

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ
ZDRAVOTNICKÁ TECHNIKA A INFORMATIKA
5345T018



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Stanovení protinádorové účinnosti liposomálního preparátu
s hydroxyhlinitým ftalocyaninem pomocí fotodynamické
terapie

Autor: Bc. Pavel Koblíček

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Pavla Poučková, CSc

Praha 2011

Poděkování:

Děkuji vedoucí diplomové práce paní doc. RNDr. Pavle Poučkové CSc. za odborné vedení závěrečné práce, za poskytnutí odborných rad a připomínek. Za její laskavost, ochotu, trpělivost a čas, který mi věnovala.

Mé rodině a přátelům děkuji za podporu a vytváření zázemí během celého mého studia.

Prohlášení:

Prohlašuji, že diplomovou práci na téma *Stanovení protinádorové účinnosti liposomálního preparátu s hydroxyhlinitým ftalocyaninem pomocí fotodynamické terapie* jsem vypracoval samostatně za použití uvedené literatury.

V Praze dne

.....

Pavel Koblíček

OBSAH

OBSAH 4

Abstrakt 6

Abstract 7

| | | |
|-------|--|----|
| 1. | Seznam zkratk a pojmů | 10 |
| 2. | Úvod..... | 11 |
| 3. | Teoretická část | 12 |
| 3.1 | Fotodynamická teorie maligních nádorů | 12 |
| 3.2 | Historie fotodynamické terapie..... | 12 |
| 3.3 | Efektivnost PDT | 13 |
| 3.4 | Fotosensitizéry | 14 |
| 3.5 | Mechanismus účinku PDT | 18 |
| 3.6 | Zdroje záření používané pro PDT | 19 |
| 4. | Lidské nádory použité v experimentech - epidemiologický výskyt | 22 |
| 4.1 | Karcinom tlustého střeva | 22 |
| 4.2 | Karcinom mammy | 24 |
| 4.3 | Neuroblastom..... | 26 |
| 5. | Liposomy pro topickou a transdermální aplikaci léčiv..... | 27 |
| 6. | Experimentální část..... | 30 |
| 6.1 | Úvod..... | 30 |
| 6.2 | Materiál a metody - společné pro všechny pokusy | 30 |
| 6.2.1 | Hydroxyhlinitý ftalocyanin | 30 |
| 6.2.2 | Zvířata..... | 30 |
| 6.2.3 | Nádorové linie..... | 31 |
| 6.2.4 | Vlastní postup | 31 |
| 7. | Výsledky | 32 |
| 7.1 | Stanovení optimálního časového intervalu mezi aplikací fotosensitizéru a ozářením lidského karcinomu colon (linie HCT -116)..... | 32 |
| 7.1.1 | Tabulky | 33 |

| | | |
|-------|---|----|
| 7.1.2 | Statistické a grafické vyhodnocení | 35 |
| 7.2 | Vliv různých dávek ftalocyaninu v liposomálním ftalocyaninovém preparátu na účinnost fotodynamické terapie karcinomu colon (linie SW -620) | 36 |
| 7.2.1 | Tabulky | 38 |
| 7.2.2 | Statistické a grafické vyhodnocení | 41 |
| 7.3 | Vliv různých dávek ftalocyaninu v liposomálním ftalocyaninovém preparátu na účinnost fotodynamické terapie lidského karcinomu mammy | 44 |
| 7.3.1 | Tabulky | 45 |
| 7.3.2 | Statistické a grafické vyhodnocení | 48 |
| 7.4. | Vliv různých dávek ftalocyaninu v liposomálním ftalocyaninovém preparátu na účinnost fotodynamické terapie lidského neuroblastomu (UKF-NB-3) | 50 |
| 7.4.1 | Tabulky | 51 |
| 7.4.2 | Statistické a grafické vyhodnocení | 54 |
| 8. | Závěr | 57 |
| 9. | Seznam použité literatury | 59 |
| 10. | Příloha | 63 |

IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM

KOBRLE, Pavel. *Stanovení protinádorové účinnosti liposomálního preparátu s hydroxyhlinitým ftalocyaninem pomocí fotodynamické terapie. [Antitumour efficacy of gels containing liposomes with hydroxy-aluminium phthalocyanine in photodynamic therapy]*. Praha 2011. 68 stran, 32 tabulek, 11 grafů, 2 obrázky, 1 příloha. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav biofyziky a informatiky, vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Pavla Poučková, CSc.

Abstrakt

Cílem diplomové práce bylo stanovení protinádorové účinnosti nového liposomálního preparátu s hydroxyhlinitým ftalocyaninem pro fotodynamickou terapii maligních nádorů a současné zjištění optimálního časového intervalu mezi topickou aplikací liposomálního preparátu a fotodynamickou terapií (PDT) – tj. vlastním ozářením tumoru.

Ve studii je porovnáván vliv různých dávek ftalocyaninu v liposomálním ftalocyaninovém preparátu na účinnost fotodynamické terapie karcinomu colon (linie SW-620), karcinomu mammy (linie MDA-MB-231) a lidského neuroblastomu (UKF NB-3). Jako fotosensitizer byl použit hydroxyhlinitý ftalocyanin. K pokusům byly použity outbrední nu/nu myši kmene CD-1 s již uvedenými xenotransplantovanými lidskými tumory. Oblast s nádorem byla ozařována xenonovou lampou (600-700nm), 80J/cm². Výsledky byly statisticky vyhodnoceny, zaznamenány v tabulkách a zobrazeny v grafech. V diplomové práci bylo prokázáno, že liposomální preparát s ftalocyaninem (obsah Ftc 9-18mg/ml) má výrazný protinádorový účinek na zvolené typy nádorů. Optimální časový interval pro PDT je 10 minut po topické aplikaci preparátu.

Klíčová slova:

fotodynamická terapie; hydroxyhlinitý ftalocyanin; liposomální preparát

IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM

KOBRLE, Pavel. *Stanovení protinádorové účinnosti liposomálního preparátu s hydroxyhlinitým ftalocyaninem pomocí fotodynamické terapie. [Antitumour efficacy of gels containing liposomes with hydroxy-aluminium phthalocyanine in photodynamic therapy]*. Praha 2011. 68 stran, 32 tabulek, 11 grafů, 2 obrázky, 1 příloha. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav biofyziky a informatiky, vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Pavla Poučková, CSc.

Abstract

The targets of the diploma thesis presented here were to establish the antitumour efficacy of a new liposomal product with hydroxy-aluminium phthalocyanine (PC) in photodynamic therapy (PDT) of malignant tumours and determine the optimum time interval between the topical application of the product and PDT (tumour exposure to light). Effects were examined of the PC concentration on the PDT efficacy in a colon carcinoma cell line (SW-620), mammary carcinoma cell line (MDA-MB-231) and human neuroblastoma cell line (UKF NB-3). Hydroxy-aluminium phthalocyanine was employed as a photosensitizer. Outbred athymic female nude CD-1 mice already bearing the above mentioned xenotransplanted tumours were used in the experiments. The area comprising the tumour was exposed to light from a xenon lamp (600-700 nm, 80 J/cm²). The results were statistically evaluated, summarized in tables and plotted in graphs. In the diploma work, the liposomal product containing phthalocyanine (9-18 mg/ml) was shown to have considerable antitumour effects in the types of tumours chosen. The optimum time interval for the PDT is of 10 min after the product topical application.

