

# Karakterizacija i djelovanje porfirina na stanice melanoma

---

Šušković, Franka

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:943053>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-22**

Repository / Repozitorij:

BIotech

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU  
Diplomski sveučilišni studij  
Biotehnologija u medicini

Franka Šušković

Fotodinamička terapija:

**Karakterizacija i djelovanje porfirina na stanice melanoma**

Diplomski rad

Rijeka, 2022.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU  
Diplomski sveučilišni studij  
Biotehnologija u medicini

Franka Šušković

Fotodinamička terapija:

**Karakterizacija i djelovanje porfirina na stanice melanoma**

Diplomski rad

Rijeka, 2022.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Ivana Ratkaj

Neposredni mentor rada: mag.med.chem. Martina Mušković

UNIVERSITY OF RIJEKA  
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY  
Graduate programme  
Biotechnology in medicine

Franka Šušković

Photodynamic Therapy:

**Characterization and effect of porphyrins on melanoma cells**

Master's thesis

Rijeka, 2022.

Diplomski rad obranjen je dana 23. rujna, 2022. pred povjerenstvom:

1. izv. prof. dr. sc. Nela Malatesti, predsjednica

2. izv. prof. dr. sc. Jelena Ban, članica

3. izv. prof. dr. sc. Ivana Ratkaj, mentorica

Rad ima 69 stranica, 44 slike, 1 tablicu i 48 literaturnih navoda.

## **Zahvale**

Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Ivani Ratkaj što mi je pružila šansu biti njenim studentom te je svojim vedrim duhom svaku zabrinutost učinila blažom. Posebno se zahvaljujem asistentici Martini Mušković na uloženom vremenu u moj rad, posvećenosti, motivaciji te ugodnoj i prijateljskoj radnoj atmosferi.

Zahvaljujem se svojim roditeljima, bratu i Ninu na bezuvjetnoj podršci i ljubavi tijekom svih ovih godina te posvećujem rad onima koji nisu uspjeli dočekati kraj mog studija.

Naposlijetku, zahvaljujem se svim svojim prijateljima, a posebice onima koje sam upoznala kao kolege i sustanare, a sada ih smatram prijateljima za cijeli život.

## Sažetak

Melanom je zloćudni tumor kože koji nastaje prilikom maligne transformacije melanocita, a zbog agresivnosti te metastatske prirode predstavlja najsmrtonosniji oblik raka kože. Konvencionalne strategije u liječenju raka poput radioterapije, kemoterapije i biološke terapije često uzrokuju nuspojave te ne mogu nadvladati problem rezistencije tumora i hipoksičnog tumorskog mikrokoliša. Jedno od inovativnih rješenja predstavlja oblik minimalno invazivne i kliničke odobrene fototerapije, fotodinamička terapija. Fotodinamička terapija temelji se na interakciji svjetlosti, fotosenzibilizatora i kisika pri čemu dolazi do fotokemijske reakcije i generiranja reaktivnih kisikovih vrsta koje zatim uzrokuju smrt tumorskih stanica, oštećenje tumorskog krvožilja i potiču imunološki odgovor.

Svrha ovog rada bila je ispitati djelotvornost piridilporfirina konjugiranih lipofilnim lancima različitih duljina pri čemu su dva spoja *N*-oksidirana, a dva *N*-metilirana. Mjerenjem intenziteta fluorescencije ispitana je količina spojeva koji ulaze u stanice u različitim vremenskim intervalima, fluorescentnom mikroskopijom praćena je lokalizacija porfirina u stanicama te je pomoću MTT testa određena citotoksičnost porfirina u uvjetima normoksije i hipoksije. Rezultati ispitivanja pokazali su kako se spojevi u najvećoj količini nalaze u stanicama nakon 6 h inkubacije te da u većoj količini ulaze u stanice fibroblasta (HDF). Također, pokazano je kako porfirini u većoj količini ulaze u stanice pri 37 °C što bi moglo ukazati na ulazak porfirina aktivnim transportom u stanice. Rezultati MTT testa ukazuju na potencijalnu selektivnost porfirina za stanice melanoma (MEWO) u koncentracijama 0.5 i 1 μM te pokazuju kako porfirini nisu citotoksični u mraku. Potvrđeni su i rezultati prethodnih ispitivanja gdje je pokazano kako veća lipofilnost spojeva utječe na bolji ulazak u stanicu te da *N*-oksidirani spojevi potencijalno bolje djeluju u uvjetima hipoksije.

## Summary

Melanoma is a malignant skin tumor that arises during the malignant transformation of melanocytes, and due to its aggressiveness and metastatic nature, it is the deadliest form of skin cancer. Conventional strategies in cancer treatment such as radiotherapy, chemotherapy, and biological therapy often cause side effects and are not able to overcome the problem of tumor resistance and hypoxia in the tumor microenvironment. One of the solutions is photodynamic therapy (PDT), a form of minimally invasive and clinically approved phototherapy. PDT is based on the interaction of light, photosensitizer, and oxygen, whereby a photochemical reaction occurs and the generation of reactive oxygen species is generated, which then causes the death of tumor cells, damages tumor blood vessels, and stimulates the immune response.

The aim of this work was to test the effectiveness of porphyrins conjugated with lipophilic chains of different lengths, where two have *N*-oxidized and two *N*-methylated pyridyl groups on *meso* position. The cell uptake of porphyrins at different time points was determined by measuring the fluorescence intensity, fluorescence microscopy was used to examine the localization of porphyrins inside melanoma cell line, and the cytotoxicity of porphyrins was determined under normoxia and hypoxia using the MTT proliferation test. The results showed that the largest amount of the porphyrins was found in the cells after 6 h of incubation, and in larger amount in fibroblasts (HDF) in comparison to melanoma cell line (MeWO). Also, it was shown that porphyrins enter the cells in larger quantities at 37 °C, which could indicate the entry of porphyrins by active transport into the cells. The results of the MTT test showed the potential selectivity of porphyrins for melanoma cells (MEWO) and show that porphyrins do not show dark toxicity in concentration up to 10 μM. The results of previous tests were also confirmed, showing that the higher lipophilicity of the compounds results in better cellular uptake and that *N*-oxidized compounds potentially work better in hypoxia.



# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	10
<b>1.1. Fotodinamička terapija</b> .....	11
<b>1.2. Mehanizmi fotodinamičke reakcije</b> .....	11
<b>1.3. Mehanizmi stanične smrti uzrokovani PDT</b> .....	13
<b>1.3.1. Apoptoza</b> .....	14
<b>1.3.2. Autofagija</b> .....	15
<b>1.3.3. Nekroza</b> .....	15
<b>1.3.4. Imunogena stanična smrt</b> .....	17
<b>1.3.5. Djelovanje na tumorsko krvožilje</b> .....	18
<b>1.4. Tumorski mikrokoliš</b> .....	20
<b>1.4.1. Hipoksija unutar TME</b> .....	21
<b>1.4.2. Hipoksija na molekularnoj razini</b> .....	22
<b>1.4.3. Problem hipoksije u PDT</b> .....	25
<b>1.5. Problem melanoma i PDT</b> .....	26
<b>1.6. Inovativne strategije u borbi protiv hipoksije</b> .....	27
<b>1.6.1. Nosači O<sub>2</sub></b> .....	27
<b>1.6.2. <i>In situ</i> generiranje kisika</b> .....	28
<b>1.6.3. Strategije smanjene upotrebe kisika</b> .....	30
<b>1.6.4. N-oksidi</b> .....	31
<b>2. CILJ RADA</b> .....	32
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	33
<b>3.1. Porfirini korišteni u eksperimentima</b> .....	33
<b>3.1.1. Strukture i svojstva korištenih porfirina</b> .....	33
<b>3.2. Stanične linije korištene u eksperimentima</b> .....	34
<b>3.3. Mjerenje intenziteta fluorescencije porfirina – Cell Uptake</b> .....	34
<b>3.5. Subcelularna lokalizacija porfirina fluorescencijskom mikroskopijom</b> .....	36
<b>3.6. MTT test</b> .....	37
<b>4. REZULTATI</b> .....	40
<b>4.1. Cell Uptake</b> .....	40
<b>4.1.1. Usporedba množine na membrani i unutar stanice</b> .....	40
<b>4.1.2. Usporedba množine spojeva unutar stanice</b> .....	43
<b>4.1.3. Usporedba po spoju – HDF i MEWO</b> .....	44

4.1.4. Usporedba množine pri različitim temperaturama inkubacije..	47
2. Fluorescentna mikroskopija .....	48
3. MTT kolorimetrijski test vijabilnosti stanica .....	50
3.1. Stanice melanoma – MEWO .....	50
3.2. Stanice fibroblasta – HDF .....	54
3.3. Usporedba proliferacije u uvjetima normoksije i hipoksije .....	56
3.4. Usporedba MEWO i HDF stanica .....	59
3.5. Usporedba spojeva sa <i>N</i> -metiliranim i <i>N</i> -oksidiranim supstituentima .....	61
5. DISKUSIJA .....	65
5.1. Ispitivanje ulaska spojeva u stanice .....	65
5.2. Ispitivanje lokalizacije fluorescentnom mikroskopijom .....	67
5.3. Ispitivanje proliferacije stanica MTT testom .....	68
6. ZAKLJUČAK .....	71
7. LITERATURA.....	72
8. ŽIVOTOPIS.....	77

## 1. UVOD

Rak kože definira se kao abnormalni rast stanica kože, a može se podijeliti na 3 tipa, rak bazalnih stanica, rak pločastih stanica te melanom. Rak bazalnih i rak pločastih stanica predstavljaju najčešće tipove raka kože, no ne metastaziraju i nisu agresivni kao treći tip, melanom<sup>1</sup>. Melanom je zloćudni tumor koji nastaje kao posljedica maligne transformacije pigmentnih stanica melanocita, a zbog velike sklonosti metastaziranju te stečene rezistencije na kemoterapiju, ubraja se među najagresivnije zloćudne tumore kože i sluznice. Iako je rijedak oblik tumora te čini 4% svih slučajeva raka kože, odgovoran je za čak 80% smrti povezanih s rakom kože<sup>2,3</sup>. Kao i kod većine zloćudnih tumora, na nastanak melanoma djeluju genetski, ali i okolišni čimbenici, posebice pretjerana izloženost UV zračenju iz sunčeve svjetlosti<sup>3</sup>.

Kirurški zahvati, kemoterapija, radioterapija i biološka terapija predstavljaju konvencionalne oblike terapije melanoma, no često uzrokuju nuspojave te djeluju na zdravo okolno tkivo. Znanstvenici ulažu brojne napore u otkriće sigurne i djelotvorne terapije pa su tako uz konvencionalne oblike terapije aktualne i metode poput imunoterapije, ciljanja gena te korištenje nanotehnologije, no najčešće ih ograničava problem rezistencije tumora na lijekove (engl. *multidrug resistance*, skraćeno MDR)<sup>3,4</sup>.

Jedan od inovativnih pristupa predstavlja i fotodinamička terapija (engl. *photodynamic therapy*, skraćeno PDT) koja se smatra obećavajućom metodom u tretmanu raznih onkoloških stanja, ali i autoimunih te zaraznih bolesti te bi se mogla pokazati učinkovitom u borbi protiv melanoma, s obzirom na prednosti poput minimalne tkivne toksičnosti, neinvazivnosti i visoke specifičnosti<sup>5,6,7</sup>.

## 1.1. Fotodinamička terapija

Fotodinamička terapija predstavlja novi oblik klinički odobrene i minimalno invazivne fototerapije, okarakteriziran selektivnom i citotoksičnom aktivnošću prema malignim stanicama<sup>5</sup>. Temelj ove terapije tri su esencijalne komponente, fotosenzibilizator (engl. *photosensitizer*, PS) koji se unosi na ciljano područje unutar organizma, svjetlo, kojim se ozračuje ciljano područje i time potiče apsorpcija svjetla od strane PS te posljedično stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROSs) uz prisutnost treće komponente, kisika<sup>5,6</sup>. Stvorene reaktivne kisikove vrste zatim pokreću biološke mehanizme terapije, a to su induciranje stanične smrti malignih stanica u obliku apoptoze, autofagije i nekroze<sup>6</sup>.

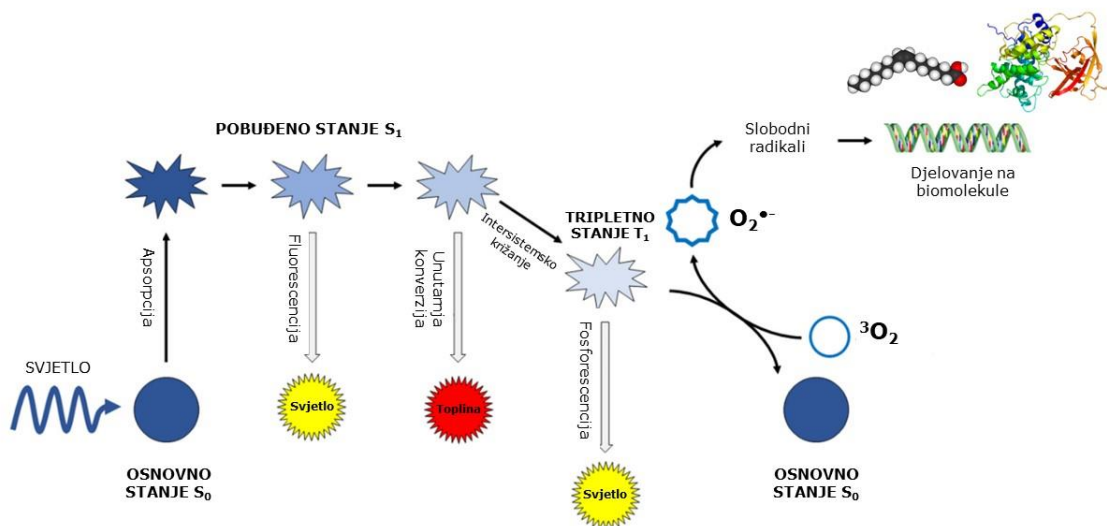
## 1.2. Mehanizmi fotodinamičke reakcije

Fotodinamička reakcija uključuje dva mehanizma, odnosno fotokemijsku reakciju tipa I i mehanizam tipa II. Fotokemijska reakcija tipa I podrazumijeva redoks reakciju slobodnih radikala putem prijenosa elektrona, konkretno superoksidnog aniona  $O_2^{\bullet-}$ , hidroksilnih radikala  $\bullet OH$  i peroksida, dok mehanizam tipa II podrazumijeva prijenos energije na okolne molekule kisika pri čemu nastaje singletni kisik  $^1O_2$ . Navedeni mehanizam objašnjava se Jablonski dijagramom (Slika 1)<sup>7</sup>.

Primjenom svjetlosti određene valne duljine, fotosenzibilizator apsorbira određeni kvant energije te prelazi iz osnovnog stanja  $S_0$  u pobuđeno energetska stanje  $S_1$  i kao takav je veoma nestabilan. Pobuđeno stanje  $S_1$  energetski je manje povoljno, stoga se molekula veoma brzo vraća u osnovno stanje  $S_0$ , a pritom emitira energiju u obliku fluorescencije i/ili unutarnje konverzije<sup>8</sup>. No, PS u stanju  $S_1$  često može podlijeći i intersustavnom križanju (engl. *intersystem crossing*, ISC) pri čemu formira stabilnije, pobuđeno tripletno stanje  $T_1$ . Iz pobuđenog tripletnog stanja  $T_1$ , fotosenzibilizator se može vratiti u osnovno stanje  $S_0$  emitiranjem svjetlosti

– fosforescencijom ili pak prenijeti energiju molekuli kisika  $^3\text{O}_2$  pri čemu nastaje singletni kisik  $^1\text{O}_2$ . Takav prijenos energije iz tripletnog stanja na molekulu kisika naziva se fotokemijskom reakcijom tipa II<sup>9</sup>.

S druge strane, fotokemijska reakcija tipa I odvija se prilikom direktne reakcije fotosenzibilizatora i organske molekule (npr. peptid ili nukleinska kiselina) unutar staničnog mikrookoliša i pritom zahtijeva atom vodika ili elektron za stvaranje radikala. Reducirani se PS zatim auto-oksidira pri čemu nastaje radikal superoksidnog aniona,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Iz  $\text{O}_2^{\bullet-}$  dalje mogu nastati vodikov peroksid  $\text{H}_2\text{O}_2$  te veoma snažan oksidans, hidroksilni radikal  $\bullet\text{OH}$ <sup>6</sup>.



**Slika 1. Modificirani Jablonski dijagram, prilagođeno prema<sup>7</sup>.**

Reakcije se mogu odvijati simultano, no njihov omjer ovisi o mnogim faktorima poput koncentracije kisika u tkivu, dielektričnoj konstanti i pH u tkivu te svojstvima i strukturi fotosenzibilizatora<sup>10</sup>.

Reakcije tipa II smatraju se dominantnijima, odnosno pokazuju snažnije oksidativno djelovanje na maligne stanice i kao takve najviše doprinose učinkovitosti fotodinamičke terapije. No, prisutno je i razmišljanje kako bi se u uvjetima gdje je fotosenzibilizator veoma koncentriran te se nalazi u hipoksičnom okolišu, reakcije tipa I mogle pokazati nadmoćnijima<sup>9</sup>.

Stvorene reaktivne kisikove vrste i singletni kisik mogu djelovati na veliki broj bioloških molekula poput proteina i molekule DNA. Prilikom djelovanja na proteine, glavnim metama ovih spojeva smatraju se aminokiselinski ostatci na proteinima koji uključuju aminokiseline cistein, metionin, histidin te triptofan okarakterizirane reaktivnošću koja je pogodna za oksidativni „napad“<sup>10</sup>.

Djelovanjem na molekulu DNA, mogu izazvati oksidativna oštećenja na nukleotidnim bazama i ugljikohidratnim podjedinicama. Stanice u određenoj mjeri mogu popravljati nastala oštećenja, no ukoliko je oštećenje preveliko, stanice podliježu staničnoj smrti u obliku apoptoze ili nekroze<sup>11</sup>.

PDT također djeluje na lipide koji su manje zastupljeni od proteina, no membrane su građene od nezasićenih masnih kiselina što čini plazmatsku membranu i organele obavijene membranom primarnim metama singletnog kisika i ROS-a. Također, molekularni kisik je visoko topljiv u lipidima pa će PS u takvim uvjetima lakše stvoriti singletni kisik i ROS-e. Singletni se kisik veže direktno na nezasićene masne kiseline i pritom stvara lipidne perokside koji u prisutnosti prijelaznih materijala produciraju radikale koji zatim uzrokuju oštećenja lipidnih biomembrana, ali i promjene u metabolizmu i staničnom signaliziranju<sup>12</sup>.

### **1.3. Mehanizmi stanične smrti uzrokovani PDT**

Sudbina malignih stanica izloženih terapiji uvelike ovisi o porijeklu tumora, fotofizikalnim i fotokemijskim svojstvima PS-a, njegovoj distribuciji u tkivima, ulasku u stanice, subcelularnoj lokalizaciji i primjenjenoj dozi svjetla<sup>12</sup>. Stanična smrt uzrokovana PDT-om već se desetljećima kategorizira u tri skupine, tzv. „*three classical pillars*“ stanične smrti: tip 1 – apoptoza, tip 2 – autofagija, tip 3 – nekroza. Spomenuti putevi aktivirani su direktnom fototoksičnošću, no PDT može uzrokovati i uništenje tumorskog krvožilja te imunološki posredovana upalna oštećenja tumorskih stanica<sup>13,14</sup>.

Mnogobrojna istraživanja posljednjih su godina dovela do novih saznanja o molekularnim mehanizmima stanične smrti, ali i otkrića novih, nekonvencionalnih oblika smrti poput nekroptoze, ferroptoze, mitotske katastrofe, paraptoze, partanatoze i piroptoze. Spomenuti oblici stanične smrti okarakterizirani su različitim morfološkim, biokemijskim, genetičkim i funkcionalnim svojstvima od konvencionalnih oblika stanične smrti te se aktivno istražuje njihova uloga u protutumorskoj terapiji<sup>13</sup>.

### **1.3.1. Apoptoza**

Apoptoza je strogo regularni oblik programirane stanične smrti, kontroliran intracelularnim i ekstracelularnim signalima što rezultira karakterističnim slijedom morfoloških te biokemijskih promjena tumorskih stanica – skupljanje stanice, kondenzacija kromatina i nakupljanje preostalih staničnih komponenti u obliku apoptotskog tjelešca<sup>14</sup>. Apoptoza se može aktivirati ekstrinzičnim putem, odnosno stimulacijom membranskih receptora iz TNF (engl. *Tumor Necrosis Factor*) obitelji gdje se u signalnoj kaskadi naposljetku aktiviraju kaspaze 3, 6 i 7 odgovorne za razgradnju stanice<sup>15,16</sup>.

S druge strane, povećana koncentracija reaktivnih kisikovih vrsta, poremećaj u ionskom transportu ili povećana koncentracija kalcijevih iona u citoplazmi dovesti će do aktivacije intrinzičnog puta. Time dolazi do promjene u ravnoteži proapoptotskih i antiapoptotskih proteina iz obitelji Bcl-2. Proapoptotski proteini poput Bax i Bad bit će aktivirani, oligomerizirati i umetnuti se u membranu mitohondrija kako bi stvorili kanal kroz koji proapoptotička molekula poput citokroma c može izaći iz membrane u citoplazmu i uzrokovati gubitak stanične funkcije<sup>17</sup>. U slučaju oštećenja molekule DNA, molekule poput tumor-supresorskog protein p53 utječu na ravnotežu proteina ili potiču transkripciju gena koji induciraju stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta kako bi izazvale oštećenja stanice i odlazak stanice u apoptozu<sup>16</sup>.

### **1.3.2. Autofagija**

Autofagija je drugi tip stanične smrti uzrokovan PDT-om te često zamjenjuje apoptozu ukoliko ona nije moguća. Predstavlja katabolički proces koji omogućuje stanicama očuvanje balansa između sinteze, degradacije te recikliranja staničnih produkata. Na taj se način ciljani i oštećeni dijelovi stanice mogu ukloniti tako što se oko njih stvara dvomembranska vezikula, tzv. autofagosom. Autofagosom se zatim spaja s lizosomom pri čemu nastaje autofagolizosom i pod djelovanjem lizosomalnih enzima obuhvaćeni sadržaj biva razgrađen<sup>18</sup>.

Kao takva, autofagija predstavlja mehanizam koji doprinosi preživljenju stanica, a s druge strane jedan je od mehanizama smrti pokrenutih prilikom PDT<sup>19</sup>. Takvu kontradiktornost potvrđuje i činjenica da je jedna od prvih bolesti povezanih s autofagijom bio upravo rak gdje su znanstvenici primijetili da protein Beclin1 nužan u procesu autofagije je i ujedno i tumor supresorski protein. Kako tumor napreduje, Beclin1 gubi svoju ulogu te se tumor putem autofagije počinje opskrbljivati energijom. A s druge strane, postoje mnoga istraživanja koja su potvrdila autofagiju kao mehanizam smrti potaknut PDT-om. Kako bi se terapija učinila što učinkovitijom potrebna su daljnja istraživanja o ulozi ovog mehanizma, a jedna od ideja je korištenje inhibitora autofagije prilikom terapije i poticanje apoptotičke smrti<sup>20</sup>.

