\psi$  jest aktywacja kaspaz w tym kaspazy-9, a następnie kaspazy-3, dlatego badanie ich aktywności było kolejnym krokiem zmierzającym do wyjaśnienia mechanizmu śmierci komórek poddanych PDT z użyciem TG3. Badanie aktywności kaspazy-9 wykazało istotny wzrost aktywności tego enzymu po czasie 2 godzin od naświetlania, a najwyższą aktywność zaobserwowano dla stężenia 2,5  $\mu$ M i czasu naświetlania 20 minut. Pomiar aktywności po czasie 4 h od naświetlania nie wykazał różnic względem kontroli, a ponadto w najwyższym stężeniu i dłuższym czasie naświetlania zaobserwowano spadek aktywności kaspazy-9. Uzyskany wynik sugeruje, możliwość uszkodzeń tego enzymu pod wpływem RFT generowanych przy najwyższym stężeniu badanego związku i dłuższej ekspozycji na światło. Pomiar aktywności kaspazy-3 wykonano po

dwóch czasach od naświetlania: 12 i 24 godzin. Po 12 godzinach zaobserwowano istotny wzrost aktywności enzymu dla stężenia 2,5  $\mu\text{M}$  i czasu naświetlania 20 minut. Natomiast aktywność enzymu po czasie 24h od naświetlania wzrosła dla stężenia 0,6  $\mu\text{M}$  i 2,5  $\mu\text{M}$  (10 i 20 minut naświetlania). Dla najwyższego badanego stężenia aktywność kaspazy-3 uległa zmniejszeniu, co również może sugerować fotoksydacyjne uszkodzenia enzymu. Bardzo interesujące wydawało się zestawienie danych uzyskanych w tych eksperymentach, których zasada była oparta na enzymatycznym rozkładzie substratu dla kaspazy-3 do fluorescencyjnego produktu i pomiarze jego stężenia z użyciem fluorymetru z danymi uzyskanymi w eksperymencie, w którym został użyty oparty o metodę Western blot panel apoptotyczny. Wyniki uzyskane w tej drugiej metodzie wykazały istotny statystycznie wzrost stosunku kaspaza-3 aktywna/prokaspaza-3 jedynie w przypadku komórek traktowanych TG3 w stężeniu 2,5  $\mu\text{M}$  i naświetlanych przez 20 min. Różnica ta, która bez wątplenia ma swoje źródło w fakcie, że obie metody oparte są na różnych zasadach jest trudna do wyjaśnienia na podstawie uzyskanych obecnie danych. Pomimo, że metody enzymatyczne używane do oceny aktywności kaspaz, są często określane jako „caspase like” to zastosowanie w oznaczeniu specyficznego inhibitora kaspazy-3 i uwzględnienie uzyskanych dla nich wyników pozwala na uznanie tych pomiarach wartości jako wartości będących wynikiem właściwej aktywności enzymatycznej tych kaspaz. Z drugiej strony wyniki uzyskane w metodzie Western blot uważanej za specyficzną, wydają się przeczyć wynikom uzyskanym w metodzie enzymatycznej. Dla wyjaśnienia tych wątpliwości konieczne są dalsze badania np. z użyciem rozkładanego do fluorescencyjnego produktu substratu dla kaspaz i mikroskopu fluorescencyjnego wyposażonego w inkubator pozwalający na ciągłą obserwację tej samej komórki, wydaje się, że pomocne mogą być oznaczenia wykonane za pomocą klasycznej metody Western blot wykonane po kilku dodatkowych punktach czasowych.

Terapia fotodynamiczna może wpływać na aktywność i poziom licznych białek, w tym istotnych w procesie apoptozy i autofagii białek z rodziny Bcl-2 (53). Badania ftalocyjaniny Pc4 przeprowadzone przez Ferrario i wsp wykazały, że podczas PDT z zastosowaniem tego fotouczulacza może dochodzić do obniżenia poziomu białka Bcl-2, prawdopodobnie na skutek uszkodzeń oksydacyjnych, jednocześnie białko Bax w tych komórkach nie ulegało uszkodzeniu (299). Autorzy tej pracy sugerują, że spadek poziomu białka Bcl-2 może prowadzić do zmiany stosunku obu białek (Bax/Bcl-2) na korzyść działania proapoptotycznego. Podobne wyniki uzyskali Kessel i wsp. dla

fotouczulaczy: SnET2 (pochodna etiopurpuryny), CPO (porficyna) oraz *m*THPC (300). Także fotoksydacyjne uszkodzenia białka Bcl-2 pod wpływem PDT z zastosowaniem Photofrinu oraz ATX-s10 (pochodna chloryny) skutkowały śmiercią komórek na drodze apoptozy (149;301). Ponadto, białka z rodziny Bcl-2: Bcl-2 oraz Bcl-xL są zaangażowane w proces autofagii. Uważa się, że oba białka mogą hamować proces autofagii poprzez blokowanie połączenia się Bekliny-1 z białkiem hVps34 oraz zmniejszenie powinowactwa białka UVRAG do Bekliny-1 i jej stabilizację w postaci dimerów (302). Uszkodzenia fotoksydacyjne podczas PDT z zastosowaniem fotouczulaczy gromadzących się głównie w ER oraz mitochondriach mogą w wyniku uszkodzenia Bcl-2 promować zarówno proces apoptozy oraz autofagii (111). Wyniki uzyskane w tej pracy wskazują, że TG3 może prowadzić do zmniejszenia poziomu białka Bcl-2 oraz Bcl-xL, co jest czynnikiem, który może sprzyjać śmierci komórek na drodze autofagii oraz apoptozy.

Białko Bcl-2 odgrywa zatem istotną rolę w procesach związanych ze śmiercią komórek podczas PDT. W związku z tym wpływ na poziom i aktywność białka są jedną z interesujących możliwości zwiększenia efektywności PDT. Badanie wpływu inhibitora białka Bcl-2 związku HA14-1 w mysiej linii komórkowej białaczki L2210 wykazało, zwiększenie siły działania wykorzystanej w badaniu porficyny, fotouczulacza gromadzącego się w ER (303).

Opublikowane w 2013 roku wyniki badań nad niskocząsteczkowym inhibitorem białka Bcl-2 –określanym skrótem ABT-199 wskazują że związek ten może dodatkowo uwrażliwiać komórki nowotworowe na działanie terapii przeciwnowotworowych (304). ABT-199 jest uważany za czynnik nie powodujący trombocytopenii, a główny nurt badań nad jego aktywnością skierowany został w stronę terapii nowotworów hematologicznych (263;304;305). Dotychczasowo opublikowano jedynie 3 prace (2 w 2013r i jedną w 2014 r) opisujące możliwość zastosowania ABT-199 w terapii nowotworów innych niż hematologiczne (306-308) i jak dotąd nie opublikowano jeszcze raportu dotyczącego zastosowania ABT-199 w PDT. Badanie wpływu ABT-199 nie wykazało wzrostu siły działania fototoksycznego związku TG3. Wyniki wykazały, jednak, że bardzo istotnym czynnikiem wpływającym na działanie ABT1-99 w zastosowanym w tej pracy modelu doświadczalnym jest czas pre-inkubacji komórek z tym inhibitorem. W sytuacji, kiedy inhibitor podano 2 godziny przed naświetlaniem nie wykazano różnic w sile działania TG3. Natomiast w doświadczeniu w którym ABT-



199 podano do pożywki hodowlanej 24h przed naświetlaniem zaobserwowano wzrost przeżywalności komórek podczas PDT. Uzyskany wynik może sugerować, że dłuższy czas inkubacji prowadzi do zahamowania białka Bcl-2, a następnie w celu utrzymania homeostazy w komórce uruchomienie mechanizmu cytoprotekcyjnego i w efekcie obniżenie siły działania TG3. Wynik może także sugerować, że białko Bcl-2 podczas PDT z zastosowaniem TG3 ulega degradacji i jego zahamowanie nie wpływa na siłę działania cytotoksycznego. Uzyskany wynik pozwala jedynie na sformułowanie wstępnych hipotez i wymaga wyjaśnienia poprzez przeprowadzenia dodatkowych eksperymentów, w tym potwierdzenia wpływu ABT-199 na poziom Bcl-2 np. techniką Western blot lub ELISA.

PDT z zastosowaniem TG3 w stężeniu 0,6  $\mu$ M oraz 2,5  $\mu$ M spowodowała istotny spadek poziomu antyapoptotycznych białek z rodziny IAPs (surwiwiny, liwininy, cIAP-1, cIAP-2, XIAP). W komórce poziom tych białek podlega kontroli przez białka proapoptotyczne Smac/DIABLO oraz HtrA2/Omi (63;309). W komórkach w których zastosowano związek TG3 w stężeniu 0,6  $\mu$ M zaobserwowano widoczny, ale nieistotny statystycznie wzrost poziomu białka Smac/Diablo oraz spadek poziomu HtrA2/Omi. W wyniku PDT z zastosowaniem związku TG3 w stężeniu 2,5  $\mu$ M zaobserwowano istotny statystycznie spadek obu białek proapoptotycznych. Obniżenie poziomu Smac/Diablo oraz HtrA2/Omi może być związane ze związaniem docelowych białek antyapoptotycznych (310).

Za jeden z możliwych mechanizmów oporności na PDT uważa się poziom białka surwiwiny, który może ulegać podwyższeniu podczas PDT (182;183). Badania z wykorzystaniem dwóch fotouczulaczy Photofrin, NPe6 oraz 7-alliloamino-17-demetoksygeldanamycyny (17-AAG) - inhibitora białka HSP90 wykazało, że zastosowanie tych fotouczulaczy prowadziło do spadku poziomu białek pozostających pod kontrolą HSP90 - ufosforylowanej formy surwiwiny, białka Akt oraz Bcl-2 w komórkach nowotworu piersi BT-474 (183). Jednocześnie spadek poziomu tych białek był związany z nasileniem działania cytotoksycznego i indukcji apoptozy (183). Solar i wsp. wykazali wzrost poziomu surwiwiny w komórkach SKBR-3 pod wpływem PDT z zastosowaniem hiperycyny. Inkubacja z innym inhibitorem białka Hsp90- 17-dimetyloaminoetylaomino-17-demetoksygeldanamycyną (17-DMAG) prowadziła do spadku poziomu surwiwiny, p-ERK1/2 oraz białka Akt przy jednoczesnym wzroście działania cytotoksycznego hiperycyny (311). Ponadto,

wyciszenie genu surwiwiny w komórkach nowotworu skóry YUSAC2/T34A z jednoczesnym zastosowaniem Photofrinu oraz NPe6 prowadziło do nasilenie działania cytotoksycznego. Badania nad PDT z zastosowaniem metyloвого estru kwasu 5-aminolewulinowego wykazały wzrost apoptozy w komórkach linii nowotworu piersi T47D z wyciszonym genem surwiwiny. Natomiast nadekspresja surwiwiny korelowała ze zwiększoną przeżywalnością komórek poddanych PDT (182). W komórkach raka kolczystokomórkowego skóry SCC-13 niewrażliwych na PDT z zastosowaniem metyloвого estru kwasu 5-aminolewulinowego wykazano między innymi wzrost poziomu ufosforylowanej aktywnej formy białka, co może być jednym z czynników oporności na terapię (312). Wykazano, że poziom surwiwiny może ulegać zmniejszeniu podczas zainicjowania apoptozy w wyniku stresu oksydacyjnego w badaniach nanocząsteczek tlenku cynku wobec komórek A549 (313) oraz podczas stresu oksydacyjnego indukowany przez H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w komórkach T24 (314).

PDT z zastosowaniem TG3 w stężeniu 0,6 μM oraz 2,5 μM po 24h naświetlania trwającego 20 minut spowodowała spadek poziomu surwiwiny w badanych komórkach. Obniżenie poziomu tego białka może być związane z silnym stresem oksydacyjnym w komórkach nowotworowych oraz oksydacyjnym uszkodzeniem tego białka. Z drugiej strony biorąc pod uwagę liczne, zacytowane powyżej, doniesienia naukowe, podczas PDT obserwuje się zwykle wzrost poziomu surwiwiny, która według niektórych badaczy wiązana jest z mechanizmem oporności na PDT (182;183). Uzyskany wynik w świetle badań nad rolą surwiwiny w PDT wydaje się niezwykle interesujący, wymaga jednak przeprowadzenia licznych dodatkowych eksperymentów w celu określenia wpływu PDT-TG3 na poziom surwiwiny i wyjaśnienia dalszych konsekwencji jakie niesie za sobą spadek po ewentualnego mechanizmu interakcji pomiędzy PDT-TG3, a surwiwiną.

Barwienie jodkiem propidyny oraz analiza faz cyklu komórkowego wskazują, że wzrost dawki fotouczulacza i długości czasu ekspozycji na światło jest związany ze wzrostem liczby komórek które mogą być zaklasyfikowane jako nekrotyczne. W celu sprawdzenia w jaki sposób zahamowanie nekrotycznej śmierci komórki wpływa na cytotoksyczne działanie TG3 wykonano eksperyment z zastosowaniem związku Necrox-2 należącego do opisanej po raz pierwszy w 2010 roku (na podstawie bazy PubMed) grupy związków, których działanie hamujące na proces nekrozy i (lub) nekroptozy przypisywane jest ich właściwościom antyoksydacyjnym (315;316).

Na uwagę zasługuje fakt, że wśród ciągle jeszcze bardzo małej liczby doniesień opisujących aktywność biologiczną tej grupy związków nie znaleziono doniesień naukowych, w których zastosowano Necrox-2 lub jego analog w badaniach związanych z PDT. Uzyskane wyniki wykazały, że inkubacja z komórek z tym inhibitorem 2 godziny przed naświetlaniem zwiększała przeżywalność komórek inkubowanych z wyższymi dawkami fotouczulacza naświetlanych przez 10 minut. Natomiast po 20 minutach jedynie w stężeniu 2,5  $\mu\text{M}$  zaobserwowano wzrost przeżywalności. Dłuższy czas inkubacji z inhibitorem wynoszący 24 godziny przed naświetlaniem spowodował istotny statystycznie wzrost przeżywalności komórek jedynie w najniższym badanym stężeniu (0,6  $\mu\text{M}$ ) i najdłuższym czasie naświetlania (20 minut). Wyniki sugerują, że dłuższa ekspozycja na światło przy najwyższym badanym stężeniu prowadzi do uszkodzeń komórek, przed którymi dodatek tego inhibitora nie jest w stanie uchronić. Jednocześnie największy wpływ inhibitora zaobserwowano w przypadku krótszego czasu inkubacji przed naświetlaniem, co może być związane z właściwościami samego inhibitora, jego kumulowaniem w określonych strukturach komórkowych (najprawdopodobniej w mitochondriach) w zależności od czasu pre-inkubacji czy procesom metabolicznym prowadzącym do zmiany jego aktywności. Uzyskane w tym eksperymencie wyniki wydają się potwierdzać istotny udział procesów nekrozy i nekroptozy w mechanizmie działania TG3-PDT.

Jedną z możliwych dróg śmierci podczas PDT jest autofagia. Proces ten może jednak także umożliwić przetrwanie komórki poddanej czynnikom toksycznym może więc też ochronić przed śmiercią komórki poddane PDT (103). Znajomość udziału tego procesu w eliminacji komórek poddanych PDT wydaje się mieć niezwykle istotne znaczenie ponieważ modulowanie ścieżek przekazywana sygnałów zaangażowanych w autofagię pozwoli z jednej strony na dodatkowe uwrażliwienie komórek na PDT z drugiej strony może ułatwić eliminację zjawiska oporności na PDT (317-319). Biorąc pod uwagę powyższe informacje wykonano eksperyment mający na celu sprawdzenie wpływu inhibitora autofagii na działanie cytotoksyczne związku TG3. Badanie przeprowadzono za pomocą spautyny-1, która inaktywuje zaangażowane w proces autofagii proteazy USP10 oraz USP13 prowadząc w efekcie degradacji kluczowego dla przebiegu autofagii kompleksu Beklina-1-PI3KC3 (320). Inhibitor podawano w trzech stężeniach: 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  oraz 2,5  $\mu\text{M}$ , 1 godzinę przed naświetlaniem. Uzyskane wyniki wykazały zmniejszenie przeżywalności komórek nienaświetlanych inkubowanych ze związkiem TG3. Obserwowane efekty mogą wynikać z istotnej roli

procesu autofagii w prawidłowym funkcjonowaniu zdrowych komórek, zgodnie z opisanym powyżej założeniem, że proces ten pozwala na utrzymanie równowagi pomiędzy syntezą oraz degradacją istotnych dla komórki białek czy całych organelli komórkowych. Spautyna-1 w każdym użytym stężeniu spowodowała istotny statystycznie wzrost przeżywalności komórek w przypadku dawki 2,5  $\mu\text{M}$  i krótszego czasu naświetlania (10 minut). W przypadku komórek naświetlanych 20 minut zaobserwowano widoczny, ale nieistotny statystycznie wzrost przeżywalności komórek. Uzyskane wyniki sugerują, że jedną z możliwych dróg śmierci komórek pod wpływem PDT-TG3 może być proces autofagii, która istotnie zależy od czasu naświetlania i użytej dawki. Zaangażowanie procesu autofagii w śmierć komórek poddanych PDT-TG3 sugeruje także, że nie można wykluczyć sytuacji w której, autofagia będzie czynnikiem chroniącym komórki nowotworowe przez PDT z użyciem związku TG3. Sytuacja taka może mieć miejsce np. w warunkach *in vivo*, na skutek trudniejszej niż w warunkach *in vitro* dystrybucji fotouczulacza lub trudniejszego przenikania światła do tkanki nowotworowej.

Terapia fotodynamiczna może prowadzić do zmian struktury białek cytoszkieletu. PDT z zastosowaniem ftalocyjaniny cynkowej w komórkach nowotworu szyjki macicy HeLa prowadziła do uszkodzeń białek tworzących cytoszkielet komórek: aktyny, tubuliny, keratyny oraz aktyniny (131). Dezintegracja struktury cytoszkieletu zwłaszcza mikrotubul oraz filamentów pośrednich mogła być związana z depolimeryzacją mikrotubul do  $\alpha$  i  $\beta$ -tubuliny, oraz filamentów pośrednich do G-aktyniny lub być wynikiem bezpośredniego uszkodzenia tych struktur podczas PDT (131). Ponadto, zaobserwowano wzrost indeksu mitotycznego, który interpretowany był jako wynik uszkodzenia mikrotubul, struktur, które odgrywają istotną rolę podczas podziałów komórkowych. Badania pyrofeoforbidu a, skoniugowanego z inhibitorem specyficznego antygenu błony komórkowej prostaty (PSMA; ang. prostate specific membrane antigen) w modelu hodowli komórek nowotworu prostaty LNCaP wykazały zmiany i zaburzenia w strukturze mikrotubul ( $\alpha$ - i  $\beta$ -tubuliny), mikrofilamentów (aktyny), oraz filamentów pośrednich (cytokeratyny 8/18), które mogły prowadzić do śmierci komórek (321). Reorganizacja struktur wchodzących w skład cytoszkieletu w tym tubulin i aktyny może być także wynikiem degradacji tych białek przez kaspazy wykonawcze podczas apoptozy (321;322).

Ocena zmian w strukturze cytoszkieletu podczas PDT z zastosowaniem TG3 w oparciu o barwienie  $\alpha$ -tubuliny po 6h od naświetlania wykazała zaburzenia prawidłowej struktury cytoszkieletu. Jednocześnie badania fazy cyklu komórkowego dla tego samego punktu czasowego nie wykazały wzrostu liczby komórek znajdujących się w fazie G<sub>2</sub>/M w związku z tym można przypuszczać, że obserwowane zmiany mogą w większym stopniu wynikać zarówno z bezpośrednich oksydacyjnych uszkodzeń tubuliny i (lub) z aktywności kaspaz wykonawczych niż ze specyficznego wiązania się z mikrotubulami wrzeciona podziałowego jako struktury docelowej dla TG3 i jego uszkodzeniem.

Mechanizm działania fotouczulaczy opiera się w przypadku większości związków na generowanych w wyniku reakcji I oraz II typu, reaktywnych form tlenu i/lub wolnych rodników (7). W związku z tym PDT praktycznie zawsze prowadzi do indukcji stresu oksydacyjnego w komórkach (110;323). Zdolność badanego związku do generowania stresu oksydacyjnego zbadano za pomocą barwienia dioctanem 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (DCFH-DA), bezpośrednio po naświetlaniu oraz po 0,5h; 2h; 4h; 6h oraz 24h od naświetlania. DCFH-DA łatwo przenika do komórki, gdzie następuje jego hydroliza do 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (DCFH) katalizowana przez niespecyficzne esterazy. Dwuelektronowe utlenienie DCFH prowadzi do powstania fluorescencyjnego produktu dichlorofluoresceiny, której obecność może zostać wykryta za pomocą całego szeregu metod badawczych, których zasada oparta jest o fluorescencję (324). Wybór DCFH-DA jako narzędzia do wstępnego prześledzenia równowagi redoks w komórkach poddanych PDT-TG3 podyktowany został dwoma względami: stosunkowo "szerokim spektrum" RFT, których obecność może być wykazana przy użyciu tego związku (324) oraz faktem, że jest on powszechnie używany co sprawia, że wyniki eksperymentów z jego użyciem bardzo często są opisywane w piśmiennictwie, a to umożliwia porównanie uzyskanych wyników z doświadczeniami innych badaczy (153;325;326). Wzrost stresu oksydacyjnego zaobserwowano bezpośrednio oraz po 30 min od naświetlania. Obserwowany stopniowy spadek sygnału wraz z czasem jaki minął od naświetlania może wynikać z jednej strony z faktu zanikania bardzo krótko żyjących RFT, z drugiej strony analiza zdjęć uzyskanych w trakcie realizacji tej pracy może sugerować, uszkodzenia esteraz biorących udział w utworzeniu DCFH reagującej następnie z wolnymi rodnikami. Za tą ostatnią hipotezą może przemawiać także obserwacja komórek kontrolnych w tym eksperymencie wskazująca na istnienie stałego

niewielkiego stresu oksydacyjnego w komórkach, które nie zostały poddane PDT. Fakt, że komórki nowotworowe znajdują się w ciągłym niewielkim stresie oksydacyjnym jest powszechnie akceptowany (327), a wyniki obserwacji dokonanych w tej pracy w przypadku komórek kontrolnych, a zatem powstawanie fluorescencyjnego produktu w komórkach w których nie zaindukowano powstawania RFT są zgodne z tym podglądem. Komórki kontrolne charakteryzują się wysokim poziomem RFT oraz posiadają sprawne esterazy zdolne do wydajnej hydrolizy DCHF-DA, dlatego w tym eksperymencie problemem może również wydawać się istnienie stosunkowo silnego "sygnału tła" w przypadku tych komórek. Fakt ten może częściowo tłumaczyć relatywnie niewielki wzrost fluorescencji obserwowany w komórkach poddanych PDT zmierzony natychmiast po naświetlaniu oraz krótko po nim. Doniesienie w których posługiwano się DHCF-DA opisują najczęściej bardzo silny wzrost fluorescencji po zadziałaniu czynnika generującego (267). Niewielki wzrost fluorescencji może być jednak spowodowany nie tylko silnym sygnałem tła, ale także powstawaniem bardzo reaktywnych, a w związku z tym szybko zanikających RFT. Skutkiem silnego stresu oksydacyjnego może być także uszkodzenie esteraz konwertujących DHCF-DA do DHCF. Wniosek ten wydają się potwierdzać obserwacje dokonane dla komórek poddanych PDT i inkubowanych przez 24h lub nawet tylko 6h. Na zdjęciach wykonanych po tym czasie wykazano istnienie w obserwowanych polach widzenia komórek, w których nie powstała DCF. Fakt, że w komórkach tych nie powstał fluorescencyjny produkt może być wynikiem niskiego poziomu RFT, ale za obecnością RFT w próbach poddanych PDT i inkubowanych przez 24h może przemawiać jednocześnie istnienie pojedynczych komórek będących silnymi ogniskami fluorescencji, dlatego prawdopodobna może wydawać się hipoteza, że brak DCF w tych komórkach jest wynikiem dezaktywacji esteraz co z jednej strony dostarcza dodatkowych argumentów autorom prac sugerujących bardzo dokładną i ostrożną analizę wyników uzyskanych za pomocą DHCF-DA (324;328;329) z drugiej strony zachęca do dokładniejszego zbadania mechanizmów leżących u podstawy generowania RFT w komórkach poddanych TG3-PDT za pomocą innych bardziej selektywnych i specyficznych znaczników, markerów i testów.

W celu oceny oksydacyjnych uszkodzeń DNA podczas PDT z zastosowaniem TG3 wykonano pomiar markera wolnorodnikowych uszkodzeń materiału genetycznego 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyny. Biorąc pod uwagę powszechnie uznawany obecnie pogląd, że jądro komórkowe nie stanowi struktury docelowej dla aktualnie stosowanych

fotouczulaczy, co zmniejsza ryzyko działania mutagennego podczas PDT (7) to nie ulga wątpliwości, że oceniając nowy fotouczulacz bezwzględnie należy ocenić jego bezpieczeństwo również pod tym względem. Zależność pomiędzy dawką światła, a powstawaniem 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyny zaobserwowano dla fotouczulacza Met-ALA, gdzie wyższe dawki promieniowania korelowały z poziomem markera oksydacyjnych uszkodzeń DNA (330)

Uzyskane wyniki wykazały, że badany związek w zakresie stężeń efektywnych nie powoduje wzrostu ilości oznaczanego markera, jedynie przy najwyższym badanym stężeniu zaobserwowano istotny statystycznie wzrost poziomu 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyny.