Key words: *photodynamic therapy; hydroxy-aluminium phthalocyanine; liposomal drug delivery*

TABULKY A GRAFY

| | |
|------------|--|
| Tabulka 1 | Pokusná skupina č. 1, ftalocyanin 1mg/ml, PDT za 10minut |
| Tabulka 2 | Pokusná skupina č. 2, ftalocyanin 1mg/ml, PDT za 30minut |
| Tabulka 3 | Kontrolní skupina č. 1, bez PDT |
| Tabulka 4 | Kontrolní skupina č. 2, PDT bez ftalocyaninu |
| Tabulka 5 | Statistické hodnocení T test - hladiny významnosti z dat tab. 1-4 |
| Tabulka 6 | Statistické hodnocení T test - vypočítané hodnoty z dat tab. 1-4 |
| Tabulka 7 | Pokusná skupina č. 1, ftalocyanin 1,8mg/ml, liposom 608 |
| Tabulka 8 | Pokusná skupina č. 2, ftalocyanin 4,5mg/ml, liposom 608 |
| Tabulka 9 | Pokusná skupina č. 3, ftalocyanin 6,0mg/ml, liposom 608 |
| Tabulka 10 | Pokusná skupina č. 4, ftalocyanin 9,0mg/ml, liposom 608 |
| Tabulka 11 | Pokusná skupina č. 5, ftalocyanin 18,0mg/ml, liposom 608 |
| Tabulka 12 | Pokusná skupina č. 6, ftalocyanin 18,0mg/ml, liposom 613 |
| Tabulka 13 | Pokusná skupina č. 7, ftalocyanin 18,0mg/ml, liposom 614 |
| Tabulka 14 | Kontrolní skupina bez léčby (bez liposomů a ftalocyaninů) |
| Tabulka 15 | Statistické hodnocení T test - hladiny významnosti z dat tab. 7-14 |
| Tabulka 16 | Statistické hodnocení T test - vypočítané hodnoty z dat tab. 7-14 |
| Tabulka 17 | Pokusná skupina č. 1, ftalocyanin 2mg/ml |
| Tabulka 18 | Pokusná skupina č. 2, ftalocyanin 3mg/ml |
| Tabulka 19 | Pokusná skupina č. 3, ftalocyanin 4mg/ml |
| Tabulka 20 | Kontrolní skupina č. 1, bez léčby (bez ftalocyaninů) |
| Tabulka 21 | Kontrolní skupina č. 2, bez PDT |
| Tabulka 22 | Kontrolní skupina č. 3, ftalocyanin 4mg/ml |
| Tabulka 23 | Statistické hodnocení T test – hladiny významnosti z dat tab. 17-22 |
| Tabulka 24 | Statistické hodnocení T test – vypočítané hodnoty z dat tab. 17-22 |
| Tabulka 25 | Pokusná skupina č. 1, liposomální gel s ftalocyaninem (ftalocyanin 2mg/ml), PDT za 10minut |
| Tabulka 26 | Pokusná skupina č. 2, liposomální gel s ftalocyaninem (ftalocyanin 4mg/ml), PDT za 10minut |

| | |
|------------|---|
| Tabulka 27 | Pokusná skupina č. 3, liposomální gel s ftalocyaninem (ftalocyanin 6mg/ml), PDT za 10minut |
| Tabulka 28 | Kontrolní skupina č. 1, bez léčby |
| Tabulka 29 | Kontrolní skupina č. 2, pouze PDT |
| Tabulka 30 | Kontrolní skupina č. 3, pouze liposomální gel s ftalocyaninem (ftalocyanin 6mg/ml) |
| Tabulka 31 | Statistické hodnocení T test – hladiny významnosti z dat tab. 25-30 |
| Tabulka 32 | Statistické hodnocení T test – vypočítané hodnoty z dat tab. 25-30 |
| Graf 1 | Výskyt zhoubných nádorů tlustého střeva a konečníku v České republice |
| Graf 2 | Srovnání incidence v České republice s ostatními zeměmi Evropy |
| Graf 3 | Výskyt karcinomu prsu v České republice |
| Graf 4 | Podíl jednotlivých příčin úmrtí na celkové mortalitě žen ve věkové kategorii 20-54 let |
| Graf 5 | Vliv časového intervalu mezi topickou aplikací preparátu s ftalocyaninem a následnou PDT na růst karcinomu colon (linie HCT-116) v podkoží nu/nu myší |
| Graf 6 | Vliv různých dávek ftalocyaninu v gelu a následné PDT na lidský karcinom colon (linie SW-620) |
| Graf 7 | Vliv liposomů Lampertheim (č. 613 a 614) na účinnost fotodynamické terapie karcinomu colon (linie SW-620) |
| Graf 8 | Vliv dávek ftalocyaninu (2, 3 a 4mg/ml) v gelu na účinnost fotodynamické terapie lidského karcinomu prsu (linie MDA-MB-231) |
| Graf 9 | Vliv různých dávek ftalocyaninu (2, 3 a 4mg/ml) na účinnost fotodynamické terapie lidského karcinomu prsu (linie MDA-MB-231) |
| Graf 10 | Vliv různých dávek ftalocyaninu (2,4,6 mg/ml) v liposomálním gelu na účinnost fotodynamické terapie lidského neuroblastomu (linie UKF-NB-3) |
| Graf 11 | Vliv různých dávek ftalocyaninu (2,4,6 mg/ml) v liposomálním gelu na účinnost fotodynamické terapie lidského neuroblastomu (linie UKF-NB-3) |

1. SEZNAM ZKRATEK A POJMŮ

| | |
|-------------------|---|
| ALA | kyselina 5- aminolevulová |
| AlPcOH | hydroxyhlinitý ftalocyanin |
| ATP | adenosin trifosfát |
| Ftc | ftalocyanin |
| Hp | hematoporfyrin |
| HpD | hematoporfyrinové deriváty |
| HVD | hydroxyetylvinyldeuteroporfyrin |
| LED | luminiscenční dioda |
| MDA-MB-231 | nádorová linie karcinomu mammy |
| NB | neuroblastom |
| PDT | fotodynamická terapie |
| Pp | protoporfyrin |
| ROS | reaktivní formy kyslíku |
| SW-620 | nádorová linie karcinomu tlustého střeva |
| TGI | inhibice nádorového růstu |
| TPPS ₄ | 5, 10, 15, 20 -tetrakis(4 -sulphonatophenyl) porphyrine |
| UKF-NB-3 | nádorová linie lidského neuroblastomu |

2. ÚVOD

Fotodynamická terapie PDT má dnes již pevné postavení v současné medicíně, především pak v onkologii. Jedná se o nový způsob léčby zhoubných nádorů, který spočívá v aktivaci barviva citlivého na světlo, které se selektivně nahromadí v nádoru a po osvětlení vhodným světelným zdrojem způsobí jeho nekrosu. Metoda je tedy vhodná k léčbě iniciálních karcinomů, nebo k relativně bezpečné paliativní léčbě některých dalších nádorů, jako například nádorů trávicí trubice či bronchiálního stromu.

Tato práce se zabývá sledováním účinku fotodynamické terapie s ftalocyaninem pro léčení těchto nádorů - lidský melanom, karcinom mammy a neuroblastom, v experimentech na nu/nu myších. Cílem bylo stanovit protinádorovou účinnost nového liposomálního preparátu s hydroxyhlinitým ftalocyaninem pro fotodynamickou terapii maligních nádorů. Současně jsem se snažil zjistit optimální časový interval mezi topickou aplikací liposomálního preparátu fotodynamickou terapií (PDT) a vlastním ozářením tumoru.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Fotodynamická terapie maligních nádorů

Fotodynamická terapie maligních nádorů (PDT) je diagnostická a léčebná metoda využívaná zejména při léčbě tumorů. Je to druh fotochemoterapie, který kromě světla a aplikované látky – fotosensitizeru, vyžaduje také přítomnost kyslíku. PDT je založena na principu selektivní akumulace fotosenzibilizující látky v nádoru a následném ozáření tumoru světelnou energií vhodné vlnové délky. Fotosensitizer se aplikuje trojím způsobem. Buďto je aplikován mastí obsahující příslušnou látku, nebo je zaveden injekčně a to buď intravenózně či intralezionálně. Koncentrace fotosensitizeru v postižených buňkách dosahuje optimální hodnoty v různých časech od 5 minut až po 72 hodin v závislosti na způsobu aplikace a druhu použité látky. Vlivem absorpce světla dochází ve fotosensitizeru ke vzniku excitovaných stavů, které v zásadě podléhají dvěma typům deaktivčních reakcí. Buď excitovaná forma fotosensitizeru reaguje přímo se substrátem za vzniku volných radikálů substrátu, nebo dochází k transferu energie z fotosensitizeru na kyslík a ke vzniku vysoce reaktivních singletových forem kyslíku, které jsou hlavní příčinou destrukce nádoru. Výsledným terapeutickým efektem je nekróza a apoptóza nádorových buněk.