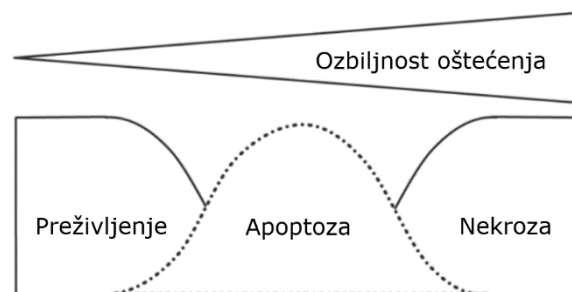
### **1.3.3. Nekroza**

Suprotno apoptozi i autofagiji, nekroza je pasivan oblik stanične smrti, a rezultat je ekstremnih vanjskih fizikalnih uvjeta poput temperature, tlaka, pH ili osmolarnosti ili pak teškog oštećenja stanica induciranog kemijskim procesima (npr. superletalne doze ionizirajućeg zračenja, metaboličkim inhibitorima ili drugim toksičnim supstancama). Okarakterizirana je gubitkom integriteta membrane i metaboličke homeostaze uslijed



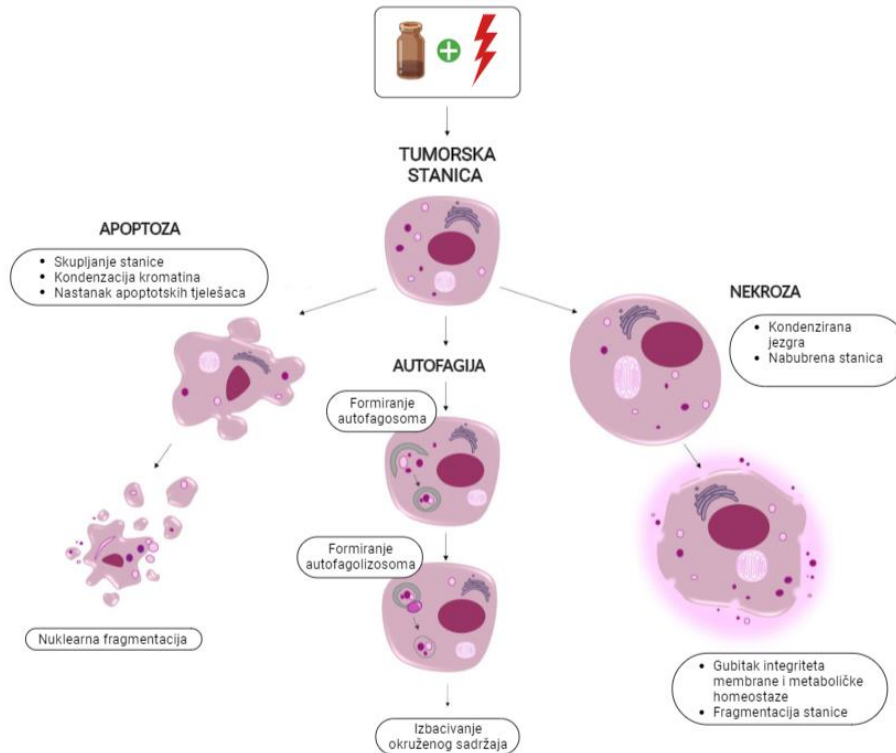
nekontrolirane stanične disintegracije te morfološkim promjenama u obliku bubrenja citoplazme, rupture membrane te kondenzirane jezgre<sup>21</sup>.

Pokazano je da ukoliko se stanice izloži visokim koncentracijama PS-a ili se upotrijebi visoka doza svjetlosti, one umiru brzo i nereguliranom nekrotičnom smrću – poznatije kao slučajna nekroza (engl. *accidental necrosis*). No, ukoliko se terapija ispravno optimizira, stanice podliježu reguliranim putevima stanične smrti<sup>13</sup> (Slika 2).



**Slika 2. Ovisnost staničnog odgovora i ozbiljnosti oštećenja izazvanih PDT-om<sup>21</sup>.**

Nekrozu u PDT najčešće uzrokuju lipofilni i anionski PS-i koji se nakupljaju u membrani te djeluju na kolesterol i druge membranske fosfolipide, uzrokujući njihovu peroksidaciju. Time dovode do promjene u permeabilnosti membrane, gubitka fluidnosti, poremećaja u povezanosti aminolipida i polipeptida te inaktivacije enzimskih sustava i receptora u membrani. Također, dovodi do inaktivacije liozosomalnih, mitohondrijskih i citosolnih enzima i na taj način utječe na gubitak stanične homeostaze<sup>21</sup>.



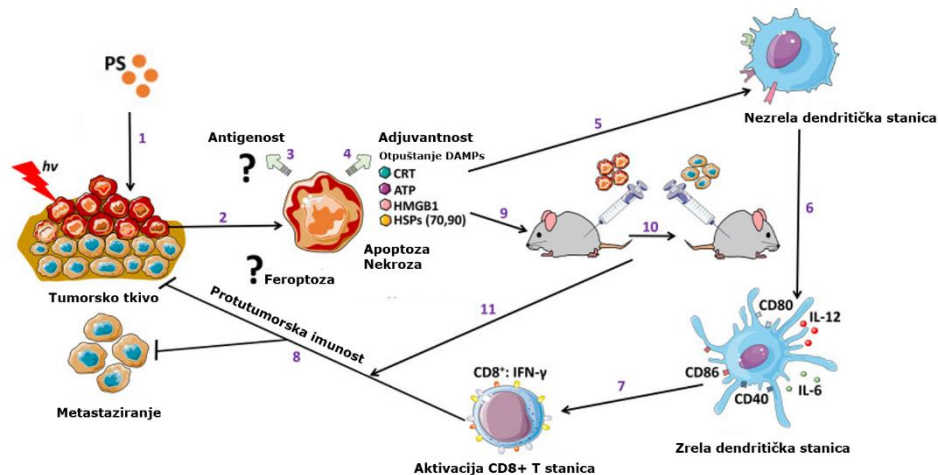
**Slika 3. Konvencionalni oblici stanične smrti izazvani PDT-om, prilagođeno<sup>22</sup>.**

### 1.3.4. Imunogena stanična smrt

Imunogena stanična smrt (engl. *immunogenic cell death*, ICD) predstavlja oblik stanične smrti uzrokovane PDT-om gdje se na ciljanom području stvara upalna reakcija, točnije aktiviraju se putevi urođene i stečene imunosti. Koliko će ovaj oblik smrti biti imunogen određuje antigenost i adjuvantnost umirućih stanica raka. Antigenost se određuje prema prisutnosti antigena povezanih s tumorom (engl. *tumor-associated antigens*, TAA) i tumorskih neoantigena (engl. *tumor neoantigens*, TNA)<sup>22</sup>. No, spomenute molekule često ne uspijevaju potaknuti dovoljnu imunost ukoliko nisu prisutne pomoćne molekule nužne za regrutaciju i aktivaciju antigen prezentirajućih stanica (engl. *antigen-presenting cells*, APC). Imunogena stanična smrt potiče otpuštanje spomenutih pomoćnih signalnih molekula – DAMPs (engl. *damage-associated molecular patterns*)<sup>18,23</sup>.

DAMPs mogu biti otpuštene aktivnim putem, pasivno ili biti prezentirane na površini umiruće stanice, a njihova je glavna uloga upravo regrutacija i aktivacija APC stanica poput dendritičkih stanica koje će zatim na svojoj površini ispoljiti TAA i TNA nužne za aktivaciju efektorskih CD8+ T limfocita<sup>23</sup>.

PDT snažno djeluje na poticanje ICD, no većina istraživanja koja to potvrđuje se i dalje temelji na ispitivanjima na modelnim životinjama, stoga je nužno pokazati uspješnost terapije u kliničkim uvjetima. Također, problem hipoksičnog tkiva uvelike utječe na ovakav oblik stanične smrti što potiče znanstvenike na predlaganje različitih terapijskih rješenja<sup>23</sup>.



**Slika 4. Imunogena stanična smrt uzrokovana PDT-om<sup>23</sup>.**

### 1.3.5. Djelovanje na tumorsko krvožilje

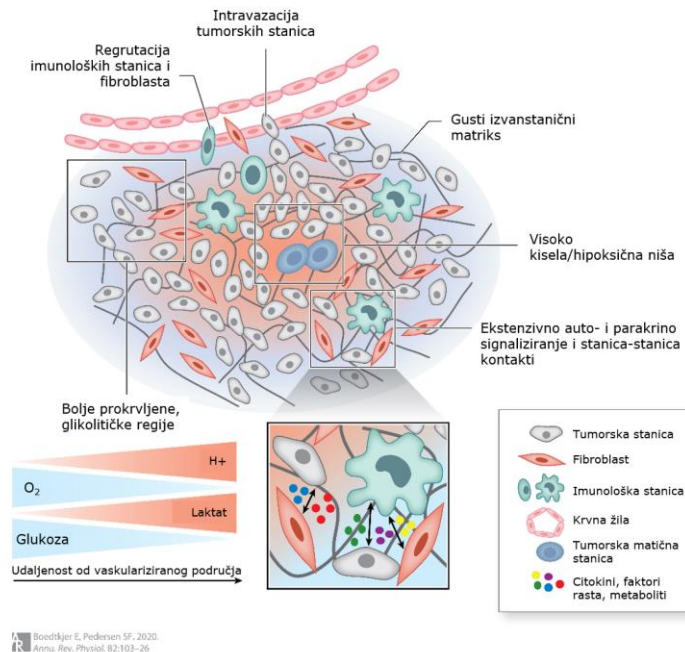
Još jedna od mogućih posljedica PDT je i djelovanje na tumorsko krvožilje što rezultira značajno smanjenim dotokom krvi u tumorsko tkivo, a time i nedostatkom kisika u tkivu, odnosno hipoksijom. Tumorsko krvožilje nužno je za preživljenje tumora, dopremajući kisik i druge potrebne nutrijente. U tu svrhu koriste se VDAs (engl. *vascular-disrupting agents*) koji utječu na destrukciju krvožilja i time uzrokuju smrt



## 1.4. Tumorski mikrookoliš

Na razvoj i metastaziranje tumora utječu dva faktora, genetske i epigenetske promjene u tumorskim stanicama i preraspodjela komponenti tumorskog mikrookoliša (engl. *tumor microenvironment* TME)<sup>27</sup>. TME građen je od nakupina tumorskih stanica, matičnih tumorskih stanica, stromalnih stanica tumora uključujući i stromalne fibroblaste, endotelne stanice te imunoloških stanica poput mikroglija, makrofaga i limfocita, nestaničnih komponenti izvanstaničnog matriksa poput kolagena, fibronektina, hijalurona, laminina i drugih. Jednako kao i zdravim stanicama, nužna im je doprema kisika i nutrijenata pa TME čine i limfne te krvne žile<sup>27,28</sup>. Tumorske stanice glavna su komponenta TME gdje kontroliraju funkciju staničnih i nestaničnih komponenti putem kompleksnih signalnih puteva gdje pritom šalju signale ne-malignim stanicama kako bi djelovale u korist tumora, odnosno poticale njegov rast i metastaziranje<sup>27</sup>.

U odnosu na zdravo tkivo, TME posjeduje različite biofizikalne i biokemijske karakteristike. Tkivo TME okarakterizirano je visokim tlakom intersticijske tekućine, povećanom čvrstoćom izvanstaničnog matriksa, nepravilnom organizacijom krvožilja, hipoksijom i acidozom ( $\text{pH} \leq 6.8$ ). Acidoza unutar TME posljedica je metaboličkih promjena unutar TME, gdje stanice preferencijalno provode glikolizu (anaerobni uvjeti) umjesto oksidativne fosforilacije (aerobni uvjeti) što dovodi do nakupljanja mliječne kiseline i acidoze mikrookoliša<sup>29</sup>.



**Slika 6. Komponente i karakteristike TME, prilagođeno<sup>30</sup>.**

### 1.4.1. Hipoksija unutar TME

Jedno od glavnih obilježja solidnih tumora je hipoksija, a nastaje kao posljedica ubrzane proliferacije tumorskih stanica i abnormalnosti u tumorskoj vaskulaturi. Hipoksična područja unutar TME nastaju kao posljedica u neravnoteži dopreme i potrošnje kisika unutar tumora pa je u takvim područjima tlak kisika obično ispod 2.5 mm Hg, dok u normalnim tkivima tlak kisika odgovara metaboličkim potrebama i uglavnom je iznad 40 mm Hg<sup>31</sup>.

Poznato je nekoliko mehanizama koji doprinose razvoju hipoksije u TME, a jedan od njih je hipoksija ograničena perfuzijom (engl. *perfusion-restricted hypoxia*). Ovakav oblik hipoksije je prolazan pa se naziva i akutnim oblikom, a posljedica je nedostatne dopreme kisika uslijed aberacije krvnih žila. Otvaranjem i zatvaranjem takvih žila krvni protok postaje neustaljen i „trom“ što dovodi do fluktuacija u dopremi kisika. Ukoliko takve fluktuacije postanu konstantne, dolazi do pojave cikličkih perioda hipoksije i

reoksigenacije, što naposljetku dovodi do razvoja heterogenih staničnih linija unutar tumora<sup>30</sup>.

Nadalje, hipoksija ograničena difuzijom (engl. *diffusion-restricted hypoxia*) predstavlja kronični, odnosno trajni oblik hipoksije, a pojavljuje se prilikom trajno ograničene difuzije kisika uslijed abnormalnosti u tumorskom krvožilju. Kronična hipoksija definira se širenjem tumorskih stanica većim od 70  $\mu\text{m}$  od već postojećih krvnih žila što sprječava odgovarajuću dopremu kisika stanicama. Udalje li se stanice više od 180  $\mu\text{m}$  mogu postati i nekrotične. Posljednji oblik hipoksije je anemična hipoksija kao posljedica smanjenog kapaciteta za transport kisika u krvi. Često se povezuje s prisutnošću tumora ili primjenom terapije<sup>28</sup>.

Akutna i kronična hipoksija povezuju se sa progresijom tumora i agresivnim fenotipom, a kronična hipoksija se također povezuje i sa regresijom tumora. Štoviše, nekoliko je studija pokazalo kako akutna hipoksija potiče preživljenje stanica i autofagiju, konkretno tumorskih stanica sa osobinama matičnih stanica, pojačavajući ekspresiju markera takvih stanica i pritom povećavajući otpornost na radioterapiju. Chenet i suradnici su pokazali kako akutna hipoksija potiče genetske, molekularne, biokemijske i stanične promjene pormovirajući preživljenje i heterogenost tumorskih stanica, plastičnost i metastaziranje tumora<sup>28</sup>.

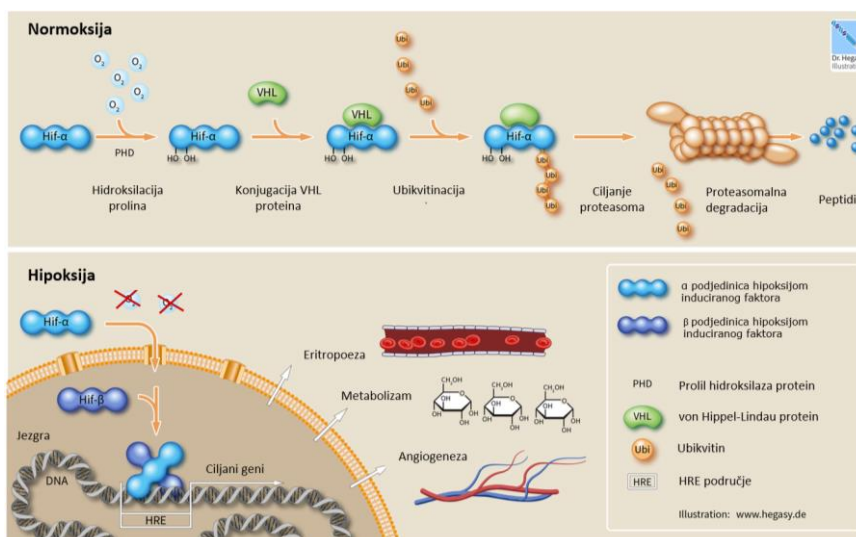
#### **1.4.2. Hipoksija na molekularnoj razini**

Na molekularnoj razini, hipoksija se povezuje s transkripcijskim faktorom HIF-1 (hipoksijom induciran faktor 1, engl. *hypoxia-inducible factor 1*) građenog od dvije podjedinice, HIF-1 $\alpha$  i HIF-1 $\beta$ /ARNT. Aktivacija HIF-1 u uvjetima hipoksije najbolje je opisana mehanizmom moduliranja stabilnosti HIF-1 $\alpha$  podjedinice. U uvjetima normoksije, odnosno normalne razine kisika, enzimi prolil hidroksilaze (engl. *prolyl hydroxylases*, PHDs) uzrokuju hidroksilaciju specifičnih prolinskih ostataka o kisiku ovisne domene unutar HIF-1 $\alpha$  (engl. *oxygen-dependent degradation domain*, ODD)

podjedinice. Posljedično tome, ODD će biti ubikvitarno obilježena putem von Hippel-Lindau proteina (VHL) što će uzrokovati degradaciju HIF-1 $\alpha$  i kao takav HIF-1 neće biti stabiliziran, odnosno aktivan u uvjetima normoksije. S druge strane, u nedostatnim uvjetima kisika, HIF-1 $\alpha$  biva stabilizirana uslijed aktivacije PHDs prilikom smanjene razine kisika te se translocira do stanične jezgre gdje stupa u interakciju s podjedinicom HIF-1 $\beta$  čime zajedno tvore heterodimer HIF-1. Naposljetku, HIF-1 se veže na HRE sekvence unutar molekule DNK (engl. *hypoxia responsive elements*, HRE) gdje potiče ekspresiju brojnih gena povezanih s adaptacijom, invazijom, metastaziranjem i angiogenezom tumorskih stanica prilikom hipoksičnih uvjeta<sup>32</sup>.

HIF-1 će pokrenuti angiogenezu unutar hipoksičnog tumorskog područja tako što potiče pretjeranu ekspresiju vaskularnog endotelnog faktora (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF), glikoproteina odgovornog za angiogenezu i vaskulogenezu. Također, HIF-1 pokreće metaboličko reprogramiranje tumorskih stanica, odnosno potiče ekspresiju gena koji kodiraju transportere glukoze (engl. *glucose transporters*, GLUT) i glikolitičke enzime (engl. *glycolytic enzymes*) koji će pokrenuti proces glikolize. U isto vrijeme, geni potaknuti HIF-1 smanjuju aerobni mitohondrijski metabolizam i broj kopija mitohondrija. Također, HIF-1 potiče invaziju i metastaziranje putem različitih signalnih puteva, uključujući epitelno-mezenhimalnu tranziciju (engl. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT) te ekspresiju protoonkogena Met i lizil oksidaze (engl. *lysyl oxidase*) odgovornih za proces metastaziranja<sup>32</sup>.





**Slika 7. Usporedba mehanizama normoksije i hipoksije, prilagođeno<sup>33</sup>.**

Hipoksija ima širok raspon djelovanja unutar TME, potiče angiogenezu i limfangiogenezu, metabolizam tumora, rast, metastaziranje i terapijsku rezistenciju u različitim tipovima tumora. Također, utječe na agresivnost tumora i potiče klonalnu selekciju pri čemu nastanak novih i invazivnijih klonova ponovno dovodi do hipoksije koja zatim djeluje kao zapreka u konvencionalnim oblicima terapije raka, uključujući radioterapiju, kemoterapiju i fototerapiju.

U slučaju PDT, hipoksija značajno utječe na efikasnost terapije posredovane mehanizmom tipa II, s obzirom da je kisik nužan za stvaranje singletnog kisika. Pritom se aktiviraju različiti mehanizmi koji djeluju na imunološki sustav i umanjuju protutumorski odgovor, a to potvrđuju i istraživanja gdje je pokazano da su tumorske matične stanice u uvjetima hipoksije uvelike odgovorne za rezistenciju i remisiju tumora za vrijeme primanja konvencionalne terapije<sup>28</sup>.

S druge strane, postoje dokazi u literaturi koji predlažu da hipoksija čini tumorske stanice osjetljivijima na kemoterapiju. No, i dalje je sveopće prihvaćeno da su hipoksični tumori povezani s lošijim ishodom<sup>28</sup>.

### 1.4.3. Problem hipoksije u PDT

Unatoč brojnim prednostima i širokoj primjeni, fotodinamička terapija i dalje se ne svrstava u prvu liniju obrane protiv onkoloških stanja u kliničkim uvjetima. Razlog tome su ograničenja poput poteškoća u dopremi i lokalizaciji PS-a, odgovarajućoj dozi i propusnosti svjetla te nepovoljnih uvjeta unutar TME, uključujući hipoksiju<sup>34</sup>. Proliferacija tumorskih stanica i abnormalni rast tumorskog krvožilja dovode do nedovoljne dopreme kisika u tumorsko tkivo što uvelike utječe na efikasnost fotodinamičke terapije. Štoviše, PDT zahtjeva velike količine kisika i pritom uništava tumorske krvne žile čime ujedno i blokira daljnju dopremu kisika i time dodatno uzrokuje hipoksične uvjete unutar TME. U takvim uvjetima dolazi do aktivacije faktora poput HIF-1 te se potiče preživljenje i invazija hipoksičnih tumorskih stanica<sup>35,37</sup>.

Uz aktivaciju faktora iz obitelji HIF, u stanju hipoksije dolazi do povećane ekspresije ABC transportera (engl. *adenosine triphosphate-binding cassette*, ABC), uključujući MDR rezistentne gene 1 (engl. *multidrug resistance*, MDR1 ili ABCB1) i njihovih produkata P-glikoproteina i proteina MRP1 (engl. *multidrug resistance-associated protein*). P-glikoprotein i MRP1 djeluju kao membranski transporteri i omogućuju tumorskim matičnim stanicama izbacivanje citotoksičnih materijala iz stanice. Povećana ekspresija transportera smanjuje djelovanje kemoterapeutskih agensa uslijed visokog kapaciteta za izbacivanje materijala iz stanice što dovodi do neuspjele terapije i razvoja tumora rezistentnog na lijekove<sup>27</sup>.

Znanstvenici trenutno predlažu mnoge inovativne strategije u borbi protiv hipoksije i posljedične rezistencije na lijekove u PDT. Poseban fokus pridaje se moduliranju TME, dopremi kisika na ciljano mjesto koristeći različite nosače i mnoge druge metode<sup>34</sup>.

## 1.5. Problem melanoma i PDT

U već spomenutoj rezistenciji na lijekove, osim hipoksije, u slučaju melanoma dodatno sudjeluju i pigment melanin te posebni organeli unutar melanocita zaduženi za sintezu melanina, melanosomi. Melanosomi su organeli nalik liposomima te se smatra kako su uključeni u „hvatanje“ lijeka i njegovo izbacivanje iz stanice pomoću transportera. PDT se predlaže kao moguće rješenje u rezistenciji melanoma na terapiju, no također podliježe rezistenciji, posebice od strane melanina koji se nalazi na površini kože te djeluje poput filtera koji sprječava duboku penetraciju svjetlosti i pritom štiti stanične mete od svjetla, ali i apsorbira te lomi terapijsko svjetlo. U studijama je pokazano kako u intervalu od 500-600 nm melanin dominantno apsorbira svjetlost te da svjetlost u stanice melanoma dopire tek iznad 700 nm. Time melanin utječe na efikasnost fotosenzibilizatora, a primjer je i Photofrin<sup>®</sup>, PS korišten u klinici koji se aktivira pri 630 nm, no prilikom tretiranja visoko pigmentiranih melanoma nema učinka. Dodatno, melanin djeluje kao antioksidans te cijepa molekule ROS-a pri čemu štiti stanice od njihovog daljnjeg djelovanja<sup>38</sup>.