W związku z faktem, że mechanizm działania związków fotouczulających jest związany z generowaniem w komórkach RFT i/lub wolnych rodników, aktywność systemów antyoksydacyjnych może wpływać na efektywność terapii (7). Kimani i wsp. wykazali wpływ inhibitorów enzymów antyoksydacyjnych w komórkach na działanie cytotoksyczne ftalocyjaniny glinowej. Uzyskane wyniki wykazały najwyższy wzrost działania cytotoksycznego w przypadku zastosowania inhibitora syntetazy glutationu oraz jego połączeń z pozostałymi inhibitorami, czemu towarzyszył wzrost produkcji ROS i indukcja apoptozy (197). Price i wsp. zaobserwowali, że inkubacja komórek z inhibitorem katalazy 3-AT- prowadziła do wzrostu działania cytotoksycznego BPD (pochodna benzoporfiryny) podczas PDT w komórkach P388 w wyniku zwiększonej produkcji nadtlenu wodoru (331). Zastosowany inhibitor katalazy prowadził do nasilenia aktywowanej podczas PDT apoptozy wskazując na proapoptotyczne działanie nadtlenu wodoru (331). Zahamowanie aktywności mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej przy użyciu inhibitora MnSOD - 2-metoksyestradiolu, prowadziło do uzyskania silniejszego działania cytotoksycznego podczas PDT z zastosowaniem Photofrinu (198) oraz inhibitora cytozolowej dysmutazy SOD-1 w komórkach EAC pod wpływem pochodnych hematoporfiryny (332).

Wpływ inhibitorów enzymów antyoksydacyjnych na działanie cytotoksyczne TG3 wykonano dla następujących inhibitorów: katalazy, syntetazy glutationu oraz cytozolowej dysmutazy ponadtlenkowej. Do badania nie włączono stosowanego często w takich badaniach 2-metoksyestradiolu ze względu na silne działanie cytotoksyczne samego inhibitora wobec komórek LNCaP w ciemności oraz w połączeniu z naświetlaniem. Uzyskane wyniki wykazały spadek przeżywalności

komórek poddanych PDT-TG3 w wyniku zahamowania aktywności katalazy (~76%) oraz syntetazy glutationu (~32%). W przypadku inhibitora katalazy pomimo przeprowadzonych wstępnych badań cytotoksyczności samego inhibitora wobec komórek linii LNCaP zaobserwowano jego działanie cytotoksyczne, co może sugerować zaburzenie równowagi w procesach oksydacyjno-redukcyjnych w komórkach w wyniku zahamowania aktywności katalazy. Wyniki uzyskane w panelu apoptotycznym wykazały istotny statystycznie wzrost poziomu katalazy w komórkach, co może sugerować udział enzymu w procesach związanych z odpowiedzią komórek na PDT z zastosowaniem TG3. Inhibitor cytozolowej dysmutazy ponadtlenkowej wykazał natomiast działanie cytoprotekcyjne wobec komórek traktowanych TG3-PDT. Działanie takie może być związane z zahamowaniem powstawania nadtlenu wodoru, uważanego za bardziej „niebezpieczną” dla komórek reaktywną formę tlenu niż anionorodnik ponadtlenkowy, który ulega dysmutacji w reakcji katalizowanej przez Cu,Zn(SOD) i MnSOD do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Istotną rolę jaką odgrywa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w mechanizmie cytotoksycznego efektu TG3-PDT może potwierdzać wspomniany powyżej wzrost poziomu katalazy który może być reakcją adaptacyjną na podwyższony poziom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Niestety mimo, zastosowania dwóch różnych metod (kolorymetryczna oraz fluorescencyjna dane nieprezentowane) nie udało się wykazać wzrostu poziomu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w pożywce hodowlanej w której znajdowały się komórki poddane TG3-PDT. Uzyskane wyniki wymagają potwierdzenia poprzez przeprowadzenie kolejnych eksperymentów, w tym oznaczenia aktywności katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej, a także peroksydazy glutationowej, która wykorzystując glutation, również może być wewnątrzkomórkową eliminację H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (333;334).

Glutation należy do niskocząsteczkowych antyoksydantów, i może w komórce występować w dwóch postaciach: tzw. zredukowanej (GSH) oraz utlenionej (GSSG). Antyoksydacyjna i cytoprotekcyjna funkcja glutationu opiera się na utlenieniu grup tiolowych dostarczanych przez cząsteczki cysteiny wchodzącej w skład glutationu przez reaktywne formy tlenu, azotu oraz inne bardzo reaktywne cząsteczki (335). Glutation stanowi też, tak jak wspomniano powyżej substrat dla jednego z kluczowych enzymów antyoksydacyjnych peroksydazy glutationowej, katalizującej między innymi reakcję redukcji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jak i innych RFT (333;334). Powstający w tych reakcjach GSSG może następnie ulec redukcji do GSH przy udziale reduktazy glutationu lub zostać usunięty z komórek (336). Wykazano także, że spadek GSH w komórkach może prowadzić do aktywacji procesu apoptozy (336). W odniesieniu do PDT, wysoki poziom GSH



w komórce może być czynnikiem zmniejszającym efektywność PDT. Badania *in vitro* z zastosowaniem porfirmeru sodu wykazały zwiększoną skuteczność fotouczulacza wobec komórek glejaka U87 oraz U251, inkubowanych z inhibitorem syntetazy glutationu- BSO (337). Także, w badaniach *in vivo* z zastosowaniem tego samego fotouczulacza i BSO wykazano wzrost skuteczności PDT (337). Zmniejszenie podaży glukozy w komórkach A431 przed naświetlaniem z wykorzystaniem ftalocyjaniny glinowej skutkowało obniżeniem poziomu GSH i wzrostem działania cytotoksycznego. Glukoza poprzez cykl pentozofosforanowy jest związana z produkcją NADPH, który uczestniczy w regeneracji GSH przez reduktazę glutationu (338). PDT z wykorzystaniem purpuryny-18 (Pu-18) w komórkach HL60, prowadziła do stresu oksydacyjnego i spadku poziomu glutationu, uważanych za wystarczające czynniki do indukowania otwarcia kanałów jonowych w mitochondriach prowadząc do śmierci komórek na drodze apoptozy (339).

Pomiar GSH w komórkach poddanych działaniu PDT z zastosowaniem TG3 wykazał spadek jego poziomu w zależności od dawki badanego fotouczulacza, czasu naświetlania oraz czasu pomiaru. Oznaczenie GSH wykonano od razu po naświetlaniu oraz po: 0,5h; 2h; 4h; 6h oraz 24h. W przypadku kontroli oraz dawek: 0,6  $\mu\text{M}$  i 2,5  $\mu\text{M}$  zaobserwowano po 30 minutach od trwającego 20 min naświetlania gwałtowny spadek, a następnie po 2h znaczny, wzrost poziomu GSH w komórkach. Gwałtowny wzrost syntezy GSH jako odpowiedź na jego nagłą utratę jest reakcją która była już wcześniej opisywana także w eksperymentach prowadzonych *in vivo*. (340). W przypadku kontroli i najniższego stężenia poziom GSH uległ następnie obniżeniu i osiągnięcia po czasie 4h stałego poziomu. Natomiast w dawce 2,5  $\mu\text{M}$  dla kolejnych punktów czasowych obserwowano spadek stężenia GSH wraz z upływem czasu, co może sugerować zużycie GSH w procesach antyoksydacyjnych przy jednoczesnym zaburzeniu prawidłowego funkcjonowania systemów enzymatycznych w komórce odpowiedzialnych za syntezę i redukcję GSSG. W najwyższej badanej dawce TG3 5  $\mu\text{M}$  w połączeniu z naświetlaniem poziom GSH zmniejszał się wraz z upływem czasu. Uzyskane wyniki sugerują, bardzo szybkie zużycie rezerw GSH w obronie komórek przed RFT, a także poważne wolnorodnikowe uszkodzenia komórek, którym towarzyszy niewydolność mechanizmów odpowiedzialnych za syntezę GSH w celu uzupełnienia rezerw enzymu zużytych w procesach antyoksydacyjnych.

Rola tlenu azotu podczas terapii fotodynamicznej może wiązać się z działaniem ochronnym na komórki poddane działaniu PDT jak również być czynnikiem wpływającym na wewnątrzkomórkowe szlaki sygnalizacyjne zaangażowane w śmierć komórek (192). Badanie generowania tlenu azotu podczas PDT z zastosowaniem ftalocyjaniny krzemowej Pc4 wykazały wzrost stężenia NO w komórkach A431 (341), czy 2-butylamino-2-demetoksyhypokreliny B w linii MCF7 (342). PDT zastosowaniem 2-BA-2-DMHB i inhibitora syntetazy tlenu azotu lub związku neutralizującego NO prowadziła do wzrostu przeżywalności komórek, ponadto PTIO wpływał na uwalnianie cytochromu c sugerując tym samym, wpływ NO na apoptozę związaną z PDT z użyciem 2-BA-2-DMHB w komórkach MCF-7 (342). Z drugiej strony PDT może nie wpływać na poziom NO, co zaobserwowano podczas PDT z zastosowaniem Pc4 w linii komórkowej-RIF-1 (341).

Pomiar stężenia tlenu azotu wykazał, że jego wzrost następuje w wyniku 20 minutowego naświetlania zarówno w kontroli oraz w całym badanym zakresie stężeń po czasie 2h oraz 4h od naświetlania. Natomiast po 6h od naświetlania zmierzony poziom tlenu azotu uległ istotnie statystycznemu podwyższeniu w komórkach nienaświetlanych inkubowanych ze związkiem TG3. W komórkach naświetlanych 10 minut istotny statystycznie wzrost poziomu NO zaobserwowano w kontroli oraz w stężeniu 0,6  $\mu\text{M}$  i 2,5 $\mu\text{M}$ , natomiast dla 20 minut istotny statystycznie wzrost zaobserwowano w kontroli oraz stężeniu 0,6  $\mu\text{M}$ . Obserwowany poziom tlenu azotu w naświetlanej kontroli oraz inkubowanych ze związkiem może wynikać z wpływu światła na syntetazę tlenu azotu. Lindgard i wsp. wykazali, że ekspozycja monocytów na światło o długości fali 634 nm prowadziła do wzrostu uwalniania NO w wyniku aktywacji syntetazy tlenu azotu izoformy iNOS oraz eNOS (343). Pomimo, że taki scenariusz w przypadku PDT-TG3 wydaje się mało prawdopodobny, wymaga on sprawdzenia za pomocą np. za pomocą metody Western blot.

Uzyskane wyniki nie wykazały istotnego wzrostu generowania tlenu azotu pod wpływem PDT z zastosowaniem TG3 w porównaniu z kontrolą. Jednocześnie tlenek azotu powstający w komórkach może ulegać reakcji z anionorodnikiem ponadtlennym generując nadtlenoazotyny (344). W związku z tym z tym nie można wykluczyć, że wzrost poziomu tlenu azotu w sytuacji stresu oksydacyjnego w komórce zainicjowanego podczas PDT pomimo braku istotnych różnic między kontrolą, może w obecności anionorodnika ponadtlennego odgrywać rolę

w mechanizmie działania cytotoksycznego. W związku z krótkim czasem życia reaktywnych form tlenu, również istotny jest czas wykonania pomiaru. Ponadto, obserwowany po 6h od naświetlania spadek fluorescencji w komórkach inkubowanych z wyższymi stężeniami TG3 i naświetlanych przez 20 minut może być związany z uszkodzeniem enzymów z grupy esteraz odpowiedzialnego za deacetylację zastosowanego w eksperymencie związku DAF-FM DA do 4-amino-5-metyloamino-2',7'-difluorofluoresceiny, która w obecności NO przechodzi w fluorescencyjny produkt. W celu potwierdzenia wpływu TG3 na generowanie tlenku azotu, oraz możliwości modulowania aktywności TG3 przez NO, wykonanie kolejnych eksperymentów takich jak: określenie ekspresji syntetazy tlenku azotu oraz wpływu jej inhibitorów i związków neutralizujących NO mogłoby dostarczyć wielu cennych informacji.

Skutek jaki zostanie osiągnięty podczas PTD jest wypadkową bardzo wielu czynników: czasu preinkubacji z fotouczulaczem, czasu ekspozycji na światło, długości fali użytego światła, właściwości fotochemicznych fotouczulacza jak również jego lokalizacji w komórce. Ten ostatni parametr zależy głównie od właściwości fizykochemicznych fotouczulacza (17)

Ftalocyjaniny podobnie jak inne związki fotouczulające mogą gromadzić się w różnych strukturach komórki: ftalocyjanina glinowa (AlPcS<sub>4</sub>) lokalizuje się głównie w mitochondriach (345), krzemowa Pc<sub>4</sub> w mitochondriach, ER, aparatach Golgiego (139), cynkowa (ZnPc) w aparatach Golgiego i mitochondriach (290), a pochodna cynkowa (ZnPcOCH<sub>3</sub>) w lizosomach (75). Badanie lokalizacji związku TG3 w badanych komórkach nowotworu prostaty wykazało, że prawdopodobnie główną strukturą docelową nie są lizosomy oraz mitochondria dla czasu inkubacji z TG3 wynoszącego 1 godzinę. Jednocześnie uzyskane wyniki wskazują, że związek może gromadzić się w cytoplazmie komórek oraz retikulum endoplazmatycznym. Nie można jednak wykluczyć, że związek TG3 kumuluje się również w innych organelach komórkowych. Badania lokalizacji Photofrinu w komórkach A431 wykazały, że fotouczulacz ten początkowo (3 godziny inkubacji) gromadził się w błonie komórkowej, natomiast dłuższy czas inkubacji (24 godziny) odpowiadał za przemieszczenie się głównie do aparatów Golgiego (99). Zależność pomiędzy czasem inkubacji, a wewnątrzkomórkową lokalizację wykazano także dla ftalocyjaniny cynkowej ZnPc w komórkach fibroblastów 4R. Czas inkubacji wynoszący 2h skutkowało

gromadzeniem się fotouczulacza głównie w obrębie aparatów Golgiego, natomiast po 24h oprócz nasilenia sygnały z aparatów Golgiego zaobserwowano gromadzenie się fotouczulacza częściowo również w mitochondriach (290). Ponadto, wykazano, że PS mogą ulegać w komórce relokalizacji pod wpływem naświetlania (133;134). Uzyskane wyniki dostarczyły wstępnych informacji na temat lokalizacji badanego związku, jednak kolejne badania są niezbędne w celu określenia zależności czasu inkubacji, naświetlaniem, a lokalizacją badanego związku badania te są jednak są znacznie utrudnione z powodów technicznych, dostępne obecnie mikroskopy budowane i wyposażane są głównie z myślą o standardowo używanych barwnikach, zatem montowane w nich filtry nie zawsze pozwalają na obserwację związków o „nietypowych” długościach fali wzbudzenia i emisji jakim charakteryzuje się także związek TG3

Dotychczasowe badania przeprowadzone w ramach tej pracy doktorskiej sugerują, że TG3 jest to związkiem o bardzo interesującej aktywności przeciwnowotworowej. Z uwagi na fakt, że jest to związek zupełnie nowy o trudnej do przewidzenia aktywności biologicznej, przeprowadzone w ramach tej pracy eksperymenty dotyczyły bardzo wielu aspektów związanych z jego aktywnością, tak aby możliwe było wytycznie najważniejszych kierunków, na które powinny być skierowane dalsze badania. Przeprowadzenie kolejnych szczegółowych badań pozwoli wyjaśnić mechanizm działania cytotoksycznego w komórkach nowotworowych, a także ocenić możliwości zastosowania badanego związku, jako efektywnego fotouczulacza w PDT chorób nowotworowych.

## 6. WNIOSKI

- § Wstępne badania cytotoksyczności przeprowadzone dla czterech ftalocyjanin wyposażonych w peryferyjne ugrupowania morfolinowe w pozycjach nieperyferyjnych (tj.1,4) pierścieni ftalocyjaninowych i posiadające skoordynowany jon metalu: TG3 (dwie grupy morfolinowe; jon cynku, TG4 (8 grup morfolinowych; jon magnezu), TG18 (8 grup morfolinowych; jon cynku); TG15 (8 grup morfolinowych; jon magnezu; w postaci soli) wykazały aktywność cytotoksyczną wobec komórek nowotworowych jedynie w przypadku związku TG3
- § Związek TG3 wykazuje silne działanie cytotoksyczne wobec komórek nowotworowych w połączeniu z naświetlaniem, oraz słabe działanie toksyczne w komórkach nienaświetlanych; siła działania cytotoksycznego zależy od stężenia związku, czasu naświetlania oraz czasu inkubacji z badanym związkiem
- § Związek TG3 ulega szybkiemu wchłanianiu przez komórki nowotworowe (jego obecność w komórce można stwierdzić już po 1h), a jego najwyższe stężenie w badanych komórkach zmierzono 6h
- § Badany związek nie spowodował zahamowania podziałów komórkowych w żadnej z faz cyklu komórkowego
- § Badany związek wykazał zdolność do indukcji apoptozy w zależności od zastosowanej dawki i czasu naświetlania
- § Wzrost aktywności kaspazy-9, -3 oraz zmiany potencjału błony mitochondrialnej pozwalają przypuszczać, że badany związek aktywuje wewnątrzkomórkowy szlak apoptozy
- § PDT z zastosowaniem TG3 wpływa na poziom białek pro-antyapoptotycznych, w tym zaobserwowano spadek poziomu białek antyapoptotycznych z rodziny IAP oraz spadek poziomu białka Bcl-2
- § Wstępne badania w zakresie wpływu badanego związku na proces autofagii z użyciem inhibitora tego procesu spautyny-1, wykazały jej wpływ na cytotoksyczność badanego związku, w zależności od czasu naświetlania i użytego stężenia TG3, co świadczy o udziale tego procesu w odpowiedzi komórek na PDT z użyciem związku TG3

- § Zahamowanie nekrozy i (lub) nekroptozy wpływa na działanie cytotoksyczne w zależności od stężenia i czasu naświetlania. co świadczy o udziale tego procesu w odpowiedzi komórek na PDT z użyciem związku TG3
- § Nie zaobserwowano nasilenia działania cytotoksycznego TG3 w wyniku zastosowania inhibitora białka Bcl-2
- § Uzyskane wyniki sugerują możliwość fotodegradacji białek zaangażowanych w procesy związane ze śmiercią komórek, jak również innych białek (w tym także enzymów)
- § Badany związek wpływa na cytoszkielet komórek w zależności od użytego stężenia i czasu ekspozycji na światło
- § Aktywność fototoksyczna związku TG3 jest związana z generowaniem reaktywnych form tlenu, indukowaniem stresu oksydacyjnego i spadkiem wewnątrzkomórkowego poziomu zredukowanego glutationu, ale jednocześnie badany związek powoduje wolnorodnikowe uszkodzenia DNA tylko w najwyższym użytym stężeniu fotouczulacza (5  $\mu$ M) i najdłuższym czasie naświetlania (20 min).
- § Badanie wpływu inhibitorów enzymów antyoksydacyjnych na fototoksyczność związku TG3 sugerują, że aktywność ta może być modulowana za pomocą ich inhibitorów.
- § Badanie lokalizacji związku TG3 w komórkach nowotworowych sugeruje, że badany związek może gromadzić się w cytoplazmie oraz w retikulum endoplazmatycznym
- § Wykonane eksperymenty wskazują także, że samo naświetlanie komórek, pomimo, że nie powoduje śmierci komórek, może istotnie zmieniać poziom wielu parametrów opisujących ich stan biochemiczny takich jak np. GSH lub NO.

## 7. PIŚMIENICTWO

- (1) Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 2013 Apr;49(6):1374-403.
- (2) Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 2013 Jan;63(1):11-30.
- (3) Lomax ME, Folkes LK, O'Neill P. Biological consequences of radiation-induced DNA damage: relevance to radiotherapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2013 Oct;25(10):578-85.
- (4) Tubiana M. Can we reduce the incidence of second primary malignancies occurring after radiotherapy? A critical review. *Radiother Oncol* 2009 Apr;91(1):4-15.
- (5) Mellor HR, Callaghan R. Resistance to chemotherapy in cancer: a complex and integrated cellular response. *Pharmacology* 2008;81(4):275-300.
- (6) Rebutti M, Michiels C. Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. *Biochem Pharmacol* 2013 May 1;85(9):1219-26.
- (7) Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin* 2011 Jul;61(4):250-81.
- (8) Allison RR, Sibata CH. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2010 Jun;7(2):61-75.
- (9) Vatansever F, de Melo WC, Avci P, Vecchio D, Sadasivam M, Gupta A, et al. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species--bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. *FEMS Microbiol Rev* 2013 Nov;37(6):955-89.
- (10) Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res* 2008;163(1):1-12.
- (11) Babilas P, Schreml S, Landthaler M, Szeimies RM. Photodynamic therapy in dermatology: state-of-the-art. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2010 Jun;26(3):118-32.
- (12) Nowak-Sliwinska P, van den Bergh H, Sickenberg M, Koh AH. Photodynamic therapy for polypoidal choroidal vasculopathy. *Prog Retin Eye Res* 2013 Nov;37:182-99.
- (13) Josefsen LB, Boyle RW. Unique diagnostic and therapeutic roles of porphyrins and phthalocyanines in photodynamic therapy, imaging and theranostics. *Theranostics* 2012;2(9):916-66.
- (14) Rai P, Mallidi S, Zheng X, Rahmanzadeh R, Mir Y, Elrington S, et al. Development and applications of photo-triggered theranostic agents. *Adv Drug Deliv Rev* 2010 Aug 30;62(11):1094-124.
- (15) Friberg EG, Cunderlikova B, Pettersen EO, Moan J. pH effects on the cellular uptake of four photosensitizing drugs evaluated for use in photodynamic therapy of cancer. *Cancer Lett* 2003 May 30;195(1):73-80.
- (16) Roberts WG, Hasan T. Role of neovasculature and vascular permeability on the tumor retention of photodynamic agents. *Cancer Res* 1992 Feb 15;52(4):924-30.
- (17) Castano A.P, Demidova T.N, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2004 Dec;1(4):279-93.

- (18) Robertson CA, Evans DH, Abrahamse H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J Photochem Photobiol B* 2009 Jul 17;96(1):1-8.
- (19) Bae B, Na K. Development of polymeric cargo for delivery of photosensitizer in photodynamic therapy. *International Journal of Photoenergy* 2012.
- (20) Plaetzer K, Krammer B, Berlanda J, Berr F, Kiesslich T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med Sci* 2009 Mar;24(2):259-68.
- (21) Hackbarth S, Schlothauer J, Preuss A, Roder B. New insights to primary photodynamic effects-- Singlet oxygen kinetics in living cells. *J Photochem Photobiol B* 2010 Mar 8;98(3):173-9.
- (22) Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res* 1998 Aug;39(8):1529-42.
- (23) Girotti AW. Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. *J Photochem Photobiol B* 2001 Oct;63(1-3):103-13.
- (24) Sakharov DV, Elstak ED, Chernyak B, Wirtz KW. Prolonged lipid oxidation after photodynamic treatment. Study with oxidation-sensitive probe C11-BODIPY581/591. *FEBS Lett* 2005 Feb 14;579(5):1255-60.
- (25) Davies MJ. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 Jun 6;305(3):761-70.
- (26) Bose B, Dube A. Interaction of chlorin p6 with bovine serum albumin and photodynamic oxidation of protein. *J Photochem Photobiol B* 2006 Oct 2;85(1):49-55.
- (27) Szokalska A, Makowski M, Nowis D, Wilczynski GM, Kujawa M, Wojcik C, et al. Proteasome inhibition potentiates antitumor effects of photodynamic therapy in mice through induction of endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response. *Cancer Res* 2009 May 15;69(10):4235-43.
- (28) Agnez-Lima LF, Melo JT, Silva AE, Oliveira AH, Timoteo AR, Lima-Bessa KM, et al. DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms. *Mutat Res* 2012 Jan 14.
- (29) Allison RR, Moghissi K. Oncologic photodynamic therapy: clinical strategies that modulate mechanisms of action. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2013 Dec;10(4):331-41.
- (30) Nyman ES, Hynninen PH. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 2004 Jan 23;73(1-2):1-28.
- (31) Bonnett R, Martinez G. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron* 2001;57(47):9513-47.
- (32) Panzarini E, Inguscio V, Dini L. Overview of Cell Death Mechanisms Induced by Rose Bengal Acetate-Photodynamic Therapy. *International Journal of Photoenergy* 2011;2011.
- (33) Mroz P, Hamblin MR. The immunosuppressive side of PDT. *Photochem Photobiol Sci* 2011 May;10(5):751-8.
- (34) Korbely M, Dougherty GJ. Photodynamic therapy-mediated immune response against subcutaneous mouse tumors. *Cancer Res* 1999 Apr 15;59(8):1941-6.
- (35) Krosi G, Korbely M, Dougherty GJ. Induction of immune cell infiltration into murine SCCVII tumour by photofrin-based photodynamic therapy. *Br J Cancer* 1995 Mar;71(3):549-55.
- (36) Cecic I, Stott B, Korbely M. Acute phase response-associated systemic neutrophil mobilization in mice bearing tumors treated by photodynamic therapy. *Int Immunopharmacol* 2006 Aug;6(8):1259-66.