3.2 Historie fotodynamické terapie

Již Řekové popisovali hojivé účinky slunečního světla a Herodotus byl označován za otce tzv. helioterapie. V roce 1990 německý student Raab zjistil, že světlo má letální účinek na nálevníky – trepky (paramecia), ke kterým byla přidána akridinová modř. Je to pravděpodobně první zmínka o využití fotoreakcí v biologických systémech. Pro léčení nádorů byly fotosensitizery poprvé použity v roce 1903 Teppeinerem a Jesionekem (1). Jednalo se o kožní nádory a jako fotosensitizer byl použit eosin. V roce

1904 Tappeiner a Jodelbauer (2) prokázali, že pro úspěšnou terapii je nezbytná přítomnost kyslíku a jako první použili pojem „fotodynamický efekt“.

Porfyrinům byla poprvé věnována pozornost v roce 1911. V roce 1924 Policard (3) pozoroval fluorescenci endogenních porfyrinů v sarkomech laboratorních zvířat a v lidských nádorech. Podobný jev pozorovali Korbler (4) u lidí, a to u operovaných karcinomů prsu a u řady dalších povrchově lokalizovaných nádorů. Teprve v roce 1942 Auler a Banzer (5) jako první aplikovali hematoporfyrin potkanům a zjistili, že se hromadí v transplantovaných nádorech, metastázách a částečně i v lymfatických uzlinách. Výsledky práce Aulera a Banzera (5) byly potvrzeny Figgem aj. (6), kteří prokázali, že hematoporfyrin se hromadí nejen v nádorové tkáni a lymfatických uzlinách, ale i v embryonální a regenerující tkáni hlodavců. O 12 let později byly Schwartzem, jak uvádí Lipson a Baldes (7) připraveny z hematoporfyrinu hematoporfyrinové deriváty (HpD). Lipson, Baldes a Olsen (8) ve svých pokusech na potkanech a myších zjistili, že HpD se akumuluje lépe do nádorové tkáně než „hrubý hematoporfyrin“ (32).

V současnosti jsou hematoporfyrinované deriváty pod různými firemními názvy již schváleny pro klinické využití v řadě zemí. Nevýhodou těchto fotosensitizerů první generace je, že se jedná o ne zcela definované látky, které po intravenózní aplikaci vyvolávají kožní fotosenzitivitu po solárním ozáření. Přesto HpD jsou pod firemními názvy – Photofrin (USA), Photocarcinorin (Čína), Photosan (Německo), Photogem (Rusko), Haematodrex (Bulharsko) používány v klinických studiích dodnes.

3.3 Efektivnost PDT

Efektivnost je ovlivněna faktory zahrnujícími:

- absorpční spektrum fotosensitizeru
- vlnovou délku aktivačního světla
- hloubku tkáňové penetrace světla

- biologickou odpověď tkáně na singletový kyslík

V ideálním případě by použitá vlnová délka měla odpovídat jednomu z absorpčních maxim fotosensitizeru. Jelikož tkáňová penetrace závisí na vlnové délce, musí být vlnové délky vybrány tak, aby dostatečné množství fotonů dosáhlo určitého místa zásahu. Ve viditelné oblasti spektra se vzrůstající vlnovou délkou roste i hloubka penetrace záření do tkání.

Dosud bylo studováno několik tříd fotosensitizerů včetně porfyrinů, chlorinů, ftalocyaninů a různých organických barviv.

Ideální fotosensitizer by měl vykazovat následující vlastnosti:

- selektivní vychytávání a retenci v patologické tkáni
- být fotolabilní, rychlé odstranění ze zdravé tkáně, především z kůže a očí
- možnost aktivace delšími, hlouběji penetrujícími vlnovými délkami
- nevýraznou toxicitu

3.4 Fotosensitizery

Aby bylo možné danou látku využít jako fotosensitizer, musí splňovat řadu předpokladů. Základní podmínkou je schopnost excitace s následným předáním energie okolním molekulám. Fotosensitizer musí být také minimálně toxický a nesmí mít mutagenní účinky. Důležitá je také jeho rozpustnost, stabilita v roztocích i v intracelulárním prostředí, schopnost selektivní akumulace v nádorové tkáni, schopnost vazby na různé typy přenašečů a v neposlední řadě i specifická akumulace na subcelulární úrovni, která definuje charakter, závažnost a rozsah poškození buněčných struktur v důsledku oxidativního stresu a tím i účinnost PDT.

První generaci fotosensitizerů představují deriváty hematoporfyrinu v různém stupni purifikace, jejichž systém konjugovaných dvojných vazeb způsobuje delokalizaci vazebných π -elektronů nad a pod rovinu molekuly. Hlavní absorbující složkou v těchto

molekulách jsou právě vazebné π -elektrony, nacházející se ve dvojných vazbách molekulárního skeletu. Absorpční spektra těchto látek se vyznačují maximy v oblasti optimální pro PDT (400 – 800 nm), přičemž nejvýraznější maximum je zpravidla způsobeno právě přechody $\pi \rightarrow \pi^*$. Energie přechodu $\pi \rightarrow \pi^*$ určující vlnovou délku absorpčního maxima se zvyšuje s rostoucí elektronovou hustotou nad rovinou molekuly. Různé vnější ligandy, případně koordinačně vázaný atom kovu ve středu molekulárního skeletu mohou působit přitažlivě či odpudivě na okolní π -elektrony, snižovat či zvyšovat výslednou elektronovou hustotu a posouvat tak absorpční maximum ke kratším či delším vlnovým délkám (9).

Hematoporfyrin a jeho deriváty (HpD) a jeho purifikovaná frakce s komerčním názvem Photofrin I. vzniká acetylací, neutralizací a následnou alkalickou hydrolyzou hematoporfyrinu. Výsledná směs obsahuje hematoporfyrin (Hp), hydroxyetylvinyldeuteroporfyrin (HVD), protoporfyrin (Pp) a také frakci dimerů a oligomerů tvořenou porfyriny navzájem propojenými esterovými, éterovými a C-C vazbami. HpD obsahuje přibližně 45% monomerů a dimerů a 55% oligomerních porfyrinů a právě oligomerní frakce se využívá k přípravě Photofrinu I, jenž je asi z 85% tvořen oligomery. Tato oligomerní frakce také způsobuje zvýšenou akumulaci Photofrinu I v nádorové tkáni, což umožnilo jeho využití také při diagnostice nádorových onemocnění. V dnešní době je velmi často používaným fotosensitizerem Photofrin II, který byl oficiálně schválen k léčbě nádorů močového měchýře, plic a jícnu v Kanadě, Holandsku a Japonsku. Fotosenzitizéry však mají řadu nevýhod. Jsou to směsi často ještě nedokonale prozkoumaných porfyrinů, což komplikuje identifikaci hlavních aktivních komponent zodpovědných za výsledný léčebný efekt a snižuje reproduibilitu výrobního procesu. Navíc jejich účinnost při tvorbě ROS je poměrně nízká a k jejich excitaci je třeba použít relativně krátkovlnné světlo, které špatně proniká tkáni. Fotosenzitizéry první generace se také vyznačují prodlouženou akumulací v kůži, která může trvat až do 8 týdnů po aplikaci.

Po intravenózní aplikaci vyvolávají kožní fotosenzitivitu po interakci se slunečním zářením. Souběžně se studiem hematoporfyrinových derivátů byl syntetizován v roce 1962 Winkelmanem meso-tetra-(para-sulfofenyl)-porfyrin (TPPS₄), který byl po chemické stránce přesně definovanou látkou, která byla v roztoku stabilní a dobře rozpustná. Autor sledoval distribuci TPPS₄ do Walkerova karcinosarkomu a ostatních orgánů u potkanů. Nalezl nejvyšší koncentraci TPPS₄ v nádoru, v ostatních orgánech a tkáních byla koncentrace nižší. Důležité však bylo, že koncentrace TPPS₄ v nádoru byla vyšší než koncentrace HpD (10,31,32).

Později však bylo zjištěno, že TPPS₄ má výrazný neurotoxický účinek, a proto byl další vývoj tohoto fotosensitizeru zastaven (34).