Ulažu se mnogi napor u rješenje problema rezistencije melanoma na PDT, a najveće se nade polažu u korištenje fotosenzibilizatora koji apsorbiraju svjetlo u području blizu infracrvenog zračenja, odnosno između 600 i 800 nm (engl. *phototherapeutic window*) gdje je penetracija u tkivo mnogo dublja. Poznato je kako apsorpcija pri 400 nm pruža penetraciju u tkivo od samo 1 mm, a pri 630 nm iznosi čak 10 mm što je uvelike nužno u terapiji melanoma koji raste u oba smjera, vertikalno te horizontalno<sup>38,39</sup>. Druga rješenja predlažu depigmentaciju melanina, odnosno korištenje inhibitora sinteze melanina, upotrebu hipertermije na tretirano tkivo pri čemu se potiče dodatno stvaranje ROS-a ili pak korištenje PDT u kombinaciji sa stimulacijom imunološkog sustava<sup>38</sup>.

## 1.6. Inovativne strategije u borbi protiv hipoksije

### 1.6.1. Nosači O<sub>2</sub>

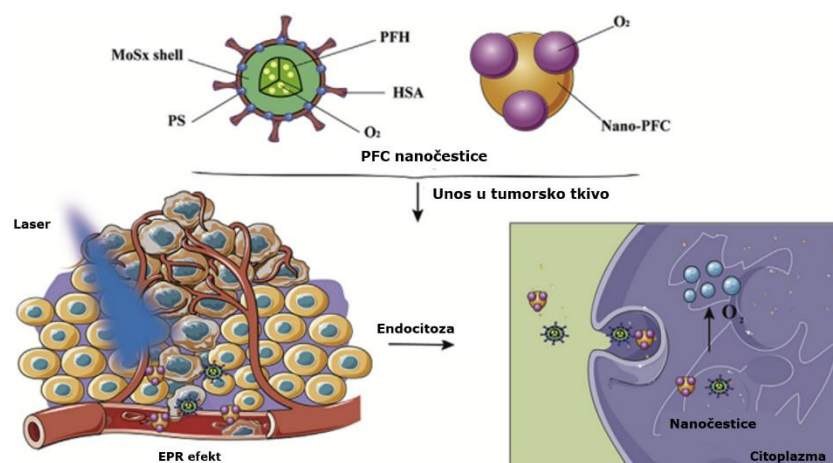
Ubrzani razvoj nanomedicine doveo je do razvoja mnogih rješenja u PDT kojima se pokušava zaobići problem hipoksije. Jedna od strategija je korištenje nanonosača za dopremu kisika na ciljano mjesto terapije<sup>36</sup>. Korištenje nanonosača omogućuje očuvanje i otpuštanje veće količine kisika potrebnog za odvijanje fotodinamičke reakcije na ciljanom mjestu, a mogu se podijeliti na nosače na bazi hemoglobina (engl. *Hb based carriers*) i one koji nisu na bazi hemoglobina, već su građeni od perfluorugljika (PFC) ili materijala poput metalno-organskih okvira (engl. *metal-organic frameworks*, skraćeno MOFs)<sup>36,37</sup>.

Hemoglobin (Hb) je esencijalni metaloprotein koji se nalazi unutar crvenih krvnih stanica te je odgovoran za vezanje i dostavu kisika. Usprkos efikasnoj dopremi kisika, slobodni Hb često biva auto-oksidiran prilikom cirkuliranja u krvi i kao takav uzrokuje bubrežne i vaskularne probleme. Korištenjem nanonosača koji prenose Hb u tumorsko tkivo takve se komplikacije mogu izbjeći<sup>37</sup>. Primjer takvih nosača su umjetne crvene krvne stanice u koje je unesen Hb i PS (*indocyanine green*, ICG) te je pokazano kako je kisik dopremljen Hb-om doprinjeo razvoju ROS-a te je i on sam oksidiran od strane ROS-a, pri čemu je nastao citotoksičniji feril-hemoglobin koji je dodatno pojačao protutumorsko djelovanje PDT.

S druge strane, nanonosači poput perfluorugljika posjeduju jedinstvena svojstva kao što su velike gustoća, visoka mobilnost, dobra stabilnost i biokompatibilnost. Za razliku od Hb, PFC ne prenosi kisik tako što ga veže na sebe, već ga otapa. U usporedbi s Hb, PFC može otopiti 40–56 ml O<sub>2</sub> na 100 ml PFC pri 760 Torr i 25 °C i pritom donirati molekularni kisik u tumorsko tkivo. No, iako posjeduje veliki kapacitet za primanje kisika, efikasnost otpuštanja se temelji isključivo na pasivnoj difuziji ovisnoj o

gradijentu koncentracije kisika i ona je niža nego u slučaju Hb. Zanimljiv primjer gdje su znanstvenici pokušali riješiti taj problem je korištenje PFC nanočestice stabilizirane s HSA gdje je PFC injektirana u miševe, a zatim su izloženi kisiku i istovremenoj sonifikaciji koja bi potakla otpuštanje kisika na ciljano mjesto. Razina kisika porasla je s prethodnih 17% na 49%<sup>40</sup>.

Aktualan oblik nanonosača predstavljaju i metalno-organski okviri (MOFs) čija građa omogućuje veliku unutrašnju površinu za prijenos plinova pa tako i molekularnog kisika. Prednost ovakvih nosača je biorazgradivost, prilagodljiva funkcionalnost površine i strukturne modifikacije<sup>37</sup>.



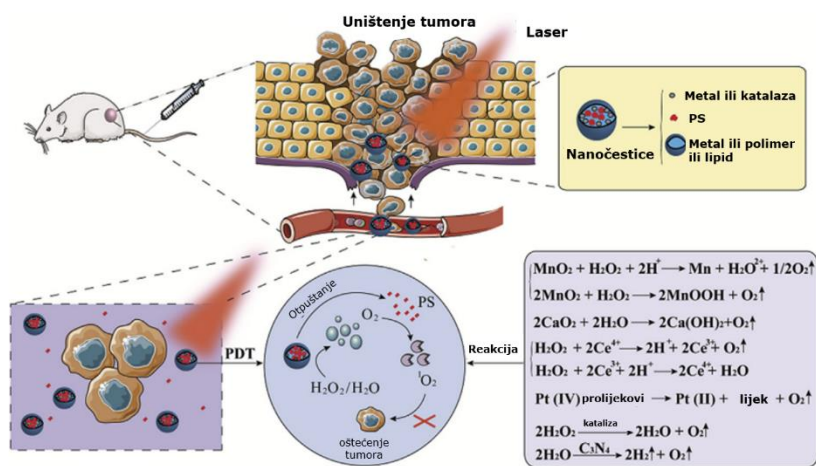
**Slika 8. Prikaz nosača kisika na bazi PFC i obrasca ulaska nosača u tumorske stanice, prilagođeno<sup>36</sup>.**

### 1.6.2. *In situ* generiranje kisika

Sljedeća skupina inovativnih strategija temelji se na generiranju kisika u ciljanom tumorskom području, a u odnosu na prethodno spomenute nosače gdje može doći do preuranjenog otpuštanja kisika prilikom transporta, ovdje kisik nastaje direktno na ciljanom mjestu<sup>35</sup>. Jedna od najučestalijih metoda je generiranje kisika prilikom katalizirane razgradnje vodikovog peroksida čija je koncentracija povišena upravo u tumorskim tkivima te razgradnja endogene vode<sup>37</sup>.

Za razgradnju  $\text{H}_2\text{O}_2$  nužan je antioksidativni enzim katalaza (CAT) smješten u peroksisomima stanice gdje će katalizirati nastanak vode i molekularnog kisika nužnog za terapiju. CAT se može poduprijeti različitim nanomaterijalima – mezopornim materijalima, nanočesticama ili npr. MOFs te se dostavlja u ciljano područje zajedno s PS-om<sup>35</sup>. Zanimljiv primjer su „pametne“ nanočestice osjetljive na pH gdje se CAT dodaje na površinu Ce6-silica šuplje nanočestice uz dodatak probe koja cilja mitohondrije (engl. *mitochondrial targeting probe molecule*, CTPP) i pH osjetljivog anionskog polimera (DPEG) pri čemu nastaje finalni produkt - CAT@S/Ce6 CTPP/DPEG nanočestica. Prilikom ulaska u tumorski mikrookoliš, DPEG se neutralizira i nanočestica postaje pozitivno nabijena što utječe na poboljšanu endocitozu i retenciju u tumorskim stanicama, a zbog prisutnosti CTPP ona se zadržava u mitohondrijima i time pospješuje smrt tumorskih stanica<sup>35</sup>.

Nedostatak primjene CAT je dugotrajan i skup proces pripreme i purifikacije enzima te lak utjecaj biološkog okoliša, temperature, pH, ionske koncentracije i unutarstaničnih proteina na aktivnost enzima<sup>37</sup>.

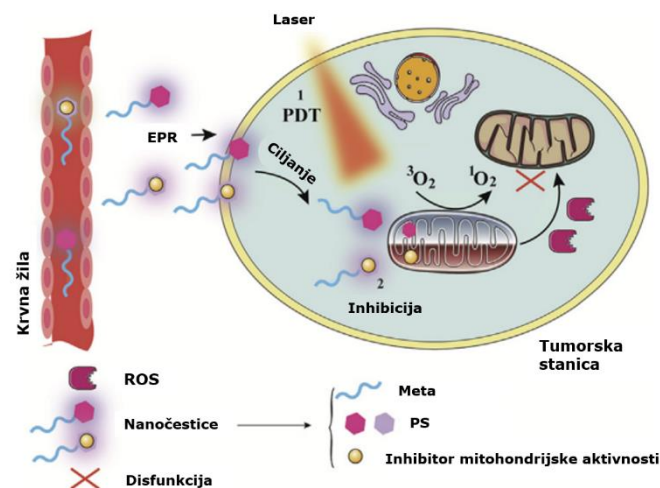


**Slika 9. Prikaz djelovanja generatora kisika te specifičnih mehanizama generiranja kisika prikazanih putem kemijskih jednadžbi, prilagođeno<sup>36</sup>.**

### 1.6.3. Strategije smanjene upotrebe kisika

Smanjenom upotrebom kisika moguće je boriti se protiv hipoksije, a metode kojima se to postiže su inhibiranje mitohondrijske aktivnosti te PDT neovisna o kisiku.

Inhibicija mitohondrijske aktivnosti moguća je korištenjem spojeva koji djeluju na mitohondrijski respiracijski lanac gdje suprimiraju mitohondrijske komplekse I-IV i pritom dovode do disfunkcije mitohondrija i smanjene upotrebe kisika. Konkretni primjer ovakve metode je liposom s inkapsuliranim hidrofobnim Hce6 (Ce6 kovalentno vezan na heksamin) i hidrofilnim metforminom u vanjskoj membrani i unutrašnjoj šupljini. Postepeno otpuštanje metformina dovelo je do inhibicije mitohondrijskog kompleksa I i smanjene upotrebe kisika iz kojeg je Ce6 zatim stvorio ROS-e i inhibirao tumorski rast<sup>36</sup>.



**Slika 10. Mehanizam djelovanja mitohondrijskih nanočestica, prilagođeno<sup>36</sup>.**

PDT neovisna o kisiku uključuje korištenje nanočestica u obliku spojeva koji oponašaju peptide - peptidomimetici (engl. *peptidomimetics*) i pritom stvaraju ROS-e uslijed djelovanja svjetla, bez potrebe za kisikom. Primjer

takvog spoja građen je od diariletileenske jezgre osjetljive na svjetlost i prirodnog peptida gramicidina S. Prilikom izlaganja UV svjetlu, jezgra bi poprimila otvoreni oblik i potaknula citotoksično djelovanje peptidomimetika<sup>34</sup>.

#### **1.6.4. N-oksidi**

Derivati *N*-oksida predstavljaju skupinu osjetljivu na stanje hipoksije te se nazivaju prolijekovima, odnosno molekulama koje se nalaze u neaktivnom obliku, no prilikom redukcije od strane enzima bivaju aktivirane i pritom stvaraju radikale koji djeluju na tumorske stanice. Osim *N*-oksidne skupine, na stanje hipoksije osjetljive su skupine azobenzena, nitro skupine, kinoni te prijelazni metali. Jedan od najpoznatijih prolijekova je heterociklički *N*-oksid tirapazamin (TPZ), tipičan primjer lijeka koji se pomoću različitih unutarstaničnih reduktaza pretvara u citotoksične radikale pri hipoksičnim uvjetima u stanici. Pri normalnoj razini kisika ovaj spoj se oksidira i vraća u početno, necitotoksično stanje. Citotoksični radikali TPZ-a imaju tendenciju susjednim molekulama oduzeti atom vodika i pritom uzrokovati oštećenja u stanici. Na taj način, hipoksija djeluje sinergistički s fotodinamičkom terapijom i uzrokuje smrt tumorskih stanica<sup>34</sup>.

Veoma slično djeluju i porfirini s *N*-oksidnom skupinom gdje se smatra kako su u redukciju skupine uključeni citokrom P450 (NADH ovisan i/ili NADPH ovisan) i drugi hemoproteini, a proces redukcije uzrokuje nastanak citotoksičnih metabolita koji uzrokuju oksidativno cijepanje DNA molekule i oštećenja u stanicama. Primjer takvih spojeva su porfirin-*N*-oksidi, konkretno *mezo*-piridil porfirini koji bivaju *N*-oksidirani na piridilnim skupinama na *meso* pozicijama i pritom nastaju oksido-piridil porfirini. Također, porfirini mogu biti konjugirani i spojevima poput tirapazamina koji će zatim djelovati također preko *N*-oksidne skupine<sup>41,42</sup>.



## 2. CILJ RADA

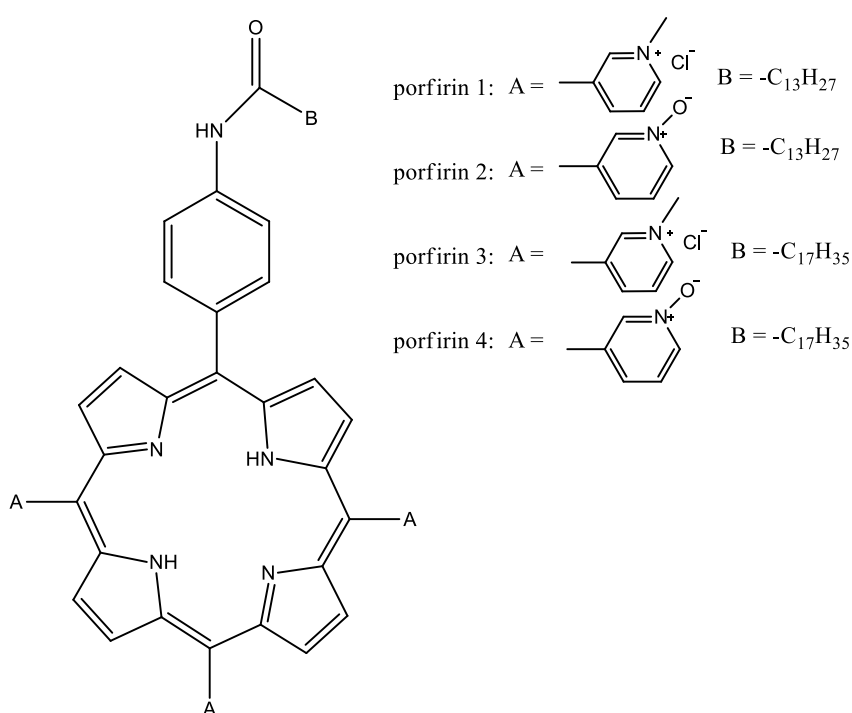
Svrha ovog istraživačkog rada je usporediti te dodatno okarakterizirati najučinkovitije spojeve iz prijašnjih istraživanja. Ispitat će se količina porfirina u stanicama mjerenjem intenziteta fluorescencije PS-a u različitim vremenskim intervalima za ukupno 4 porfirinska spoja ( 2 sa *N*-metiliranim i 2 s *N*-oksidiranim substituentima na *meso* pozicijama). Navedeni spojevi sadrže alkilne lance od 14C i 18C atoma te će se odrediti nakon kojeg perioda je njihova koncentracija u stanicama najviša te koliko se zadržavaju u stanici. Također, pokazat će se utječe li promjena u temperaturi inkubacije na ulazak PS-a u stanice. Provođenjem fluorescentne mikroskopije cilj je utvrditi subcelularnu lokalizaciju PS-a, ali i potvrditi rezultate mjerenja intenziteta. Naposljetku, cilj je ispitati citotoksični učinak porfirina na stanice melanoma (MEWO) u normalnim i hipoksičnim uvjetima u trenutku najveće koncentracije spoja u stanici.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Porfirini korišteni u eksperimentima

U provedenim biološkim eksperimentima korišteni su porfirini sintetizirani u Laboratoriju za medicinsku kemiju i kemiju čvrstog stanja pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Nele Malatesti i asistentice Martine Mušković.

##### 3.1.1. Strukture i svojstva korištenih porfirina



**Slika 11. Strukture korištenih porfirina.**

U eksperimentu su korištena 4 spoja gdje kratice sa slovom **M** označavaju *N*-metilirane, a sa slovom **O** *N*-oksidirane spojeve:

PORFIRIN 1: 5-(4-tetradekanamidofenil)-10,15,20-tris(*N*-metilpiridin-3-il) porfirin triklorid – kratica pod kojom je kasnije oslovljavan spoj je **14C-M**.

PORFIRIN 2: 5-(4-tetradekanamidofenil)-10,15,20-tris(1-oksidopiridin-3-il)porfirin - (**14C-O**).

PORFIRIN 3: 5-(4-oktadekanamidofenil)-10,15,20-tris(*N*-metilpiridin-3-il)porfirin triklorid - (**18C-M**).

PORFIRIN 4: 5-(4-oktadekanamidofenil)-10,15,20-tris(1-oksidopirdin-3-il)porfirin - (**18C-O**).

### **3.2. Stanične linije korištene u eksperimentima**

Humane stanične linije korištene u eksperimentu su stanice kožnih fibroblasta (HDF) i stanice melanoma (MEWO). Stanice su uzgajane u sterilnim uvjetima, a za njihov rast je pripremljen DMEM medij (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM*) kompletiran s 10 % fetalnog goveđeg seruma (FBS) (engl. *Fetal Bovine Serum, PAN BIOTECH, Njemačka*), 1 % L-glutamina i 1 % antibiotika (Penicilin-Streptomycin) (engl. *Pencilin-Streptamicin, PAN BIOTECH, Njemačka*). Uzgajane su pri 37 °C i 5 % CO<sub>2</sub> te su presađivane pri konfluentnosti od 90 %.

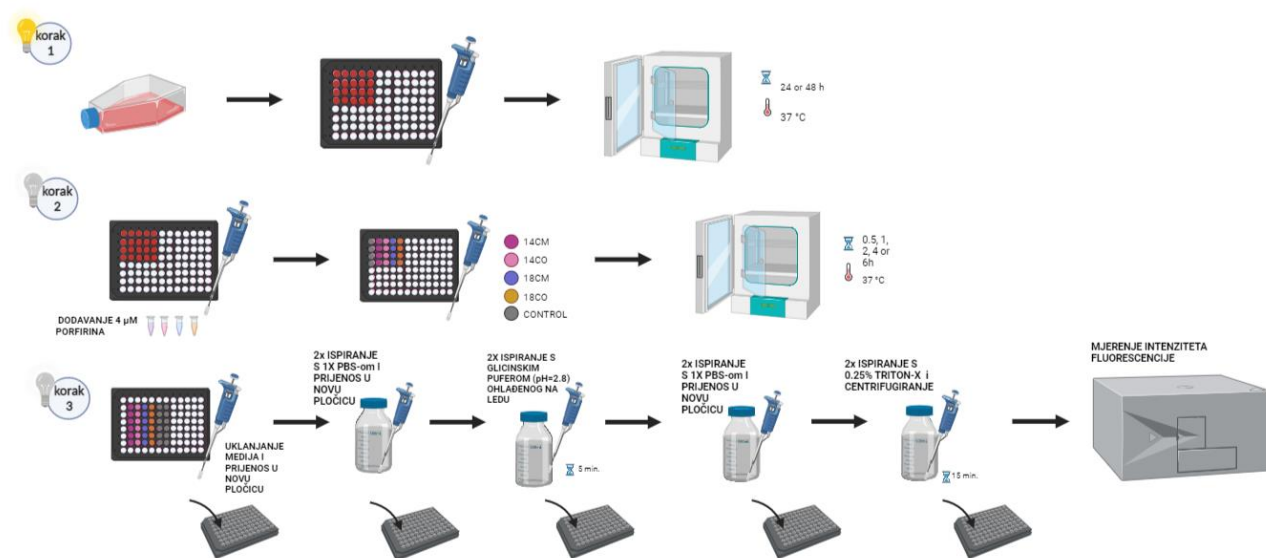
### **3.3. Mjerenje intenziteta fluorescencije porfirina – Cell Uptake**

Za potrebe eksperimenta najprije su određene kalibracijske krivulje za svaki spoj i korištena otapala DMEM, 1x PBS (engl. *phosphate buffered saline, PBS*), 50 mM glicinski pufer u 0.1 M NaCl i 0.25 % Triton X-100 u 1X PBS-u.

#### **METODA 1:**

Za utvrđivanje koncentracije porfirina u stanicama u različitim vremenskim točkama, proveden je protokol pripreme stanica za mjerenje intenziteta fluorescencije. Vremenske točke u kojima je mjeren intenzitet su 0.5, 1, 2, 4 i 6 h. Korištene su pločice s 96 jažica gdje je u 5 stupaca u četveroplikatu nasadeno 5000 stanica/jažici. Nakon 24 h inkubacije pri 4 ili 37 °C u prvi je stupac (kontrola) dodan medij, a u preostale su stupce dodani porfirini u četveroplikatu po 50 µL u konačnoj koncentraciji od 1 µM. Nakon inkubacije u željenim vremenskim intervalima, pločice su pripremljene za daljnju obradu.

Za mjerenje fluorescencije bilo je nužno koristiti crne pločice sa crnim dnom pa je u njih prebacivan sadržaj početne pločice sa stanicama. Najprije je iz svih jažica uklonjen medij, a zatim su 2x isprane s 1x PBS-om kako bi se uklonilo sve što se nije vezalo na stanice. Stanice su zatim 2x isprane s 50 mM glicinskim puferom u 0.1 M NaCl (pH=2.8) ohlađenim na ledu i pritom su postavljene na 5 minuta na led pri čemu je pufer uklonio sve što je bilo vezano na membrani. Uslijedilo je ispiranje 2x s 1x PBS-om i u posljednjem koraku, stanice su 2x isprane s 0.25 % Tritonom X-100 u 1x PBS-u pri čemu su vorteksirane na termobloku (800 rpm, 25 °C, Eppendorf, Njemačka) na 15 minuta. Triton X-100 permeabilizira staničnu membranu i pritom porfirin može izaći iz stanice i njegov intenzitet biti izmjeren. Intenzitet fluorescencije mjeren je pomoću čitača za mikrotitarske pločice (SUNRISE, Tecan, Švicarska) gdje je valna duljina ekscitacije iznosila 420 nm, a valna duljina emisije 645 nm. Rezultati su analizirani u programu MS Excel, a statistička je obrada izvršena u GraphPad Prism 9 programu (*student t-test, Mann-Whitney test, ANOVA one-way*).