- (37) Jalili A, Makowski M, Switaj T, Nowis D, Wilczynski GM, Wilczek E, et al. Effective photoimmunotherapy of murine colon carcinoma induced by the combination of photodynamic therapy and dendritic cells. *Clin Cancer Res* 2004 Jul 1;10(13):4498-508.
- (38) Gollnick SO, Brackett CM. Enhancement of anti-tumor immunity by photodynamic therapy. *Immunol Res* 2010 Mar;46(1-3):216-26.
- (39) Garg AD, Nowis D, Golab J, Agostinis P. Photodynamic therapy: illuminating the road from cell death towards anti-tumour immunity. *Apoptosis* 2010 Sep;15(9):1050-71.
- (40) Siemann DW, Horsman MR. Vascular targeted therapies in oncology. *Cell Tissue Res* 2009 Jan;335(1):241-8.
- (41) Bhuvanewari R, Gan YY, Soo KC, Olivo M. The effect of photodynamic therapy on tumor angiogenesis. *Cell Mol Life Sci* 2009 Jul;66(14):2275-83.
- (42) Weiss A, den BH, Griffioen AW, Nowak-Sliwinska P. Angiogenesis inhibition for the improvement of photodynamic therapy: the revival of a promising idea. *Biochim Biophys Acta* 2012 Aug;1826(1):53-70.
- (43) Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 2005;69 Suppl 3:4-10.
- (44) Schmidt-Erfurth U, Schlotzer-Schrehard U, Cursiefen C, Michels S, Beckendorf A, Naumann GO. Influence of photodynamic therapy on expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptor 3, and pigment epithelium-derived factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003 Oct;44(10):4473-80.
- (45) Zhang X, Jiang F, Zhang ZG, Kalkanis SN, Hong X, deCarvalho AC, et al. Low-dose photodynamic therapy increases endothelial cell proliferation and VEGF expression in nude mice brain. *Lasers Med Sci* 2005 Sep;20(2):74-9.
- (46) Ferrario A, Chantrain CF, von TK, Buckley S, Rucker N, Shalinsky DR, et al. The matrix metalloproteinase inhibitor prinomastat enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse tumor model. *Cancer Res* 2004 Apr 1;64(7):2328-32.
- (47) Handsley MM, Edwards DR. Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. *Int J Cancer* 2005 Jul 20;115(6):849-60.
- (48) Iniguez MA, Rodriguez A, Volpert OV, Fresno M, Redondo JM. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. *Trends Mol Med* 2003 Feb;9(2):73-8.
- (49) Hendrickx N, Volanti C, Moens U, Seternes OM, de WP, Vandenneede JR, et al. Up-regulation of cyclooxygenase-2 and apoptosis resistance by p38 MAPK in hypericin-mediated photodynamic therapy of human cancer cells. *J Biol Chem* 2003 Dec 26;278(52):52231-9.
- (50) Ferrario A, von TK, Wong S, Luna M, Gomer CJ. Cyclooxygenase-2 inhibitor treatment enhances photodynamic therapy-mediated tumor response. *Cancer Res* 2002 Jul 15;62(14):3956-61.
- (51) Weiss A, van Beijnum JR, Bonvin D, Jichlinski P, Dyson PJ, Griffioen AW, et al. Low-dose angiostatic tyrosine kinase inhibitors improve photodynamic therapy for cancer: lack of vascular normalization. *J Cell Mol Med* 2014 Jan 22.
- (52) Bhuvanewari R TPYGOMCS. Combined use of anti-VEGF and anti-EGFR Monoclonal Antibodies with Photodynamic Therapy Suppresses Tumor Growth in an In vivo Tumor Model . *J Cancer Sci Ther* 2013 Feb 15;5((2)).
- (53) Mroz P, Yaroslavsky A, Kharkwal GB, Hamblin MR. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers (Basel)* 2011;3(2):2516-39.

- (54) Giampietri C, Starace D, Petrunaro S, Filippini A, Ziparo E. Necroptosis: Molecular Signalling and Translational Implications. *Int J Cell Biol* 2014;2014:490275.
- (55) Rello-Varona S, Stockert JC, Canete M, Acedo P, Villanueva A. Mitotic catastrophe induced in HeLa cells by photodynamic treatment with Zn(II)-phthalocyanine. *Int J Oncol* 2008 Jun;32(6):1189-96.
- (56) Soares AR, Neves MG, Tome AC, Iglesias-de la Cruz MC, Zamarron A, Carrasco E, et al. Glycophthalocyanines as photosensitizers for triggering mitotic catastrophe and apoptosis in cancer cells. *Chem Res Toxicol* 2012 Apr 16;25(4):940-51.
- (57) Lee HZ, Yang WH, Hour MJ, Wu CY, Peng WH, Bao BY, et al. Photodynamic activity of aloemodin induces resensitization of lung cancer cells to anoikis. *Eur J Pharmacol* 2010 Dec 1;648(1-3):50-8.
- (58) Giansanti V, Torriglia A, Scovassi AI. Conversation between apoptosis and autophagy: "Is it your turn or mine?". *Apoptosis* 2011 Apr;16(4):321-33.
- (59) Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010 Sep;11(9):621-32.
- (60) Bratton SB, Salvesen GS. Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome. *J Cell Sci* 2010 Oct 1;123(Pt 19):3209-14.
- (61) Fulda S, Galluzzi L, Kroemer G. Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2010 Jun;9(6):447-64.
- (62) de Bruin EC, Medema JP. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. *Cancer Treat Rev* 2008 Dec;34(8):737-49.
- (63) Vande WL, Lamkanfi M, Vandenabeele P. The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview. *Cell Death Differ* 2008 Mar;15(3):453-60.
- (64) Cregan SP, Dawson VL, Slack RS. Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene* 2004 Apr 12;23(16):2785-96.
- (65) Kitazumi I, Tsukahara M. Regulation of DNA fragmentation: the role of caspases and phosphorylation. *FEBS J* 2011 Feb;278(3):427-41.
- (66) Tait SW, Green DR. Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. *Oncogene* 2008 Oct 27;27(50):6452-61.
- (67) McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013 Apr;5(4):a008656.
- (68) Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, Schow P, et al. Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem* 2001 Dec 7;276(49):46639-46.
- (69) Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007 Sep;8(9):741-52.
- (70) Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem* 2011 May;351(1-2):41-58.
- (71) Elkholi R, Floros KV, Chipuk JE. The Role of BH3-Only Proteins in Tumor Cell Development, Signaling, and Treatment. *Genes Cancer* 2011 May;2(5):523-37.
- (72) Volkmann N, Marassi FM, Newmeyer DD, Hanein D. The rheostat in the membrane: BCL-2 family proteins and apoptosis. *Cell Death Differ* 2014 Feb;21(2):206-15.

- (73) Chipuk JE, Green DR. Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ* 2006 Jun;13(6):994-1002.
- (74) Tsutsumi M, Miki Y, Akimoto J, Haraoka J, Aizawa K, Hirano K, et al. Photodynamic therapy with talaporfin sodium induces dose-dependent apoptotic cell death in human glioma cell lines. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2013 May;10(2):103-10.
- (75) Yslas EI, Durantini EN, Rivarola VA. Zinc-(II) 2,9,16,23-tetrakis (methoxy) phthalocyanine: potential photosensitizer for use in photodynamic therapy in vitro. *Bioorg Med Chem* 2007 Jul 1;15(13):4651-60.
- (76) Leung WN, Sun X, Mak NK, Yow CM. Photodynamic effects of mTHPC on human colon adenocarcinoma cells: photocytotoxicity, subcellular localization and apoptosis. *Photochem Photobiol* 2002 Apr;75(4):406-11.
- (77) Devi DG, Cibin TR, Abraham A. Bis (3,5-diiodo-2,4,6-trihydroxyphenyl) squaraine photodynamic therapy induces in vivo tumor ablation by triggering cytochrome c dependent mitochondria mediated apoptosis. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2013 Dec;10(4):510-7.
- (78) Kaneko T, Chiba H, Yasuda T, Kusama K. Detection of photodynamic therapy-induced early apoptosis in human salivary gland tumor cells in vitro and in a mouse tumor model. *Oral Oncol* 2004 Sep;40(8):787-92.
- (79) Zaidi SI, Oleinick NL, Zaim MT, Mukhtar H. Apoptosis during photodynamic therapy-induced ablation of RIF-1 tumors in C3H mice: electron microscopic, histopathologic and biochemical evidence. *Photochem Photobiol* 1993 Dec;58(6):771-6.
- (80) Zeng H, Sun M, Zhou C, Yin F, Wang Z, Hua Y, et al. Hematoporphyrin monomethyl ether-mediated photodynamic therapy selectively kills sarcomas by inducing apoptosis. *PLoS One* 2013;8(10):e77727.
- (81) Zhao H, Yin R, Chen D, Ren J, Wang Y, Deng H, et al. In vitro and in vivo antitumor activity of a novel hypocrellin B derivative for photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2014 Feb 14.
- (82) Ali SM, Chee SK, Yuen GY, Olivo M. Hypericin induced death receptor-mediated apoptosis in photoactivated tumor cells. *Int J Mol Med* 2002 Jun;9(6):601-16.
- (83) Olivo M, Ali-Seyed M. Apoptosis signalling mechanisms in human cancer cells induced by Calphostin-PDT. *Int J Oncol* 2007 Mar;30(3):537-48.
- (84) Granville DJ, Jiang H, McManus BM, Hunt DW. Fas ligand and TRAIL augment the effect of photodynamic therapy on the induction of apoptosis in JURKAT cells. *Int Immunopharmacol* 2001 Sep;1(9-10):1831-40.
- (85) Ali SM, Chee SK, Yuen GY, Olivo M. Photodynamic therapy induced Fas-mediated apoptosis in human carcinoma cells. *Int J Mol Med* 2002 Mar;9(3):257-70.
- (86) Ahmad N, Gupta S, Feyes DK, Mukhtar H. Involvement of Fas (APO-1/CD-95) during photodynamic-therapy-mediated apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. *J Invest Dermatol* 2000 Dec;115(6):1041-6.
- (87) Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenaebelle P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta* 2006 Sep;1757(9-10):1371-87.
- (88) Castano AP, Mroz P, Hamblin MR. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer* 2006 Jul;6(7):535-45.

- (89) Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 2012 Jan;19(1):107-20.
- (90) Wu W, Liu P, Li J. Necroptosis: an emerging form of programmed cell death. *Crit Rev Oncol Hematol* 2012 Jun;82(3):249-58.
- (91) Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010 Oct;11(10):700-14.
- (92) Christofferson DE, Yuan J. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr Opin Cell Biol* 2010 Apr;22(2):263-8.
- (93) Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif* 2012 Dec;45(6):487-98.
- (94) Vanlangenakker N, Berghe TV, Vandenabeele P. Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview. *Cell Death and Differentiation* 2012;19:75-86.
- (95) Vantieghem A, Assefa Z, Vandenabeele P, Declercq W, Courtois S, Vandenheede JR, et al. Hypericin-induced photosensitization of HeLa cells leads to apoptosis or necrosis. Involvement of cytochrome c and procaspase-3 activation in the mechanism of apoptosis. *FEBS Lett* 1998 Nov 27;440(1-2):19-24.
- (96) Marchal S, Fadloun A, Maugain E, D'Hallewin MA, Guillemin F, Bezdetnaya L. Necrotic and apoptotic features of cell death in response to Foscan photosensitization of HT29 monolayer and multicell spheroids. *Biochem Pharmacol* 2005 Apr 15;69(8):1167-76.
- (97) Serebrovskaya E.O, Ryumina A.P.Bouulina M.E., Shirmanova M.V., Zagaynova E.V., Bogdanova E.A.Lukyanov S.A.Lukyanov K.A. Phototoxic effects of lysosome-associated genetically encoded photosensitizer KillerRed. *Journal of Biomedical Optics* 2013 Dec;19(7).
- (98) Ahn WS, Bae SM, Huh SW, Lee JM, Namkoong SE, Han SJ, et al. Necrosis-like death with plasma membrane damage against cervical cancer cells by photodynamic therapy. *Int J Gynecol Cancer* 2004 May;14(3):475-82.
- (99) Hsieh YJ, Wu CC, Chang CJ, Yu JS. Subcellular localization of Photofrin determines the death phenotype of human epidermoid carcinoma A431 cells triggered by photodynamic therapy: when plasma membranes are the main targets. *J Cell Physiol* 2003 Mar;194(3):363-75.
- (100) Buytaert E, Dewaele M, Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta* 2007 Sep;1776(1):86-107.
- (101) Coupienne I, Fettweis G, Rubio N, Agostinis P, Piette J. 5-ALA-PDT induces RIP3-dependent necrosis in glioblastoma. *Photochem Photobiol Sci* 2011 Dec;10(12):1868-78.
- (102) Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol* 2010 May;221(1):3-12.
- (103) Inguscio V, Panzarini E, Dini L. **Autophagy Contributes to the Death/Survival Balance in Cancer PhotoDynamic Therapy.** *Cells* 2012;1:464-91.
- (104) Wirth M, Joachim J, Tooze SA. Autophagosome formation--the role of ULK1 and Beclin1-PI3KC3 complexes in setting the stage. *Semin Cancer Biol* 2013 Oct;23(5):301-9.
- (105) Alers S, Loffler AS, Wesselborg S, Stork B. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol* 2012 Jan;32(1):2-11.

- (106) Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, et al. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell* 2009 Apr;20(7):1981-91.
- (107) Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol* 2011 Sep;13(9):1016-23.
- (108) Codogno P, Mehrpour M, Proikas-Cezanne T. Canonical and non-canonical autophagy: variations on a common theme of self-eating? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012 Jan;13(1):7-12.
- (109) Lotz MK, Carames B. Autophagy and cartilage homeostasis mechanisms in joint health, aging and OA. *Nat Rev Rheumatol* 2011 Oct;7(10):579-87.
- (110) Dewaele M, Martinet W, Rubio N, Verfaillie T, de Witte PA, Piette J, et al. Autophagy pathways activated in response to PDT contribute to cell resistance against ROS damage. *J Cell Mol Med* 2011 Jun;15(6):1402-14.
- (111) Reiners JJ, Jr., Agostinis P, Berg K, Oleinick NL, Kessel D. Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy. *Autophagy* 2010 Jan;6(1):7-18.
- (112) Buytaert E, Callewaert G, Hendrickx N, Scorrano L, Hartmann D, Missiaen L, et al. Role of endoplasmic reticulum depletion and multidomain proapoptotic BAX and BAK proteins in shaping cell death after hypericin-mediated photodynamic therapy. *FASEB J* 2006 Apr;20(6):756-8.
- (113) Kessel D, Arroyo AS. Apoptotic and autophagic responses to Bcl-2 inhibition and photodamage. *Photochem Photobiol Sci* 2007 Dec;6(12):1290-5.
- (114) Xue LY, Chiu SM, Oleinick NL. Atg7 deficiency increases resistance of MCF-7 human breast cancer cells to photodynamic therapy. *Autophagy* 2010 Feb;6(2):248-55.
- (115) Ji HT, Chien LT, Lin YH, Chien HF, Chen CT. 5-ALA mediated photodynamic therapy induces autophagic cell death via AMP-activated protein kinase. *Mol Cancer* 2010;9:91.
- (116) Hatz S, Poulsen L, Ogilby PR. Time-resolved singlet oxygen phosphorescence measurements from photosensitized experiments in single cells: effects of oxygen diffusion and oxygen concentration. *Photochem Photobiol* 2008 Sep;84(5):1284-90.
- (117) Ezzeddine R, Al-Banaw A, Tovmasyan A, Craik JD, Batinic-Haberle I, Benov LT. Effect of molecular characteristics on cellular uptake, subcellular localization, and phototoxicity of Zn(II) N-alkylpyridylporphyrins. *J Biol Chem* 2013 Dec 20;288(51):36579-88.
- (118) Ma HM, Chen X, Zhang N, Han YY, Wu D, Du B, et al. Spectroscopic studies on the interaction of a water-soluble cationic porphyrin with proteins. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2009 Apr;72(3):465-9.
- (119) Zhou B, Zhang Z, Zhang Y, Li R, Xiao Q, Liu Y, et al. Binding of cationic porphyrin to human serum albumin studied using comprehensive spectroscopic methods. *J Pharm Sci* 2009 Jan;98(1):105-13.
- (120) Mori M, Kuroda T, Obana A, Sakata I, Hirano T, Nakajima S, et al. In vitro plasma protein binding and cellular uptake of ATX-S10(Na), a hydrophilic chlorin photosensitizer. *Jpn J Cancer Res* 2000 Aug;91(8):845-52.
- (121) Jin CS, Zheng G. Liposomal nanostructures for photosensitizer delivery. *Lasers Surg Med* 2011 Sep;43(7):734-48.
- (122) Kelbauskas L, Dietel W. Internalization of aggregated photosensitizers by tumor cells: subcellular time-resolved fluorescence spectroscopy on derivatives of pyropheophorbide-a ethers and chlorin e6 under femtosecond one- and two-photon excitations. *Photochem Photobiol* 2002 Dec;76(6):686-94.

- (123) Peng TI, Chang CJ, Guo MJ, Wang YH, Yu JS, Wu HY, et al. Mitochondrion-targeted photosensitizer enhances the photodynamic effect-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 2005 May;1042:419-28.
- (124) Wang H, Wang X, Wang P, Zhang K, Yang S, Liu Q. Ultrasound enhances the efficacy of chlorin E6-mediated photodynamic therapy in MDA-MB-231 cells. *Ultrasound Med Biol* 2013 Sep;39(9):1713-24.
- (125) Pogue BW, Ortel B, Chen N, Redmond RW, Hasan T. A photobiological and photophysical-based study of phototoxicity of two chlorins. *Cancer Res* 2001 Jan 15;61(2):717-24.
- (126) Rancan F, Wiehe A, Nobel M, Senge MO, Omari SA, Bohm F, et al. Influence of substitutions on asymmetric dihydroxychlorins with regard to intracellular uptake, subcellular localization and photosensitization of Jurkat cells. *J Photochem Photobiol B* 2005 Jan 14;78(1):17-28.
- (127) Li H, Jensen TJ, Fronczek FR, Vicente MG. Syntheses and properties of a series of cationic water-soluble phthalocyanines. *J Med Chem* 2008 Feb 14;51(3):502-11.
- (128) Ritz R, Roser F, Radomski N, Strauss WS, Tatagiba M, Gharabaghi A. Subcellular colocalization of hypericin with respect to endoplasmic reticulum and Golgi apparatus in glioblastoma cells. *Anticancer Res* 2008 Jul;28(4B):2033-8.
- (129) Teiten MH, Bezdetnaya L, Morliere P, Santus R, Guillemin F. Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are the preferential sites of Foscan localisation in cultured tumour cells. *Br J Cancer* 2003 Jan 13;88(1):146-52.
- (130) Matroule JY, Carthy CM, Granville DJ, Jolois O, Hunt DW, Piette J. Mechanism of colon cancer cell apoptosis mediated by pyropheophorbide-a methylester photosensitization. *Oncogene* 2001 Jul 5;20(30):4070-84.
- (131) Juarranz A, Espada J, Stockert JC, Villanueva A, Polo S, Dominguez V, et al. Photodamage induced by Zinc(II)-phthalocyanine to microtubules, actin, alpha-actinin and keratin of HeLa cells. *Photochem Photobiol* 2001 Mar;73(3):283-9.
- (132) Sporn LA, Foster TH. Photofrin and light induces microtubule depolymerization in cultured human endothelial cells. *Cancer Res* 1992 Jun 15;52(12):3443-8.
- (133) Peng Q, Farrants GW, Madslie K, Bommer JC, Moan J, Danielsen HE, et al. Subcellular localization, redistribution and photobleaching of sulfonated aluminum phthalocyanines in a human melanoma cell line. *Int J Cancer* 1991 Sep 9;49(2):290-5.
- (134) Wood SR, Holroyd JA, Brown SB. The subcellular localization of Zn(II) phthalocyanines and their redistribution on exposure to light. *Photochem Photobiol* 1997 Mar;65(3):397-402.
- (135) Berg K, Madslie K, Bommer JC, Oftebro R, Winkelmann JW, Moan J. Light induced relocation of sulfonated meso-tetraphenylporphyrins in NHIK 3025 cells and effects of dose fractionation. *Photochem Photobiol* 1991 Feb;53(2):203-10.
- (136) Strauss WS, Gschwend MH, Sailer R, Schneckenburger H, Steiner R, Ruck A. Intracellular fluorescence behaviour of meso-tetra(4-sulphonatophenyl)porphyrin during photodynamic treatment at various growth phases of cultured cells. *J Photochem Photobiol B* 1995 May;28(2):155-61.
- (137) Kessel D. Relocalization of cationic porphyrins during photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci* 2002 Nov;1(11):837-40.
- (138) Nieminen AL. Apoptosis and necrosis in health and disease: role of mitochondria. *Int Rev Cytol* 2003;224:29-55.

- (139) Lam M, Oleinick NL, Nieminen AL. Photodynamic therapy-induced apoptosis in epidermoid carcinoma cells. Reactive oxygen species and mitochondrial inner membrane permeabilization. *J Biol Chem* 2001 Dec 14;276(50):47379-86.
- (140) Hilf R. Mitochondria are targets of photodynamic therapy. *J Bioenerg Biomembr* 2007 Feb;39(1):85-9.
- (141) Varnes ME, Chiu SM, Xue LY, Oleinick NL. Photodynamic therapy-induced apoptosis in lymphoma cells: translocation of cytochrome c causes inhibition of respiration as well as caspase activation. *Biochem Biophys Res Commun* 1999 Feb 24;255(3):673-9.
- (142) Kriska T, Korytowski W, Girotti AW. Role of mitochondrial cardiolipin peroxidation in apoptotic photokilling of 5-aminolevulinic acid-treated tumor cells. *Arch Biochem Biophys* 2005 Jan 15;433(2):435-46.
- (143) Rodriguez ME, Kim J, Delos Santos GB, Azizuddin K, Berlin J, Anderson VE, et al. Binding to and photo-oxidation of cardiolipin by the phthalocyanine photosensitizer Pc 4. *J Biomed Opt* 2010 Sep;15(5):051604.
- (144) Luzio JP, Pryor PR, Bright NA. Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007 Aug;8(8):622-32.
- (145) Kuester D, Lippert H, Roessner A, Krueger S. The cathepsin family and their role in colorectal cancer. *Pathol Res Pract* 2008;204(7):491-500.
- (146) Repnik U, Stoka V, Turk V, Turk B. Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death. *Biochim Biophys Acta* 2012 Jan;1824(1):22-33.
- (147) Terman A, Kurz T. Lysosomal iron, iron chelation, and cell death. *Antioxid Redox Signal* 2013 Mar 10;18(8):888-98.
- (148) Kurz T, Eaton JW, Brunk UT. The role of lysosomes in iron metabolism and recycling. *Int J Biochem Cell Biol* 2011 Dec;43(12):1686-97.
- (149) Ichinose S, Usuda J, Hirata T, Inoue T, Ohtani K, Maehara S, et al. 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* 2006 Aug;29(2):349-55.
- (150) Saggi S, Hung HI, Quiogue G, Lemasters JJ, Nieminen AL. Lysosomal signaling enhances mitochondria-mediated photodynamic therapy in A431 cancer cells: role of iron. *Photochem Photobiol* 2012 Mar;88(2):461-8.
- (151) Chiu SM, Xue LY, Lam M, Rodriguez ME, Zhang P, Kenney ME, et al. A requirement for bid for induction of apoptosis by photodynamic therapy with a lysosome- but not a mitochondrion-targeted photosensitizer. *Photochem Photobiol* 2010 Sep;86(5):1161-73.
- (152) Wan Q, Liu L, Xing D, Chen Q. Bid is required in NPe6-PDT-induced apoptosis. *Photochem Photobiol* 2008 Jan;84(1):250-7.
- (153) Marino J, Garcia Vior MC, Furmento VA, Blank VC, Awruch J, Roguin LP. Lysosomal and mitochondrial permeabilization mediates zinc(II) cationic phthalocyanine phototoxicity. *Int J Biochem Cell Biol* 2013 Nov;45(11):2553-62.
- (154) Ali-Seyed M, Bhuvaneshwari R, Soo KC, Olivo M. Photolon --photosensitization induces apoptosis via ROS-mediated cross-talk between mitochondria and lysosomes. *Int J Oncol* 2011 Oct;39(4):821-31.
- (155) Hung HI, Schwartz JM, Maldonado EN, Lemasters JJ, Nieminen AL. Mitoferrin-2-dependent mitochondrial iron uptake sensitizes human head and neck squamous carcinoma cells to photodynamic therapy. *J Biol Chem* 2013 Jan 4;288(1):677-86.

- (156) Berridge MJ. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium* 2002 Nov;32(5-6):235-49.
- (157) Arbabian A, Brouland JP, Apati A, Paszty K, Hegedus L, Enyedi A, et al. Modulation of endoplasmic reticulum calcium pump expression during lung cancer cell differentiation. *FEBS J* 2013 Nov;280(21):5408-18.
- (158) Kessel D, Castelli M, Reiners JJ. 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* 2005 May;12(5):502-11.
- (159) Moserova I, Kralova J. Role of ER stress response in photodynamic therapy: ROS generated in different subcellular compartments trigger diverse cell death pathways. *PLoS One* 2012;7(3):e32972.
- (160) He P, Ahn JC, Shin JI, Chung PS. Photoactivation of 9-hydroxypheophorbide alpha triggers apoptosis through the reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway and endoplasmic reticulum stress in AMC-HN-3 laryngeal cancer cells. *Int J Oncol* 2010 Apr;36(4):801-8.
- (161) Granville DJ, Ruehlmann DO, Choy JC, Cassidy BA, Hunt DW, van BC, et al. Bcl-2 increases emptying of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> stores during photodynamic therapy-induced apoptosis. *Cell Calcium* 2001 Nov;30(5):343-50.
- (162) Shahzidi S, Cunderlikova B, Wiedlocha A, Zhen Y, Vasovic V, Nesland JM, et al. Simultaneously targeting mitochondria and endoplasmic reticulum by photodynamic therapy induces apoptosis in human lymphoma cells. *Photochem Photobiol Sci* 2011 Nov;10(11):1773-82.
- (163) Zhivotovsky B, Orrenius S. Calcium and cell death mechanisms: a perspective from the cell death community. *Cell Calcium* 2011 Sep;50(3):211-21.
- (164) Kessel D, Reiners JJ, Jr. Apoptosis and autophagy after mitochondrial or endoplasmic reticulum photodamage. *Photochem Photobiol* 2007 Sep;83(5):1024-8.
- (165) Firczuk M, Gabrysiak M, Barankiewicz J, Domagala A, Nowis D, Kujawa M, et al. GRP78-targeting subtilase cytotoxin sensitizes cancer cells to photodynamic therapy. *Cell Death Dis* 2013;4:e741.
- (166) Fletcher DA, Mullins RD. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 2010 Jan 28;463(7280):485-92.
- (167) Radulovic M, Godovac-Zimmermann J. Proteomic approaches to understanding the role of the cytoskeleton in host-defense mechanisms. *Expert Rev Proteomics* 2011 Feb;8(1):117-26.
- (168) Ji Z, Yang G, Shahzidi S, Tkacz-Stachowska K, Suo Z, Nesland JM, et al. Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha overexpression by cobalt chloride enhances cellular resistance to photodynamic therapy. *Cancer Lett* 2006 Dec 8;244(2):182-9.
- (169) Soares M.P., Bach F.H. Heme oxygenase-1: from biology to therapeutic potential. *Trends in Molecular Medicine* 2009 Feb;15(2):50-8.
- (170) Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002 Jan;2(1):38-47.
- (171) Evans CL, Abu-Yousif AO, Park YJ, Klein OJ, Celli JP, Rizvi I, et al. Killing hypoxic cell populations in a 3D tumor model with EtNBS-PDT. *PLoS One* 2011;6(8):e23434.
- (172) Jegu G. Targeting heat shock proteins in cancer. 2013 May 28.
- (173) Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones* 2005;10(2):86-103.