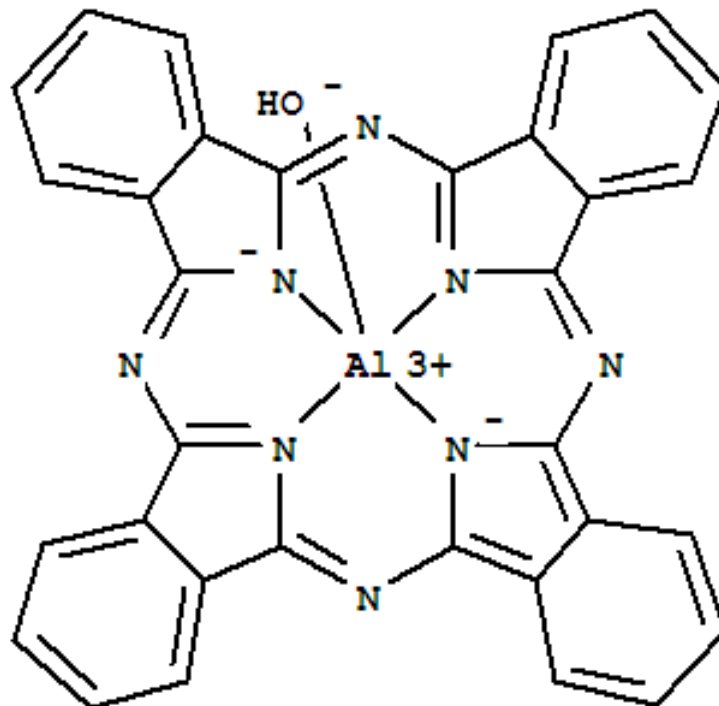
Fotosensitizer druhé generace jsou ověřovány a vyvíjeny od r. 1991. Jejich předností je nevýrazná kožní fotosenzitivita po léčbě. Patří sem např. chloriny (degradační produkty chlorofylu, které absorbují světlo o vlnových délkách 640 – 700 nm), 5- aminolevulová kyselina (ALA), ftalocyaniny, které nevyvolávají kožní fotosenzitivitu, mají aktivační vlnové délky v dlouhovlnné oblasti viditelného světla (630 – 700nm) s větší penetrací do kůže. Dále jsou ve stádiu vývoje pheoforbidy a pyropheoforbidy s absorpčním maximem při 665nm, které jsou izolovány z chlorofylu, dále pak purpuriny, naftalocyaniny a další. Další generaci fotosensitizerů budou zřejmě představovat na monoklonální protilátky vázané fotosensitizující látky, zvyšující selektivitu destrukce patologické tkáně (11,12)

Ftalocyaniny

Ftalocyaniny jsou barevné sloučeniny s širokým použitím v komerční sféře. Ftalocyaninový skelet je tvořen čtyřmi pyrrolovými jádry spojenými navzájem dusíkovými vazbami, v menší míře mohou být zastoupeny také methylenové můstky. Na vnější stranu každého pyrrolového jádra je navázána molekula benzenu. Toto

uspořádání molekuly způsobuje posun absorpčního spektra ftalocyaninu směrem k delším vlnovým délkám, což umožňuje excitaci těchto látek pomocí světla s vyšším průnikem tkání (okolo 680 nm).

Deriváty ftalocyaninů stejně jako chloriny jsou aktivovány červeným světlem a jejich hlavní předností je minimální kožní fototoxicita. Ftalocyaniny jsou syntetické porfyriny vykazující největší absorpci v dlouhovlnné oblasti viditelného spektra. Jsou chelovány zinkem, nebo hliníkem a tyto diamagnetické kovy zvyšují jejich fototoxicitu. Ftalocyaniny vstupují do buněk endocytózou a jsou lokalizovány v lysozomech. Dále se ftalocyaniny akumulují v mikrozomech a mitochondriích (13).



Obr. 1. Chemický vzorec ftalocyaninu hydroxyhlinitého

3.5 Mechanismus účinku PDT

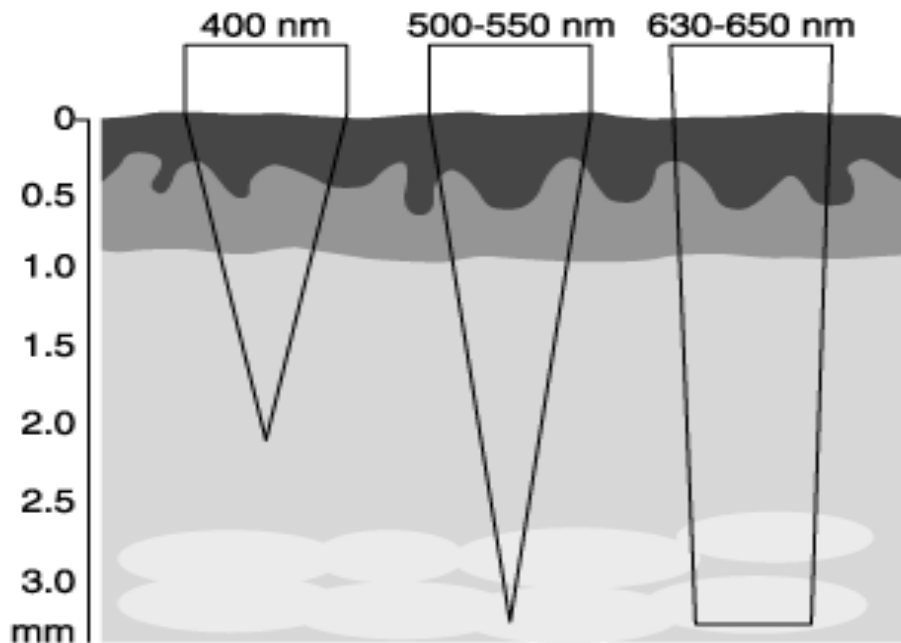
PDT má cytotoxický účinek na většinu nádorových buněk, bez ohledu na to, o jaký druh nádoru se jedná. Již za několik hodin po PDT dochází k poškození buněčných membrán, buňky se přestávají dělit a dochází k cytolýze. Je zasažena plazmatická membrána i membrány jádra, mitochondrií, lysozomů, Golgiho aparátu a endoplazmatického retikula. Poškození mitochondrií vede k inhibici elektron-transportních enzymů, inhibici oxidativní fosforylace a snížení hladiny ATP. PDT také zasahuje do systému kontroly buněčného cyklu a dochází i k apoptóze (programovaná smrt nádorových buněk). Poměrné zastoupení apoptotické a nekrotické smrti buněk závisí na typu nádoru, ale především na koncentraci fotosensitizeru a dávce ozáření. Nízké koncentrace fotosensitizeru a nízké dávky ozáření vyvolávají po PDT u 90% buněčné populace tumoru apoptózu, vyšší dávky ozáření a vyšší koncentrace fotosensitizeru vyvolávají poškození buněčných membrán s následnou nekrózou. Prakticky tedy dochází jak k apoptóze (spíše v hlubších vrstvách nádorové tkáně, kde je už dávka ozáření nižší než na povrchu) tak k nekróze nádorových buněk (14,15,32).

Reakce na PDT in vivo je poměrně rychlá. Po ozáření dochází ke vzniku nekrózy již za 24-48 hodin. V některých případech po období 1-2 týdnů začne nádor opět růst. Nárůst tumoru může být způsoben rezistencí nádorových buněk na PDT, a to z různých důvodů, např. hypoxie, akumulace fotosensitizeru v tumoru, nedostatečná koncentrace světelné energie v ozařované oblasti nebo kombinace výše uvedených důvodů. PDT působí také na cévní zásobení nádoru, dochází zde k poškození endoteliálních buněk následnému uvolnění koagulačních faktorů, což vede ke vzniku trombů v dané oblasti a zamezuje prokrvení nádoru (16).