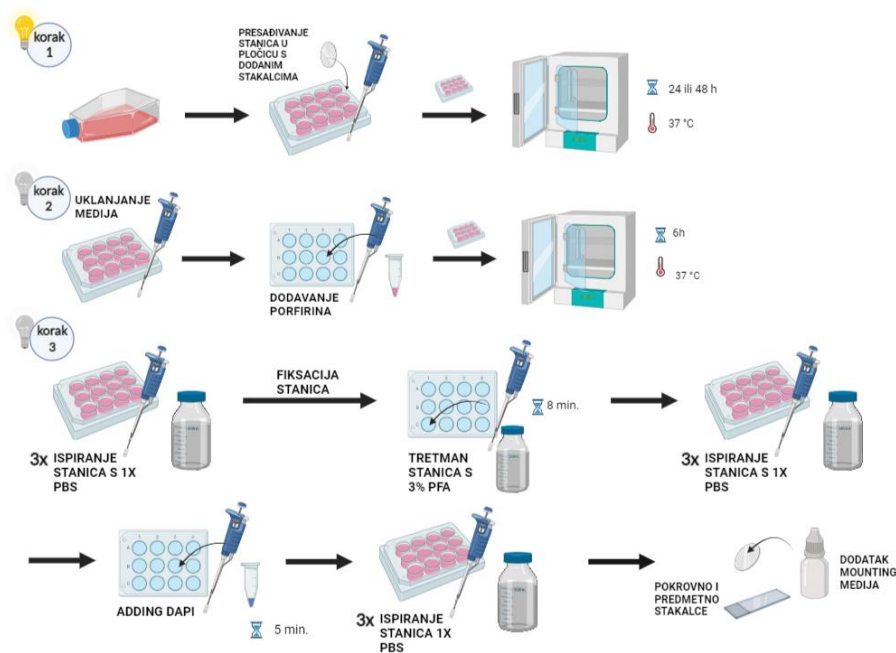
**Slika 12. Shema protokola pripreme stanica za mjerenje fluorescencije porfirina, izrađeno pomoću BioRender.com.**

## METODA 2:

Opisani protokol rezultat je prethodno optimiziranog protokola gdje je uz spomenuta otapala korišten i tripsin kako bi se prije ispiranja s 0.25 %-tnim Tritonom X stanice odignule od površine. U jažice s tripsinom dodan je DMEM i sav je sadržaj jažica prebačen u Eppendorf tubice koje su zatim centrifugirane na 5 minuta, iz njih je potom izbačen DMEM i dodan 1x PBS. Stanice su resuspendirane u 1x PBS-u i ponovno centrifugirane na 5 minuta. 1x PBS je izbačen i u epice je dodan 0.25 % Triton X-100 i stanice su inkubirane na 10 minuta i naposljetku, prebačene u crnu pločicu.

### **3.5. Subcelularna lokalizacija porfirina fluorescencijskom mikroskopijom**

U svrhu ispitivanja ulaska i lokalizacije PS-a u stanicama i potvrde rezultata *cell uptake* eksperimenta provedena je fluorescentna mikroskopija. Korištene su pločice s 12 jažica gdje je u 5 jažica postavljeno pokrovno stakalce, a zatim u njih nasađeno HDF ili MEWO stanica u koncentraciji 50 000 stanica/jažici u volumenu od 1 mL. Stanice su inkubirane na 24 h pri 37 °C nakon čega im je promijenjen medij, a potom su u pripadajuće jažice dodani porfirini s DMEM-om u koncentraciji od 1  $\mu$ M i 5  $\mu$ M u volumenu od 1 mL. Nakon inkubacije od 6 h stanice su isprane 3x s 1x PBS-om, a zatim tretirane 8 minuta s 4 % otopinom paraformaldehida (PFA) kako bi se fiksirale. Nakon fiksacije, tretirane su s 500  $\mu$ L 2 mg/ml DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) na 5 minuta i ponovno isprane 1x PBS-om tri puta. Stakalce je zatim prenesno na stakalce za mikroskopiranje pomoću medija za učvršćivanje stanica (engl. *mounting medium*, PAN™ Biotech, Njemačka). Pripremljeni uzorci su analizirani pomoću invertnog fluorescentnog mikroskopa Olympus IX83 (Olympus, Japan), a slike su obrađene pomoću ImageJ software-a.



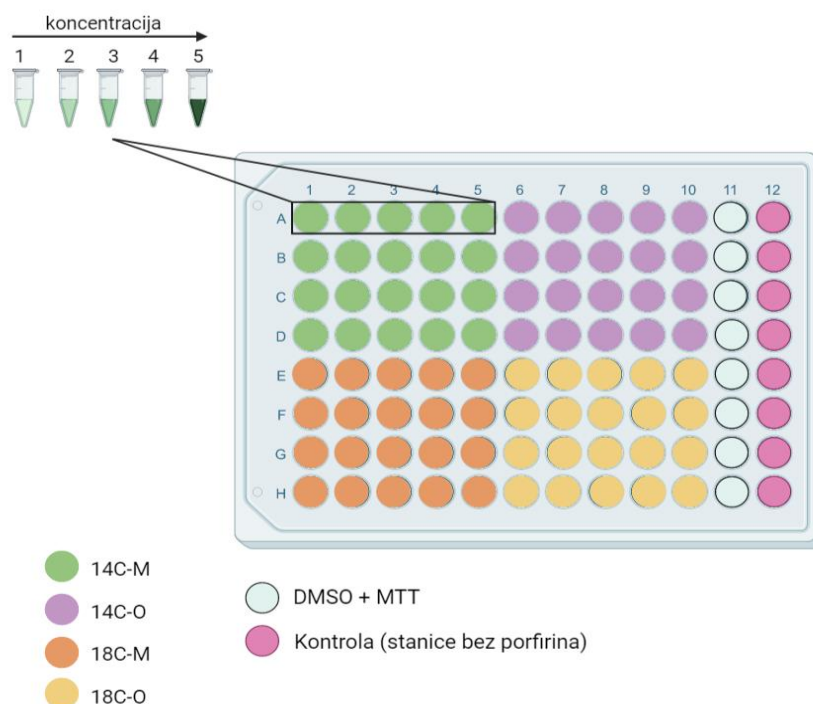
**Slika 13. Shema protokola pripreme stanica za fluorescentnu mikroskopiju, izrađeno pomoću BioRender.com.**

### 3.6. MTT test

MTT test proveden je u svrhu analize citotoksičnosti porfirina na zdrave stanice fibroblasta (HFF) i stanice melanoma (MEWO). Prilikom provođenja eksperimenta korištena je mračna komora kako bi se osigurali tamni uvjeti s obzirom da su porfirini fotosenzibilni spojevi. Prvog dana eksperimenta stanice su nasađene u pločice s 96 jažica u koncentraciji 5000 stanica/jažici u volumenu od 150  $\mu\text{L}$ . 2 su pločice one koje će kasnije biti osvjetljavane (označene engl. *LIGHT*), dok su dvije pločice kontrola kojima se ispituje potencijalnu toksičnost u mraku (označene engl. *DARK*) te nisu osvjetljavane.

Idućeg su dana pripremljena razrjeđenja porfirina otopljenih u DMEM mediju gdje su željene koncentracije bile 0.1, 0.5, 1, 5 i 10  $\mu\text{M}$ , no za nakapavanje u pločice su pripremljene 4x veće koncentracije, dakle 0.4, 2, 4, 20 i 40  $\mu\text{M}$ . Pripremljena razrjeđenja nakapana su od najmanje prema najvećoj koncentraciji u četveroplikatu za svaki spoj gdje je dodani volumen po jažici iznosio 50  $\mu\text{L}$ .

Osim ispitivanja citotoksičnosti na svjetlu i u mraku, ispitivana je i citotoksičnost u uvjetima hipoksije pa je tako u 1 *LIGHT* i 1 *DARK* pločici od svake stanične linije prije tretiranja porfirinima promijenjen medij te je dodan novi DMEM s dodatkom 0.1 M otopine kobaltovog klorida ( $\text{CoCl}_2$ , SIGMA-Aldrich, Missouri, SAD) koji se koristi kao spoj za postizanje uvjeta hipoksije<sup>43</sup>.



**Slika 14. Prikaz pločice korištene u MTT testu, izrađeno pomoću BioRender.com.**

Nakon inkubacije od 6 h, u svim je pločicama promijenjen medij (za pločice namijenjene ispitivanju hipoksije ponovno je korišten medij s  $\text{CoCl}_2$ ). *LIGHT* pločice zatim su osvjetljavane pomoću LED lampe ( $\lambda=645$  nm, Laboratorij za fotoniku i kvantnu optiku, Institut Ruđer Bošković, Zagreb) na 30 minuta i pločice su zatim vraćene u inkubator do idućeg dana.



**Slika 15. LED lampa korištena u eksperimentu.**

Idućeg je dana iz pločica najprije uklonjen medij ne koristeći pipetu, već je izbačen iz pločice jakim zaokretom ruke, a zatim je u svaku jažicu dodano 40  $\mu\text{L}$  MTT-a [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijevog bromid]. MTT je pripremljen iz početne otopine koncentracije 5 mg/ml te je za potrebe jedne pločice pripremljeno 445  $\mu\text{L}$  MTT-a i 4 mL DMEM medija. Pločice su omotane aluminijskom folijom i vraćene na inkubaciju na 3 h. Nakon 3 h u pločice je dodano 160  $\mu\text{L}$  DMSO-a, omotane su folijom i zatim je pomoću čitača za mikrotitarske pločice (Tecan, Njemačka) izmjerena apsorbanca sadržaja u jažicama pri  $\lambda=570$  nm. Dobiveni rezultati obrađeni su u MS Excel programu.



**Slika 16. Shema protokola MTT testa, izrađeno pomoću BioRender.com.**



## 4. REZULTATI

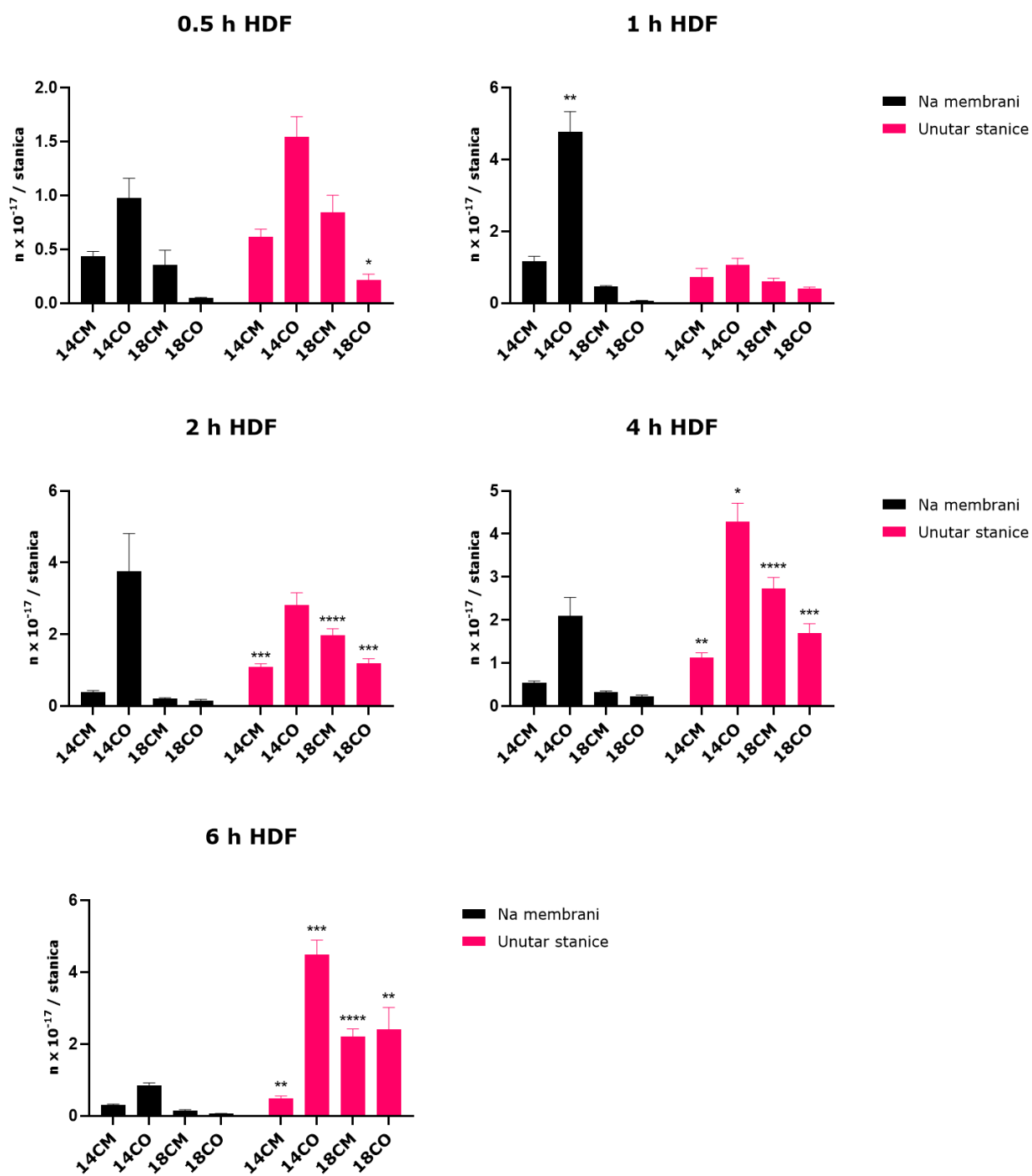
### 4.1. Cell Uptake

U svrhu određivanja koncentracije porfirina u stanici te gdje se porfirini preferencijalno nakupljaju, provedeno je mjerenje intenziteta fluorescencije porfirina u različitim vremenskim točkama – 0.5, 1, 2, 4 i 6 h za HDF i MEWO stanice. Stanice su tretirane s 4 različita porfirina od kojih je svaki nanesen u četveroplikatu. Mjerenjem intenziteta fluorescencije dobivene su vrijednosti u obliku RFU (engl. *relative fluorescence unit*) koje su podijeljene s nagibom kalibracijskih krivulja za odgovarajuće otapalo i spoj i pritom je dobivena vrijednost koncentracije spoja po jažici. Zatim, umnoškom koncentracije i volumena spoja dobivena je množina spoja po jažici i naposljetku, ta je vrijednost pomnožena s brojem nasađenih stanica po jažici te je dobivena množina spoja po stanici (n/cell [mol]).

#### 4.1.1. Usporedba množine na membrani i unutar stanice

##### HDF STANICE

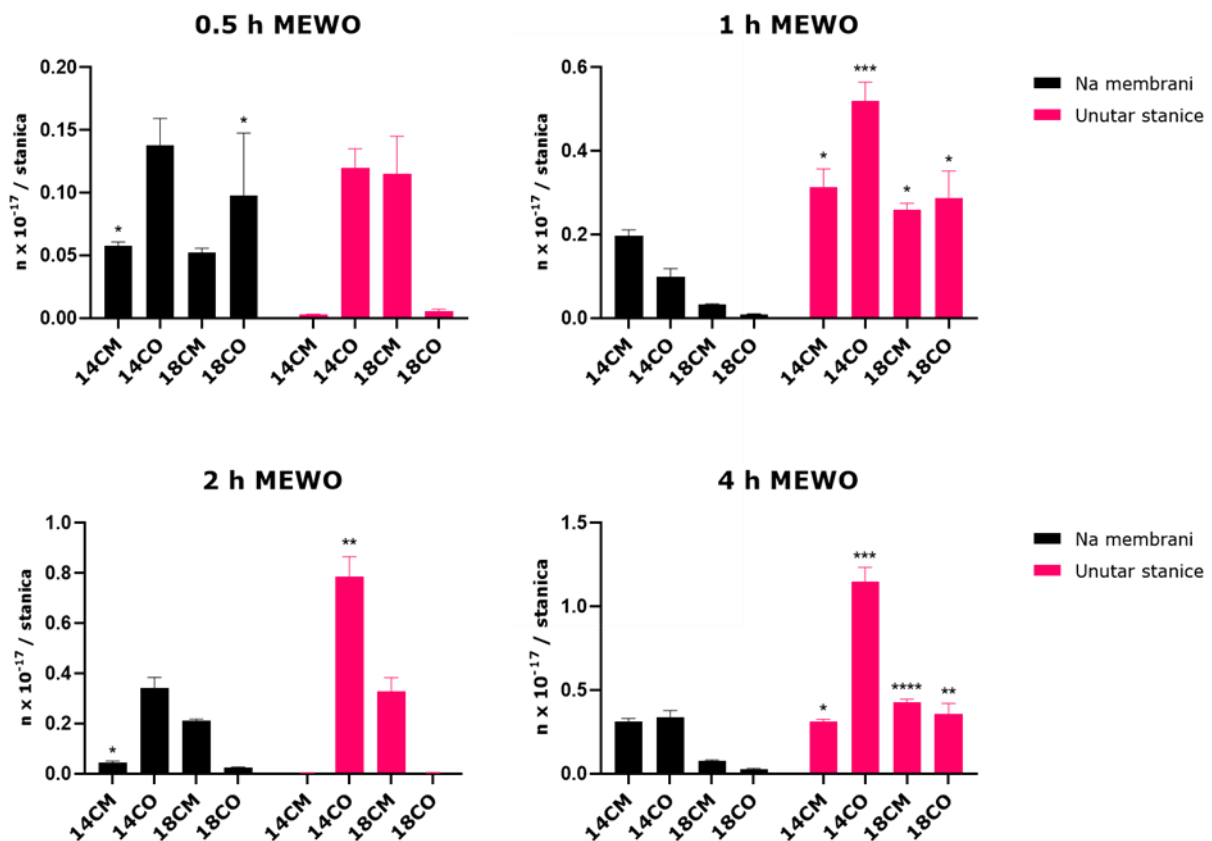
Najprije je uspoređena množina porfirina na membrani i unutar stanice u svim vremenskim točkama. U prvoj vremenskoj točki – 0.5 h porfirin **18CO** veće je množine unutar stanice nego na membrani (\* p<0.05) (Slika 17). Nakon 1h, množina **14CO** veća je na membrani u odnosu na unutrašnjost stanice (\*\* p<0.01) (Slika 17). Nakon 2h, **14CO** se ponovno akumulira u većoj količini na membrani, no bez statističke značajnosti. S druge strane, spojevi **18 CM** (\*\*\*\* p<0.0001), **14CM** (\*\*\*) p<0.001) i **18CO** (\*\*\*) p<0.001) veće su količine unutar stanice nego na membrani (Slika 17). Nakon 4 h, sva se četiri porfirina nalaze u većoj količini u stanici – **18CM** (\*\*\*\* p<0.0001), **18CO** (\*\*\*) p<0.001), **14CM** (\*\* p<0.01) i **14CO** (\* p<0.05) (Slika 17). Naposljetku, nakon 6 h svi su porfirini ponovno u većoj količini unutar stanice – **18CM** (\*\*\*\* p<0.0001), **14CO** (\*\*\*) p<0.001), **14CM** (\*\* p<0.01) i **18CO** (\*\* p<0.01) (Slika 17).

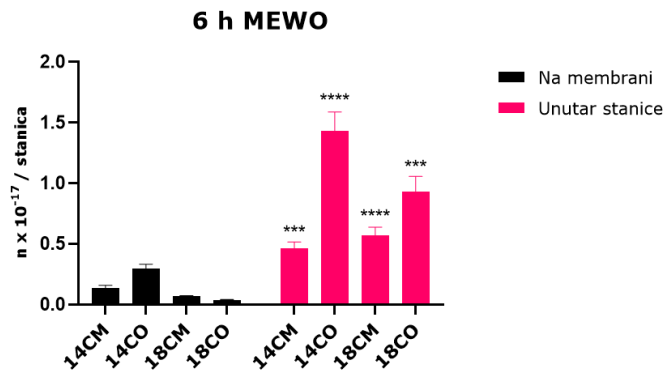


**Slika 17. Prikaz količine spojeva u različitim vremenskim točkama za stanice fibroblasta.**

## MEWO STANICE

Nakon 30 min inkubacije pri 37 °C kod porfirina **14CM** (\* p<0.05) i **18CO** (\* p<0.05) veće su množine na membrani nego unutar stanice (Slika 18). Nakon 1 h, množina sva 4 porfirina veća je u unutrašnjosti stanice – **14CO** (\*\*\*) p<0.001), **14CM** (\* p<0.05), **18CM** (\* p<0.05) i **18CO** (\* p<0.05) (Slika 18). Nakon 2 h, na membrani je veća množina **14CM** (\* p<0.05), a unutar stanice **14CO** (\*\* p<0.01) (Slika 18). No, nakon 4 h ponovno je množina sva 4 porfirina veća u unutrašnjosti stanice – **18CM** (\*\*\*\* p<0.0001), **14CO** (\*\*\*) p<0.001), **18CO** (\*\* p<0.01) i **14CM** (\* p<0.05) (Slika 18). Nakon 6 h nastavlja se trend veće množine u unutrašnjosti stanice u odnosu na membranu za sve spojeve – **14CO** (\*\*\*\* p<0.0001), **18CM** (\*\*\*\* p<0.0001), **14CM** (\*\*\*) p<0.001) i **18CO** (\*\*\*) p<0.001) (Slika 18). Slično kao i kod HDF stanica, s vremenom spojevi sve više ulaze u stanice što je najbolje vidljivo na grafovima za vremenske točke 4 i 6 h.





**Slika 18. Prikaz količine spojeva u različitim vremenskim točkama za stanice melanoma.**

#### **4.1.2. Usporedba množine spojeva unutar stanice**

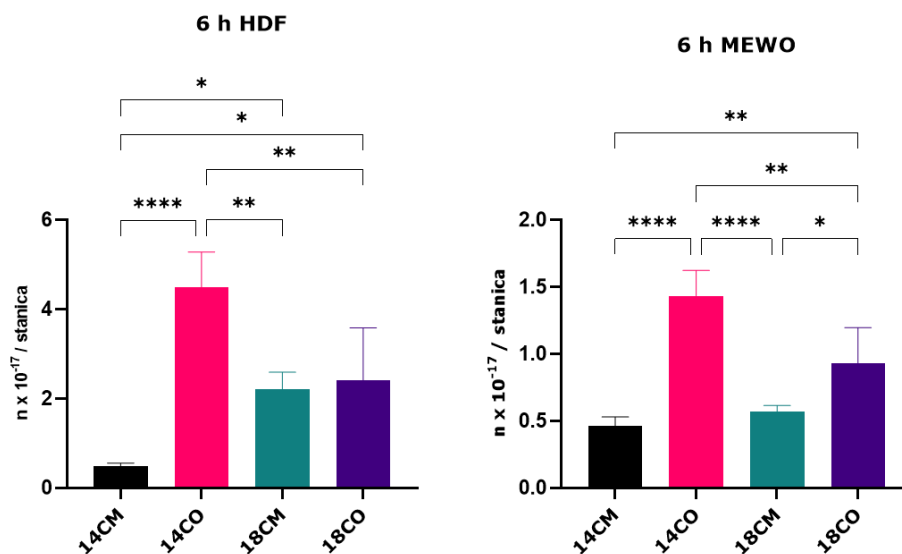
Uz usporedbu množine na membrani i unutar stanice, uspoređene su i množine 4 spoja unutar stanice. Osim prethodno navedenih vremenskih točki, ulazak porfirina također je ispitan i nakon 24 h gdje je pokazano kako se množina za sve spojeve smanjuje i/ili ostaje ista do 24 satne inkubacije, stoga je količina spoja unutar stanica određena kod 6-satne inkubacije.