- (174) Almeida MB, do Nascimento JL, Herculano AM, Crespo-Lopez ME. Molecular chaperones: toward new therapeutic tools. *Biomed Pharmacother* 2011 Jul;65(4):239-43.
- (175) Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 Aug 24;286(3):433-42.
- (176) Hanlon JG, Adams K, Rainbow AJ, Gupta RS, Singh G. Induction of Hsp60 by Photofrin-mediated photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 2001 Nov 1;64(1):55-61.
- (177) Gomer CJ, Rytter SW, Ferrario A, Rucker N, Wong S, Fisher AM. Photodynamic therapy-mediated oxidative stress can induce expression of heat shock proteins. *Cancer Res* 1996 May 15;56(10):2355-60.
- (178) Wang HP, Hanlon JG, Rainbow AJ, Espiritu M, Singh G. Up-regulation of Hsp27 plays a role in the resistance of human colon carcinoma HT29 cells to photooxidative stress. *Photochem Photobiol* 2002 Jul;76(1):98-104.
- (179) Ferrario A, Gomer CJ. Targeting the 90 kDa heat shock protein improves photodynamic therapy. *Cancer Lett* 2010 Mar 28;289(2):188-94.
- (180) Nonaka M, Ikeda H, Inokuchi T. Inhibitory effect of heat shock protein 70 on apoptosis induced by photodynamic therapy in vitro. *Photochem Photobiol* 2004 Jan;79(1):94-8.
- (181) Altieri DC. Targeting survivin in cancer. *Cancer Lett* 2013 May 28;332(2):225-8.
- (182) Cogno IS, Vittar NB, Lamberti MJ, Rivarola VA. Optimization of photodynamic therapy response by survivin gene knockdown in human metastatic breast cancer T47D cells. *J Photochem Photobiol B* 2011 Sep 2;104(3):434-43.
- (183) Ferrario A, Rucker N, Wong S, Luna M, Gomer CJ. Survivin, a member of the inhibitor of apoptosis family, is induced by photodynamic therapy and is a target for improving treatment response. *Cancer Res* 2007 May 15;67(10):4989-95.
- (184) Bhowmick R, Girotti AW. Cytoprotective induction of nitric oxide synthase in a cellular model of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. *Free Radic Biol Med* 2010 May 15;48(10):1296-301.
- (185) Bhowmick R, Girotti AW. Rapid upregulation of cytoprotective nitric oxide in breast tumor cells subjected to a photodynamic therapy-like oxidative challenge. *Photochem Photobiol* 2011 Mar;87(2):378-86.
- (186) Bhowmick R, Girotti AW. Cytoprotective signaling associated with nitric oxide upregulation in tumor cells subjected to photodynamic therapy-like oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2013 Apr;57:39-48.
- (187) Bhowmick R, Girotti AW. Pro-survival and pro-growth effects of stress-induced nitric oxide in a prostate cancer photodynamic therapy model. *Cancer Lett* 2014 Feb 1;343(1):115-22.
- (188) Henderson BW, Sitnik-Busch TM, Vaughan LA. Potentiation of photodynamic therapy antitumor activity in mice by nitric oxide synthase inhibition is fluence rate dependent. *Photochem Photobiol* 1999 Jul;70(1):64-71.
- (189) Korbelik M, Parkins CS, Shibuya H, Cecic I, Stratford MR, Chaplin DJ. Nitric oxide production by tumour tissue: impact on the response to photodynamic therapy. *Br J Cancer* 2000 Jun;82(11):1835-43.
- (190) Martinez-Ruiz A, Cadenas S, Lamas S. Nitric oxide signaling: classical, less classical, and nonclassical mechanisms. *Free Radic Biol Med* 2011 Jul 1;51(1):17-29.
- (191) Rapozzi V, Della PE, Zorzet S, Zacchigna M, Bonavida B, Xodo LE. Nitric oxide-mediated activity in anti-cancer photodynamic therapy. *Nitric Oxide* 2013 Apr 1;30:26-35.

- (192) Rapozzi V, Umezawa K, Xodo LE. Role of NF-kappaB/Snail/RKIP loop in the response of tumor cells to photodynamic therapy. *Lasers Surg Med* 2011 Sep;43(7):575-85.
- (193) Carneiro ZA, de Moraes JC, Rodrigues FP, de Lima RG, Curti C, da Rocha ZN, et al. Photocytotoxic activity of a nitrosyl phthalocyanine ruthenium complex--a system capable of producing nitric oxide and singlet oxygen. *J Inorg Biochem* 2011 Aug;105(8):1035-43.
- (194) Heinrich TA, Tedesco AC, Fukuto JM, da Silva RS. Production of reactive oxygen and nitrogen species by light irradiation of a nitrosyl phthalocyanine ruthenium complex as a strategy for cancer treatment. *Dalton Trans* 2014 Feb 11;43(10):4021-5.
- (195) Dabrowski MJ, Maeda D, Zebala J, Lu WD, Mahajan S, Kavanagh TJ, et al. Glutathione S-transferase PI-1 expression modulates sensitivity of human kidney 293 cells to photodynamic therapy with hypericin. *Arch Biochem Biophys* 2006 May 15;449(1-2):94-103.
- (196) Wang HP, Qian SY, Schafer FQ, Domann FE, Oberley LW, Buettner GR. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase protects against singlet oxygen-induced cell damage of photodynamic therapy. *Free Radic Biol Med* 2001 Apr 15;30(8):825-35.
- (197) Kimani SG, Phillips JB, Bruce JI, MacRobert AJ, Golding JP. Antioxidant inhibitors potentiate the cytotoxicity of photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 2012 Jan;88(1):175-87.
- (198) Golab J, Nowis D, Skrzycki M, Czeczot H, Baranczyk-Kuzma A, Wilczynski GM, et al. Antitumor effects of photodynamic therapy are potentiated by 2-methoxyestradiol. A superoxide dismutase inhibitor. *J Biol Chem* 2003 Jan 3;278(1):407-14.
- (199) Dolgachev V, Oberley LW, Huang TT, Kraniak JM, Tainy MA, Hanada K, et al. A role for manganese superoxide dismutase in apoptosis after photosensitization. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 Jul 1;332(2):411-7.
- (200) Hadjur C, Richard MJ, Parat MO, Jardon P, Favier A. Photodynamic effects of hypericin on lipid peroxidation and antioxidant status in melanoma cells. *Photochem Photobiol* 1996 Aug;64(2):375-81.
- (201) Yano S., Hirohara S., Obata M, Hagiya Y., Ogura S, Ikeda A., et al. Current states and future views in photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 2011 Mar;12(1):46-67.
- (202) O'Connor AE, Gallagher WM, Byrne AT. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 2009 Sep;85(5):1053-74.
- (203) Ormond A.B, Freeman H.S. Dye sensitizers for Photodynamic Therapy. *Materials* 2013 Jun;6:817-40.
- (204) Nokes B, Apel M, Jones C, Brown G, Lang JE. Aminolevulinic acid (ALA): photodynamic detection and potential therapeutic applications. *J Surg Res* 2013 May;181(2):262-71.
- (205) Fukuda H, Casas A, Batlle A. Aminolevulinic acid: from its unique biological function to its star role in photodynamic therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 2005 Feb;37(2):272-6.
- (206) Morton CA. Methyl aminolevulinate (Metvix) photodynamic therapy - practical pearls. *J Dermatolog Treat* 2003;14 Suppl 3:23-6.
- (207) Ray ER, Chatterton K, Khan MS, Thomas K, Chandra A, O'Brien TS. Hexylaminolaevulinate 'blue light' fluorescence cystoscopy in the investigation of clinically unconfirmed positive urine cytology. *BJU Int* 2009 May;103(10):1363-7.
- (208) Ray ER, Chatterton K, Thomas K, Khan MS, Chandra A, O'Brien TS. Hexylaminolevulinate photodynamic diagnosis for multifocal recurrent nonmuscle invasive bladder cancer. *J Endourol* 2009 Jun;23(6):983-8.

- (209) Lange N, Jichlinski P, Zellweger M, Forrer M, Marti A, Guillou L, et al. Photodetection of early human bladder cancer based on the fluorescence of 5-aminolaevulinic acid hexylester-induced protoporphyrin IX: a pilot study. *Br J Cancer* 1999 Apr;80(1-2):185-93.
- (210) Huang YY, Mroz P, Zhiyentayev T, Sharma SK, Balasubramanian T, Ruzie C, et al. In vitro photodynamic therapy and quantitative structure-activity relationship studies with stable synthetic near-infrared-absorbing bacteriochlorin photosensitizers. *J Med Chem* 2010 May 27;53(10):4018-27.
- (211) Garbo G.M. Purpurins and benzochlorins as sensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 1996 Jul;34(2-3):109-16.
- (212) Gerola AP, Santana A, Franca PB, Tsubone TM, de Oliveira HP, Caetano W, et al. Effects of metal and the phetyl chain on chlorophyll derivatives: physicochemical evaluation for photodynamic inactivation of microorganisms. *Photochem Photobiol* 2011 Jul;87(4):884-94.
- (213) Li WT, Tsao HW, Chen YY, Cheng SW, Hsu YC. A study on the photodynamic properties of chlorophyll derivatives using human hepatocellular carcinoma cells. *Photochem Photobiol Sci* 2007 Dec;6(12):1341-8.
- (214) Wu D, Liu Z, Fu Y, Zhang Y, Tang N, Wang Q, et al. Efficacy of 2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinyl pyropheophorbide-a in photodynamic therapy of human esophageal squamous cancer cells. *Oncol Lett* 2013 Oct;6(4):1111-9.
- (215) Rigual N, Shafirstein G, Cooper MT, Baumann H, Bellnier DA, Sunar U, et al. Photodynamic therapy with 3-(1'-hexyloxyethyl) pyropheophorbide a for cancer of the oral cavity. *Clin Cancer Res* 2013 Dec 1;19(23):6605-13.
- (216) Wang A, Long L, Zhang C. Synthesis and properties of photo-activable phthalocyanines: a brief overview. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 2011;71:1-24.
- (217) Claessens CG, Hahn U, Torres T. Phthalocyanines: from outstanding electronic properties to emerging applications. *Chem Rec* 2008;8(2):75-97.
- (218) Nyokong T. Effects of substituents on the photochemical and photophysical properties of main group metal phthalocyanines. *Coordination Chemistry Reviews* 2007 Jul;251(13-14):1707-22.
- (219) Arambula JF, Preihs C, Borthwick D, Magda D, Sessler JL. Texaphyrins: tumor localizing redox active expanded porphyrins. *Anticancer Agents Med Chem* 2011 Feb;11(2):222-32.
- (220) Ruiz-Gonzalez R, Acedo P, Sanchez-Garcia D, Nonell S, Canete M, Stockert JC, et al. Efficient induction of apoptosis in HeLa cells by a novel cationic porphycene photosensitizer. *Eur J Med Chem* 2013 May;63:401-14.
- (221) Wang Z, Lecane PS, Thiemann P, Fan Q, Cortez C, Ma X, et al. Synthesis and biologic properties of hydrophilic sapphyrins, a new class of tumor-selective inhibitors of gene expression. *Mol Cancer* 2007;6:9.
- (222) Naumovski L, Sirisawad M, Lecane P, Chen J, Ramos J, Wang Z, et al. Tumor localization and antitumor efficacy of novel sapphyrin compounds. *Mol Cancer Ther* 2006 Nov;5(11):2798-805.
- (223) Josefsen LB, Boyle RW. Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitizers. *Met Based Drugs* 2008;2008:276109.
- (224) Agostinis P, Vantieghem A, Merlevede W, de Witte PA. Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *Int J Biochem Cell Biol* 2002 Mar;34(3):221-41.
- (225) Saw CL, Olivo M, Soo KC, Heng PW. Delivery of hypericin for photodynamic applications. *Cancer Lett* 2006 Sep 8;241(1):23-30.

- (226) Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro AP, Brunetti IL, Costa CA, Jacomassi DP, et al. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol* 2011 Jul;87(4):895-903.
- (227) Liu J, Zhao YW, Zhao JQ, Xia AD, Jiang LJ, Wu S, et al. Two-photon excitation studies of hypocrellins for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 2002 Nov;68(2-3):156-64.
- (228) Guan J, Lai X, Wang X, Leung AW, Zhang H, Xu C. Photodynamic action of methylene blue in osteosarcoma cells *in vitro*. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2014;11(1):13-9.
- (229) Tremblay JF, Dussault S, Viau G, Gad F, Boushira M, Bissonnette R. Photodynamic therapy with toluidine blue in Jurkat cells: cytotoxicity, subcellular localization and apoptosis induction. *Photochem Photobiol Sci* 2002 Nov;1(11):852-6.
- (230) Lin J, Bi LJ, Zhang ZG, Fu YM, Dong TT. Toluidine blue-mediated photodynamic therapy of oral wound infections in rats. *Lasers Med Sci* 2010 Mar;25(2):233-8.
- (231) Kassab K. Photophysical and photosensitizing properties of selected cyanines. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2002 Aug;68(1):15-22.
- (232) Panzarini E, Inguscio V, Tenuzzo BA, Dini L. In vitro and in vivo clearance of Rose Bengal Acetate-PhotoDynamic Therapy-induced autophagic and apoptotic cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 2013 Jul;238(7):765-78.
- (233) Kamkaew A, Lim SH, Lee HB, Kiew LV, Chung LY, Burgess K. BODIPY dyes in photodynamic therapy. *Chem Soc Rev* 2013 Jan 7;42(1):77-88.
- (234) Mroz P, Pawlak A, Satti M, Lee H, Wharton T, Gali H, et al. Functionalized fullerenes mediate photodynamic killing of cancer cells: Type I versus Type II photochemical mechanism. *Free Radic Biol Med* 2007 Sep 1;43(5):711-9.
- (235) Mroz P, Tegos GP, Gali H, Wharton T, Sarna T, Hamblin MR. Photodynamic therapy with fullerenes. *Photochem Photobiol Sci* 2007 Nov;6(11):1139-49.
- (236) Jiang Z, Shao J, Yang T, Wang J, Jia L. Pharmaceutical development, composition and quantitative analysis of phthalocyanine as the photosensitizer for cancer photodynamic therapy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2014;87:98-104.
- (237) Camerin M, Magaraggia M, Soncin M, Jori G, Moreno M, Chambrier I, et al. The in vivo efficacy of phthalocyanine-nanoparticle conjugates for the photodynamic therapy of amelanotic melanoma. *Eur J Cancer* 2010 Jul;46(10):1910-8.
- (238) Araujo LM, Thomazine JA, Lopez RF. Development of microemulsions to topically deliver 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy. *Eur J Pharm Biopharm* 2010 May;75(1):48-55.
- (239) Zhang LW, Al-Suwayeh SA, Hung CF, Chen CC, Fang JY. Oil components modulate the skin delivery of 5-aminolevulinic acid and its ester prodrug from oil-in-water and water-in-oil nanoemulsions. *Int J Nanomedicine* 2011;6:693-704.
- (240) Gibot L, Lemelle A, Till U, Moukarzel B, Mingotaud AF, Pimienta V, et al. Polymeric Micelles Encapsulating Photosensitizer: Structure/Photodynamic Therapy Efficiency Relation. *Biomacromolecules* 2014 Mar 3.
- (241) Wang X, Chai Z, Ma R, Zhao L, Zhang Z, An Y, et al. Enhancement of the photostability and photoactivity of metallo-meso-5,10,15,20-tetrakis-(4-sulfonatophenyl)porphyrins by polymeric micelles. *J Colloid Interface Sci* 2012 Dec 15;388(1):80-5.
- (242) Master AM, Rodriguez ME, Kenney ME, Oleinick NL, Gupta AS. Delivery of the photosensitizer Pc 4 in PEG-PCL micelles for in vitro PDT studies. *J Pharm Sci* 2010 May;99(5):2386-98.

- (243) Romero M.P, Gobo N.R.S, de Oliveira K.T, Iamamoto Y., Serra O.A., Louro S.R.W. Photophysical properties and photodynamic activity of a novel menthol-zinc phthalocyanine conjugate incorporated in micelles. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2013 Feb;253:22-9.
- (244) Bolfarini G.C, Siqueira-Moura M.P, Demets G.J.F, Tedesco A.C. Preparation, characterization, and in vitro phototoxic effect of zinc phthalocyanine cucurbit[7]uril complex encapsulated into liposomes. *Dyes and Pigments* 2014 Jan;100:162-7.
- (245) Skupin-Mrugalska P, Piskorz J, Goslinski T, Mielcarek J, Konopka K, Duzgunes N. Current status of liposomal porphyrinoid photosensitizers. *Drug Discov Today* 2013 Aug;18(15-16):776-84.
- (246) Cao W, Ng KK, Corbin I, Zhang Z, Ding L, Chen J, et al. Synthesis and evaluation of a stable bacteriochlorophyll-analog and its incorporation into high-density lipoprotein nanoparticles for tumor imaging. *Bioconjug Chem* 2009 Nov;20(11):2023-31.
- (247) Li H, Marotta DE, Kim S, Busch TM, Wileyto EP, Zheng G. High payload delivery of optical imaging and photodynamic therapy agents to tumors using phthalocyanine-reconstituted low-density lipoprotein nanoparticles. *J Biomed Opt* 2005 Jul;10(4):41203.
- (248) Bechet D, Couleaud P, Frochot C, Viriot ML, Guillemin F, Barberi-Heyob M. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. *Trends Biotechnol* 2008 Nov;26(11):612-21.
- (249) Bryden F, Maruani A, Savoie H, Chudasama V, Smith ME, Caddick S, et al. Regioselective and Stoichiometrically Controlled Conjugation of Photodynamic Sensitizers to a HER2 Targeting Antibody Fragment. *Bioconjug Chem* 2014 Mar 19;25(3):611-7.
- (250) Pereira PM, Carvalho JJ, Silva S, Cavaleiro JA, Schneider RJ, Fernandes R, et al. Porphyrin conjugated with serum albumins and monoclonal antibodies boosts efficiency in targeted destruction of human bladder cancer cells. *Org Biomol Chem* 2014 Feb 18;12(11):1804-11.
- (251) Kiesslich T, Gollmer A, Maisch T, Berneburg M, Plaetzer K. A comprehensive tutorial on in vitro characterization of new photosensitizers for photodynamic antitumor therapy and photodynamic inactivation of microorganisms. *Biomed Res Int* 2013;2013:840417.
- (252) Stockert JC, Blazquez-Castro A, Canete M, Horobin RW, Villanueva A. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem* 2012 Dec;114(8):785-96.
- (253) Yeh SC, Diamond KR, Patterson MS, Nie Z, Hayward JE, Fang Q. Monitoring photosensitizer uptake using two photon fluorescence lifetime imaging microscopy. *Theranostics* 2012;2(9):817-26.
- (254) Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett* 2006 Jan 5;160(2):171-7.
- (255) Tynga IM, Houreld NN, Abrahamse H. The primary subcellular localization of Zinc phthalocyanine and its cellular impact on viability, proliferation and structure of breast cancer cells (MCF-7). *J Photochem Photobiol B* 2013 Mar 5;120:171-6.
- (256) Abo-Zeid MA, Liehr T, El-Daly SM, Gamal-Eldeen AM, Gleis M, Shabaka A, et al. Molecular cytogenetic evaluation of the efficacy of photodynamic therapy by indocyanine green in breast adenocarcinoma MCF-7 cells. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2013 May;10(2):194-202.
- (257) Lee HZ, Liu WZ, Hsieh WT, Tang FY, Chung JG, Leung HW. Oxidative stress involvement in *Physalis angulata*-induced apoptosis in human oral cancer cells. *Food Chem Toxicol* 2009 Mar;47(3):561-70.

- (258) Henry CM, Hollville E, Martin SJ. Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. *Methods* 2013 Jun 1;61(2):90-7.
- (259) Koceva-Chyla A, Jedrzejczak M, Skierski J, Kania K, Jozwiak Z. Mechanisms of induction of apoptosis by anthraquinone anticancer drugs aclarubicin and mitoxantrone in comparison with doxorubicin: relation to drug cytotoxicity and caspase-3 activation. *Apoptosis* 2005 Dec;10(6):1497-514.
- (260) Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Anal Biochem* 1994 May 1;218(2):314-9.
- (261) Laranjo M, Serra AC, Abrantes M, Pineiro M, Goncalves AC, Casalta-Lopes J, et al. 2-Bromo-5-hydroxyphenylporphyrins for photodynamic therapy: photosensitization efficiency, subcellular localization and in vivo studies. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2013 Feb;10(1):51-61.
- (262) Wang ZQ, Liao J, Diwu Z. N-DEVD-N'-morpholinecarbonyl-rhodamine 110: novel caspase-3 fluorogenic substrates for cell-based apoptosis assay. *Bioorg Med Chem Lett* 2005 May 2;15(9):2335-8.
- (263) Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, Ackler SL, Catron ND, Chen J, et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med* 2013 Feb;19(2):202-8.
- (264) Liu J, Xia H, Kim M, Xu L, Li Y, Zhang L, et al. Beclin1 controls the levels of p53 by regulating the deubiquitination activity of USP10 and USP13. *Cell* 2011 Sep 30;147(1):223-34.
- (265) Kim HJ, Koo SY, Ahn BH, Park O, Park DH, Seo DO, et al. NecroX as a novel class of mitochondrial reactive oxygen species and ONOO(-) scavenger. *Arch Pharm Res* 2010 Nov;33(11):1813-23.
- (266) Hsu MH, Chen CJ, Kuo SC, Chung JG, Lai YY, Teng CM, et al. 2-(3-Fluorophenyl)-6-methoxy-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid (YJC-1) induces mitotic phase arrest in A549 cells. *Eur J Pharmacol* 2007 Mar 15;559(1):14-20.
- (267) Hempel SL, Buettner GR, O'Malley YQ, Wessels DA, Flaherty DM. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5-(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med* 1999 Jul;27(1-2):146-59.
- (268) Hawkins CL, Morgan PE, Davies MJ. Quantification of protein modification by oxidants. *Free Radic Biol Med* 2009 Apr 15;46(8):965-88.
- (269) Kojima H, Sakurai K, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, et al. Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1998 Feb;46(2):373-5.
- (270) Presley AD, Fuller KM, Arriaga EA. MitoTracker Green labeling of mitochondrial proteins and their subsequent analysis by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003 Aug 5;793(1):141-50.
- (271) Descles J, Vartanian M, El HA, Quinet M, Bremond N, Sapriel G, et al. New tools for labeling silica in living diatoms. *New Phytol* 2008;177(3):822-9.
- (272) Cole L, Davies D, Hyde GJ, Ashford AE. ER-Tracker dye and BODIPY-brefeldin A differentiate the endoplasmic reticulum and golgi bodies from the tubular-vacuole system in living hyphae of *Pisolithus tinctorius*. *J Microsc* 2000 Mar;197(Pt 3):239-49.
- (273) Antharavally BS, Mallia KA, Rangaraj P, Haney P, Bell PA. Quantitation of proteins using a dye-metal-based colorimetric protein assay. *Anal Biochem* 2009 Feb 15;385(2):342-5.

- (274) Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007 Jun;35(4):495-516.
- (275) Fadeel B, Ahlin A, Henter JI, Orrenius S, Hampton MB. Involvement of caspases in neutrophil apoptosis: regulation by reactive oxygen species. *Blood* 1998 Dec 15;92(12):4808-18.
- (276) Ferrario A, von Tiehl KF, Rucker N, Schwarz MA, Gill PS, Gomer CJ. Antiangiogenic treatment enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse mammary carcinoma. *Cancer Res* 2000 Aug 1;60(15):4066-9.
- (277) Jung SN, Yang WK, Kim J, Kim HS, Kim EJ, Yun H, et al. Reactive oxygen species stabilize hypoxia-inducible factor-1 alpha protein and stimulate transcriptional activity via AMP-activated protein kinase in DU145 human prostate cancer cells. *Carcinogenesis* 2008 Apr;29(4):713-21.
- (278) Kietzmann T, Gorkach A. Reactive oxygen species in the control of hypoxia-inducible factor-mediated gene expression. *Semin Cell Dev Biol* 2005 Aug;16(4-5):474-86.
- (279) Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med* 2004 Feb 29;36(1):1-12.
- (280) Kim H, Yoon SC, Lee TY, Jeong D. Discriminative cytotoxicity assessment based on various cellular damages. *Toxicol Lett* 2009 Jan 10;184(1):13-7.
- (281) Adjei IM, Sharma B, Labhasetwar V. Nanoparticles: cellular uptake and cytotoxicity. *Adv Exp Med Biol* 2014;811:73-91.
- (282) Shao J, Xue J, Dai Y, Liu H, Chen N, Jia L, et al. Inhibition of human hepatocellular carcinoma HepG2 by phthalocyanine photosensitizer PHOTOCYANINE: ROS production, apoptosis, cell cycle arrest. *Eur J Cancer* 2012 Sep;48(13):2086-96.
- (283) Shao J, Dai Y, Zhao W, Xie J, Xue J, Ye J, et al. Intracellular distribution and mechanisms of actions of photosensitizer Zinc(II)-phthalocyanine solubilized in Cremophor EL against human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Cancer Lett* 2013 Mar 1;330(1):49-56.
- (284) Xia C, Wang Y, Chen W, Yu W, Wang B, Li T. 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* 2011;16(2):1389-401.
- (285) Hoi SW, Wong HM, Chan JY, Yue GG, Tse GM, Law BK, et al. Photodynamic therapy of Pheophorbide a inhibits the proliferation of human breast tumour via both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways in in vitro and in vivo models. *Phytother Res* 2012 May;26(5):734-42.
- (286) Whitacre CM, Feyes DK, Satoh T, Grossmann J, Mulvihill JW, Mukhtar H, et al. Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4 of SW480 human colon cancer xenografts in athymic mice. *Clin Cancer Res* 2000 May;6(5):2021-7.
- (287) Ahmad N, Feyes DK, Agarwal R, Mukhtar H. Photodynamic therapy results in induction of WAF1/CIP1/P21 leading to cell cycle arrest and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Jun 9;95(12):6977-82.
- (288) Liang SH, Clarke MF. Regulation of p53 localization. *Eur J Biochem* 2001 May;268(10):2779-83.
- (289) Di SA, Ettore A, Sbrana S, Giovani C, Neri P. Purpurin-18 in combination with light leads to apoptosis or necrosis in HL60 leukemia cells. *Photochem Photobiol* 2001 Mar;73(3):290-6.
- (290) Fabris C, Valduga G, Miotto G, Borsetto L, Jori G, Garbisa S, et al. Photosensitization with zinc (II) phthalocyanine as a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Cancer Res* 2001 Oct 15;61(20):7495-500.