3.6 Zdroje záření používané pro PDT

Úspěšné nastartování PDT závisí nejen na fotosensitizeru a hladině kyslíku v nádorové buňce, ale také na použitém světelném zdroji. Dříve se jako zdroje světla pro PDT používaly širokospektrální, speciálně upravené lampy s barevnými, popřípadě tepelnými filtry. Při jejich užití se nedosahovalo dostatečných příkonů zářivé energie v nádoru a docházelo též k ozáření okolních zdravých tkání. Proto se nyní používají lasery, které jsou zdrojem monochromatického, koherentního, lineárně polarizovaného a intenzivního světelného svazku s nastavitelným výkonem. V současné době se stále více prosazují lasery diodové, pro jejich menší rozměry a nižší pořizovací a provozní náklady. Svým zářivým výkonem a ve spojení se světlovou zaručují dostatečný zářivý příkon v místě nádoru a tím i vysokou fotodynamickou účinnost fotosensitizeru (17,18).

Použití PDT je omezeno především na tkáně, které můžeme ozářit přímo (nádory v ústní dutině, kožní nádory), nebo s použitím optického vlákna (nádory jícnu, tlustého střeva). Pro dosažení maximálního účinku PDT je třeba intenzivní svazek záření s dokonalou fokusací na cílovou oblast, aby nedošlo k navození fotodynamického jevu v okolní zdravé tkáni a k jejímu poškození (19,33).



Obr. 2. Penetrace záření o různých vlnových délkách do kůže

Lasery

Pro PDT se jako první laserové zdroje využívaly lasery argonové a lasery pracující v párách kovu (např. rtuť). Tyto zdroje umožňují dosažení vysokých výkonů a jsou schopny čerpat barvivové lasery, které poskytují vhodné vlnové délky pro excitaci porfyrinových sensitizérů. V dnešní době je používána celá řada dalších laserů – pevnolátkové lasery, diodové lasery, femtosekundové lasery a LED lasery (20).

Lampy

Na rozdíl od laserů produkují záření polychromatické, s nižšími hodnotami výkonu. Díky širokému spektru vlnových délek ale mohou být lampy použity v kombinaci s několika sensitizéry o různých absorpčních maximech. Lampy, díky nízké kvalitě

paprsku, jeho velkým rozměrům a malému výkonu, nemohou být v kombinaci s optickými vlákny použity. Díky těmto charakteristikám se používají většinou k léčbě rozsáhlejších kožních nádorů. Lampy jsou také cenově dostupnější než lasery a mají jednodušší obsluhu (20).

Wolframové a xenonové lampy

Zdrojem světla wolframové lampy je rozžhavené wolframové vlákno, jehož teplota dosahuje přibližně 3000 K. Při této teplotě dochází k emisi širokého spektra vlnových délek v rozmezí od UV oblasti až po blízkou infračervenou oblast (350 – 850 nm) a určitá vlnová délka může být ze spektra vybrána pomocí vhodných filtrů. Hustota výkonu lampy dosahuje až 250 mW/cm². U xenonových lamp je záření generováno pomocí elektrického oblouku, který vzniká mezi elektrodami v prostředí xenonových par. Tyto lampy září v rozsahu vlnových délek 300 – 1200 nm a dosahují hustoty výkonu až 800 mW/cm² (20).

Luminiscenční diody (LED)

Luminiscenční diody mohou emitovat záření v rozsahu vlnových délek 350-1100 nm, intenzita ozáření dosahuje přibližně 15 mW/cm² a emisní spektrum LED je na rozdíl od lamp charakteristické ostrým maximem s výrazně užším rozsahem vlnových délek. Mezi největší výhody použití LED patří především nízká cena a vysoká univerzálnost (20).

4. LIDSKÉ NÁDORY POUŽITÉ V EXPERIMENTECH – EPIDEMIOLOGICKÝ VÝSKYT

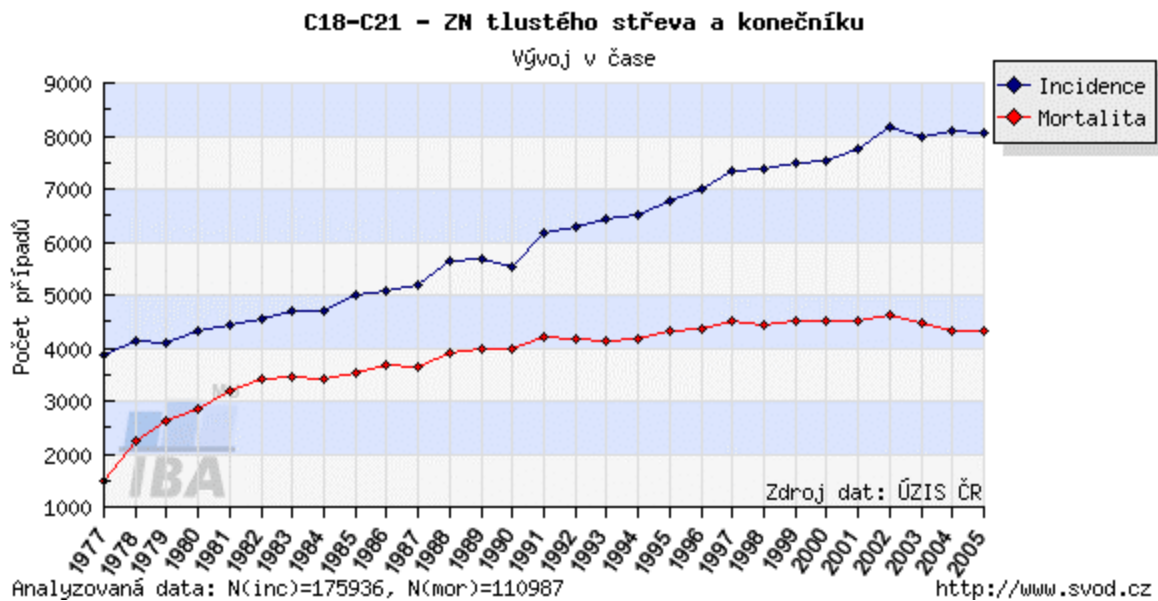
4.1 Karcinom tlustého střeva

Rakovina tlustého střeva a konečníku („kolorektální karcinom“) se v České republice vyskytuje mimořádně často. Při srovnání s jinými státy je u nás dokonce nejvyšší výskyt tohoto onemocnění. Každý rok je v České republice zhoubný nádor tlustého střeva či konečníku zjištěn asi u 7800 osob a je v České republice druhým nejčastějším nádorovým onemocněním u mužů i u žen (při vynechání některých nádorů kožních).

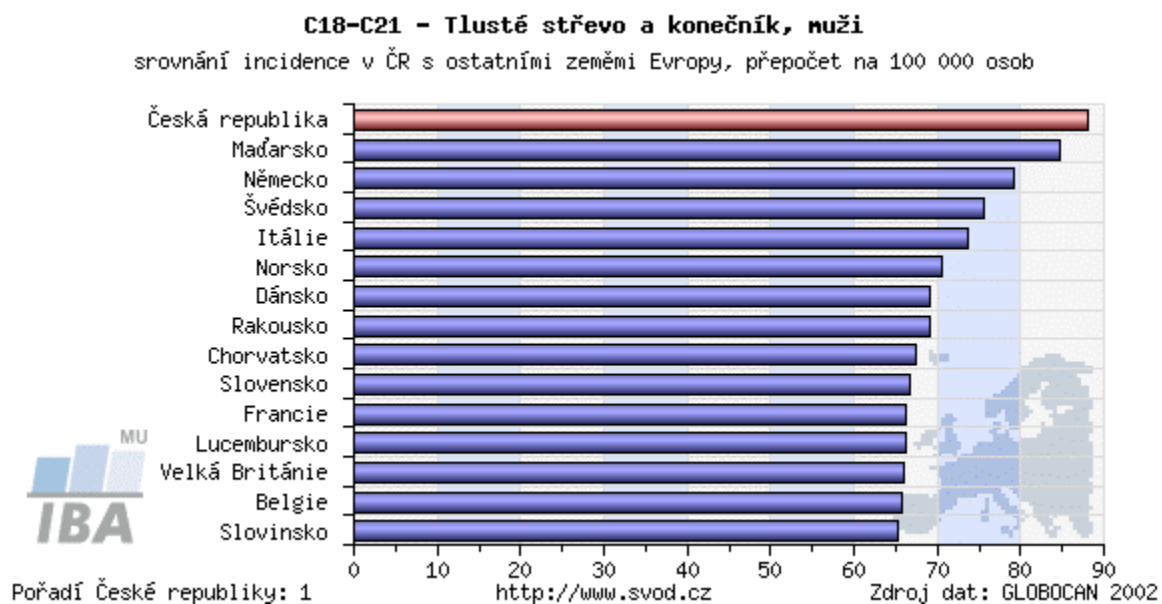
Výsledky klinických a epidemiologických studií ukazují na zvýšené riziko vzniku těchto nádorů při stravě s vysokým obsahem živočišných tuků, červeného masa a nízkým obsahem vlákniny. Naopak mezi protektivními faktory se objevuje nejen strava s vyšším obsahem vlákniny, ale také tělesný pohyb, příjem dostatečného množství vápníku, vitamínu D, kyseliny listové, metioninu, selenu, beta-karotenu a vitamínu C. Zvýšení rizika stravovacích návyků je způsobeno přítomnými genetickými poruchami. Existuje také přímá vazba mezi vzestupem tělesné váhy a vznikem nádorů tlustého střeva