#### **HDF STANICE**

Unutar stanica fibroblasta najveću množinu pokazao je spoj **14CO** čija je množina značajno veća od **14CM** (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ), **18CO** (\*\*  $p < 0.01$ ) i **18CM** (\*\*  $p < 0.01$ ). Porfirin **18CM** i **18CO** veće su množine od **14CM** (\*  $p < 0.05$ ) (Slika 19 - lijevo).

#### **MEWO STANICE**

Unutar stanica melanoma najveću je množinu pokazao spoj **14CO** čija je množina značajno veća od **14CM** (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ), **18CM** (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ) i **18CO** (\*\*  $p < 0.01$ ). Porfirin **18CO** veće je množine od **14CM** (\*\*  $p < 0.01$ ) i **18CM** (\*  $p < 0.05$ ) (Slika 19 - desno).

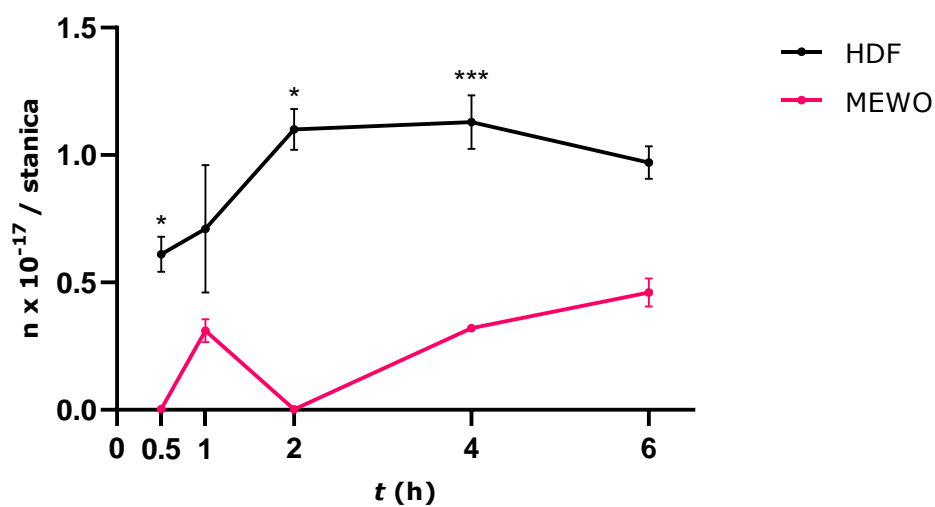


**Slika 19. Prikaz usporedbe množina 4 spoja unutar stanica nakon 6 h, lijevo – HDF, desno – MEWO.**

#### 4.1.3. Usporedba po spoju – HDF i MEWO

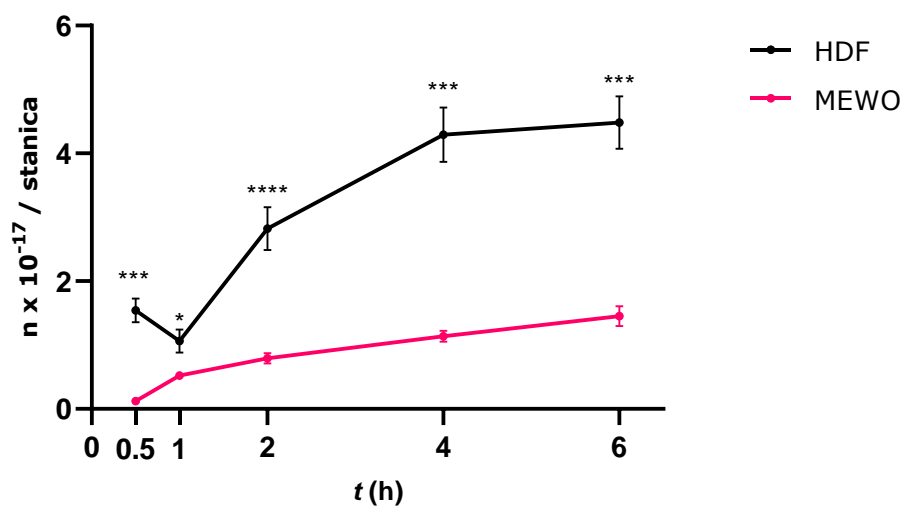
Usporedbom HDF i MEWO stanica u svim vremenskim točkama prema množini porfirina 14CM pokazano je kako je množina **14CM** veća u HDF stanicama u vremenskim točkama 0.5 h (\* p<0.05), 2 h (\* p<0.05) i 4 h (\*\*\*) p<0.001) (Slika 20). Množina **18CO** značajno je veća u HDF stanicama u odnosu na MEWO u svim vremenskim točkama – 0.5 h (\*\*\*) p<0.001), 1 h (\* p<0.05), 2 h (\*\*\*\* p<0.0001), 4 h (\*\*\*) p<0.001) i 6 h (\*\*\*) p<0.01) (Slika 21). Nadalje, množina **18CM** također je veća u HDF stanicama u odnosu na MEWO u svim točkama – 0.5 h (\*\* p<0.01), 1 h (\*\* p<0.01), 2 h (\*\*\*\* p<0.0001), 4 h (\*\*\*\* p<0.0001) i 6 h (\*\*\*) p<0.001) (Slika 22). Naposljetku, množina **18CO** veća je u HDF stanicama u odnosu na MEWO u vremenskim točkama – 0.5 h (\*\* p<0.01), 2 h (\*\*\*\* p<0.0001) i 4 h (\*\*\*) p<0.001) (Slika 23). Može se zamijetiti kako su množine sva 4 spoja većih vrijednosti u slučaju HDF stanica.

## 14CM



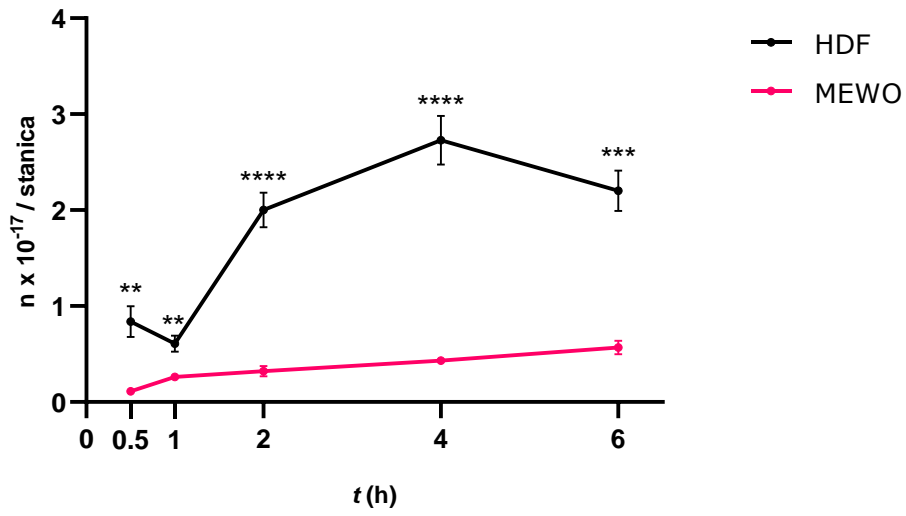
Slika 20. Usporedba množine 14CM u HDF i MEWO stanicama.

## 14CO



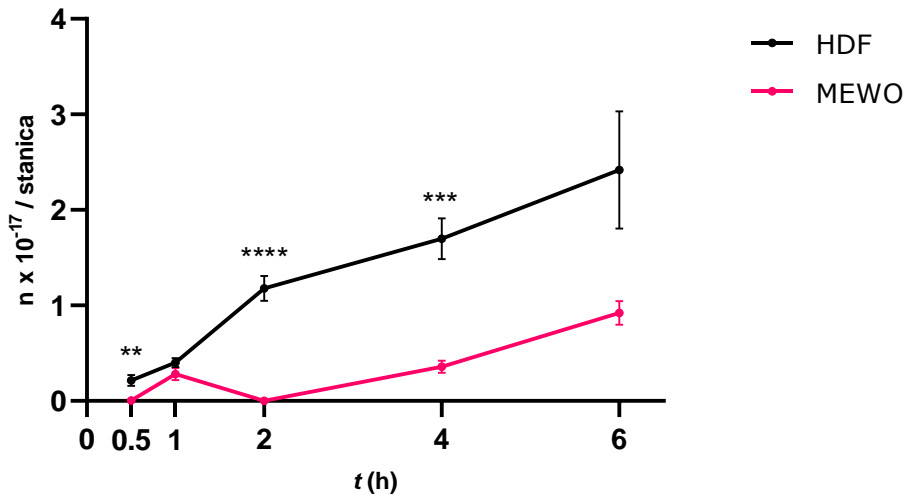
Slika 21. Usporedba množine 14CO u HDF i MEWO stanicama.

## 18CM



Slika 22. Usporedba množine 18CM u HDF i MEWO stanicama.

## 18CO

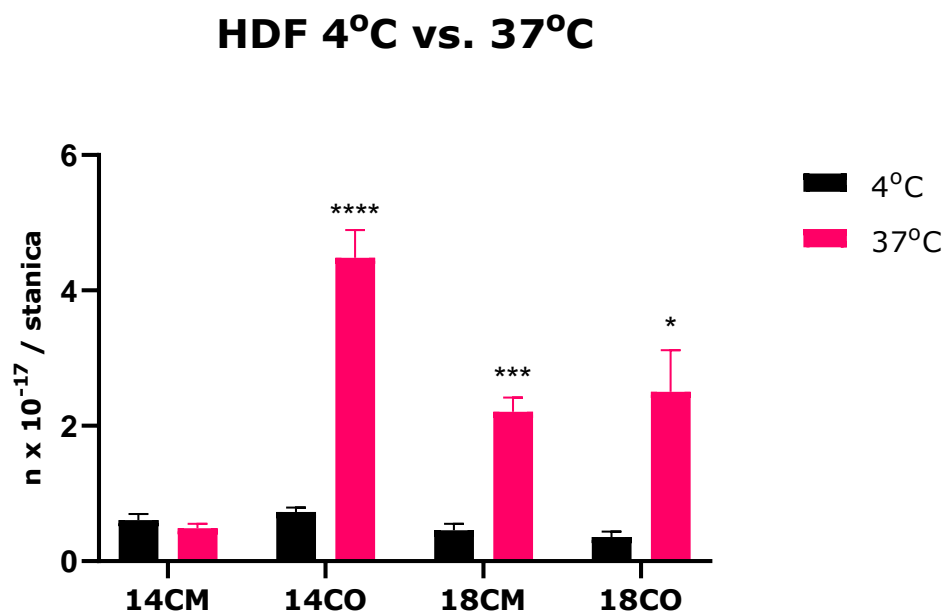


Slika 23. Usporedba množine 18CO u HDF i MEWO stanicama.

#### 4.1.4. Usporedba množine pri različitim temperaturama inkubacije

Stanice su osim na 37 °C inkubirane i na 4 °C kako bi vidjeli hoće li promjena u temperaturi inkubacije utjecati na ulazak porfirina u stanice i pritom ukazati na oblik transporta kojim ulaze u stanice, aktivni koji zahtjeva energiju za prijenos molekula (povišena temperatura inkubacije) ili pasivni gdje energija u obliku topline nije nužna za transport.

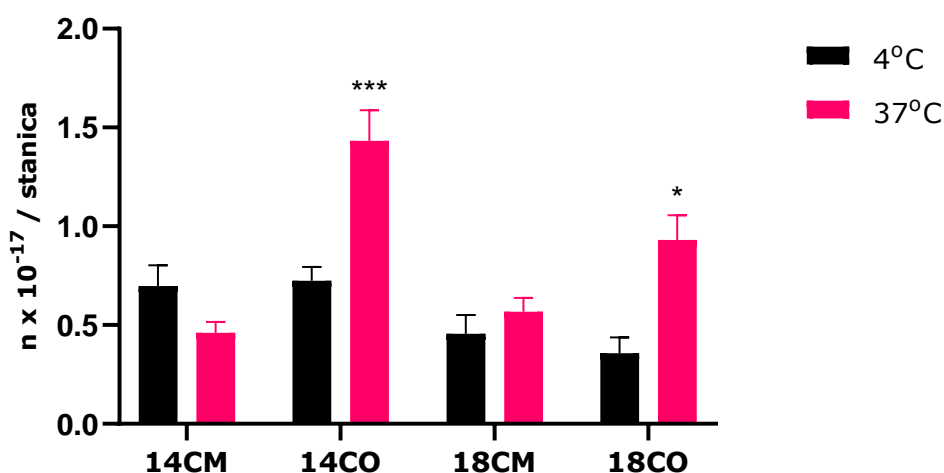
U fibroblastima inkubiranim na 4 °C množina porfirina pokazala se manjom nego u onima inkubiranim na 37 °C. Konkretno, množina **14CO** (\*\*\*)  $p < 0.001$ ), **18CM** (\*\*  $p < 0.01$ ) i **18CO** (\*  $p < 0.05$ ) značajno je veća u fibroblastima inkubiranim na višoj temperaturi (Slika 24). Slično, u stanicama melanoma razine spojeva su također više na 37 °C, no značajno više množine su množine spojeva **14CO** (\*\*\*)  $p < 0.05$ ) i **18CO** (\*  $p < 0.05$ ) (Slika 25).



**Slika 24. Usporedba množine porfirina u fibroblastima inkubiranim pri različitim temperaturama i 6 h inkubacije.**



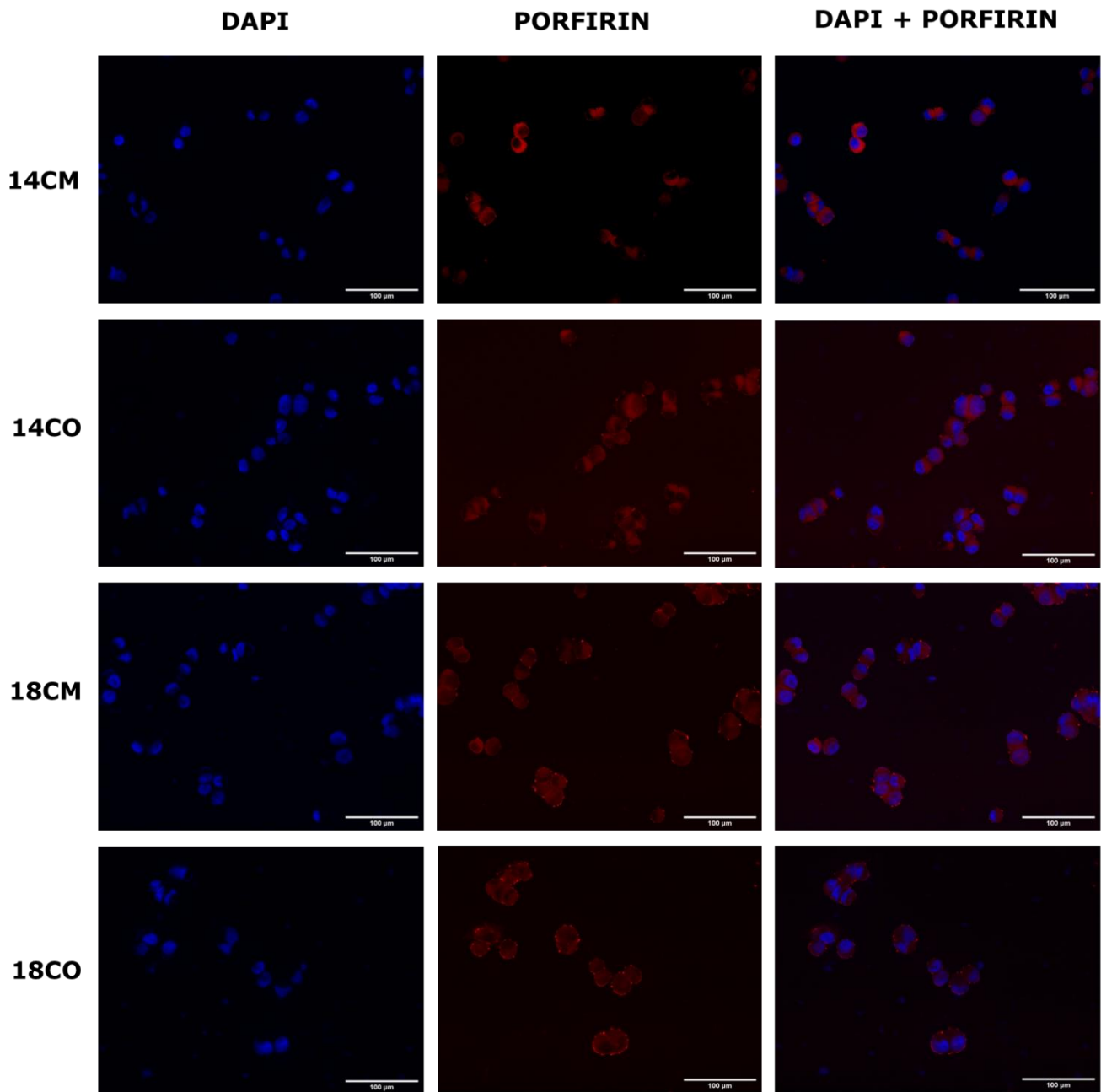
## MEWO 4°C vs. 37°C



**Slika 25. Usporedba množine porfirina u stanicama melanoma (MeWo) inkubiranim na različitim temperaturama i 6 h inkubacije.**

## 2. Fluorescentna mikroskopija

Fluorescentna mikroskopija provedena je u svrhu određivanja lokalizacije porfirina u stanicama fibroblasta i melanoma. Stanice su tretirane porfirinima u koncentracijama od 1 i 5  $\mu\text{M}$ , a za bojanje jezgre korišten je DAPI. Stanice su proučavane pri povećanju 20x, a dobivene slike obrađene su u *ImageJ* software-u. Za svaki je spoj prikazan plavi kanal gdje se može vidjeti jezgre obojane bojom DAPI, crveni kanal gdje su vidljivi porfirini i posljednja gdje su spojeni plavi i crveni kanal. Na Slici 26. prikazane su MEWO stanice tretirane porfirinima u koncentraciji 5  $\mu\text{M}$ . Za sva se četiri spoja može zamijetiti kako porfirin ulazi u stanicu te se lokalizira u citoplazmi i oko jezgre, no ističe se spoj **18CO** kod kojeg nije toliko jasna granica između jezgre i citoplazme pa bi se moglo pretpostaviti da ovaj porfirin u određenoj mjeri ulazi u jezgru. Također, kod spojeva **14CM, 14CO i 18CM** može se zamijetiti stvaranje agregata na membrani stanica.



***Slika 26. Stanice MEWO pri povećanju od 20x.***

### 3. MTT kolorimetrijski test vijabilnosti stanica

MTT kolorimetrijski test proveden je u svrhu ispitivanja citotoksičnog učinka porfirina **14CM**, **14CO**, **18CM** i **18CO** na stanice melanoma (MEWO) i zdrave fibroblaste (HDF). Stanice su tretirane spojevima u 5 različitim koncentracija – 0.1, 0.5, 1, 5 i 10  $\mu\text{M}$  nanesenih u četveroplikatu. Ispitivana je fototoksičnost spojeva u mraku te citotoksičnost prilikom 30-minutnog osvjetljavanja crvenom svjetlošću ( $\lambda = 645 \text{ nm}$ ). Također, ispitan je i citotoksični učinak spojeva u uvjetima normoksije i hipoksije.

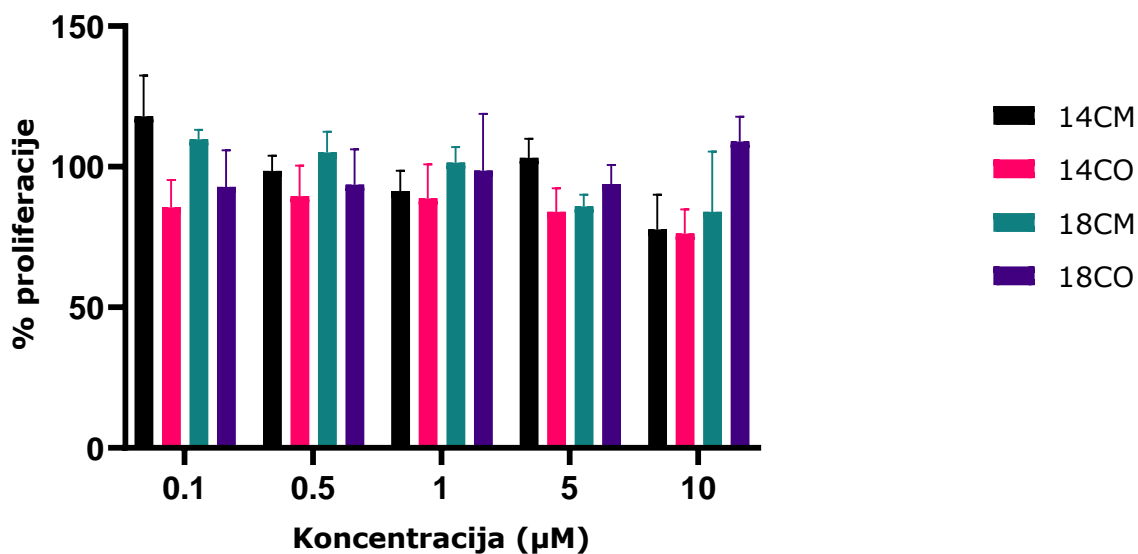
Testom se određuje metabolička aktivnost mitohondrija, a provodi se korištenjem topljive žute tetrazolijeve soli (MTT) koja biva reducirana od strane mitohondrijskih dehidrogenaza i pritom nastaje netopljivi spoj plavog obojenja – formazan. Tretirane pločice analizirane su pomoću uređaja za čitanje mikrotitarskih pločica pri čemu je mjerena apsorpcija stanica tretiranih porfirinima pri 570 nm. Rezultati su analizirani u programu Excel, a statistička je analiza provedena u programu GraphPad Prism (*student t-test, Mann-Whitney test, ANOVA one-way test*).

#### 3.1. Stanice melanoma – MEWO

##### 3.1.1. MEWO neosvijetljene pločice (DARK)

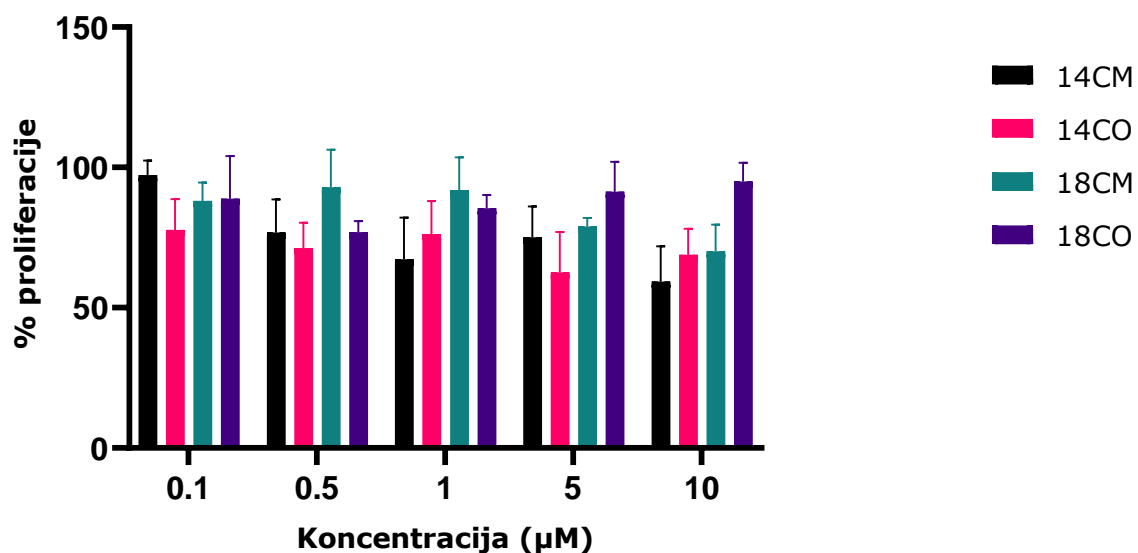
Kako bi uvidjeli da korišteni spojevi nisu toksični u mraku, stanice su inkubirane u mračnim uvjetima. Toksičnost je ispitana na pločicama sa stanicama u uvjetima normoksije i hipoksije. Na pločici sa stanicama inkubiranim u uvjetima normoksije postotak proliferacije je visok te se održava za sve spojeve između 80 % i 110 %. Nešto niže vrijednosti mogu se zamijetiti pri najvišoj koncentraciji spojeva gdje su **14CM** i **14CO** uzrokovali pad proliferacije ispod 80 % (Slika 27). U uvjetima hipoksije rezultati su nešto niži, pri koncentracijama 0.1, 0.5 i 1  $\mu\text{M}$  postotak proliferacije iznosi između 70-100 %, a pri višim koncentracijama između 60-100 %, a posebice se ističe **14CM** koji pri najvišoj koncentraciji inhibira stanični rast za 40 % (Slika 28).