- (291) Barge J, Decreau R, Julliard M, Hubaud JC, Sabatier AS, Grob JJ, et al. Killing efficacy of a new silicon phthalocyanine in human melanoma cells treated with photodynamic therapy by early activation of mitochondrion-mediated apoptosis. *Exp Dermatol* 2004 Jan;13(1):33-44.
- (292) Huang HF, Chen YZ, Wu Y. Mitochondria-dependent apoptosis induced by a novel amphipathic photochemotherapeutic agent ZnPcS2P2 in HL60 cells. *Acta Pharmacol Sin* 2005 Sep;26(9):1138-44.
- (293) Reiners JJ, Jr., Caruso JA, Mathieu P, Chelladurai B, Yin XM, Kessel D. Release of cytochrome c and activation of pro-caspase-9 following lysosomal photodamage involves Bid cleavage. *Cell Death Differ* 2002 Sep;9(9):934-44.
- (294) Liu L, Zhang Z, Xing D. Cell death via mitochondrial apoptotic pathway due to activation of Bax by lysosomal photodamage. *Free Radic Biol Med* 2011 Jul 1;51(1):53-68.
- (295) Zhou Z, Zhao C, Liu W, Li Q, Zhang L, Sheng W, et al. Involvement of the mitochondria-caspase pathway in HeLa cell death induced by 2-ethanolamino-2-demethoxy-17-ethanolimino-hypocrellin B (EAHB)-mediated photodynamic therapy. *Int J Toxicol* 2012 Sep;31(5):483-92.
- (296) Siemen D, Ziemer M. What is the nature of the mitochondrial permeability transition pore and what is it not? *IUBMB Life* 2013 Mar;65(3):255-62.
- (297) Zakaria S, Gamal-Eldeen AM, El-Daly SM, Saleh S. Synergistic Apoptotic Effect of Doxil(R) and Aminolevulinic Acid-Based Photodynamic Therapy on Human Breast Adenocarcinoma Cells. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2014 Mar 13.
- (298) Alexandratou E, Yova D, Loukas S. A confocal microscopy study of the very early cellular response to oxidative stress induced by zinc phthalocyanine sensitization. *Free Radic Biol Med* 2005 Nov 1;39(9):1119-27.
- (299) Xue LY, Chiu SM, Oleinick NL. Photochemical destruction of the Bcl-2 oncoprotein during photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4. *Oncogene* 2001 Jun 7;20(26):3420-7.
- (300) Kessel D, Castelli M. Evidence that bcl-2 is the target of three photosensitizers that induce a rapid apoptotic response. *Photochem Photobiol* 2001 Aug;74(2):318-22.
- (301) Usuda J, Hirata T, Ichinose S, Ishizumi T, Inoue T, Ohtani K, et al. Tailor-made approach to photodynamic therapy in the treatment of cancer based on Bcl-2 photodamage. *Int J Oncol* 2008 Oct;33(4):689-96.
- (302) Zhou F, Yang Y, Xing D. Bcl-2 and Bcl-xL play important roles in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *FEBS J* 2011 Feb;278(3):403-13.
- (303) Kessel D. Promotion of PDT efficacy by a Bcl-2 antagonist. *Photochem Photobiol* 2008 May;84(3):809-14.
- (304) Davids MS, Letai A. ABT-199: taking dead aim at BCL-2. *Cancer Cell* 2013 Feb 11;23(2):139-41.
- (305) Khaw SL, Merino D, Anderson MA, Glaser SP, Bouillet P, Roberts AW, et al. Both leukaemic and normal peripheral B lymphoid cells are highly sensitive to the selective pharmacological inhibition of prosurvival Bcl-2 with ABT-199. *Leukemia* 2014 Jan 9.
- (306) Colak S, Zimmerlin CD, Fessler E, Hogdal L, Prasetyanti PR, Grandela CM, et al. Decreased mitochondrial priming determines chemoresistance of colon cancer stem cells. *Cell Death Differ* 2014 Mar 28.
- (307) Deng J, Letai A. Priming BCL-2 to kill: the combination therapy of tamoxifen and ABT-199 in ER+ breast cancer. *Breast Cancer Res* 2013;15(5):317.



- (308) Vaillant F, Merino D, Lee L, Breslin K, Pal B, Ritchie ME, et al. Targeting BCL-2 with the BH3 mimetic ABT-199 in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer Cell* 2013 Jul 8;24(1):120-9.
- (309) Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000 Jul 7;102(1):33-42.
- (310) Weber TG, Poschinger T, Galban S, Rehemtulla A, Scheuer W. Noninvasive monitoring of pharmacodynamics and kinetics of a death receptor 5 antibody and its enhanced apoptosis induction in sequential application with doxorubicin. *Neoplasia* 2013 Aug;15(8):863-74.
- (311) Solar P, Ferenc P, Koval' J, Mikes J, Solarova Z, Hrcakova G, et al. Photoactivated hypericin induces downregulation of HER2 gene expression. *Radiat Res* 2011 Jan;175(1):51-6.
- (312) Milla LN, Cogno IS, Rodriguez ME, Sanz-Rodriguez F, Zamarron A, Gilaberte Y, et al. Isolation and characterization of squamous carcinoma cells resistant to photodynamic therapy. *J Cell Biochem* 2011 Sep;112(9):2266-78.
- (313) Ahamed M, Akhtar MJ, Raja M, Ahmad I, Siddiqui MK, AlSalhi MS, et al. ZnO nanorod-induced apoptosis in human alveolar adenocarcinoma cells via p53, survivin and bax/bcl-2 pathways: role of oxidative stress. *Nanomedicine* 2011 Dec;7(6):904-13.
- (314) White-Gilbertson SJ, Kasman L, McKillop J, Tirodkar T, Lu P, Voelkel-Johnson C. Oxidative stress sensitizes bladder cancer cells to TRAIL mediated apoptosis by down-regulating anti-apoptotic proteins. *J Urol* 2009 Sep;182(3):1178-85.
- (315) Park MK, Lee BD, Chae SW, Chi J, Kwon SK, Song JJ. Protective effect of NecroX, a novel necroptosis inhibitor, on gentamicin-induced ototoxicity. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2012 Sep;76(9):1265-9.
- (316) Thu VT, Kim HK, Long IT, Lee SR, Hanh TM, Ko TH, et al. NecroX-5 prevents hypoxia/reoxygenation injury by inhibiting the mitochondrial calcium uniporter. *Cardiovasc Res* 2012 May 1;94(2):342-50.
- (317) Garg AD, Dudek AM, Agostinis P. Autophagy-dependent suppression of cancer immunogenicity and effector mechanisms of innate and adaptive immunity. *Oncoimmunology* 2013 Oct 1;2(10):e26260.
- (318) Garg AD, Agostinis P. ER stress, autophagy and immunogenic cell death in photodynamic therapy-induced anti-cancer immune responses. *Photochem Photobiol Sci* 2014 Mar;13(3):474-87.
- (319) Rubio N, Verrax J, Dewaele M, Verfaillie T, Johansen T, Piette J, et al. p38(MAPK)-regulated induction of p62 and NBR1 after photodynamic therapy promotes autophagic clearance of ubiquitin aggregates and reduces reactive oxygen species levels by supporting Nrf2-antioxidant signaling. *Free Radic Biol Med* 2014 Feb;67:292-303.
- (320) Maes H, Rubio N, Garg AD, Agostinis P. Autophagy: shaping the tumor microenvironment and therapeutic response. *Trends Mol Med* 2013 Jul;19(7):428-46.
- (321) Liu T, Wu LY, Berkman CE. Prostate-specific membrane antigen-targeted photodynamic therapy induces rapid cytoskeletal disruption. *Cancer Lett* 2010 Oct 1;296(1):106-12.
- (322) Tsai JC, Wu CL, Chien HF, Chen CT. Reorganization of cytoskeleton induced by 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy and its correlation with mitochondrial dysfunction. *Lasers Surg Med* 2005 Jun;36(5):398-408.
- (323) Firczuk M, Winiarska M, Szokalska A, Jodlowska M, Swiech M, Bojarczuk K, et al. Approaches to improve photodynamic therapy of cancer. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2011;16:208-24.

- (324) Kalyanaraman B, Darley-Usmar V, Davies KJ, Dennery PA, Forman HJ, Grisham MB, et al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic Biol Med* 2012 Jan 1;52(1):1-6.
- (325) Diez B, Cordo RR, Teijo MJ, Hajos S, Batlle A, Fukuda H. Ros production by endogenously generated Protoporphyrin IX in murine leukemia cells. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)* 2009;55(2):15-9.
- (326) Jou MJ, Jou SB, Chen HM, Lin CH, Peng TI. Critical role of mitochondrial reactive oxygen species formation in visible laser irradiation-induced apoptosis in rat brain astrocytes (RBA-1). *J Biomed Sci* 2002;9(6 Pt 1):507-16.
- (327) Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat* 2004 Apr;7(2):97-110.
- (328) Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 2004 May;142(2):231-55.
- (329) Karlsson M, Kurz T, Brunk UT, Nilsson SE, Frennesson CI. What does the commonly used DCF test for oxidative stress really show? *Biochem J* 2010 Jun 1;428(2):183-90.
- (330) Frost GA, Halliday GM, Damian DL. Photodynamic therapy-induced immunosuppression in humans is prevented by reducing the rate of light delivery. *J Invest Dermatol* 2011 Apr;131(4):962-8.
- (331) Price M, Terlecky SR, Kessel D. A role for hydrogen peroxide in the pro-apoptotic effects of photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 2009 Nov;85(6):1491-6.
- (332) Chekulayeva LV, Shevchuk IN, Chekulayev VA. Influence of temperature on the efficiency of photodestruction of Ehrlich ascites carcinoma cells sensitized by hematoporphyrin derivative. *Exp Oncol* 2004 Jun;26(2):125-39.
- (333) Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2011 Oct 1;15(7):1957-97.
- (334) Meplan C, Hesketh J. Selenium and cancer: a story that should not be forgotten-insights from genomics. *Cancer Treat Res* 2014;159:145-66.
- (335) Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med* 2009 Feb;30(1-2):1-12.
- (336) Franco R, Cidlowski JA. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death Differ* 2009 Oct;16(10):1303-14.
- (337) Jiang F, Robin AM, Katakowski M, Tong L, Espiritu M, Singh G, et al. Photodynamic therapy with photofrin in combination with Buthionine Sulfoximine (BSO) of human glioma in the nude rat. *Lasers Med Sci* 2003;18(3):128-33.
- (338) Kiesslich T, Plaetzer K, Oberdanner CB, Berlanda J, Obermair FJ, Krammer B. Differential effects of glucose deprivation on the cellular sensitivity towards photodynamic treatment-based production of reactive oxygen species and apoptosis-induction. *FEBS Lett* 2005 Jan 3;579(1):185-90.
- (339) Magi B, Ettore A, Liberatori S, Bini L, Andreassi M, Frosali S, et al. Selectivity of protein carbonylation in the apoptotic response to oxidative stress associated with photodynamic therapy: a cell biochemical and proteomic investigation. *Cell Death Differ* 2004 Aug;11(8):842-52.
- (340) Parke DV, Piotrowski JK. Glutathione it's role in detoxification of reactive oxygen and the environmental chemicals. *Acta Poloniae Toxicologica* 1996;4(1):1-14.

- (341) Gupta S, Ahmad N, Mukhtar H. Involvement of nitric oxide during phthalocyanine (Pc4) photodynamic therapy-mediated apoptosis. *Cancer Res* 1998 May 1;58(9):1785-8.
- (342) Lu Z, Tao Y, Zhou Z, Zhang J, Li C, Ou L, et al. Mitochondrial reactive oxygen species and nitric oxide-mediated cancer cell apoptosis in 2-butylamino-2-demethoxyhypocrellin B photodynamic treatment. *Free Radic Biol Med* 2006 Nov 15;41(10):1590-605.
- (343) Lindgard A, Hulten LM, Svensson L, Soussi B. Irradiation at 634 nm releases nitric oxide from human monocytes. *Lasers Med Sci* 2007 Mar;22(1):30-6.
- (344) Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007 Jan;87(1):315-424.
- (345) Tamietti BF, Machado AH, Maftoum-Costa M, Da Silva NS, Tedesco AC, Pacheco-Soares C. Analysis of mitochondrial activity related to cell death after PDT with AIPCS(4). *Photomed Laser Surg* 2007 Jun;25(3):175-9.

## 8. STRESZCZENIE

Choroby nowotworowe stanowią jedną z głównych przyczyn zgonów w krajach rozwijających się oraz wysokorozwiniętych, generując znaczne koszty społeczne i ekonomiczne. Stosowane obecnie strategie terapeutyczne w dalszym ciągu nie zapewniają oczekiwanej skuteczności i selektywności oraz obciążone są poważnymi skutkami ubocznymi, dlatego badania nad opracowywaniem nowych strategii leczenia stanowią intensywnie rozwijającą się dziedzinę nauk medycznych. Terapia fotodynamiczna (PDT) to mało inwazyjna metoda leczenia opierająca się na wykorzystaniu związku chemicznego tzw. fotouczulacza oraz światła o określonej długości fali, które obecności tlenu inicjuje reakcję fotodynamiczną. W wyniku, reakcji fotodynamicznej powstają toksyczne, reaktywne formy tlenu/wolne rodniki umożliwiające eliminację komórek nowotworowych. Bardzo istotną zaletą PDT jest możliwość uzyskania działania selektywnego, z uwagi na fakt, że wiele fotouczulaczy gromadzi się w wyższych stężeniach w tkankach i komórkach nowotworowych w porównaniu ze zdrową tkanką. Dodatkowo ograniczenie naświetlania jedynie do miejsca zmiany nowotworowej pozwala zwiększyć selektywny efekt PDT. Pomimo, niezwykle obiecujących wstępnych wyników PDT ciągle nie jest jeszcze rutynowo stosowaną metodą w onkologii, a procesy zachodzące w komórkach nowotworowych po jej zastosowaniu ciągle nie są jeszcze wystarczająco dobrze poznane, ponadto liczba fotouczulaczy dostępnych dla współczesnej medycyny jest również stosunkowo niewielka. W niniejszej pracy przeprowadzono eksperymenty zmierzające do oceny możliwości zastosowania czterech nowych funkcjonalizowanych ftalocyjanin w terapii fotodynamicznej chorób nowotworowych. Testowane ftalocyjaniny wyposażone są w peryferyjne ugrupowania morfolinowe w pozycjach nieperyferyjnych (tj. 1,4) pierścieni ftalocyjaninowych i posiadają skoordynowany jon metalu: TG3 (dwie grupy morfolinowe; jon cynku, TG4 (8 grup morfolinowych; jon magnezu), TG18 (8 grup morfolinowych; jon cynku); TG15 (8 grup morfolinowych; jon magnezu; w postaci soli). Wstępne badania cytotoksyczności wykazały, że jedynie związek TG3 wykazuje działanie cytotoksyczne zależne od stężenia, czasu naświetlania oraz czasu preinkubacji. Związek TG3 ulega wchłanianiu przez komórki nowotworowe, a jego obecność w komórce stwierdzono już po godzinnej preinkubacji. Najwyższe stężenie związku TG3 zmierzono w komórkach po 6h, jednak najsilniejsze działanie cytotoksyczne stwierdzono po czasie inkubacji wynoszącym 24h. Eksperymenty PDT

z użyciem cytometru przepływowego wykazały, że badany związek nie spowodował wzrostu liczby komórek w określonej fazie cyklu. Badany związek indukuje proces apoptozy w zależności od zastosowanej dawki i czasu naświetlania. Zmiany potencjału błon mitochondriów oraz wzrost aktywności kaspaz -3,-9 i pozwalają przypuszczać, że badany związek aktywuje wewnątrzkomórkowy szlak apoptozy. Hipotezę tą potwierdziły badania zmierzające do określenia zmian w ekspresji białek pro-apoptotycznych. W badaniach z użyciem techniki Western blot zaobserwowano spadek poziomu białek antyapoptotycznych z rodziny IAP oraz spadek poziomu białka Bcl-2, pomimo, że w badaniach z użyciem wybranych inhibitorów ścieżek wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnałów nie zaobserwowano nasilenia działania cytotoksycznego TG3 w wyniku zastosowania inhibitora białka Bcl-2. Wstępne badania w zakresie wpływu badanego związku na proces autofagii z użyciem inhibitora tego procesu (spautyny-1), wykazały, że może on modulować aktywność TG3 w zależności od czasu naświetlania oraz użytego stężenia związku. Wyniki sugerują, że PDT z użyciem związku TG3 może aktywować wewnątrzkomórkowe ścieżki przekazywania sygnałów związanych z procesem autofagii. Uzyskane wyniki wskazują również na fakt, że przy zastosowaniu stosunkowo wysokich dawek związku TG3 i długiego czasu naświetlania dominującą drogą śmierci komórek jest proces nekrozy, a zastosowanie jej inhibitora wpływa na działanie cytotoksyczne związku TG3 w zależności od stężenia i czasu naświetlania. Uzyskane w tej pracy wyniki sugerują także, w komórkach poddanych PDT z użyciem związku TG3 może występować zjawisko fotodegradacji białek zaangażowanych w procesy związane z prawidłowymi procesami metabolicznymi zachodzącymi w komórkach oraz procesami związanymi z ich śmiercią.

Aktywność związku TG3 jest związana z generowaniem reaktywnych form tlenu i indukowaniem stresu oksydacyjnego w komórkach nowotworowych. Podczas PDT z użyciem TG3 zaobserwowano spadek stężenia zredukowanej formy glutationu, jednocześnie jednak warto podkreślić, że badany związek nie powoduje (poza najwyższym zastosowanym stężeniem i najdłuższym czasem naświetlania) w zakresie stężeń efektywnych wolnorodnikowych uszkodzeń DNA. Badanie wpływu inhibitorów enzymów antyoksydacyjnych na fototoksyczność wskazały na enzymy zaangażowane w neutralizowaniu wolnych rodników generowanych na skutek ekspozycji komórek nowotworowych na PDT z użyciem badanego związku, co sugeruje, że jednocześnie

zablokowanie tych enzymów przy użyciu swoistego inhibitora może spotęgować efekt cytotoksyczny.

Badanie lokalizacji związku TG3 wskazuje na możliwość akumulowania się w cytoplazmie i retikulum endoplazmatycznym.

Podsumowując można stwierdzić, że związek TG3 stanowi niezwykle interesujący i obiecujący przykład fotouczulacza o potencjalnym zastosowaniu do selektywnej eliminacji komórek nowotworowych, jednak dalsze badania jego właściwości biologicznych uwzględniające uzyskane dotychczas wyniki, są jednak konieczne.

## 9. SUMMARY

**Title: The newly non-peripherally substituted phthalocyanines as a potential photosensitizer for photodynamic therapy of cancer**

**Key words:** photodynamic therapy, phthalocyanines, cancer cell line, cytotoxicity, apoptosis, necrosis, autophagy, oxidative stress, reactive oxygen species, antioxidative enzymes.

Cancer is still one major causes of death worldwide claiming thousands of deaths every year. Despite of advances in early detection and treatment cancer mortality rates are still very high, moreover side effects of recently used anticancer therapies are therefore searching of new therapeutic strategies is greatly favored. Photodynamic therapy is minimally invasive method of cancer treatment employing drug (called photosensitizer, Ps) and light of particular (depending on physicochemical properties of photosensitizer) wavelength. The reaction of photosensitizer with oxygen is initiated by light and results in generation of reactive oxygen species (ROS)/free radicals killing cancer cells. Due to selective accumulation of Ps in cancer cells and irradiation limited only to cancer tissue this therapeutic intervention can be targeted very precisely. Despite of its advantages photodynamic therapy is still not used in routine oncology yet, the number of photosensitizers approved for PDT treatment is still limited.

In this work, four novel phthalocyanines with promising photochemical properties were investigated in *in vitro* cancer cell culture model. These phthalocyanines possess peripheral 2-(morpholin-4-yl)ethoxy groups at their non-peripheral (1,4 or 1,4,8,11,15,18,22,25) positions. In addition their macrocyclic centers were equipped with a metal ion. The following phthalocyanines were researched: TG3 (two 2-(morpholin-4-yl)ethoxy groups, zinc ion in the core), TG4 (eight 2-(morpholin-4-yl)ethoxy groups, magnesium ion in the core), TG18 (eight 2-(morpholin-4-yl)ethoxy groups, zinc ion in the core), TG15 (eight iodide 2-(4-methylmorpholin-4-ium)ethoxy groups, magnesium ion in the core). All tested compounds may be classified as 2<sup>nd</sup> generation photosensitizers. They exhibit favorable photochemical properties like long-lived triplet excited states and high efficiencies of singlet oxygen generation.

The preliminary results showed that only compound TG3 exhibits pronounced cytotoxic activity in irradiated cells while its cytotoxicity in non-irradiated cells was

very low. The uptake of TG3 by cancer cells is fast and its presence in cancer cells was evidenced already after 1h of incubation. The concentration of TG3 in LNCaP reached the peak after 6 hours of incubation, however the highest cytotoxic effect was observed after pre-incubation with TG3 for 24h and irradiation for 20 min.

In next experiments induction of apoptosis and cell cycle progression were investigated using different concentrations of tested compound (0,6  $\mu$ M; 0,25  $\mu$ M and 5,0  $\mu$ M) in cells irradiated for 10 min, 20 min and without irradiation. Tested photosensitizer did not lead to cell cycle arrest in any phase, whereas the population of cells stained positive with propidium iodide was increased at dose-and time-dependent manner. It was shown that TG3 mediated PDT caused induction of apoptosis evidenced by loss of mitochondrial potential, activation of caspase -9 and caspase-3, what suggests activation of mitochondrial pathway of apoptosis. This could be also confirmed by changes in expression of pro- and anti-apoptotic proteins shown in Western blot analysis, especially by decrease in levels of proteins belonging to IAP family as well as decreased level of Bcl-2 and Bcl-xl. In next experiments impact of spautin-1 (inhibitor of autophagy), necrox-2 (inhibitor of necrosis) as well as some inhibitors of enzymes involved in cellular antioxidative defense (superoxide dismutase, catalase, glutathione synthetase) was assayed. Most of these experiment showed that cytotoxic effect obtained in PDT employing TG3 may be modulated by these inhibitors; especially interesting effects were obtained in experiments employing spautin-1 and necrox-2, since these inhibitors were not previously tested in PDT experiments. It was shown, that cytotoxic effect of PDT induced oxidative stress may be attenuated by cumulated in mitochondria antioxidant - necrox-2. The oxidative stress induced by TG3 mediated PDT was also connected in tested cells with loss of reduced glutathione. Moreover, as it was shown in experiments employing intracellular activated ROS indicator dichlorodihydrofluorescein diacetate, that PDT-mediated TG3 may be also responsible for photodegradation of enzymes and other proteins important for cell survival. PDT-mediated TG3 did not affect the level of 8-hydroxy-2'deoxyguanosine (biomarker of oxidative DNA damage) at effective concentrations of photosensitizer. Experiments carried out in this project allowed also to show degradation of cytoskeleton, followed TG3 mediated PDT, additionally results obtained in experiments performed using confocal microscope may suggest that TG3 was located in tested cells mainly in cytoplasm and endoplasmic reticulum.



In summary, TG3 is very effective and promising photosensitizer which may be applied in photodynamic therapy of cancer. Although the preliminary data suggests that TG3 has a good photosensitizing efficiency *in vitro*, however further more detailed experiments performed in *in vitro* as well as *in vivo* models are necessary for contribute to understanding of the anticancer effect.