Mezi rizikovými faktory bývají také uváděna chronická zánětlivá onemocnění střeva.

Naprostou většinu nádorů tlustého střeva tvoří adenokarcinomy, což jsou nádory vznikající z žlaznatých buněk střevní sliznice. V tlustém střevu se mohou vzácně vyskytovat i jiné zhoubné nádory, např. lymfom nebo karcinoid. Tyto nádory se léčí jiným způsobem než adenokarcinomy, často mají také jiné příznaky. Rakovina tlustého střeva a konečníku má mnoho společného, to vystihuje i společný název kolorektální karcinom. Jsou mezi nimi ale některé odlišnosti, především v léčbě (21).



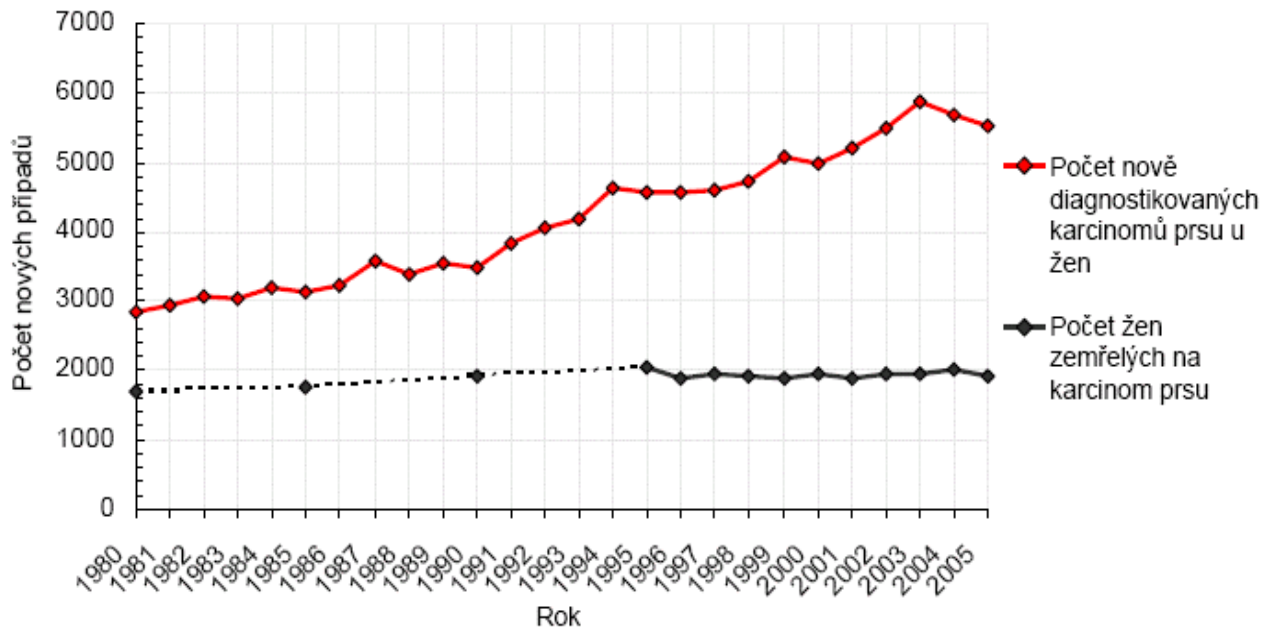
Graf 1: Výskyt zhoubných nádorů tlustého střeva a konečníku v České republice



Graf 2: Srovnání incidence v České republice s ostatními zeměmi Evropy

4.2 Karcinom mammy

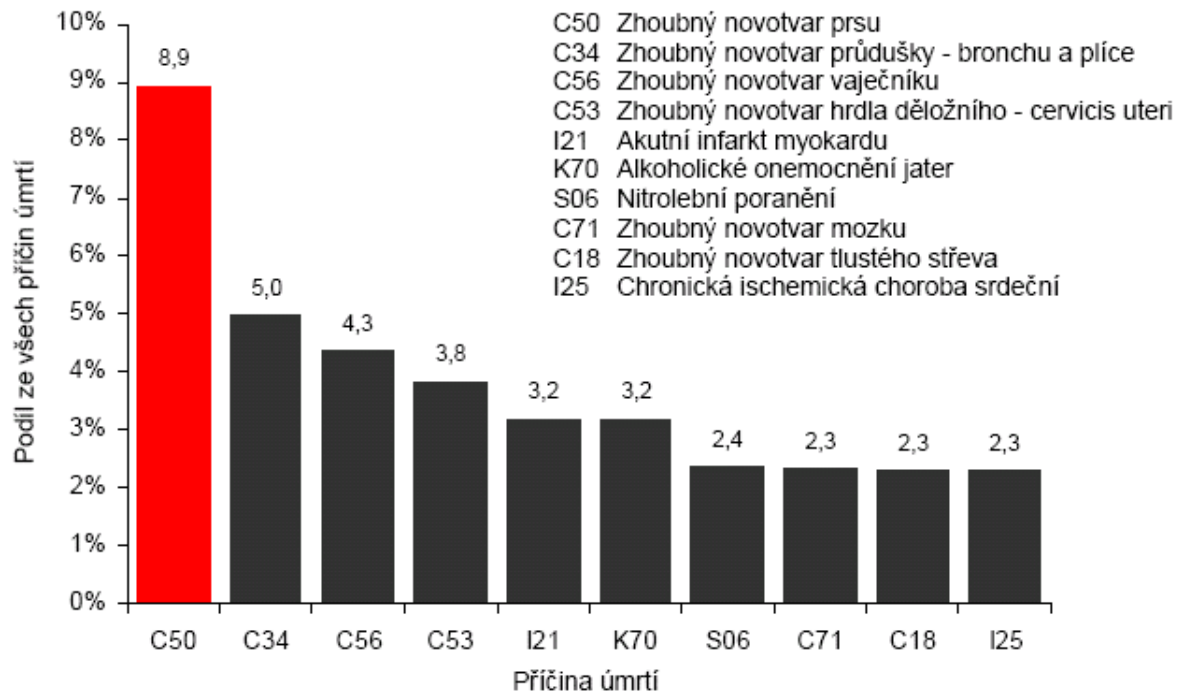
Karcinom prsu je nejčastější zhoubný nádor žen se stále rostoucí incidencí, výraznou heterogenitou a multifaktoriální etiologií. Karcinom mammy patří do skupiny hormonálně dependentních nádorů s významnou rolí estrogenů. Zhruba 10 % zhoubných nádorů prsu se vyskytuje familiárně a na jejich vzniku se podílí genetická predispozice. Vznik tohoto nádoru může být ovlivněn výživou a životním stylem ženy. V současné době nejefektivnější metodou včasné detekce nádorů prsu je mamografie. V naší zemi je každoročně diagnostikováno více než 5 500 nových případů onemocnění. Na následky karcinomu prsu zemře každý rok přibližně 2 000 českých žen a mezi příčinami úmrtí ve věkové kategorii 20 - 54 let tak zaujímá karcinom prsu první místo (22).