### MEWO Dark - normoksija



**Slika 27. Stupčasti prikaz inhibicije proliferacije stanica MEWO u mraku u uvjetima normoksije.**

### MEWO Dark - hipoksija



**Slika 28. Stupčasti prikaz inhibicije proliferacije stanica MEWO u mraku u uvjetima hipoksije.**

Također, za svaki je od prikazanih spojeva je izračunata polovna maksimalna inhibitorna koncentracija (IC<sub>50</sub>) – koncentracija spoja potrebna

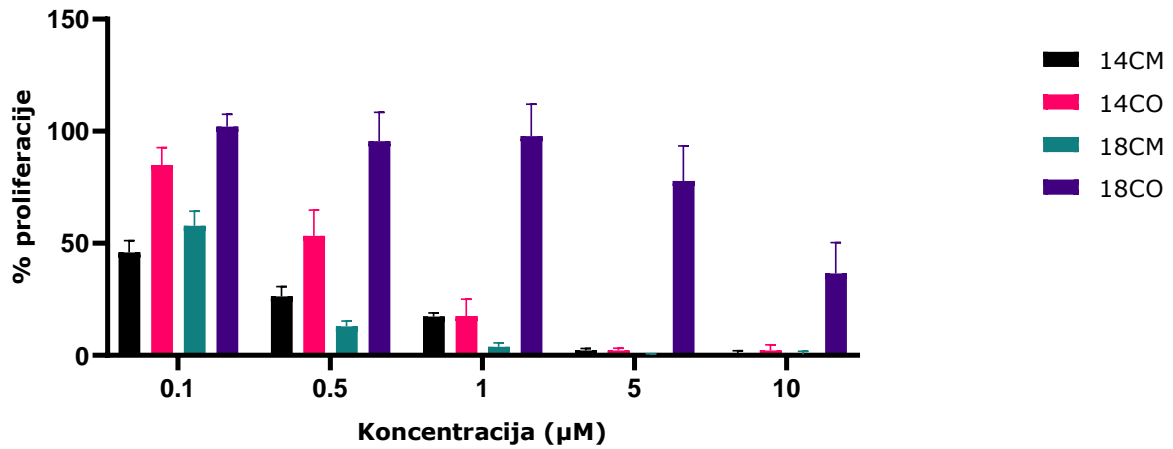
za 50%-tnu inhibiciju staničnog rasta i u slučaju normoksije i hipoksije  $IC_{50}$  nije dosegnut, odnosno  $IC_{50}$  je veći od 10  $\mu M$ .

### 3.1.2. MEWO osvjetljene pločice (LIGHT)

Kao i kod DARK pločica, ovdje je ispitivano djelovanje spojeva u uvjetima hipoksije i normoksije, no u ovom slučaju stanice su osvjetljavane na 30 minuta. U uvjetima normoksije pri najnižoj koncentraciji, spojevi se znatno razlikuju u inhibiciji proliferacije, **14CM** i **18CM** inhibiraju 40-50 % staničnog rasta, dok kod npr. **18CO** nema nikakvog utjecaja na proliferaciju. Pri koncentraciji od 1 i 5  $\mu M$  spoj **14CO** pokazuje povećanu inhibiciju u odnosu na najnižu koncentraciju i pri spomenutim koncentracijama ima najveću inhibitornu moć te skoro u potpunosti inhibira rast stanica (3-15 %). Pri koncentracijama od 5 i 10  $\mu M$  spojevi **14CM**, **14CO** i **18CM** pokazuju gotovo 100%-tnu inhibiciju rasta, a **18CO** tek pri najvišoj koncentraciji uzrokuje značajniju inhibiciju, od približno 65 % (Slika 29).  $IC_{50}$  za spoj **14CM** manja je od 0.1  $\mu M$ , za **14CO** iznosi 0.55  $\mu M$ , **18CM** 0.17  $\mu M$ , a **18CO** 8.37  $\mu M$ .

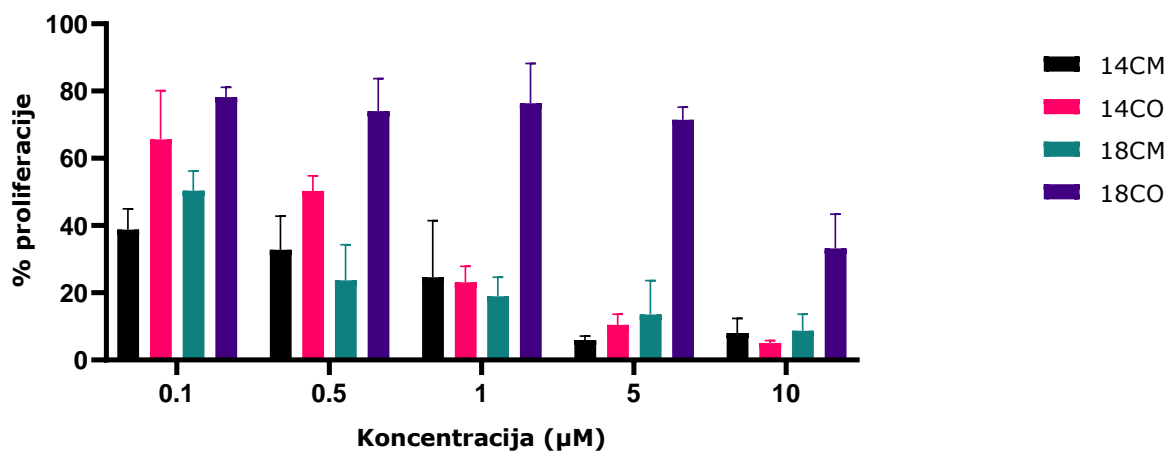
U uvjetima hipoksije, pri najnižoj koncentraciji spojevi **14CM** i **18CO** inhibiraju 50-60 % staničnog rasta, dok se postotak proliferacije za **14CO** i **18CO** kreće između 60 i 80 %. Pri koncentracijama od 0.5 i 1  $\mu M$  **14CM**, **14CO** i **18CM** inhibiraju rast u rasponu od 50-80 %, a slično kao i kod normoksije, spoj **18CO** ponovno pokazuje najmanji inhibitorni učinak (oko 20 %). Pri koncentracijama od 5 i 10  $\mu M$  spojevi **14CM**, **14CO** i **18CM** inhibiraju rast stanica u rasponu od 90-95 %, a **18CO** tek pri 10  $\mu M$  uzrokuje 70 % inhibicije rasta. (Slika 30).  $IC_{50}$  za spoj **14CM** manja je od 0.1  $\mu M$ , za **14CO** iznosi 0.50  $\mu M$ , **18CM** 0.11  $\mu M$ , a **18CO** 7.81  $\mu M$ .

### MEWO Light - normoksija



**Slika 29.** Stupčasti prikaz inhibicije proliferacije stanica MEWO na svjetlu u uvjetima normoksije.

### MEWO Light - hipoksija



**Slika 30.** Stupčasti prikaz inhibicije proliferacije stanica MEWO na svjetlu u uvjetima hipoksije.

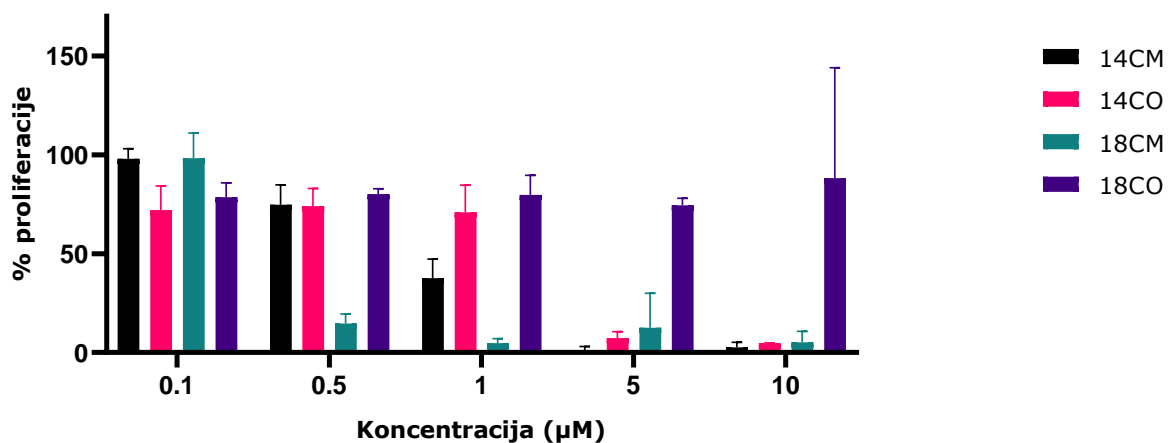
## 3.2. Stanice fibroblasta – HDF

### 3.2.1. HDF osvjetljene pločice (LIGHT)

U uvjetima normoksije, pri najnižoj koncentraciji sva četiri spoja inhibiraju rast stanica u rasponu od 20-30 %. Pri 0.5  $\mu\text{M}$  ističe se **18CO** koji inhibira rast za čak 85 %, a još snažnije djeluje pri 1  $\mu\text{M}$  gdje inhibira oko 95 % staničnog rasta. Pri koncentracijama od 5 i 10  $\mu\text{M}$  spojevi **14CM i 14CO** djeluju najsnažnije, postotak proliferacije pri 5  $\mu\text{M}$  za **14CM** iznosi tek 0.2 %. Može se zaključiti kako pri koncentracijama od 5 i 10  $\mu\text{M}$  **14CM, 14CO i 18CM** pokazuju visoko inhibitorno djelovanje, dok spoj **18CO** pri svim koncentracijama nije djelovao na rast stanica te je dostigao maksimum od 25%-tne inhibicije pri 5  $\mu\text{M}$  (Slika 31).  $\text{IC}_{50}$  za spoj **14CM** iznosi 0.83  $\mu\text{M}$ , za **14CO** iznosi 2.31  $\mu\text{M}$ , **18CM** 0.33  $\mu\text{M}$ , a za **18CO** je veća od 10  $\mu\text{M}$ .

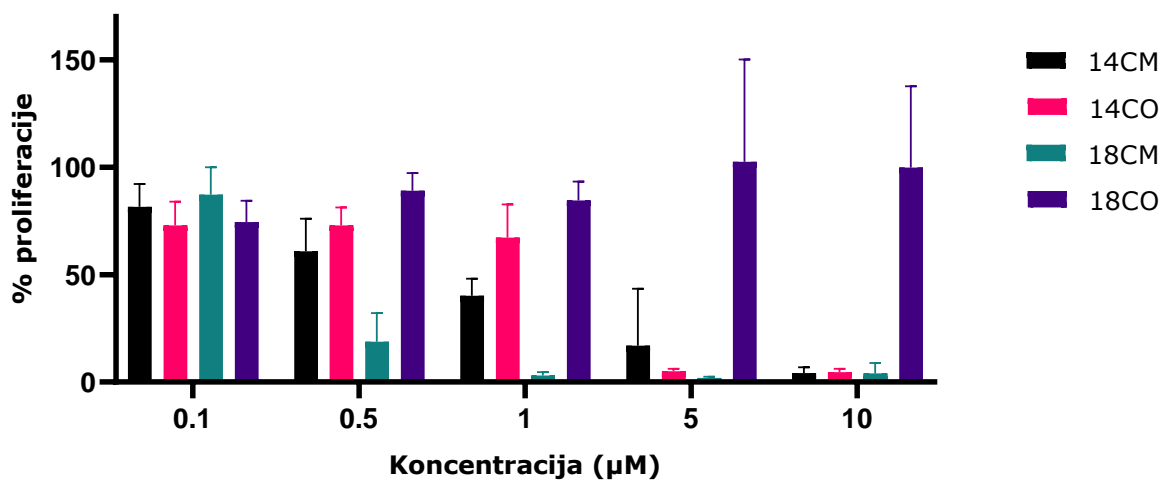
U uvjetima hipoksije, rezultati su veoma slični. Pri najnižoj koncentraciji sva četiri spoja inhibiraju rast stanica u rasponu od 13-25 %. I ovdje se ističe spoj **18CO** koji već pri 0.5  $\mu\text{M}$  inhibira blizu 80% staničnog rasta, a pri 1  $\mu\text{M}$  oko 93 % staničnog rasta. Pri koncentraciji od 1  $\mu\text{M}$  značajnije djeluje i **14CM** te inhibira oko 60% staničnog rasta. Pri koncentracijama od 5 i 10  $\mu\text{M}$  spojevi **14CM, 14CO i 18CM** djeluju najsnažnije gdje je razina inhibicije između 85-95 %, a spoj **18CO** se ponovno ponašao neobično te nije uopće djelovao na proliferaciju stanica (Slika 32).  $\text{IC}_{50}$  za spoj **14CM** iznosi 0.76  $\mu\text{M}$ , za **14CO** iznosi 2.11  $\mu\text{M}$ , **18CM** 0.32  $\mu\text{M}$ , a za **18CO** je veća od 10  $\mu\text{M}$ .

### HDF Light - normoksija



**Slika 31.** Stupčasti prikaz inhibicije proliferacije stanica HDF na svjetlu u uvjetima normoksije.

### HDF Light - hipoksija



**Slika 32.** Stupčasti prikaz inhibicije proliferacije stanica HDF na svjetlu u uvjetima hipoksije.



**Tablica 1. Prikaz vrijednosti  $IC_{50}$  izmjerenih nakon osvjetljavanja crvenom svjetlošću.**

IC <sub>50</sub> (μM) pri 645 nm				
	HDF normoksija	HDF hipoksija	MEWO normoksija	MEWO hipoksija
<b>14CM</b>	0.83	0.76	< 0.01	< 0.01
<b>14CO</b>	2.31	2.11	0.55	0.50
<b>18CM</b>	0.33	0.32	0.17	0.11
<b>18CO</b>	> 10	> 10	8.37	7.81

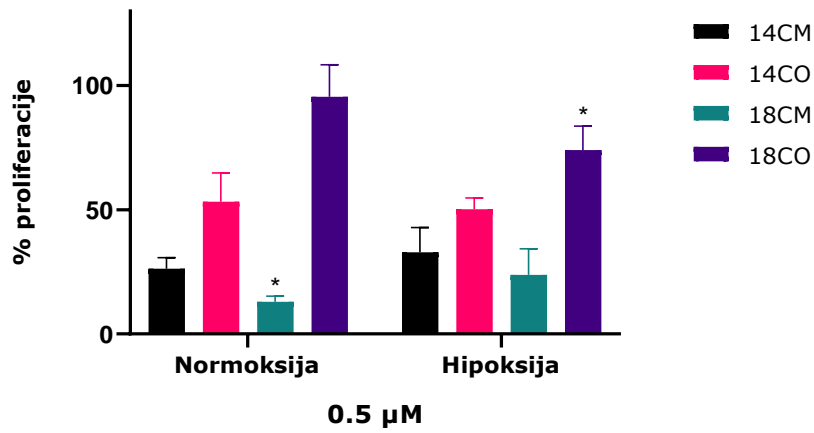
### 3.3. Usporedba proliferacije u uvjetima normoksije i hipoksije

#### 3.3.1. Stanice MEWO

U svrhu usporedbe inhibitornog djelovanja porfirina na rast stanica odlučeno je usporediti podatke dobivene za koncentracije **0.5 i 1 μM** s obzirom da je pri višim koncentracijama i u uvjetima normoksije i hipoksije stopa proliferacije veoma niska pa bi odabir nižih koncentracija mogao ukazati na razliku u djelotvornosti porfirina u različitim uvjetima.

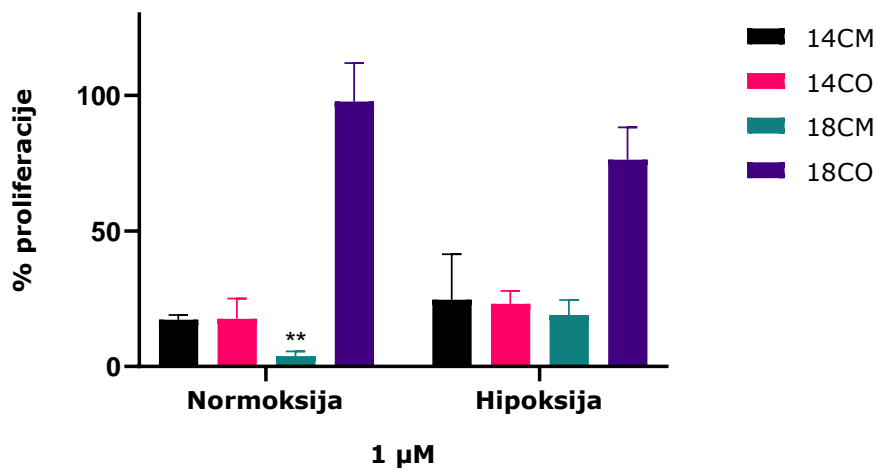
Pri koncentraciji od 0.5 μM u uvjetima normoksije i hipoksije razina inhibicije proliferacije za spojeve **14CM** i **14CO** veoma je slična, a statistički značajna razlika prisutna je kod spoja **18CM** (\* p<0.05) koji u stanju normoksije inhibira veći postotak staničnog rasta, oko 85 % dok u stanju hipoksije oko 75 %. S druge strane, spoj **18CO** (\* p<0.05) inhibira stanični rast u većem postotku u stanju hipoksije (oko 25 %) (Slika 33). Pri koncentraciji od 1 μM u uvjetima normoksije porfirin **18CM** značajno više inhibira stanični rast (oko 96 %) u odnosu na stanje hipoksije (oko 80 %) (Slika 34).

### MEWO normoksija vs. hipoksija



**Slika 33. Usporedba inhibitornog djelovanja porfirina u stanju normoksije i hipoksije pri koncentraciji 0.5  $\mu$ M na stanice melanoma.**

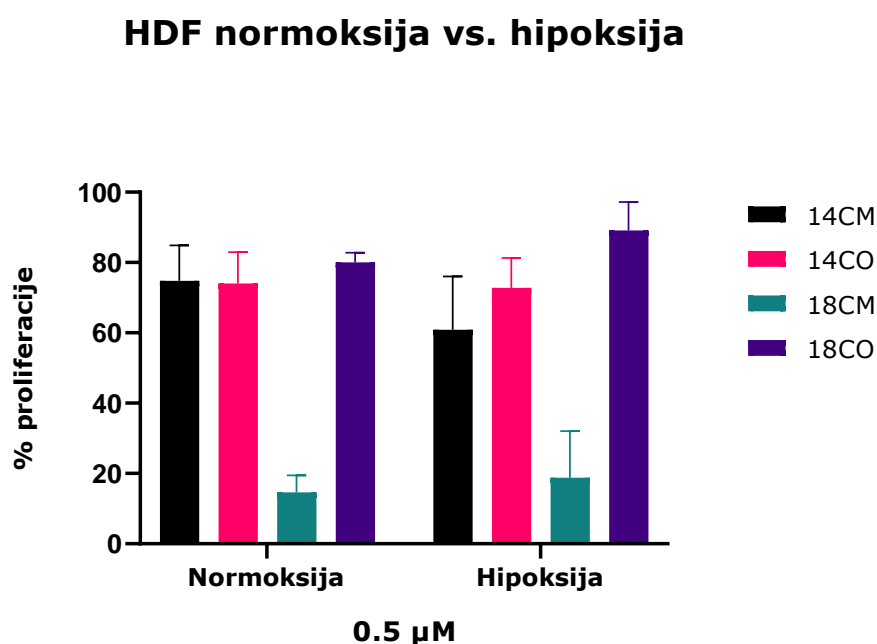
### MEWO normoksija vs. hipoksija



**Slika 34. Usporedba inhibitornog djelovanja porfirina u stanju normoksije i hipoksije pri koncentraciji 1  $\mu$ M na stanice melanoma.**

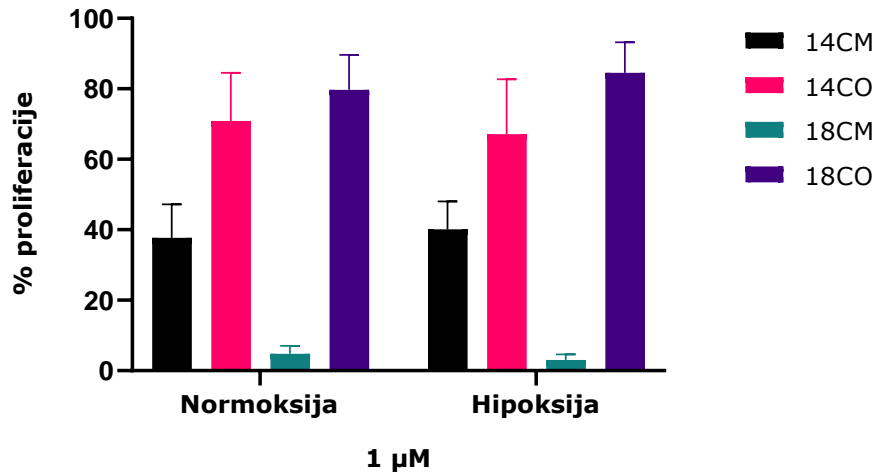
### 3.3.2. Stanice HDF

Pri koncentraciji od 0.5  $\mu\text{M}$  u uvjetima normoksije i hipoksije nema statističke značajne razlike u inhibiciji proliferacije stanica HDF te se može zamijetiti veoma slične razine inhibicije rasta za sve spojeve. Jedini spoj koji inhibira više od 50 % staničnog rasta u oba uvjeta je **18CM** (između 80-85 %) (Slika 35). Također, pri koncentraciji od 1  $\mu\text{M}$  u uvjetima normoksije i hipoksije nema statističke značajne razlike u inhibiciji proliferacije stanica HDF i razine inhibicije rasta su veoma slične i ponovno, jedini spoj koji inhibira više od 50 % staničnog rasta u oba uvjeta je **18CM** (normoksija 95 %, hipoksija 97 %) (Slika 36).