## 10. SPIS RYCIN

<b>Rycina 1.</b> Diagram Jabłońskiego przedstawiający procesy zachodzące podczas PDT.....	15
<b>Rycina 2.</b> Schemat przedstawiające procesy wolnorodnikowe zachodzące podczas PDT i rodzaj generowanych RFT .....	17
<b>Rycina 3.</b> Mechanizm działania terapii fotodynamicznej.....	18
<b>Rycina 4.</b> Schemat przedstawiający zewnętrzny oraz wewnętrzny szlak apoptozy.....	21
<b>Rycina 5.</b> Mechanizm regulacji nekrozy. ....	24
<b>Rycina 6.</b> Regulacja i przebieg procesu autofagii. ....	26
<b>Rycina 7.</b> Drogi śmierci komórki podczas PDT w wyniku uszkodzenia określonych struktur komórkowych. ....	31
<b>Rycina 8.</b> Wzory podstawowych struktur związków fotouczulających. ....	38
<b>Rycina 9.</b> Lamy użyte w eksperymentach PDT:.....	51
<b>Rycina 10.</b> Naświetlanie komórek przy użyciu lampy diodowej oraz przykładowe płytki 96-dółkowe po wykonaniu testu MTT.....	52
<b>Rycina 11.</b> Cytotoksyczność związku TG3 wobec komórek linii LNCaP, PC3 , MeWo oraz A375.. ..	80
<b>Rycina 12.</b> Cytotoksyczność związku TG4 wobec komórek linii LNCaP oraz A375.....	81
<b>Rycina 13.</b> Cytotoksyczność związku TG15 wobec komórek linii LNCaP oraz A549. ....	81
<b>Rycina 14.</b> Cytotoksyczność związku TG18 wobec komórek linii LNCaP oraz A549. ....	82
<b>Rycina 15.</b> Cytotoksyczność ZnPc wobec komórek linii LNCaP.....	82
<b>Rycina 16.</b> Wchłanianie związku TG3 przez komórki nowotworowe.....	84
<b>Rycina 17.</b> Wchłanianie związku TG4 przez komórki nowotworowe.....	85
<b>Rycina 18.</b> Wpływ czasu inkubacji ze związkiem TG3 na jego działanie cytotoksyczne .....	86
<b>Rycina 19.</b> Analiza uwalniania enzymu LDH po czasie 2 godzin oraz 24h od naświetlania.....	88
<b>Rycina 20.</b> Analiza uwalniania enzymu LDH oraz przeżywalność komórek zbadana testem MTT po czasie 2 godzin od naświetlania.....	90

<b>Rycina 21.</b> Analiza uwalniania enzymu LDH oraz przeżywalność komórek zbadana testem MTT po czasie 24 godzin od naświetlania.....	91
<b>Rycina 22.</b> Cytotoksyczność związku TG3 wobec komórek linii LNCaP zbadana za pomocą barwienia błękitem trypanu.....	93
<b>Rycina 23.</b> Cytotoksyczność związku TG3 wobec komórek linii LNCaP zbadana za pomocą barwienia błękitem trypanu (wybrane zdjęcia) .....	94
<b>Rycina 24.</b> Analiza cytometryczna faz cyklu komórkowego po czasie 2 godzin od naświetlania.....	96
<b>Rycina 25.</b> Analiza cytometryczna faz cyklu komórkowego po czasie 6 godzin od naświetlania.....	97
<b>Rycina 26.</b> Analiza cytometryczna faz cyklu komórkowego po czasie 24 godzin od naświetlania.....	98
<b>Rycina 27.</b> Przykładowy zestaw zdjęć z barwienia podwójnego Hoechst 33258/jodek propidyny.....	100
<b>Rycina 28.</b> Zdjęcia uzyskane po nałożeniu fotografii uzyskanych w kanale niebieskim i czerwonym po przekonwertowaniu do formy czarno-białej (filtr wysokonastrowy czerwony) w celu uwidocznienia zmian zachodzących pod wpływem PDT w komórkach wybarwionych barwnikiem Hoechst 33258.....	101
<b>Rycina 29.</b> Analiza komórek apoptotycznych i nekrotycznych metoda podwójnego barwienia Hoechst 33258/jodek propidyny .....	102
<b>Rycina 30.</b> Analiza komórek apoptotycznych i nekrotycznych metoda podwójnego barwienia Hoechst 33258/jodek propidyny, po 6 godzinach od naświetlania komórek.....	103
<b>Rycina 31.</b> Analiza komórek apoptotycznych i nekrotycznych metoda podwójnego barwienia Hoechst 33258/jodek propidyny, po 24 godzinach od naświetlania komórek;.....	104
<b>Rycina 32.</b> Zdolność badanego związku TG3 do indukcji apoptozy w linii LNCaP oznaczona przy użyciu Cell Death Detection ELISA <sup>PLUS</sup> .....	106
<b>Rycina 33.</b> Zmiany potencjału błony mitochondrialnej po 45 minutach od naświetlania komórek linii LNCaP.....	108
<b>Rycina 34.</b> Aktywność kaspazy-9 mierzona po 2 h oraz 4 h od naświetlania komórek.....	110
<b>Rycina 35.</b> Aktywność kaspazy-3 po 12h i 24h od naświetlania.....	112

<b>Rycina 36.</b> Cytotoksyczność związku ABT199 wobec komórek linii LNCaP w fazie ciemnej oraz w połączeniu z naświetlaniem.....	113
<b>Rycina 37.</b> Wpływ ABT199 po 2-godzinnej inkubacji przed naświetlaniem na fototoksyczne działanie związku TG3.....	115
<b>Rycina 38.</b> Wpływ ABT199 po 24-godzinnej inkubacji ze związkiem TG3 przed naświetlaniem światłem o długości fali 640 nm na cytotoksyczne działanie związku TG3.....	116
<b>Rycina 39.</b> Przykładowe zdjęcia kliszy uzyskanych podczas badania w eskperymencie z wykorzystaniem <i>Human Apoptosis Array</i> .....	117
<b>Rycina 40.</b> Ekspresja białek HIF-1 $\alpha$ oraz katalazy w kontroli nienaświetlanej, naświetlanej przez 20 minut oraz w komórkach traktowanych związkiem TG3 w stężeniu 0,6 $\mu$ M w połączeniu z naświetlaniem oraz nienaświetlanych.....	120
<b>Rycina 41.</b> Ekspresja białek HIF-1 $\alpha$ oraz katalazy w materiale uzyskanym z komórek kontroli nienaświetlanej, naświetlanej 20 minut oraz w komórkach traktowanych związkiem TG3 w stężeniu 2,5 $\mu$ M w połączeniu z naświetlaniem oraz nienaświetlanych.....	121
<b>Rycina 42.</b> Poziom prokaspazy-3 i aktywnej formy kaspazy-3 w eksperymencie wykonanym dla stężenia 0,6 $\mu$ M i 2,5 $\mu$ M oraz stosunek aktywności aktywnej postaci kaspazy-3 do prokaspazy-3 w eksperymencie wykonanym dla stężenia 2,5 $\mu$ M.....	123
<b>Rycina 43.</b> Ekspresja białek antyapoptotycznych: surwiwiny, liwininy, cIAP-1, cIAP-2, XIAP w lizatach uzyskanych z kontroli nienaświetlanej, naświetlanej 20 minut oraz w komórkach traktowanych związkiem TG3 w stężeniu 0,6 $\mu$ M 2,5 $\mu$ M w połączeniu z naświetlaniem oraz nienaświetlanych.....	125
<b>Rycina 44.</b> Poziom białek Bax oraz Bcl-2 w eksperymencie wykonanym dla stężenia 0,6 $\mu$ M oraz 2,5 $\mu$ M oraz stosunek białka Bax/Bcl-2 .....	126
<b>Rycina 45.</b> Poziom białek Smac/Diablo oraz HtrA2/Omi w eksperymencie wykonanym dla stężenia 0,6 $\mu$ M oraz 2,5 $\mu$ M.....	127
<b>Rycina 46.</b> Wpływ spautyny -1 na przeżywalność komórek linii LNCaP.. ....	128
<b>Rycina 47.</b> Wpływ spautyny-1 o stężeniu 2,5 $\mu$ M na cytotoksyczność związku TG3.....	130
<b>Rycina 48.</b> Wpływ spautyny-1 o stężeniu 5 $\mu$ M na cytotoksyczność związku TG3 wobec komórek nienaświetlanych oraz naświetlanych 10 minut i 20 minut.....	131
<b>Rycina 49.</b> Wpływ spautyny-1 o stężeniu 10 $\mu$ M na cytotoksyczność związku TG3 wobec komórek nienaświetlanych, oraz naświetlanych 10 minut i 20 minut.....	132

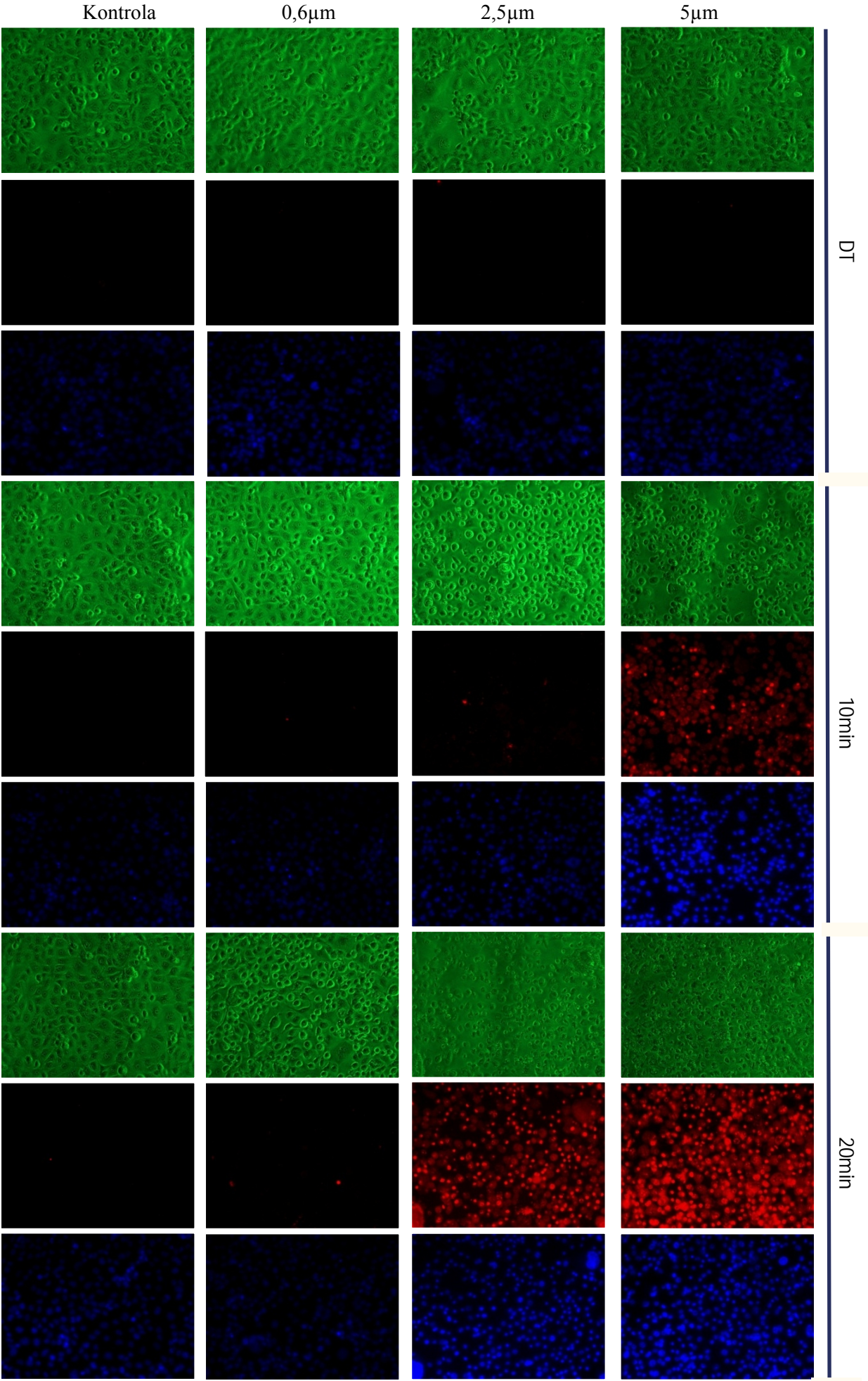
<b>Rycina 50.</b> Wpływ Necrox-2 na przeżywalność komórek LNCaP po czasie 24 godzin.....	133
<b>Rycina 51.</b> Wpływ Necrox-2 po 2-godzinnej inkubacji przed naświetlaniem na fototoksyczne działanie związku TG3.....	135
<b>Rycina 52.</b> Wpływ Necrox-2 po 24-godzinnej inkubacji przed naświetlaniem na fototoksyczne działanie związku TG3.....	136
<b>Rycina 53.</b> Wpływ związku TG3 na cytoszkielet komórek.....	138
<b>Rycina 54.</b> Wpływ związku TG3 na strukturę $\alpha$ - tubuliny oraz na fazy cyklu komórkowego po czasie 6 godzinach od naświetlania komórek. ....	139
<b>Rycina 55.</b> Stres oksydacyjny w komórkach poddanych działaniu PDT przy użyciu TG3.....	142
<b>Rycina 56.</b> Histogram obrazujący zmiany w intensywności zielonych pikseli na zdjęciach uzyskanych za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego, w wybranych do analizy próbach.....	143
<b>Rycina 57.</b> Stężenie 8-OH-2dG w lizacie komórkowym uzyskanym z komórek LNCaP po czasie 24h od naświetlania.....	145
<b>Rycina 58.</b> Cytotoksyczność inhibitorów enzymów antyoksydacyjnych: 2-metoksyestradiolu, 3-amino-1,2,4-triazolu, sulfoksyminy L-butioniny, oraz dietyloditiokarbaminianu.. ....	146
<b>Rycina 59.</b> Wpływ inhibitorów enzymów antyoksydacyjnych na cytotoskyczność TG3-PDT.....	148
<b>Rycina 60.</b> Poziom glutationu w komórkach kontrolnych oraz komórkach preinkubowanych z BSO w stężeniu 1,5 mM.....	151
<b>Rycina 61.</b> Poziom glutationu w komórkach inkubowanych z TG3 w stężeniu 0,6 $\mu$ M oraz komórkach preinkubowanych z BSO oraz TG3 .....	152
<b>Rycina 62.</b> Poziom glutationu w komórkach inkubowanych z TG3 w stężeniu 2,5 $\mu$ M oraz komórkach preinkubowanych z BSO oraz TG3.....	152
<b>Rycina 63.</b> Poziom glutationu w komórkach inkubowanych z TG3 w stężeniu 5 $\mu$ M oraz komórkach preinkubowanych z BSO oraz TG3.. ....	153
<b>Rycina 64.</b> Poziom tlenku azotu zmierzony od razu po naświetlaniu, po 2h, 4h, 6h .....	155
<b>Rycina 65.</b> Fluorescencja związku obserwowana przy wzbudzeniu: charakterystycznym dla TG3, dla Lysotrackera, światło widzialne, dla ER-trackera..	156
<b>Rycina 66.</b> Subkomórkowa lokalizacja związku TG3.....	157

## 11. SPIS TABEL

<b>Tabela 1.</b> Przykłady fotouczulaczy nieposiadających struktury pirolu. ....	39
<b>Tabela 2.</b> Lista fotouczulaczy zarejestrowanych do stosowania oraz znajdujących się na etapie badań klinicznych i ich charakterystyka. ....	40
<b>Tabela 3.</b> Wzory strukturalne, sumaryczne oraz masy molowe badanych związków. ....	45
<b>Tabela 4.</b> Linie komórkowe wykorzystane w badaniach cytotoxyczności fotouczulaczy i ich krótka charakterystyka. ....	47
<b>Tabela 5.</b> Zastosowane pożywki hodowlane. ....	50
<b>Tabela 6.</b> Inhibitory enzymów antyoksydacyjnych użyte w eksperymencie. ....	71
<b>Tabela 7.</b> Stężenie inhibitorów zastosowane w ocenie działania cytotoxycznego .....	71
<b>Tabela 8.</b> Wartości IC <sub>50</sub> dla związków: <b>TG3</b> , <b>TG4</b> , <b>TG15</b> , <b>TG18</b> , oraz ftalocyjaniny cynkowej ZnPc. ....	79
<b>Tabela 9.</b> Wartości IC <sub>50</sub> wyznaczone dla różnych czasów inkubacji z badanym związkiem i czasem naświetlania. ....	87
<b>Tabela 10.</b> Poziom białek pro i antyapoptycznych w komórkach eksponowanych na TG3 w stężeniach 0,6 μM oraz 2,5 μM po 24h godzinach od naświetlania. ....	118
<b>Tabela 11.</b> Wpływ inhibitorów enzymów antyoksydacyjnych na cytotoxyczność związku TG3. ....	149

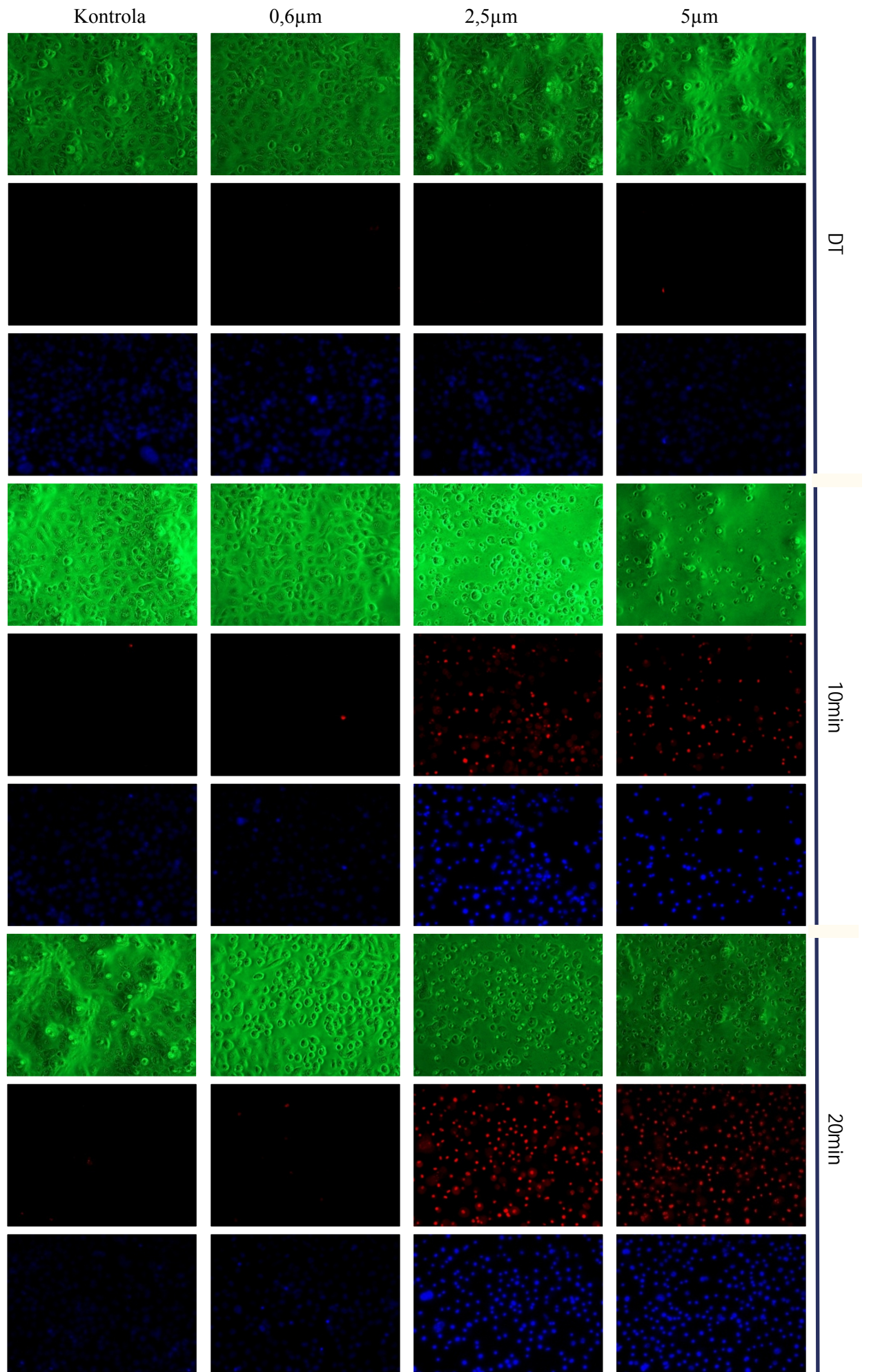
## **12. SUPLEMENT FOTOGRAFICZNY**

Apoptoza/nekroza w komórkach poddanych PDT przy użyciu związku TG3,  
zdjęcia wykonano 2h po naświetlaniu  
barwienie Hoechst 33258/jodek propidyny

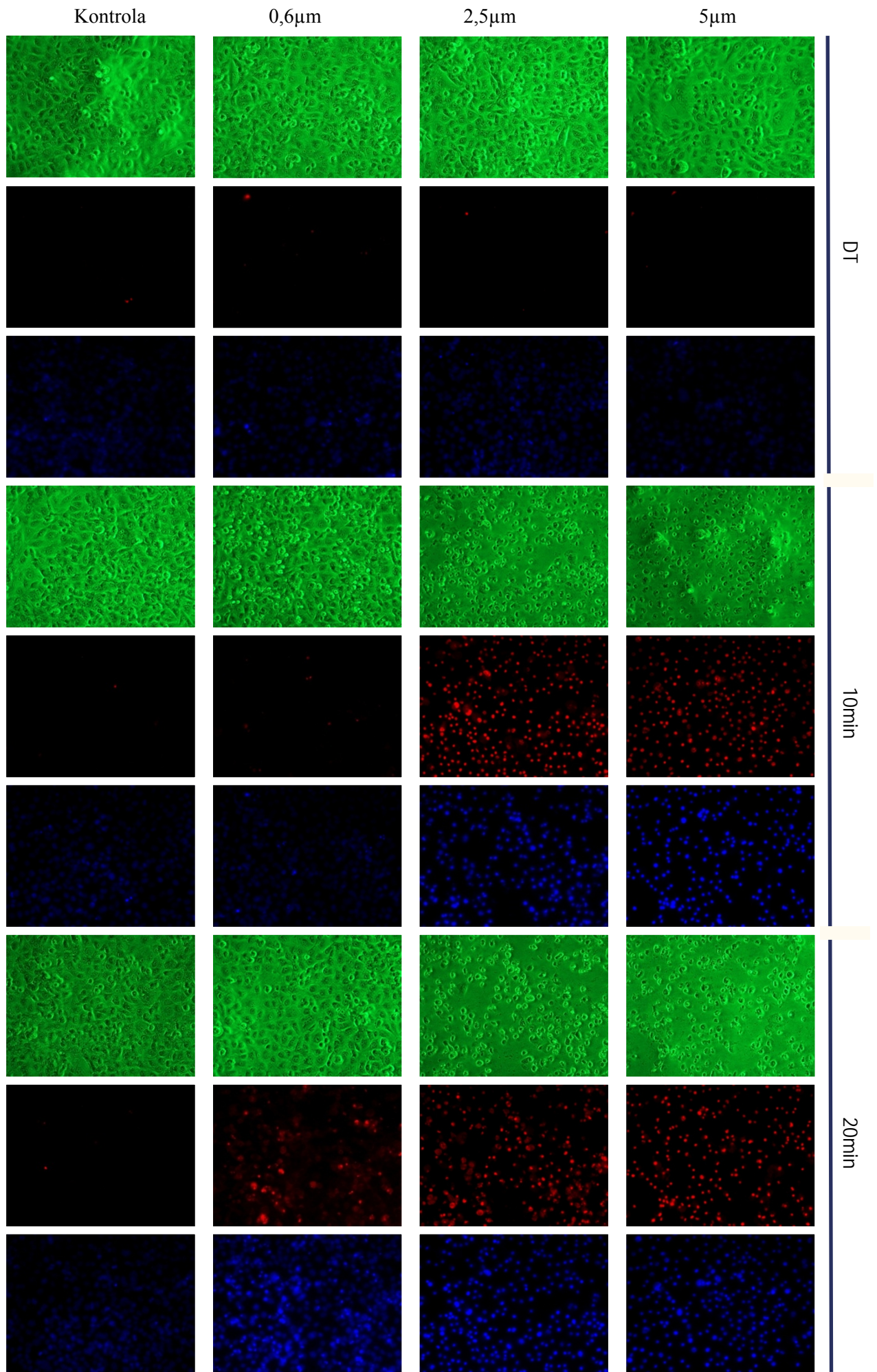




Apoptoza/nekroza w komórkach poddanych PDT przy użyciu związku TG3, zdjęcia wykonano 6h po naświetlaniu  
barwienie Hoechst 33258/jodek propidyny

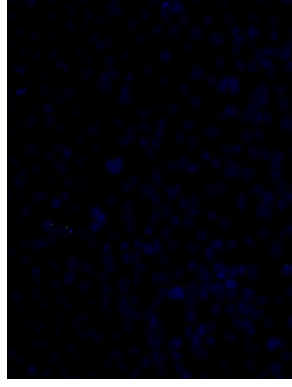


Apoptoza/nekroza w komórkach poddanych PDT przy użyciu związku TG3,  
zdjęcia wykonano 24h po naświetlaniu  
barwienie Hoechst 33258/jodek propidyny