Zdroj: Národní onkologický registr, ÚZIS ČR

Graf 3: Výskyt karcinomu prsu v České republice

V grafu 3 jsou zobrazeny základní epidemiologické údaje o onemocnění karcinomem prsu v České republice v letech 1980-2005. Z křivek je zřejmý nárůst incidence onemocnění s náznakem stagnace v posledních letech při současné dlouhodobé stagnaci mortality (počtu zemřelých).



Zdroj: Český statistický úřad

Graf 4: Podíl jednotlivých příčin úmrtí na celkové mortalitě žen ve věkové kategorii 20-54 let

Z grafu je zřejmé, že v této významné věkové kategorii umírá z důvodu onemocnění karcinomem prsu daleko nejvýznamnější podíl žen, a to přibližně každá desátá žena ze všech zemřelých. Možnosti prevence vzniku onemocnění na individuální úrovni jsou omezené. Vzhledem k tomu, že u tohoto onemocnění nebyl dosud poznán rizikový faktor vysvětlující jeho příčinu s uspokojivou spolehlivostí (jako je tomu např. u nádorů plic), jedinou možností boje je včasná diagnostika a úspěšná léčba. Možnosti snížení

mortality onemocnění jsou organizačně náročné a nákladné, ale možné. Od září roku 2002 se Česká republika připojila k většině evropských zemí a zahájila celoplošný mamografický screening, umožňující ženám ve věku 45 - 69 let pravidelná preventivní vyšetření, s cílem zvýšení podílu časného záchytu onemocnění v populaci (23).

4.3 Neuroblastom

Neuroblastom (NB) je nejčastější extrakraniální solidní nádor vyskytující se u dětí. Je charakteristický velmi širokým spektrem klinických projevů, schopností časně generalizovat a značně rozdílnou prognózou u lokalizovaných a generalizovaných forem, kojenců a dětí starších jednoho roku. Diseminované formy NB jsou častější, incidence je přibližně 1 : 100 tisícům dětí, resp. jeden NB na sedm tisíc novorozenců, což představuje v České republice záchyt 12 až 15 dětí s nově diagnostikovaným onemocněním. Jeho výskyt je převážně sporadický, ale u jednoho až dvou procent případů je výskyt familiární. Etiologie není známa. Nádor vychází z buněk neurální lišty a nejčastěji vychází z nadledviny nebo paraspinálních sympatických ganglií.

Symptomatologie závisí na lokalizaci primárního nádoru a rozsahu onemocnění. Lokalizovaný NB je velmi často asymptomatický, zatímco generalizované onemocnění se obvykle projevuje celkovými příznaky: horečkou, pocením a bolestmi kostí postižených metastatickým procesem (24).

5. Liposomy pro topickou a transdermální aplikaci léčiv – součást topických preparátů pro PDT

Liposomy jsou mikročástice dopravující výživné látky hluboko do podkoží, čili nosiče účinných látek. Jsou to uměle připravené uzavřené váčky tvořené lipidovou dvojvrstvou a vnitřním izolovaným kompartmentem obsahující vodný roztok. Vznikají například působením ultrazvuku na vodnou suspensi vhodných polárních lipidů. Nejčastěji se pro tento účel používá lecithin z vaječného žloutku. Liposomy mají obvykle průměr 1-2 μm a mohou být tvořeny i několika koncentrickými membránovými váčky. Pokud liposom vzniká ve vodném prostředí, obsahujícím rozpustné složky (soli, bílkoviny), jsou tyto složky uzavřeny do vnitřního prostředí váčku. Toho se využívá pro transport některých léčiv do buněk.

Liposomy jsou obvykle přidávány do gelů i emulzí. Pokud jsou v emulzích, dochází k reakcím mezi liposomem a emulgátorem emulze, který má přirozeně amfifilní charakter. Dochází tak k rozrušení struktury liposomu a můžeme tak předpokládat, že obvykle nabízené přípravky po zhruba 1 roce neobsahují už žádné liposomy, takže jejich účinnost by neměla být delší než právě 1 rok. K odbourávání liposomů dochází při oxidaci kyslíkem, hydrolýzou, nebo dochází k seskupování liposomů do větších útvarů.

Liposomální lékové formy pro topické využití mají dlouhou tradici. První využití liposomů v aplikaci léčiv na kůži bylo popsáno Mezeim a Gulasekharamem na počátku 90. let. (25,26) V následujících desetiletích byly liposomy a další vezikulární formy zavedeny do mnoha dermatologických a kosmetických přípravků s cílem zlepšit transport lokálně aplikovaných léčiv do hlubokých vrstev kůže, a tím zvýšit jejich účinnost. Většina lipofilních léčiv zabudovaných do liposomů se ukládá v epidermis a vytváří poměrně vysoké koncentrace ve stratum corneum. Vliv liposomální formy na transport léčiv do cílové tkáně je nutno posuzovat ze dvou aspektů: prvním z nich je

retenční účinek, tj. schopnost akumulovat látku ve stratum corneum. Druhým aspektem je zesilující účinek, tj. zvýšení penetrace látky do stratum corneum. Tento efekt je velmi silně vyznačen u některých látek, jako jsou makromolekulární substance nebo nefrakcionovaný heparin, které jinak pro svůj elektrický náboj nebo velikost molekuly penetrují minimálně. Mechanismus tohoto „enhancementu“ zatím není přesně znám. Efekt je závislý především na lipidovém složení lipozomu, na jeho lamelaritě a povrchovém náboji.

Velikost částic má zřejmě pro penetraci léčiva méně významnou úlohu. Zdá se, že menší částice o velikosti < 200 nm paradoxně pronikají do kůže hůře než lipozomy o větším průměru (27). Příčinou je zřejmě rychlá dezintegrace malých lipozomů při kontaktu s kožním povrchem a vytvoření lipidového filmu, který pak omezuje transport hydrofilních částic do kůže.

Studie mechanismu účinku lipozomů na molekulární úrovni ukázaly, že v kontaktu s kožním povrchem dochází k „budding“ (pučení) lipozomální membrány, které zřejmě způsobuje částečné mísení molekul lipidní dvojvrstvy lipozomu s intracelulárními lipidy ve stratum corneum. Tím dochází ke změně hydratace, a tudíž i struktury lipidových lamel. Následně se zvyšuje permeace lipofilních léčiv do stratum corneum a difuze hydrofilních léčiv do mezilamelárních prostor. Někteří autoři rovněž předpokládají, že určité typy lipozomů s dostatečně deformovatelnou strukturou mohou pronikat přes stratum corneum v intaktní formě, k jejich dezintegraci by pak docházelo až v hlubších vrstvách kůže (28). Ze studie Vermy a kol. (29) vyplynula další zajímavá skutečnost, že lipozomy složené z fosfatidylcholinu nejen zvyšují transport léčiv enkapsulovaných do jejich nitra, ale i jejich prostá přítomnost v lékové formě významně zvyšuje průnik volných neinkorporovaných hydrofilních léčiv do hlubších vrstev kůže.

Kožní povrch je hlavním místem pro topickou a transdermální aplikaci léčiv. Hluboká kožní vrstva stratum corneum však představuje účinnou bariéru pro průnik

xenobiotik včetně léčiv přes neporušenou kůži do vnitřního prostředí. Hledání cest ke zvýšení kožní propustnosti pro topické přípravky vedlo k širšímu využití vezikulárních lékových forem, které přinesly značný pokrok zprvu v oblasti dermatologických a kosmetických přípravků a později i v dalších oborech. Mezi základní vezikulární formy patří liposomy. Lipozomální formy zlepšují účinnost aplikovaných látek tím, že zvyšují schopnost látky penetrovat do stratum corneum a ovlivňují také retenci neboli akumulaci léčiva v této vrstvě. Průnik do hlubokých vrstev kůže zvyšuje i samotná přítomnost lipozomů nebo fosfatidylcholinu v léčivém přípravku (28,29).