**Slika 35. Usporedba inhibitornog djelovanja porfirina u stanju normoksije i hipoksije pri koncentraciji 0.5  $\mu\text{M}$  na stanice fibroblasta.**

## HDF normoksija vs. hipoksija

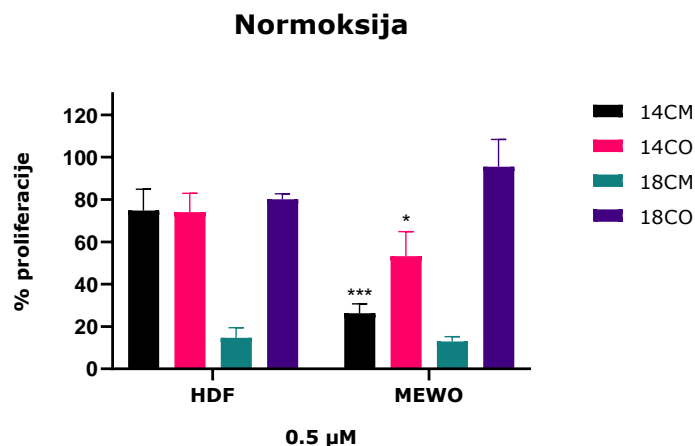


**Slika 36. Usporedba inhibitornog djelovanja porfirina u stanju normoksije i hipoksije pri koncentraciji 1 µM na stanice fibroblasta.**

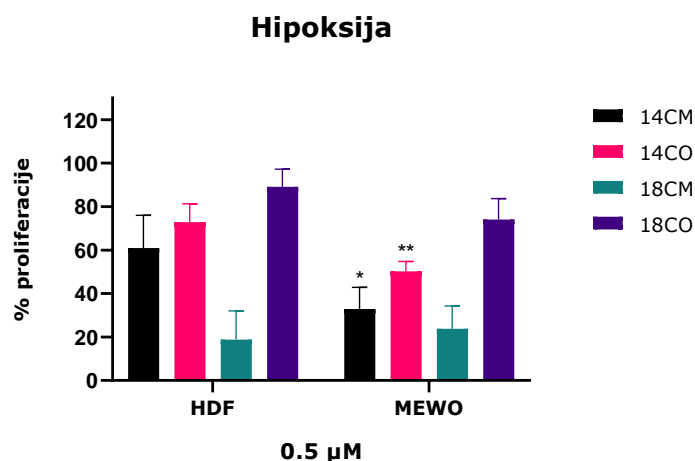
### 3.4. Usporedba MEWO i HDF stanica

Osim usporedbe unutar stanične linije, uspoređena je i proliferacija, odnosno stupanj inhibicije spojeva između MEWO i HDF stanica za koncentracije od 0.5 i 1 µM u uvjetima normoksije i hipoksije.

U uvjetima normoksije i pri 0.5 µM, spojevi **14CM** (\*\*\*) i **14CO** (\* p<0.05) statistički značajno inhibiraju rast MEWO stanica u odnosu na HDF stanice (Slika 37). Također, u uvjetima hipoksije i pri 0.5 µM spojevi **14CM** (\* p<0.05) i **14CO** (\*\* p<0.01) pokazuju statistički značajnu inhibiciju rasta MEWO nego HDF stanica (Slika 38).

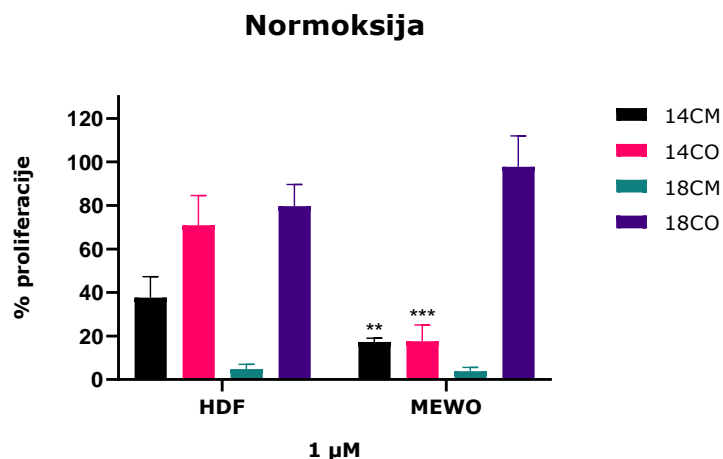


**Slika 37. Usporedba inhibitornog djelovanja 0.5  $\mu$ M porfirina u stanju normoksije na stanice HDF i MEWO.**

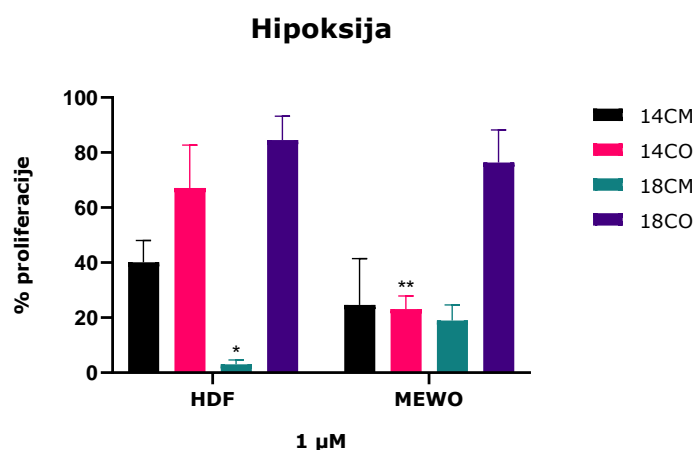


**Slika 38. Usporedba inhibitornog djelovanja 0.5  $\mu$ M porfirina u stanju hipoksije na stanice HDF i MEWO.**

U uvjetima normoksije i pri koncentraciji od 1  $\mu$ M, ponovno je prisutna statistički značajna razlika u inhibiciji rasta stanica kod spojeva **14CM** (\*\*  $p < 0.01$ ) i **14CO** (\*\*\*)  $p < 0.001$ ) u MEWO stanicama u odnosu na HDF (Slika 39). Pri istoj koncentraciji, no u uvjetima hipoksije spoj **14CO** ponovno statistički značajno inhibira rast MEWO stanca (\*\*  $p < 0.01$ ), no u ovom slučaju spoj **18CM** je pokazao statistički značajnu inhibiciju u HDF stanicama (\*  $p < 0.05$ ) (Slika 40).



**Slika 39. Usporedba inhibitornog djelovanja 1 µM porfirina u stanju normoksije na stanice HDF i MEWO.**



**Slika 40. Usporedba inhibitornog djelovanja 1 µM porfirina u stanju hipoksije na stanice HDF i MEWO.**

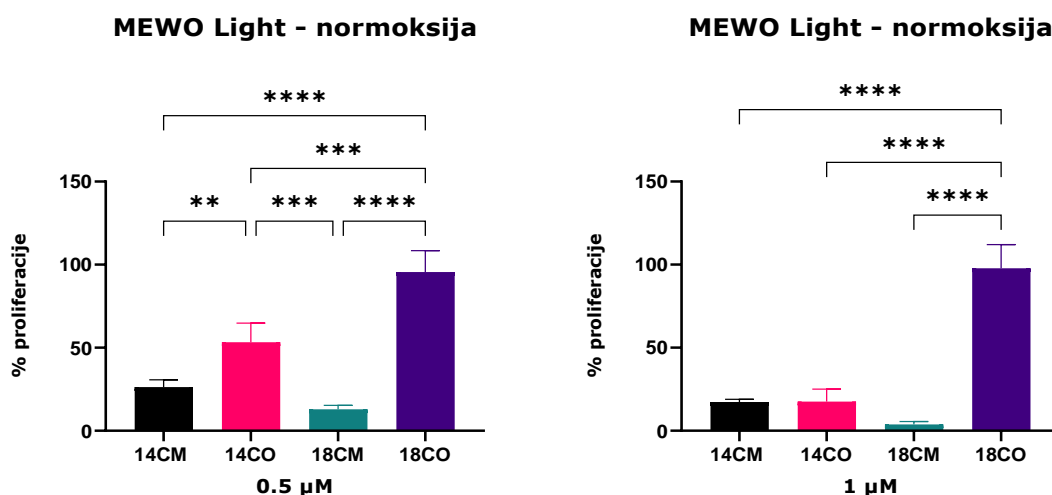
### 3.5. Usporedba spojeva sa *N*-metiliranim i *N*-oksidiranim supstituentima

Jedan od ciljeva ovog rada je i pokazati razliku u djelotvornosti metiliranih i oksidiranih porfirina, stoga je uspoređena njihova djelotvornost u inhibiranju staničnog rasta unutar svake stanične linije, za stanja normoksije i hipoksije te koncentracije 0.5 i 1 µM.

### 3.5.1. MEWO stanice

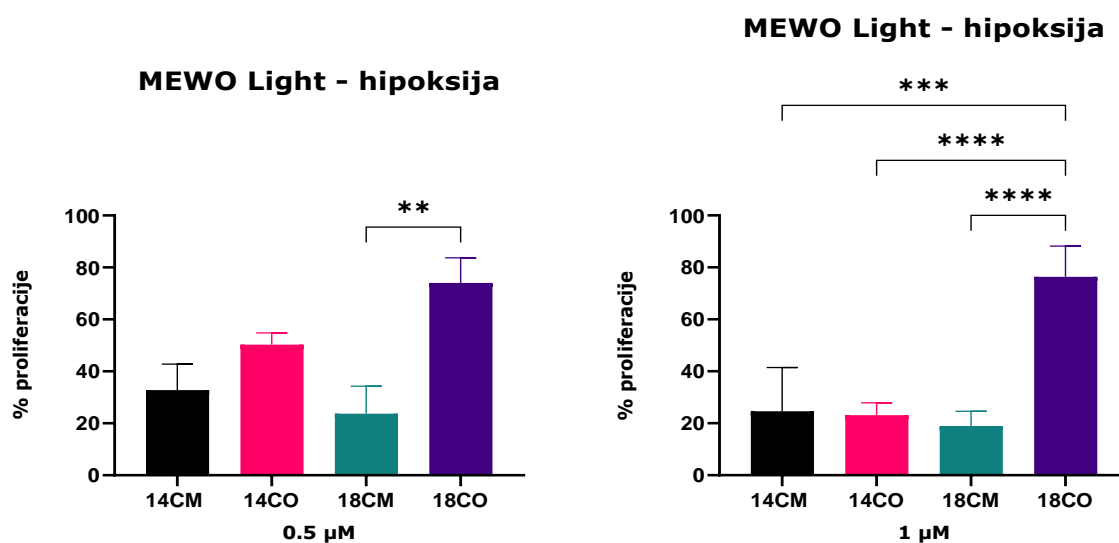
Pri koncentraciji od 0.5  $\mu\text{M}$  i uvjetima normoksije, prisutna je statistički značajna razlika među svim spojevima. Metilirani spojevi **14CM** (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ) i **18CM** (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ) značajno inhibiraju rast u odnosu na oksidirani spoj duljeg lanca **18CO**. Također, metilirani **14CM** značajno više inhibira rast stanica u odnosu na oksidirani **14CO** (\*\*  $p < 0.01$ ), a **14CO** značajno više inhibira rast stanica u odnosu na **18CM** (\*\*\*)  $p < 0.001$ ) i **18CO** (\*\*\*)  $p < 0.001$ ) (Slika 41 - lijevo).

U uvjetima normoksije, no pri koncentraciji od 1  $\mu\text{M}$ , prisutna je statistički značajna razlika između inhibitornog djelovanja **14CM** i **18CO** (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ), **14CO** i **18CO** (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ) te **18CM** i **18CO** (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ) (Slika 41 - desno).



**Slika 41. Grafički prikaz usporedbe djelovanja porfirina u uvjetima normoksije na rast MEWO stanica, lijevo – 0.5  $\mu\text{M}$  porfirini, desno - 1  $\mu\text{M}$ .**

Pri koncentraciji od 0.5  $\mu\text{M}$  i uvjetima hipoksije, metilirani porfirin **18CM** (\*\*  $p < 0.01$ ) statistički značajno inhibira stanični rast u odnosu na oksidirani spoj iste duljine lanca **18CO**. Pri koncentraciji od 1  $\mu\text{M}$  i uvjetima hipoksije, spoj **18CM** ponovno statistički značajno inhibira stanični rast u odnosu na **18CO** (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ). Oksidirani **14CO** kraćeg lanca (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ) te metilirani **14CM** (\*\*\*)  $p < 0.001$ ) također statistički značajno inhibiraju stanični rast u odnosu na **18CO** (Slika 42).



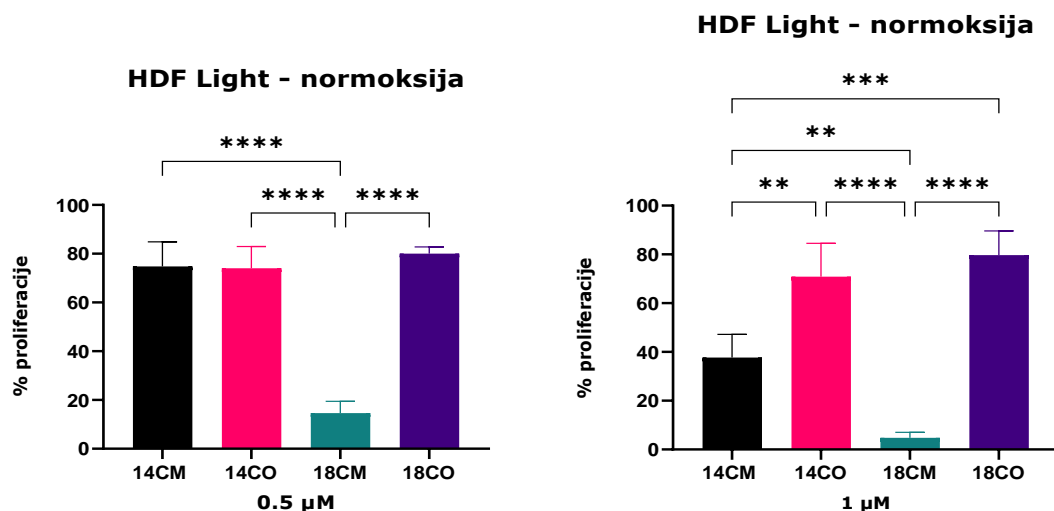
**Slika 42. Grafički prikaz usporedbe djelovanja porfirina u uvjetima hipoksije na rast MEWO stanica, lijevo – 0.5 μM porfirini, desno - 1 μM.**

### 3.5.2. HDF stanice

Pri koncentraciji od 0.5 μM i uvjetima normoksije, **18CM** statistički značajno više inhibira rast stanica u odnosu na **14CM** (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ), **14CO** (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ) i **18CO** (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ).

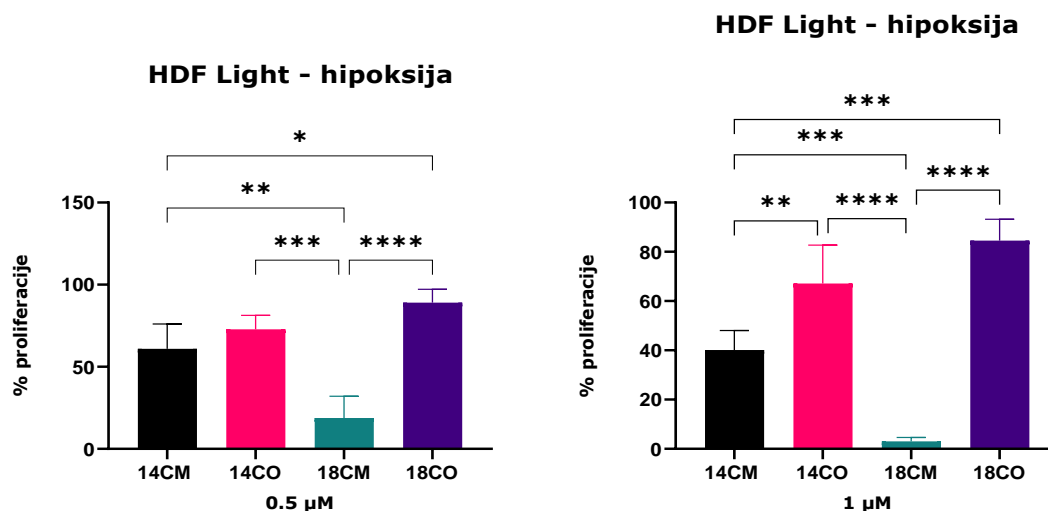
Pri koncentraciji od 1 μM, porfirin **18CM** značajno više inhibira rast stanica u odnosu na **14CO** (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ), **18CO** (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ) i **14CM** (\*\*  $p < 0.01$ ). Također, kraći metilirani spoj **14CM** značajno više inhibira rast stanica u odnosu na **18CO** (\*\*  $p < 0.01$ ) i **14CO** (\*\*  $p < 0.01$ ) (Slika 43).





**Slika 43. Grafički prikaz usporedbe djelovanja porfirina u uvjetima normoksije na rast HDF stanica, lijevo – 0.5 μM porfirini, desno - 1 μM.**

U uvjetima hipoksije i pri koncentraciji od 0.5 μM, spoj **18CM** statistički značajno inhibira rast stanica u odnosu na oksidirani **18CO** (\*\*\*\* p<0.0001) i metilirane porfirine **14CO** (\*\* p<0.001) i **14CM** (\*\* p<0.01). Također, metilirani **14CM** značajno više inhibira rast stanica u odnosu na oksidirani **18CO** (\* p<0.05). Pri koncentraciji od 1 μM, metilirani **18CM** značajno inhibira rast stanica u odnosu na **18CO** (\*\*\*\* p<0.0001), **14CM** (\*\* p<0.001) i **14CO** (\*\* p<0.001). Također, metilirani porfirin kraćeg lanca **14CM** značajno inhibira rast u odnosu na **18CO** (\*\* p<0.001) i **14CO** (\*\* p<0.01) (Slika 44).



**Slika 44. Grafički prikaz usporedbe djelovanja porfirina u uvjetima hipoksije na rast HDF stanica, lijevo – 0.5 μM porfirini, desno - 1 μM.**

## 5. DISKUSIJA

### 5.1. Ispitivanje ulaska spojeva u stanice

Mjerenje intenziteta fluorescencije provedeno je u svrhu ispitivanja množine spojeva u stanicama u različitim vremenskim točkama kako bi se odredilo optimalno vrijeme inkubacije sa spojevima.

Najprije je uspoređena množina spojeva na membrani i unutar stanice za obje stanične linije te je pokazano kako u HDF stanicama dolazi do značajnog porasta količine spojeva unutar stanice već nakon 2 h (**14CM**, **18CM** i **18CO**), a nakon 4 i 6 h svi su spojevi u većoj količini unutar stanice. Slično je i kod MEWO stanica gdje je čak i nakon 1 h bila značajna količina sva 4 spoja unutar stanice, nakon 2 h je prekinut taj trend gdje je spoj **14CM** zaostao u većoj količini na membrani, a **14CO** unutar stanice. No, nakon 4 i 6 h sva 4 porfirina ponovno se nalaze u značajno većoj količini unutar stanice. Kao što je navedeno u rezultatima, ulazak spojeva u stanice je ispitan i u vremenskoj točki od 24 h gdje su rezultati pokazali da je razina porfirina ostala ista ili se pak smanjila, stoga su za daljnje usporedbe korištene vrijednosti izmjerene nakon 6 h.

Usporedbom množine spojeva unutar stanice za staničnu liniju HDF pokazano je kako je *N*-oksidirani porfirin kraćeg lanca, **14CO** spoj najveće količine u odnosu na **14CM**, **18CM** i **18CO**, a spojevi **18CM** i **18CO** veće su količine u odnosu na **14CM**. Kod stanica MEWO, **14CO** je ponovno spoj u najvećoj količini, a slijedi ga **18CO**. S obzirom da spojevi moraju proći kroz lipofilnu staničnu membranu, očekivalo bi se kako će spoj u najvećoj količini unutar stanice biti jedan od spojeva s duljim bočnim lancem poput **18CM** ili **18CO** koji doprinosi većoj lipofilnosti spoja. Dodatno, oksidirani porfirini na molekuli posjeduju pozitivan i negativan naboj (*zwitterion*) i uslijed toga su lipofilniji i lakše prolaze membranu, dok amfilni metilirani posjeduju isključivo pozitivan naboj na porfirinskoj jezgri, što ih čini polarnijima, a to mogu potvrditi i rezultati kod MEWO stanica.

Nadalje, provedena je i usporedba količine porfirina u stanicama HDF i MEWO. Rezultati usporedbe ukazuju da su sva četiri porfirina u većoj količini unutar HDF stanica te da su množine duplo veće u odnosu na MEWO stanice, a statistički su značajne u svim vremenskim točkama za spojeve **14CO** i **18CM**. Ovakav rezultat je neočekivan te se dovodi u pitanje permeabilnost membrane stanica melanoma MEWO.

Pregledom literature pronađen je podatak kako stanice raka u membrani sadrže više razne kolesterola, što membranu čini debljom i rigidnijom, a takve se promjene mogu povezati s kiselim izvanstaničnim okolišem. U članku autori naglašavaju da se radi o stanicama otpornim na lijekove (MDR) te da osim kolesterola takve stanice smanjuju razinu ceramida tako što potiču sintezu sfingomijelina i pritom dolazi do smanjene razine lipidnih raftova obogaćenih ceramidima koji inače imaju važnu ulogu u indukciji stanične smrti<sup>44</sup>. Pokazuju li MEWO stanice sličan obrazac i je li membrana HDF stanica veće permeabilnosti, trebalo bi dodatno ispitati. Također, rezultati bi se mogli objasniti i razlikom u veličini stanica s obzirom da su stanice fibroblasta veće površine i kao takve bi mogle primiti više porfirina.

Naposlijetku, ispitan je ulazak porfirina u stanice pri 4 i 37 °C kako bi se odredio način ulaska spojeva u stanicu, ulaze li porfirini aktivnim transportom gdje je za kretanje kroz staničnu membranu potrebna stanična energija i transport se odvija pomoću receptora u membrani ili pak pasivnim gdje nije potrebna stanična energija, već se prijenos tvari odvija pomoću difuzije ili osmoze i ovisi o propusnosti membrane, odnosno organizaciji membranskih lipida i proteina. Rezultati usporedbe ukazuju kako u obje stanične linije porfirini ulaze u većoj količini pri 37 °C (HDF značajni rezultati – **14CO**, **18CM** i **18CO**, MEWO – **14CO**, **18CO**) pa se iz dobivenih rezultata može pretpostaviti da je porfirinima za ulazak u stanicu potrebna energija, odnosno da ulaze u stanicu aktivnim transportom<sup>45</sup>. Mnogi su načini ulaska porfirina u stanice, a istraživanje iz 2021. pokazalo je kako spoj *meso-tetra(4-karboksifenil)porfirin* u stanice ulazi endocitozom posredovanom klatrinom pa bi se moglo pretpostaviti da i ovdje korišteni porfirini ulaze u

stanice endocitozom, što bi trebalo dodatno ispitati i pritom uvidjeti utječe li način ulaska u stanice na lokalizaciju porfirina<sup>46</sup>. Također, zanimljivo je što se iz grafova može usporediti količina porfirina koja ulazi u stanice pri 4 °C te kako porfirini u većoj količini ulaze u MEWO stanice.