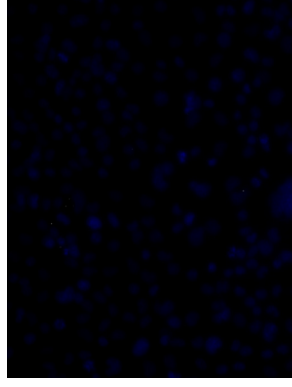




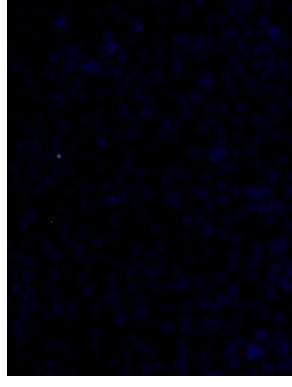
DT - 0  $\mu$ M



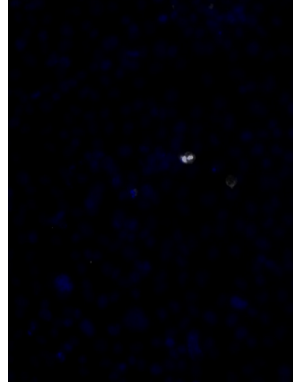
DT - 0,8  $\mu$ M



DT - 2,5  $\mu$ M



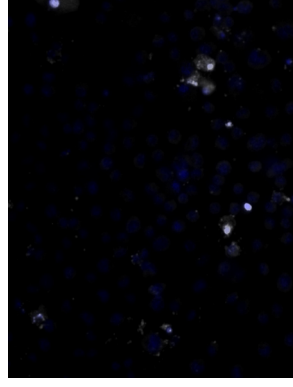
DT - 5,0  $\mu$ M



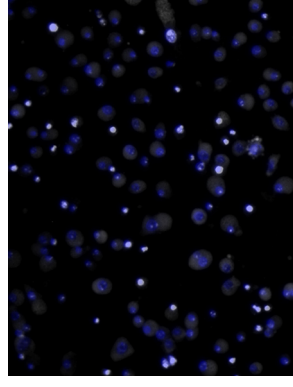
LT10 - 0  $\mu$ M



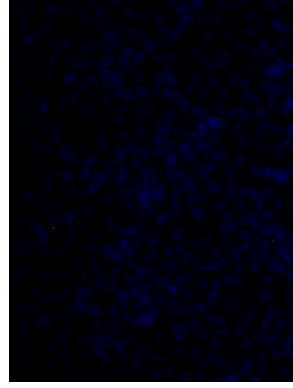
LT10 - 0,8  $\mu$ M



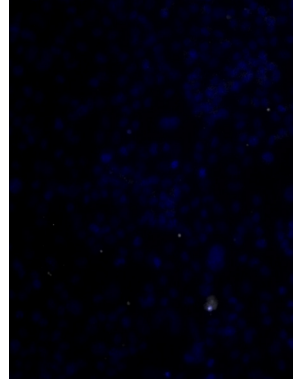
LT10 - 2,5  $\mu$ M



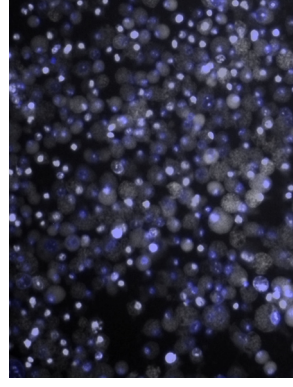
LT10 - 5,0  $\mu$ M



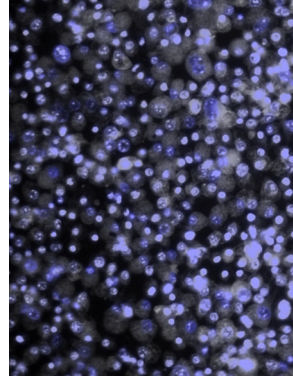
LT20 - 0  $\mu$ M



LT20 - 0,8  $\mu$ M

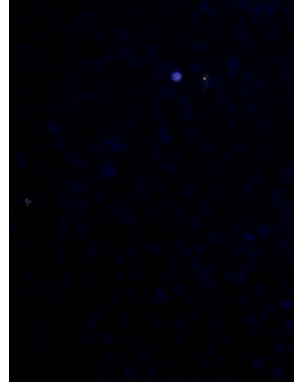


LT20 - 2,5  $\mu$ M

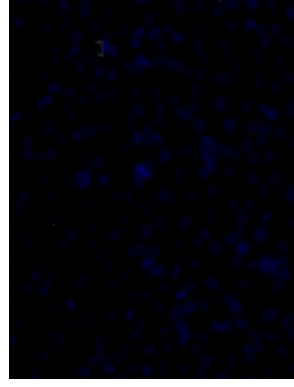


LT20 - 5,0  $\mu$ M

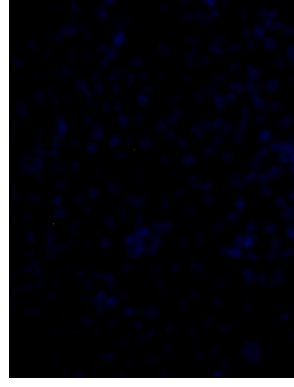
Apoptoza/nekroza w komórkach LNCaP poddanych PDT z u yciem zwi zku TG3, barwienie Hoechst 33258/jodek propidyny, zdj cia wykonano 2h od na wietlania



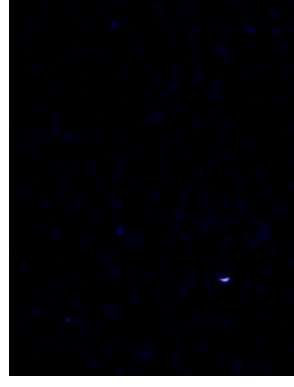
DT - 0  $\sigma$ M



DT - 0,8  $\sigma$ M



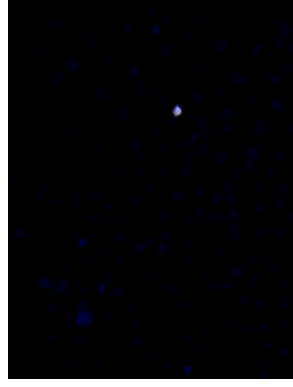
DT - 2,7  $\sigma$ M



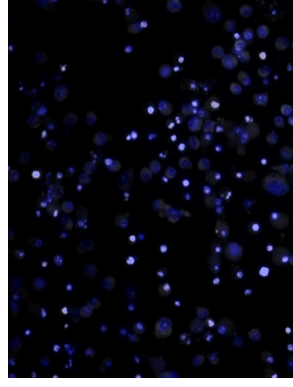
DT - 7,0  $\sigma$ M



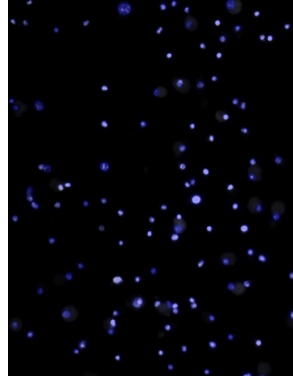
LT10 - 0  $\sigma$ M



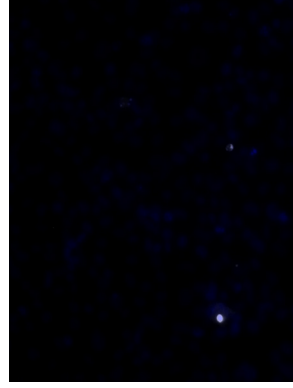
LT10 - 0,8  $\sigma$ M



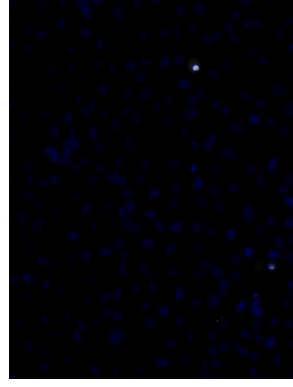
LT10 - 2,7  $\sigma$ M



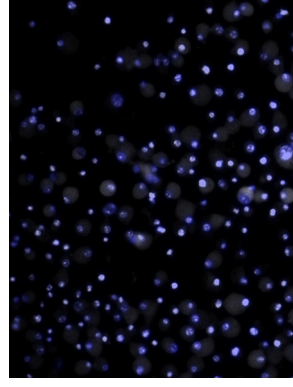
LT10 - 7,0  $\sigma$ M



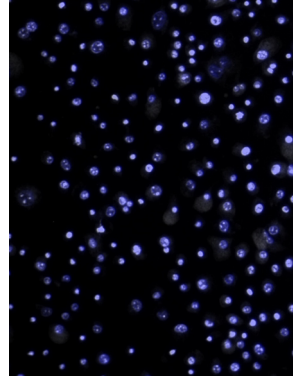
LT20 - 0  $\sigma$ M



LT20 - 0,8  $\sigma$ M



LT20 - 2,7  $\sigma$ M



LT20 - 7,0  $\sigma$ M

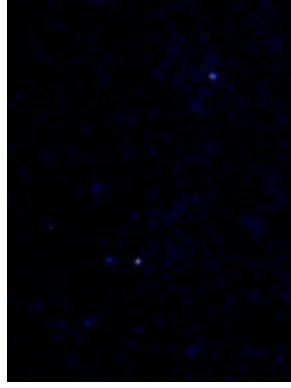
Apoptoza/nekroza w komórkach LNCaP poddanych PDT z u yciem zwi zku TG3, barwienie Hoechst 33258/jodek propidyny, zdj cia wykonano 6h od na wietlania



DT - 0  $\mu$ M



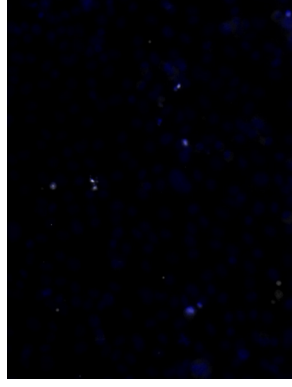
LT10 - 0  $\mu$ M



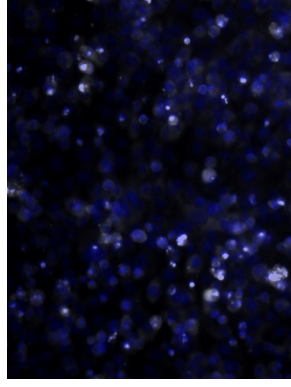
LT20 - 0  $\mu$ M



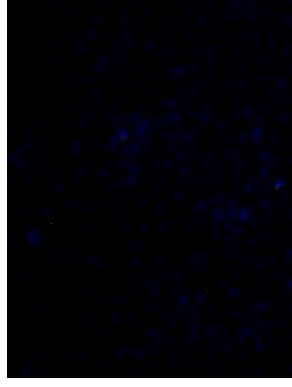
DT - 0,8  $\mu$ M



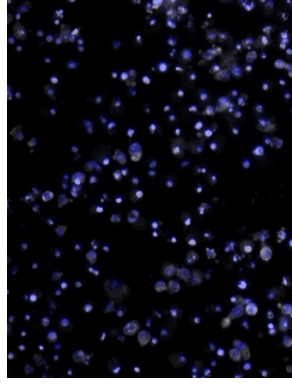
LT10 - 0,8  $\mu$ M



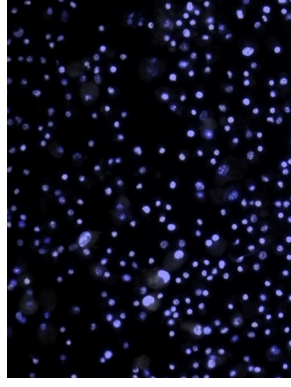
LT20 - 0,8  $\mu$ M



DT - 2,7  $\mu$ M



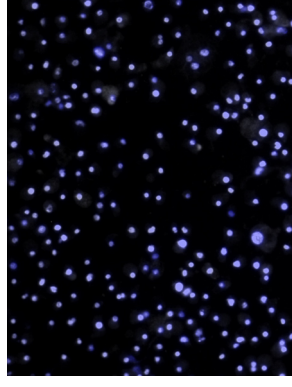
LT10 - 2,7  $\mu$ M



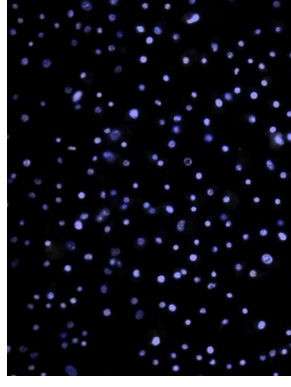
LT20 - 2,7  $\mu$ M



DT - 7,0  $\mu$ M



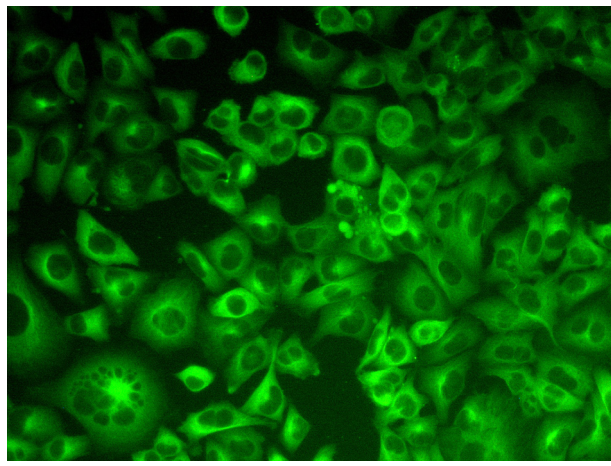
LT10 - 7,0  $\mu$ M



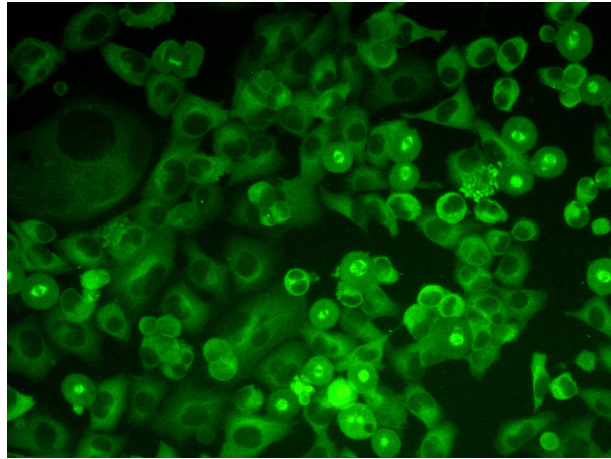
LT20 - 7,0  $\mu$ M

Apoptoza/nekroza w komórkach LNCaP poddanych PDT z u yciem zwi zku TG3, barwienie Hoechst 33258/jodek propidyny, zdj cia wykonano 24h od na wietlania

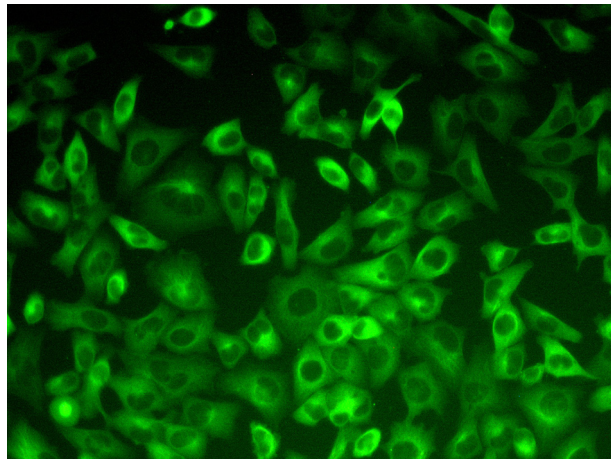
Zaburzenia sytuktury cytoszkietu  
w komórkach LNCaP na skutek  
PDT z u yciem zwi zku TG3.  
Barwienie  $\zeta$ -tubuliny.  
**komórki nienaswietlane**



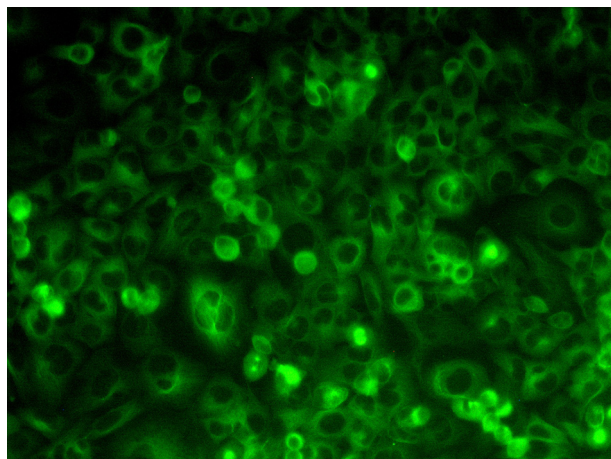
DT 0  $\mu$ M



DT 0,8  $\mu$ M

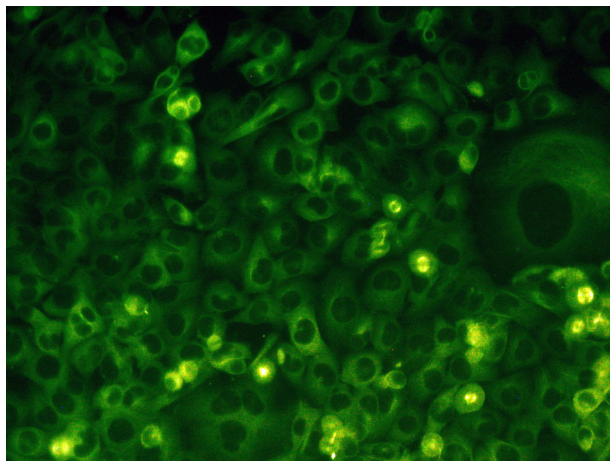


DT 2,7  $\mu$ M

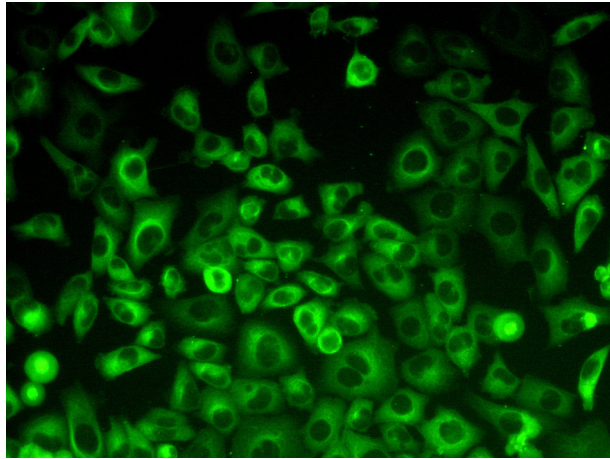


DT 7,0  $\mu$ M

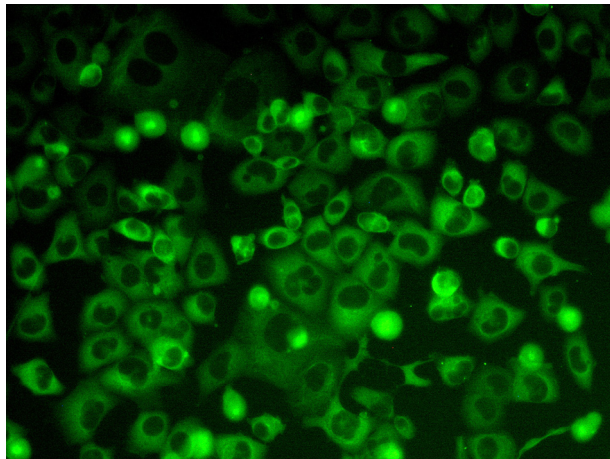
Zaburzenia sytuktury cytoszkieletu  
w komórkach LNCaP na skutek  
PDT z u yciem zwi zku TG3.  
Barwienie  $\zeta$ -tubuliny.  
**komórki naswietlane 10 min**



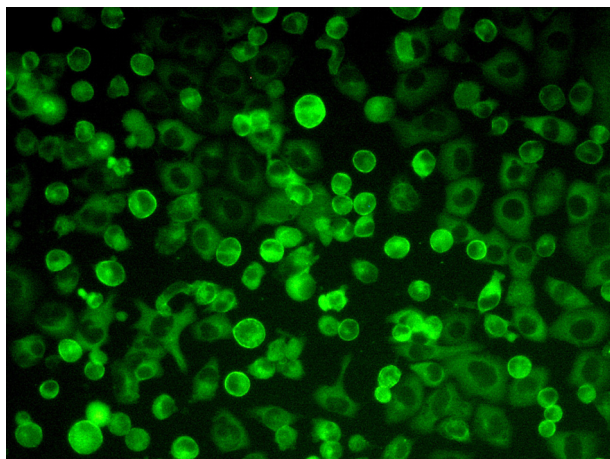
LT10 - 0  $\mu$ M



LT10 - 0,6  $\mu$ M

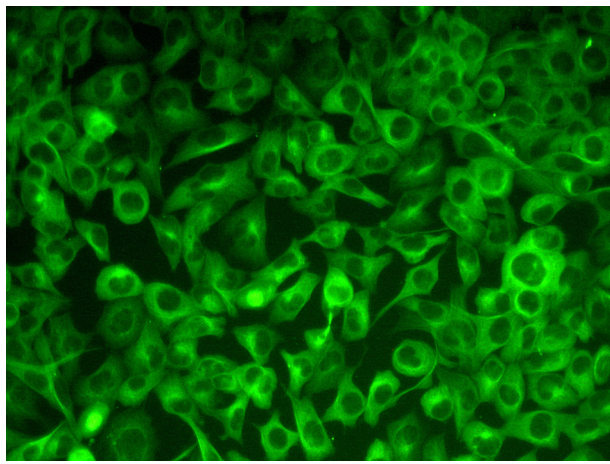


LT10 - 2,5  $\mu$ M

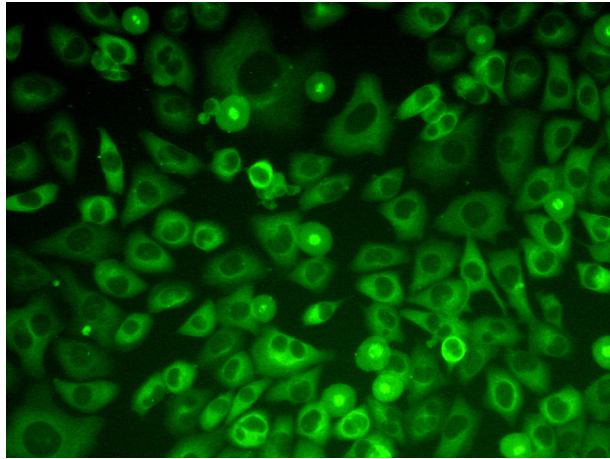


LT10 - 5,0  $\mu$ M

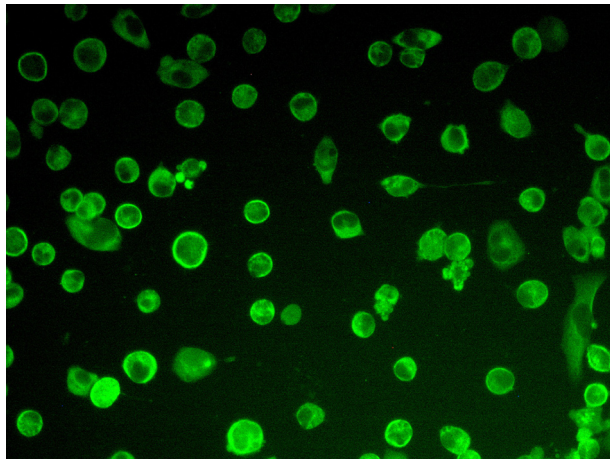
Zaburzenia sytuktury cytoszkieletu  
w komórkach LNCaP na skutek  
PDT z u yciem zwi zku TG3.  
Barwienie  $\zeta$ -tubuliny.  
**komórki naswietlane 20 min**