## 5.2. Ispitivanje lokalizacije fluorescentnom mikroskopijom

Fluorescentna mikroskopija korištena je u svrhu potvrde lokalizacije porfirina u stanicama nakon 6 h inkubacije. Stanice su tretirane porfirinima u dvije koncentracije, 1 i 5  $\mu\text{M}$ , no rezultati su prikazani isključivo za koncentraciju 5  $\mu\text{M}$ . U MEWO stanicama se za sva 4 spoja može zamijetiti kako ulaze u stanice te se lokaliziraju u citoplazmi i oko jezgre, no za spojeve **14CO**, **18CM** i **18CO** može se zamijetiti stvaranje agregata na membrani stanice. S obzirom na strukturu spojeva i njihova svojstva, stvaranje agregata mogla bi biti posljedica polarnosti, odnosno veće hidrofilnosti metiliranih spojeva uslijed njihovog pozitivnog naboja<sup>47</sup>, ali i prevelike korištene koncentracije porfirina. Spojevi **14CM** i **18CM** su porfirini hidrofilnog karaktera te bi se preferencijalno trebali lokalizirati u citoplazmi ili pak lizosomima, a oksidirani **14CO** i **18CO** su hidrofobni te se lokaliziraju u stanične organele obavijene lipidnim dvoslojem poput mitohondrija i endoplazmatskog retikuluma<sup>48</sup>. Slika crvenog kanala sa spojem **18CO** ukazuje na potencijalni ulazak porfirina i u jezgru stanice što bi mogla biti posljedica hidrofobnosti, odnosno lipofilnosti ovog spoja.

U stanicama tretiranim 1  $\mu\text{M}$  spojevima također se moglo zamijetiti kako se spojevi nakupljaju u citoplazmi i oko jezgre, agregati nisu bili prisutni u tolikoj mjeri, no crveno je obojenje bilo jako teško zamijetiti, pogotovo uz poteškoće s DAPI bojom, stoga je prikazana viša koncentracija spojeva.

### 5.3. Ispitivanje proliferacije stanica MTT testom

MTT kolorimetrijski test proveden je u svrhu ispitivanja citotoksičnog učinka porfirina **14CM**, **14CO**, **18CM** i **18CO** na stanice melanoma (MEWO) i stanice kožnih fibroblasta (HDF). Rezultati ispitivanja fototoksičnosti ukazuju na slabo inhibitorno djelovanje porfirina na proliferaciju MEWO stanica u mraku gdje stopa proliferacije u svim koncentracijama iznosi između 70-100 % u uvjetima normoksije i hipoksije te su vrijednosti  $IC_{50}$  veće od 10  $\mu$ M čime je potvrđeno da spojevi nisu toksični u mraku. Ovakvi su rezultati za iste koncentracije dobiveni i u diplomskim radovima kolegica Anamarije Cindrić i Laure Penić Ivanko, čime je ovaj rezultat dodatno potvrđen.

Nakon osvjetljavanja MEWO stanica, u uvjetima normoksije pri nižim koncentracijama svojim se inhibitornim djelovanjem istaknuo oksidirani **14CO**, a pri većim koncentracijama svi su spojevi izazivali gotovo 100 %-tnu inhibiciju osim oksidiranog **18CO** s tek 65 % inhibicije pri najvećoj koncentraciji. U stanju hipoksije rezultati su slični za manje koncentracije, no pri većim koncentracijama je stopa inhibicije bila viša nego u uvjetima normoksije. Usporedimo li  $IC_{50}$  vrijednosti u stanju normoksije i hipoksije, vrijednosti su veoma slične, no za spojeve **14CO** i **18CM** niže su u stanju hipoksije. Isto tako, kod HDF stanica su veoma slični rezultati u stanju normoksije i hipoksije, no ponovno,  $IC_{50}$  vrijednosti su nešto niže u stanju hipoksije. Rezultati upućuju na veću djelotvornost spoja **14CO** s *N*-oksidnom skupinom u uvjetima hipoksije, ali i na lipofilnost spoja **18CM** što mu omogućuje lakši prolazak kroz dvosloj.

Koncentracije 0.5 i 1  $\mu$ M odabrane su za usporedbu inhibitornog djelovanja porfirina te je pokazano kako pri obje koncentracije u stanicama MEWO značajno djeluje metilirani spoj **14CM** u uvjetima normoksije, a u uvjetima hipoksije oksidirani **18CO**, dok za stanice HDF nije bilo statistički značajnih rezultata.

Usporedbom inhibitornog djelovanja pri uvjetima normoksije i hipoksije za koncentracije 1 i 5  $\mu\text{M}$  pokazano je kako u MEWO stanicama pri nižoj koncentraciji, spoj **14CM** značajno djeluje u uvjetima normoksije, a spoj **14CO** u uvjetima hipoksije. Pri višoj koncentraciji, značajno je ponovno djelovao **14CM** u uvjetima normoksije. Za HDF stanice niti jedan spoj nije pokazao statistički značajnu stopu inhibicije. Ovakvi rezultati upućuju na djelotvornost **14CM** spoja u uvjetima normoksije, ali i potencijalnu djelotvornost spoja **14CO** u uvjetima hipoksije na stanice MEWO.

Usporedbom MEWO i HDF stanica, pokazano je kako u uvjetima normoksije i hipoksije pri 0.5  $\mu\text{M}$  spojevi **14CM** i **14CO** značajno djeluju na inhibiciju rasta MEWO stanica. Pri koncentraciji od 1  $\mu\text{M}$  u stanju normoksije ponovno najbolje djeluju **14CM** i **14CO**, a u uvjetima hipoksije na MEWO stanice značajno djeluje **14CO**, a na HDF stanice **18CM**.

Naposlijetku, za svaku su staničnu liniju i odabrane koncentracije uspoređeni spojevi međusobno te se može zamijetiti kako u MEWO stanicama pri obje koncentracije u stanju normoksije značajno djeluju metilirani spojevi **14CM** i **18CM** (pri višoj koncentraciji 83 % i 96 % inhibicije) te da spoj **14CO** ima veću inhibitornu moć od **18CO**. U stanju hipoksije pri nižoj koncentraciji spoj **18CM** (76 %) djeluje bolje od **18CO** (26 %), a pri višoj koncentraciji spojevi **14CM**, **14CO** i **18CM** značajno djeluju u odnosu na spoj **18CO**. Stanice fibroblasta pokazale su sličan obrazac, no ovdje je spoj sa najznačajnijim djelovanjem **18CM** (pri višoj koncentraciji 95 % inhibicije), a pri višoj koncentraciji u oba uvjeta značajan je i **14CM** koji djeluje bolje od **14CO** i **18CO**.

Kroz provedena ispitivanja spoj **18CO** pokazao se najmanje djelotvornim u odnosu na preostala tri spoja, no razlog tome bi mogla biti nestabilnost *N*-oksidiranih piridilporfirina otopljenih u DMSO nakon određenog vremena.

Usporedbom  $\text{IC}_{50}$  vrijednosti, može se zaključiti kako su vrijednosti za MEWO stanice niže u usporedbi s HDF stanicama što upućuje na potencijalnu selektivnost spojeva za stanice melanoma (MEWO). Prema

vrijednostima koncentracija može se uočiti kako spojevi **14CM** i **18CM** pokazuju najveću inhibitornu moć, u oba uvjeta. Takav rezultat u skladu je s rezultatima rada Jelovica i sur, 2018. te rezultatima kolegice Penić-Ivanko gdje je pokazano kako je metilirani spoj s duljim lancem značajno djelovao na stanice, no ipak ovdje spoj kraćeg lanca **14CM** pokazuje niže IC<sub>50</sub> vrijednosti.

S obzirom na lipofilnost spojeva s duljim lancem te osjetljivost *N*-oksidne skupine na hipoksiju, očekivano je kako će spojevi **14CO** i **18CO** djelovati bolje u uvjetima hipoksije od metiliranih spojeva. U ispitivanjima je spoj **14CO** pokazao značajne rezultate, no ukoliko se usporedi sa **14CM**, on ipak djeluje bolje u MEWO stanicama, a **18CM** u HDF stanicama. Kako bi se dodatno ispitala djelotvornost oksidiranih piridilporfirina potrebno je provesti dodatna ispitivanja i statističke testove te pritom pripaziti na stabilnost svih korištenih spojeva.

## 6. ZAKLJUČAK

Provedenim eksperimentom pokazano je kako se porfirini u najvećoj količini akumuliraju u stanicama nakon 6 h te kako je veća količina spojeva ušla u stanice fibroblasta. Ispitivanje pri različitim temperaturama ukazalo je na preferencijalni ulazak spojeva u stanice pri temperaturi od 37 °C što upućuje na aktivni način ulaska u stanice.

Fluorescentnom mikroskopijom je potvrđen ulazak svih spojeva u stanicu pri čemu su uočeni agregati spojeva **14CO**, **18CM** i **18CO** te mogući ulazak **18CO** u jezgru stanice.

Rezultati MTT testa pokazali su kako spojevi ne uzrokuju citotoksičnost u mraku te da su selektivniji za stanice melanoma (MEWO) pri koncentracijama 0.5 i 1  $\mu$ M. Usporedbom stope inhibicije, pokazano je kako spojevi **14CM** i **14CO** značajno djeluju na stanice melanoma u uvjetima normoksije, ali i hipoksije. Prema vrijednostima  $IC_{50}$  te usporedbi stope proliferacije za sva 4 spoja, može se zaključiti kako spojevi **14CM** i **18CM** pokazuju najveću inhibitornu moć. U uvjetima hipoksije spoj **14CO** pokazao je značajne rezultate, no ukoliko se usporedi s metiliranim spojevima, njegovo je djelovanje ipak slabije, stoga je potrebno provesti dodatna ispitivanja djelotvornosti oksidiranih piridilporfirina vodeći računa o stabilnosti korištenih spojeva.



## 7. LITERATURA

1. Naidoo, C., Kruger, C. A., & Abrahamse, H. (2018). Photodynamic Therapy for Metastatic Melanoma Treatment: A Review. *Technology in cancer research & treatment*, 17, 1533033818791795. <https://doi.org/10.1177/1533033818791795>
2. Basta Juzbašić A. (2014). *Dermatovenerologija: Melanom*. Medicinska naklada. 687.
3. Akasov, R. A., Sholina, N. V., Khochenkov, D. A., Alova, A. V., Gorelkin, P. V., Erofeev, A. S., Generalova, A. N., & Khaydukov, E. V. (2019). Photodynamic therapy of melanoma by blue-light photoactivation of Flavin mononucleotide. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46115-w>
4. Huang, Y. Y., Vecchio, D., Avci, P., Yin, R., Garcia-Diaz, M., & Hamblin, M. R. (2013). Melanoma resistance to photodynamic therapy: new insights. *Biological chemistry*, 394(2), 239–250. <https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0228>
5. Wang, S., Wang, X., Yu, L., & Sun, M. (2021). Progress and trends of photodynamic therapy: From traditional photosensitizers to AIE-based photosensitizers. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 34, 102254. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102254>
6. Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., Hahn, S. M., Hamblin, M. R., Juzeniene, A., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J., Mroz, P., Nowis, D., Piette, J., Wilson, B. C., & Golab, J. (2011). Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(4), 250–281. <https://doi.org/10.3322/caac.20114>
7. Kwiatkowski, S., Knap, B., Przystupski, D., Saczko, J., Kędziarska, E., Knap-Czop, K., Kotlińska, J., Michel, O., Kotowski, K., & Kulbacka, J. (2018). Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 106, 1098–1107. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.049>
8. Plaetzer, K., Krammer, B. & Berlanda, Jürgen & Berr, Frieder & Kiesslich, T. (2008). Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: Fundamental aspects. *Lasers in medical science*. 24, 259-268. <https://doi.org/10.1007/s10103-008-0539-1>

9. MacDonald, I.J. & Dougherty, T.J. (2001). Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 5, 105-129. <https://doi.org/10.1002/jpp.328>
10. Castano, A. P., Demidova, T. N., & Hamblin, M. R. (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 1(4), 279-293. [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00007-4](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00007-4)
11. Rkein, A.M. & Ozog D.M. (2014). Photodynamic Therapy. *Dermatol Clin*. 32, 415-425. <https://doi.org/10.1016/j.det.2014.03.009>
12. Benov L. (2015). Photodynamic therapy: current status and future directions. *Medical principles and practice: international journal of the Kuwait University, Health Science Centre*, 24 Suppl 1(Suppl 1), 14-28. <https://doi.org/10.1159/000362416>
13. Mishchenko, T., Balalaeva, I., Gorokhova, A., Vedunova, M., & Krysko, D. V. (2022). Which cell death modality wins the contest for photodynamic therapy of cancer?. *Cell death & disease*, 13(5), 455. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04851-4>
14. Kou, J., Dou, D., & Yang, L. (2017). Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications. *Oncotarget*, 8(46), 81591-81603. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20189>
15. Oleinick, N. L., Morris, R. L., & Belichenko, I. (2002). The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 1(1), 1-21. <https://doi.org/10.1039/b108586g>
16. Zlender V. (2003). Apoptoza--programirana smrt stanice [Apoptosis--programmed cell death]. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 54(4), 267-274.
17. Castano, A. P., Demidova, T. N., & Hamblin, M. R. (2005). Mechanisms in photodynamic therapy: part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 2(1), 1-23. [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00030-X](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00030-X)
18. Dąbrowski, J. M., & Arnaut, L. G. (2015). Photodynamic therapy (PDT) of cancer: from local to systemic treatment. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 14(10), 1765-1780. <https://doi.org/10.1039/c5pp00132c>

19. Liang, L., Bi, W., Tian, Y. (2016). Autophagy in photodynamic therapy. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 15(4), 885-889. <http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v15i4.31>
20. Mroz, P., Yaroslavsky, A., Kharkwal, G. B., & Hamblin, M. R. (2011). Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers*, 3(2), 2516–2539. <https://doi.org/10.3390/cancers3022516>
21. Plaetzer, K., Kiesslich, T., Verwanger, T., & Krammer, B. (2003). The Modes of Cell Death Induced by PDT: An Overview. *Medical Laser Application*, 18(1), 7–19. doi:10.1078/1615-1615-00082
22. Donohoe, C., Senge, M. O., Arnaut, L. G., & Gomes-da-Silva, L. C. (2019). Cell death in photodynamic therapy: From oxidative stress to anti-tumor immunity. *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer*, 1872(2), 188308. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.07.003>
23. Alzeibak, R., Mishchenko, T. A., Shilyagina, N. Y., Balalaeva, I. V., Vedunova, M. V., & Krysko, D. V. (2021). Targeting immunogenic cancer cell death by photodynamic therapy: past, present and future. *Journal for immunotherapy of cancer*, 9(1), e001926. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001926>
24. Suzuki, T., Tanaka, M., Sasaki, M., Ichikawa, H., Nishie, H., & Kataoka, H. (2020). Vascular Shutdown by Photodynamic Therapy Using Talaporfin Sodium. *Cancers*, 12(9), 2369. <https://doi.org/10.3390/cancers12092369>
25. Sorrin, A. J., Kemal Ruhi, M., Ferlic, N. A., Karimnia, V., Polacheck, W. J., Celli, J. P., Huang, H. C., & Rizvi, I. (2020). Photodynamic Therapy and the Biophysics of the Tumor Microenvironment. *Photochemistry and photobiology*, 96(2), 232–259. <https://doi.org/10.1111/php.13209>
26. Handoko, Y. A., Rondonuwu, F. S., & Limantara, L. (2015). The photosensitizer stabilities of Tookad® on aggregation, acidification, and day-light irradiation. *Procedia Chemistry*, 14, 474-483. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2015.03.064>
27. Baghban, R., Roshangar, L., Jahanban-Esfahlan, R. et al. (2020). Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Commun Signal* 18, 59. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-0530-4>
28. Emami Nejad, A., Najafgholian, S., Rostami, A. et al. (2021). The role of hypoxia in the tumor microenvironment and development of cancer stem cell: a novel approach to developing treatment. *Cancer Cell Int* 21, 62. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01719-5>

29. Yang L. V. (2017). Tumor Microenvironment and Metabolism. *International journal of molecular sciences*, 18(12), 2729. <https://doi.org/10.3390/ijms18122729>
30. Boedtkjer, E., & Pedersen, S. F. (2020). The Acidic Tumor Microenvironment as a Driver of Cancer. *Annual review of physiology*, 82, 103–126. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021119-034627>
31. Hong, L., Li, J., Luo, Y., Guo, T., Zhang, C., Ou, S., Long, Y., & Hu, Z. (2022). Recent Advances in Strategies for Addressing Hypoxia in Tumor Photodynamic Therapy. *Biomolecules*, 12(1), 81. <https://doi.org/10.3390/biom12010081>
32. Harada, H. (2011). Gene Therapy Strategy for Tumour Hypoxia. In (Ed.), *Targets in Gene Therapy*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/17645>
33. Zhang, Q., Yan, Q., Yang, H., & Wei, W. (2019). Oxygen sensing and adaptability won the 2019 Nobel Prize in Physiology or medicine. *Genes & diseases*, 6(4), 328–332. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2019.10.006>
34. Dang, J., He, H., Chen, D., & Yin, L. (2017). Manipulating tumor hypoxia toward enhanced photodynamic therapy (PDT). *Biomaterials science*, 5(8), 1500–1511. <https://doi.org/10.1039/c7bm00392g>
35. Huang, L., Zhao, S., Wu, J., Yu, L., Singh, N., Yang, K., Lan, M., Wang, P., & Kim, J. S. (2021). Photodynamic therapy for hypoxic tumors: Advances and perspectives. *Coordination Chemistry Reviews*, 438, 213888. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.213888>
36. Sun, Y., Zhao, D., Wang, G., Wang, Y., Cao, L., Sun, J. & He, Z. (2020). Recent progress of hypoxia-modulated multifunctional nanomedicines to enhance photodynamic therapy: opportunities, challenges, and future development. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. doi:10.1016/j.aps
37. Wan, Y., Fu, L. H., Li, C., Lin, J., & Huang, P. (2021). Conquering the Hypoxia Limitation for Photodynamic Therapy. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 33(48), e2103978. <https://doi.org/10.1002/adma.202103978>
38. Huang, Y. Y., Vecchio, D., Avci, P., Yin, R., Garcia-Diaz, M., & Hamblin, M. R. (2013). Melanoma resistance to photodynamic therapy: new insights. *Biological chemistry*, 394(2), 239–250. <https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0228>
39. Allison, R. R., Downie, G. H., Cuenca, R., Hu, X. H., Childs, C. J., & Sibata, C. H. (2004). Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and*

photodynamic therapy, 1(1), 27–42. [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(04\)00007-9](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(04)00007-9)

40. Shen, Z., Ma, Q., Zhou, X. et al. (2021). Strategies to improve photodynamic therapy efficacy by relieving the tumor hypoxia environment. *NPG Asia Mater* 13, 39. <https://doi.org/10.1038/s41427-021-00303-1>

41. Posakony, J. J., Pratt, R. C., Rettig, S. J., James, B. R., & Skov, K. A. (1999). Porphyrins incorporating heterocyclic n-oxides: (oxidopyridyl)porphyrins, porphyrin-n-oxides, and a tirapazamine-porphyrin conjugate. *Canadian Journal of Chemistry*, 77(2), 182-198. <https://doi.org/10.1139/v98-238>

42. Cerecetto, H., & Gonzalez, M. (2001). N-oxides as hypoxia selective cytotoxins. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 1(3), 219-231. <https://doi.org/10.2174/1389557013406891>

43. Muñoz-Sánchez, J., & Chánez-Cárdenas, M. E. (2019). The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. *Journal of applied toxicology : JAT*, 39(4), 556–570. <https://doi.org/10.1002/jat.3749>

44. Preta G. (2020). New Insights Into Targeting Membrane Lipids for Cancer Therapy. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 571237. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.571237>

45. Physiology, active transport - StatPearls - NCBI bookshelf. (2021, September 14). National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547718/>

46. Elzi, D. J., Bauta, W. E., Sanchez, J. R., Das, T., Mogare, S., Zannes Fatland, P., Iza, M., Pertsemliadis, A., & Rebel, V. I. (2021). Identification of a novel mechanism for meso-tetra (4-carboxyphenyl) porphyrin (TCPP) uptake in cancer cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 35(3), e21427. <https://doi.org/10.1096/fj.202000197R>

47. Jelovica, M., Grbčić, P., Mušković, M., Sedić, M., Pavelić, S. K., Lončarić, M., & Malatesti, N. (2018). In Vitro Photodynamic Activity of N-Methylated and N-Oxidised Tripyridyl Porphyrins with Long Alkyl Chains and Their Inhibitory Activity in Sphingolipid Metabolism. *ChemMedChem*, 13(4), 360–372. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201700748>

48. Martinez De Pinillos Bayona, A., Mroz, P., Thunshelle, C., & Hamblin, M. R. (2017). Design features for optimization of tetrapyrrole macrocycles as antimicrobial and anticancer photosensitizers. *Chemical biology & drug design*, 89(2), 192–206. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12792>

## 8. ŽIVOTOPIS

### Franka Šušković

- univ. bacc. biotechn. et pharm. inv.
- KONTAKT: +385 091 333 0470
- EMAIL: franka3suskovic@gmail.com

### EDUKACIJA

- 2020 - 2022 - Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju  
Diplomski studij "Biotehnologija u medicini."
- 2017 - 2020 - Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju  
Preddiplomski studij "Biotehnologija i istraživanje lijekova."

### RADNO ISKUSTVO

- **Stručna praksa**

svibanj-lipanj 2022 | HALMED, Agencija za lijekove i medicinske proizvode Ksaverska  
cesta 4, 10000, Zagreb

- Edukacija o postupcima registracije lijekova, zakonskim osnovama i provjeri kakvoće.
- Vršenje administracijskih zadataka u svrhu pomoći NRL timu.

- **Stručna praksa**

lipanj-srpanj 2020 | Dechra Pharmaceuticals - Genera d.d. Svetonedeljska cesta 2, 10436,  
Kalinovica

- Obilazak odjela tvrtke s posebnim fokusom na osiguranje i kontrolu kvalitete.
- Edukacija o provođenju osiguranja i kontroli kvalitete te o dobroj proizvođačkoj praksi.

- **OSTALO RADNO ISKUSTVO:**

- PROMOTOR /studenj 2021 - srpanj 2022 | NAOS Adria d.o.o.  
Promoviranje dermatološki testirane kozmetike u ljekarnama i specijaliziranim trgovinama. Savjetovanje pacijenata, educiranje o proizvodima i aktivnim sastojcima, briga o urednosti i opremljenosti proizvoda na prodajnom mjestu.
- Rad u različitim trgovinama te logističkoj tvrtci

## ISTAKNUTE VJEŠTINE I OSOBINE

- Organizacijske vještine i upravljanje vremenom
- Kreativnost i pozornost na detalje
- Kritičko razmišljanje
- Komunikacijske vještine
- Prilagodljivost
- Radna etika
- Timski rad

## RADOVI

- 2020, Fotodinamička terapija raka, završni literaturni rad.
- Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Ivana Ratkaj

## POČASTI I NAGRADE

- Stipendistica grada Svete Nedelje (2017-2022)
- eStudent Case Study Lumen Business natjecanje (2020 – treće mjesto)

## JEZIČNE VJEŠTINE

- Engleski jezik

Slušanje	Čitanje	Pisanje	Razgovorne vještine
C1	C1	B2	B2

- Talijanski jezik

Slušanje	Čitanje	Pisanje	Razgovorne vještine
A1	A1	A1	A1

## DIGITALNE VJEŠTINE

- Napredno korištenje MS Office paketa: Word/Excel/Power Point
- Napredno korištenje Canva aplikacije
- Osnovno poznavanje programa PyMol, UCSF Chimera, VMD, Avogadro

## VOLONTERSTVO

- Član Udruge studenata biotehnologije u Rijeci (USBRI), Social Media Manger (2022)
- Student Mentor (2019)
- Volonter - Otvoreni dan Odjela za biotehnologiju (2018)
- Volonter - Noć istraživača (2018)

**OSTALE VJEŠTINE:** Vozačka dozvola B kategorije

**HOBII I INTERESI:** Ples (više od 15 godina) - brojni televizijski nastupi i natjecanja