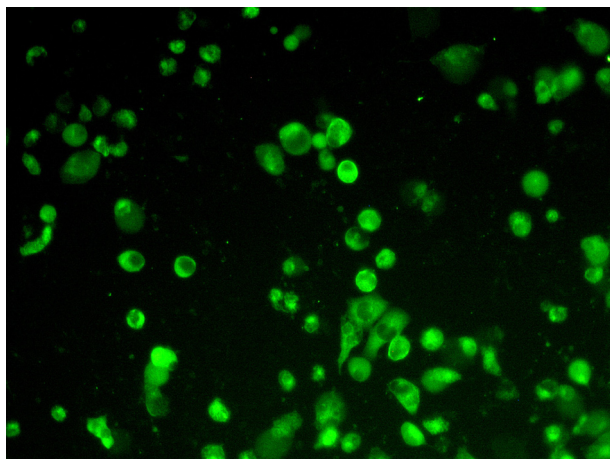
LT20 - 0  $\sigma$ M



LT20 - 0,6  $\sigma$ M



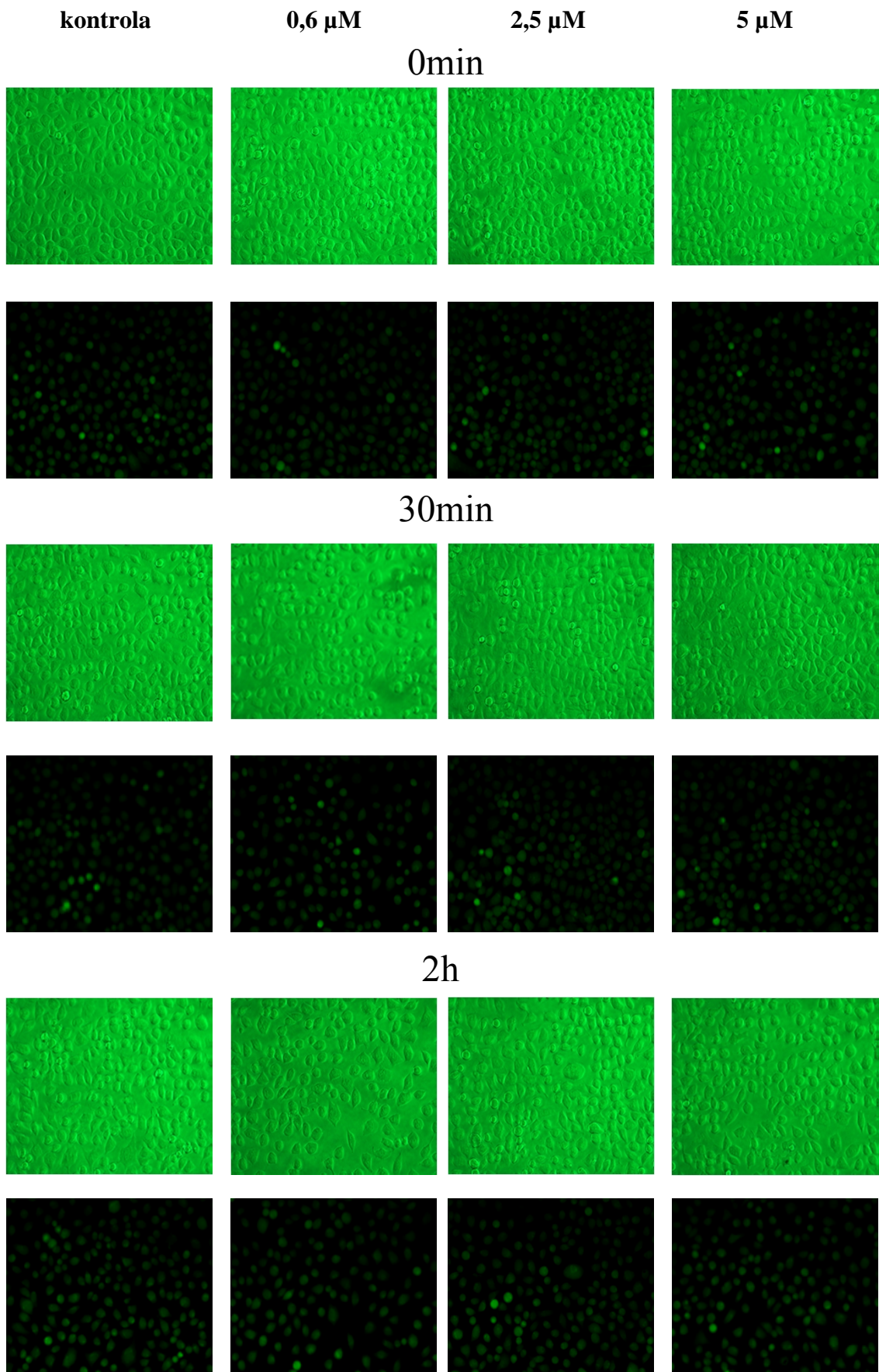
LT20 - 2,5  $\sigma$ M



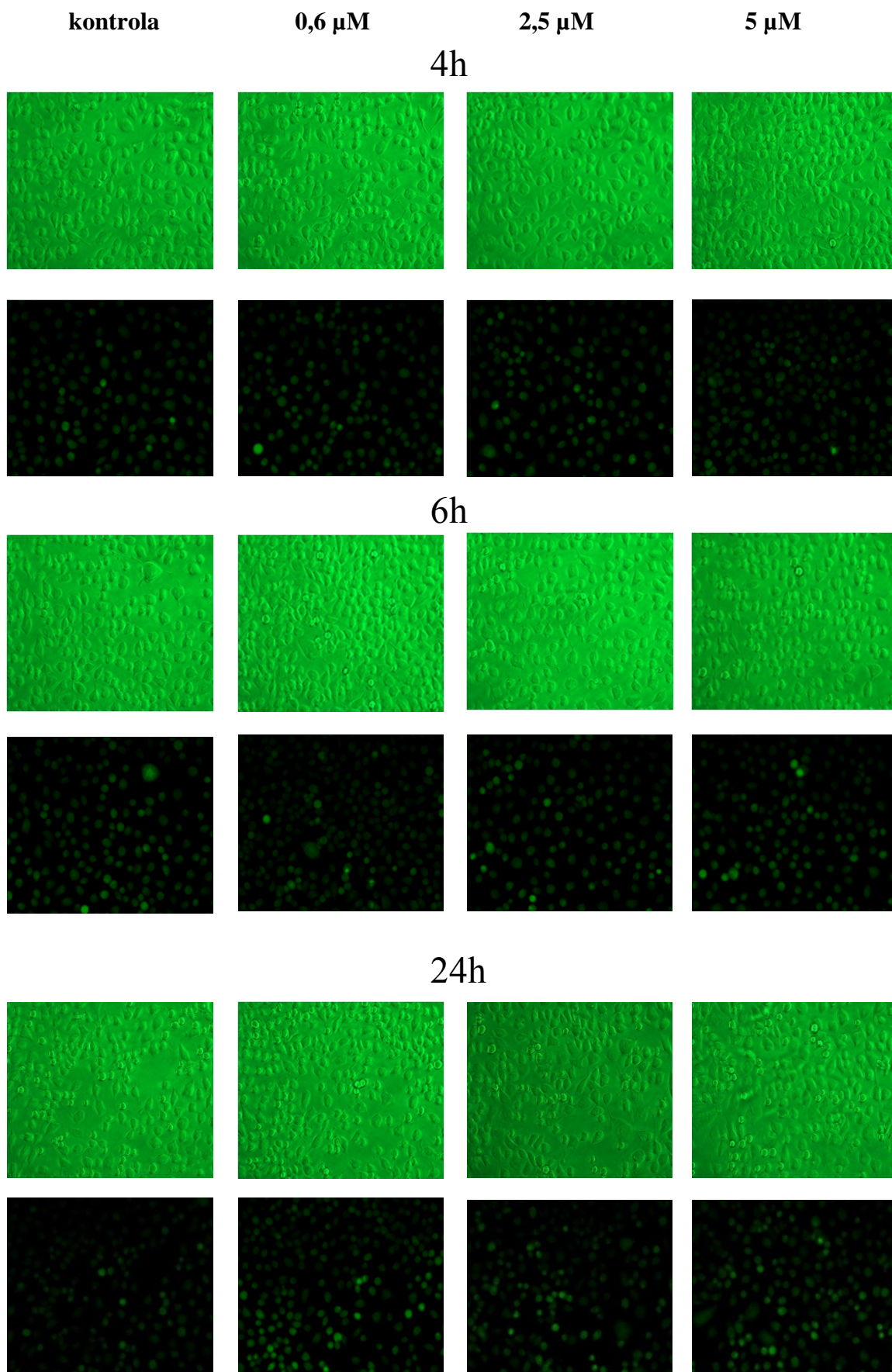
LT20 - 5,0  $\sigma$ M



Stres oksydacyjny w komórkach LNCaP poddanych PDT ze związkiem TG3,  
komórki nienaświetlane  
barwienie dioctanem 2,7 -dichlorodihydrofluoresceiny



Stres oksydacyjny w komórkach LNCaP poddanych PDT ze związkiem TG3,  
komórki nienaświetlane  
barwienie dioctanem 2,7 -dichlorodihydrofluoresceiny



Stres oksydacyjny w komórkach LNCaP poddanych PDT ze związkiem TG3,  
komórki naświetlane 10min  
barwienie diocetanem 2,7-dichlorodihydrofluoresceiny

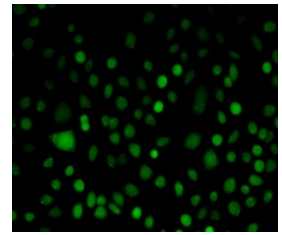
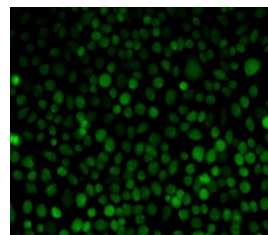
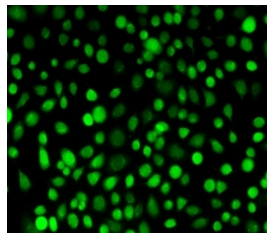
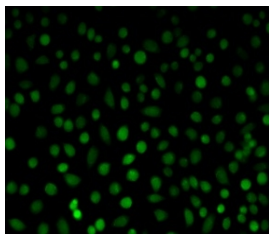
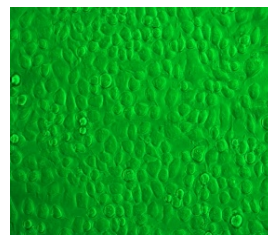
**kontrola**

**0,6  $\mu$ M**

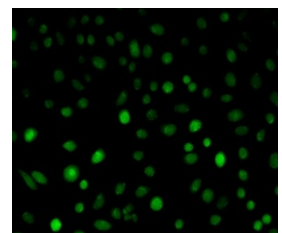
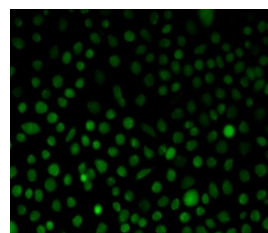
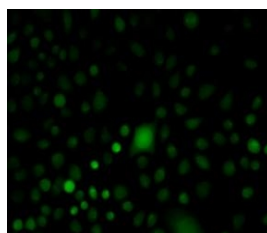
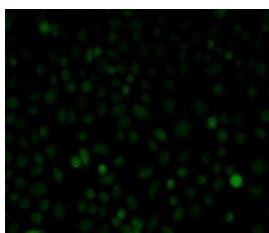
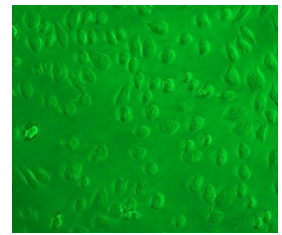
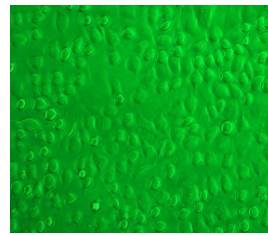
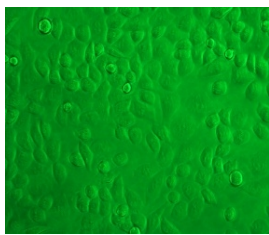
**2,5  $\mu$ M**

**5  $\mu$ M**

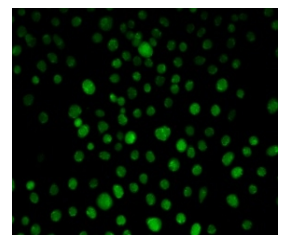
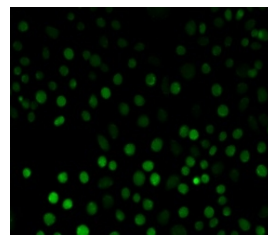
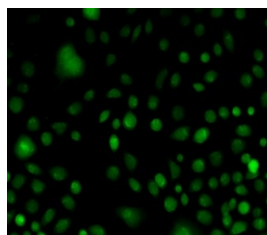
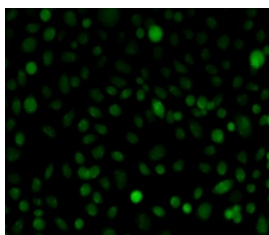
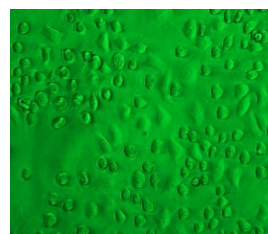
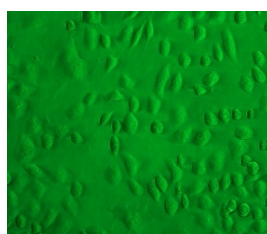
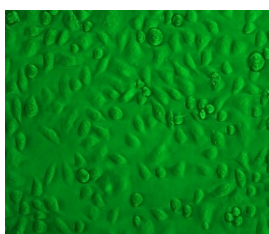
czas od naświetlania **0min**



czas od naświetlania **30min**



czas od naświetlania **2h**



Stres oksydacyjny w komórkach LNCaP poddanych PDT ze związkiem TG3,  
komórki naświetlane 20min  
barwienie diocetanem 2,7-dichlorodihydrofluoresceiny

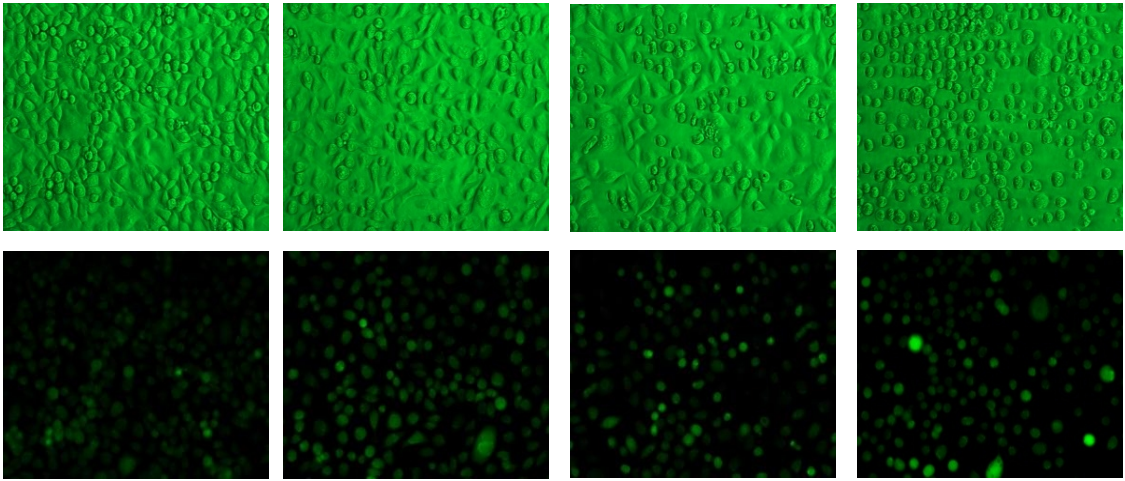
**kontrola**

**0,6  $\mu\text{M}$**

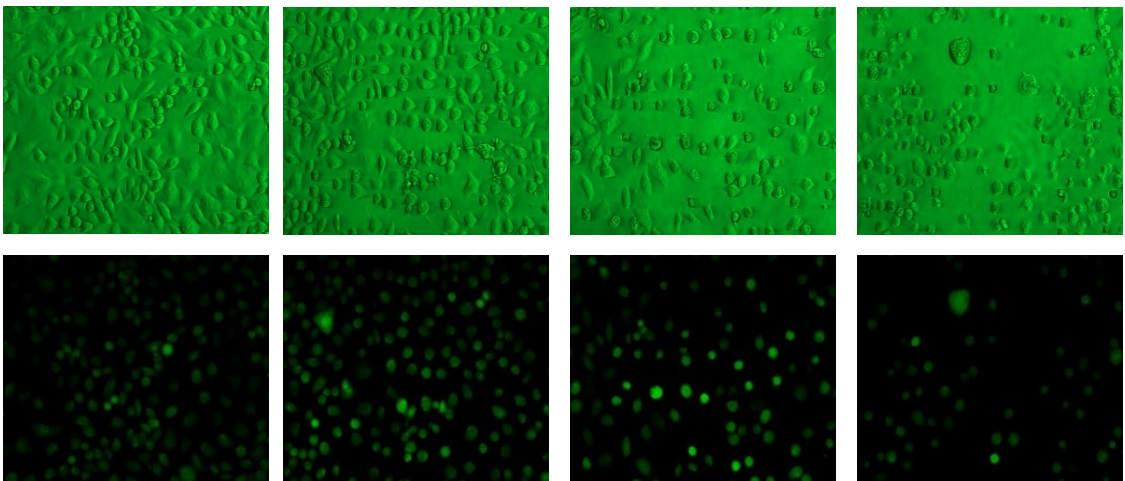
**2,5  $\mu\text{M}$**

**5  $\mu\text{M}$**

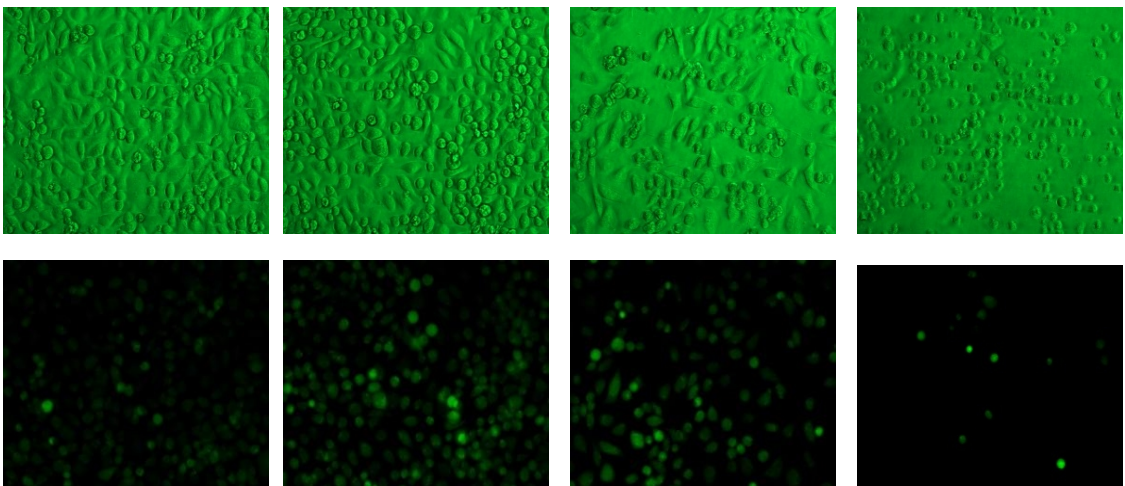
czas od naświetlania **4h**



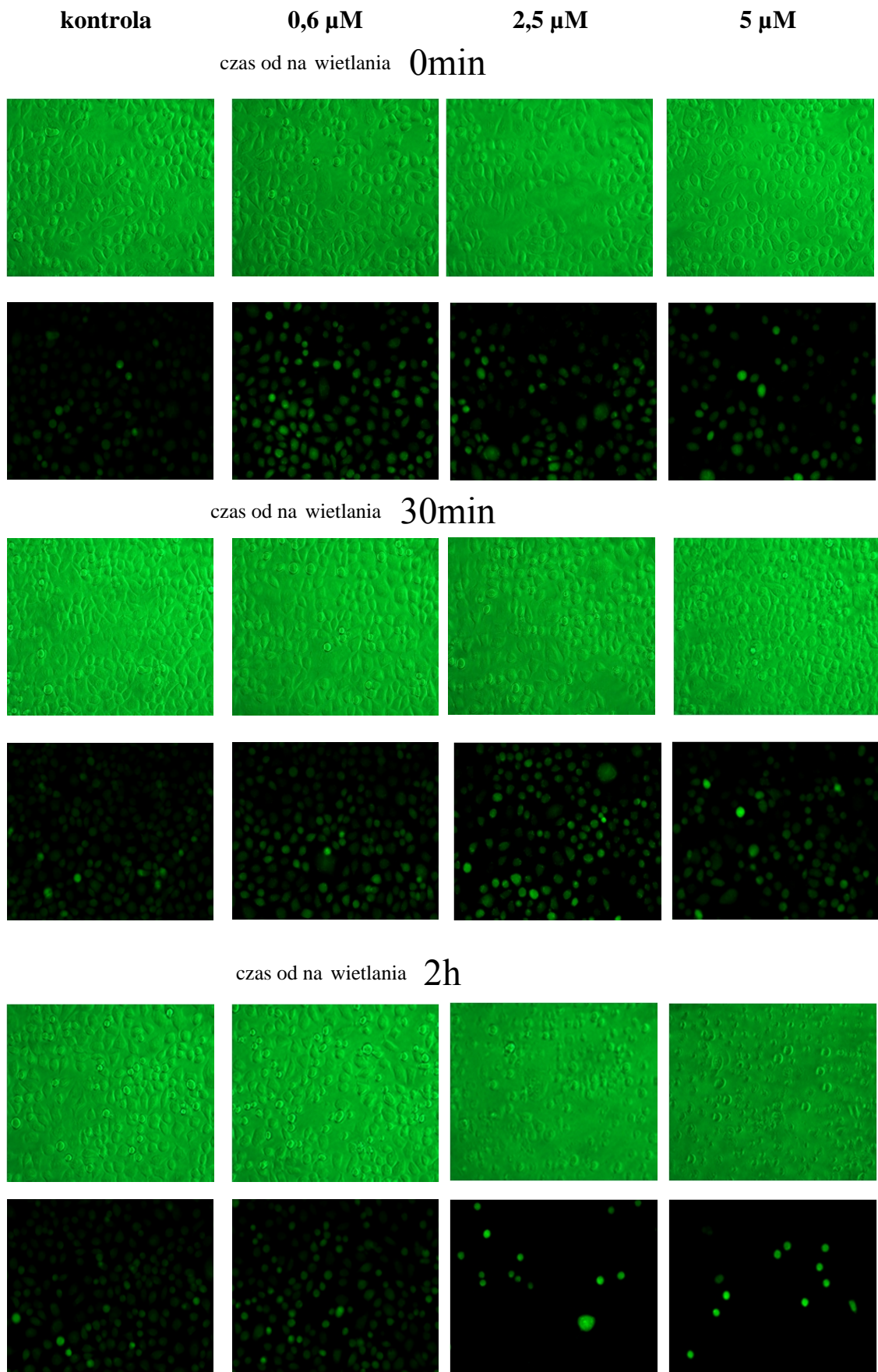
czas od naświetlania **6h**



czas od naświetlania **24h**



Stres oksydacyjny w komórkach LNCaP poddanych PDT ze związkiem TG3,  
komórki naświetlane 20min  
barwienie dioctanem 2,7-dichlorodihydrofluoresceiny



Stres oksydacyjny w komórkach LNCaP poddanych PDT ze związkiem TG3,  
komórki naświetlane 10min

barwienie dioctanem 2,7 -dichlorodihydrofluoresceiny

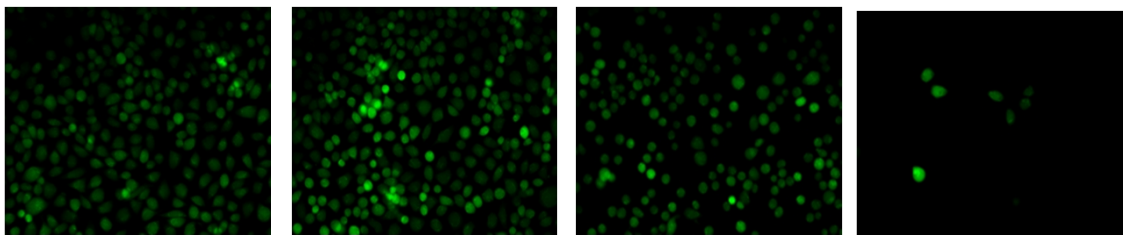
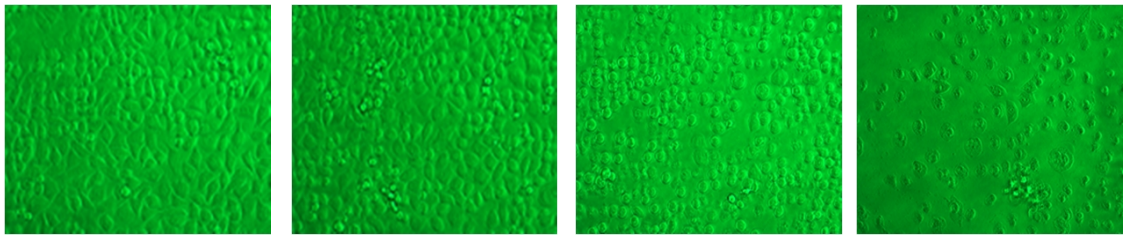
**kontrola**

**0,6  $\mu$ M**

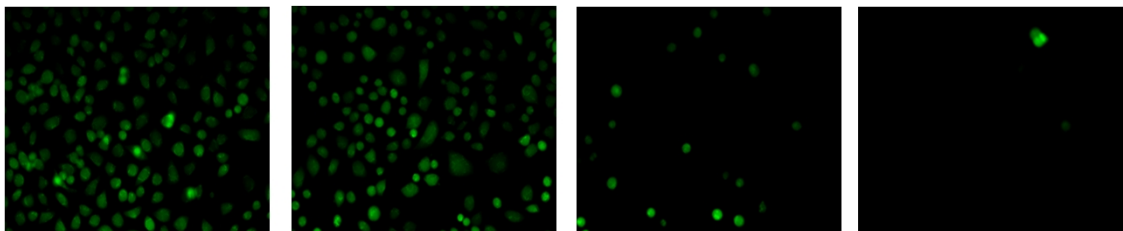
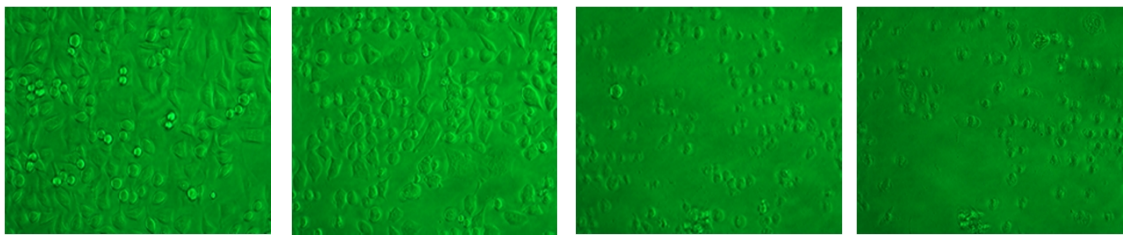
**2,5  $\mu$ M**

**5  $\mu$ M**

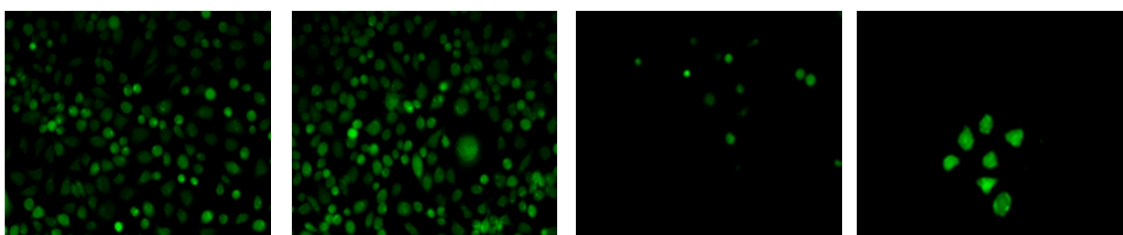
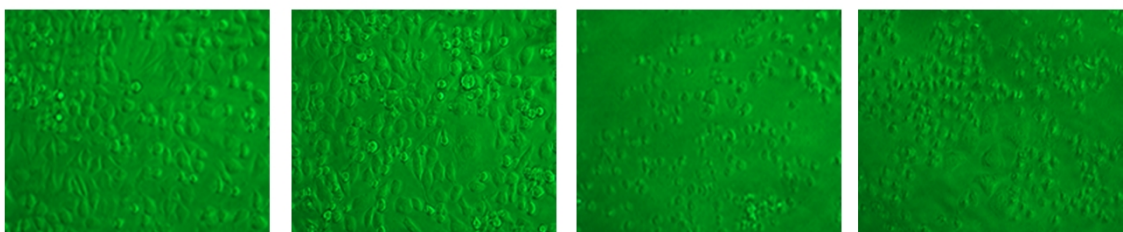
czas od naświetlania **4h**



czas od naświetlania **6h**



czas od naświetlania **24h**



Aktywność fototoksyczna związku TG3 - barwienie błękitem trypanu.