6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6.1 ÚVOD

Cílem práce bylo stanovit protinádorovou účinnost nového liposomálního preparátu s hydroxyhlinitým ftalocyaninem pro fotodynamickou terapii maligních nádorů. Současně jsem se snažil zjistit optimální časový interval mezi topickou aplikací liposomálního preparátu fotodynamickou terapií (PDT) a vlastním ozářením tumoru. Dále jsem stanovoval optimální dávku ftalocyaninu v liposomálním gelu tak, aby PDT byla co nejúčinnější.

6.2 Materiál a metody – společné pro všechny pokusy

6.2.1 Hydroxyhlinitý ftalocyanin

Pro pokusy byl použit jako fotosensitizer hydroxyhlinitý ftalocyanin, který byl připraven ve Výzkumném ústavu organických syntéz v Pardubicích – Rybitví. Fúzování ftalocyaninu s liposomy a následné převedení do gelu bylo prováděno ve Fyziologickém ústavu AVČR. Gel byl připraven v lékárně nemocnice Motol a liposomy ve fyziologickém ústavu AV z dováženého lecitinu (LECITHINUM EX OVO, Lipoid, Mannheim). Připravené vzorky byly dodány na ÚBI/ 1. LF UK Praha.

6.2.2 Zvířata

K pokusům byly použity outbrední nu/nu myši kmene CD-1, samice, tělesné hmotnosti 16-18g (ANLAB s.r.o.). Myši byly ustájeny v IVC boxech v centrálním zvěřinci 1. LF, podestýlány radiačně sterilizovanou podestýlkou (SAWI), krmeny radiačně sterilizovanou dietou Ssniff (ANLAB s.r.o.) a napájeny autoklávovanou vodou ad libitum.

6.2.3 Nádorové linie

Myším pokusných a kontrolních skupin byly subkutánně transplantovány lidské nádorové buňky v množství 10^7 /myš. Jednotlivé nádorové linie (ca colon – linie HCT - 116, ca colon – linie SW -620, ca mammy – linie MDA-MB-231, neuroblastom UKF-NB-3) byly nakoupeny z evropské nádorové banky Health Protection Agency Culture Collection, UK.

6.2.4 Vlastní postup

Když tumory dorostly do objemu cca $0,1 - 0,17 \text{ cm}^3$, byl na oblast s nádorem topicky aplikován liposomální preparát s ftalocyaninem. Za 10 minut po topické aplikaci preparátu byl nádor ozářen xenonovou lampou (Preciosa a.s.) o vlnové délce 600-700nm, celkovou energií 80 J/cm^2 .

Z rozměrů nádorů v jednotlivých časových intervalech byly vypočteny objemy tumorů podle vzorce $V = a \times b^2 \times \pi/6$ a vytvořeny růstové křivky tumorů (30).

Vyhodnocení pokusu

Bylo provedeno na základě srovnání růstových křivek tumorů u jednotlivých experimentálních skupin s kontrolní skupinou a na konci pokusu byla vypočtena % inhibice nádorového růstu tzv. % TGI proti kontrolní skupině.

$$\% TGI = 1 - \frac{\text{průměrný objem nádorů léčené skupiny}}{\text{průměrný objem nádorů kontrolní skupiny}} \cdot 100$$

7. VÝSLEDKY

7.1. Stanovení optimálního časového intervalu mezi aplikací fotosensitizeru a ozáření lidského karcinomu colon (linie HCT -116)

V tomto pokuse byl stanovován optimální časový interval mezi aplikací fotosensitizeru a ozáření tumoru (ca colon – linie HCT – 116). Byl zkoušen časový interval 10 minut a 30minut, což vyplynulo z distribučních studií, kdy se stanovoval obsah ftalocyaninu v nádorech a jednotlivých orgánech a tkáních. Koncentrace ftalocyaninu v liposomálním gelu byla pouze 1mg/ml. Tento ftalocyanin (výrobce VÚOS a.s. Pardubice- Rybitví) po krátké době v organismu polymeruje s ostatními molekulami ftalocyaninu a tím se stává neúčinným (osobní sdělení RNDr. Stanislav Nešpůrek, DrSc. 2011)

Uspořádání pokusu:

Každé myši bylo subkutánně aplikováno 10^7 nádorových buněk, když tumory dosáhly velikosti cca $0,2 \text{ cm}^3$, byly myši rozděleny do jednotlivých skupin.

Pokusná skupina č. 1: lidský karcinom colon linie HCT -116 + ftalocyanin, aplikován lokálně, topicky, AlPcOH v dávce 0,2ml gelu (koncentrace ftalocyaninu 1mg/1ml), PDT po 10 minutách, oblast s nádorem byla ozářena xenonovou lampou o vlnové délce 600-700 nm s celkovou energií 80J dopadající na jednotku plochy cm^2 .

Pokusná skupina č. 2: lidský karcinom colon linie HCT -116 + ftalocyanin, aplikován lokálně, topicky, AlPcOH v dávce 0,2ml gelu (koncentrace ftalocyaninu 1mg/1ml),

PDT po 30 minutách, oblast s nádorem byla ozářena xenonovou lampou o vlnové délce 600-700 nm s celkovou energií 80J dopadající na jednotku plochy cm^2 .

Kontrolní skupina č. 1: bez PDT

Kontrolní skupina č. 2: PDT bez ftalocyaninu

Výsledky:

Výsledky pokusu jsou znázorněny v tab. 1-4 a na grafu 5. Z pokusu vyplynulo, že časový interval 10minut mezi aplikací fotosensitizeru a ozářením tumoru (PDT) je statisticky významně vhodnější a účinnější v terapii ca colon (linie HCT-116), než interval 30minut. Dávka ftalocyaninu v liposomální gelu 1mg/ml je pro tuto terapii příliš nízká. Získané výsledky byly statisticky hodnoceny nepárovým Studentovým t-testem tab. 5,6.

7.1.1 Tabulky

| Myš číslo | dny pokusu/objem tumoru (cm^3) | | | | | | | | |
|---------------|---|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | 1 | 4 | 8 | 12 | 16 | 20 | 24 | 28 | 32 |
| 1 | 0,166 | 0 | 0,179 | 0,212 | 0,264 | 0,397 | 0,452 | 0,657 | 0,732 |
| 2 | 0,195 | 0 | 0 | 0,092 | 0,15 | 0,346 | 0,418 | 0,473 | 0,572 |
| 3 | 0,179 | 0 | 0,243 | 0,256 | 0,294 | 0,353 | 0,486 | 0,548 | 0,551 |
| 4 | 0,221 | 0 | 0,124 | 0,126 | 0,179 | 0,179 | 0,307 | 0,383 | 0,454 |
| 5 | 0,238 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 0,218 | 0 | 0 | 0,113 | 0,188 | 0,216 | 0,32 | 0,436 | 0,491 |
| 7 | 0,254 | 0,085 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 8 | 0,192 | 0 | 0,098 | 0,197 | 0,216 | 0,333 | 0,382 | 0,452 | 0,529 |
| 9 | 0,205 | 0,046 | 0,113 | 0,155 | 0,265 | 0,382 | 0,448 | 0,549 | 0,635 |
| 10 | 0,192 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,058 | 0,113 | 0,179 |
| průměr | 0,206 | 0,013 | 0,076 | 0,115 | 0,156 | 0,221 | 0,287 | 0,361 | 0,414 |
| S.D. | 0,026 | 0,028 | 0,085 | 0,088 | 0,11 | 0,158 | 0,184 | 0,225 | 0,247 |

Tabulka 1 Pokusná skupina č. 1, ftalocyanin 1mg/ml, PDT za 10minut

| Myš číslo | dny pokusu/ objem tumoru (cm ³) | | | | | | | | |
|---------------|---|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | 1 | 4 | 8 | 12 | 16 | 20 | 24 | 28 | 32 |
| 1 | 0,221 | 0,256 | 0,378 | 0,472 | 0,523 | 0,606 | 0,664 | 0,728 | 0,83 |
| 2 | 0,218 | 0,179 | 0,269 | 0,352 | 0,496 | 0,575 | 0,664 | 0,796 | 0,905 |
| 3 | 0,179 | 0,179 | 0,221 | 0,268 | 0,302 | 0,382 | 0,429 | 0,472 | 0,523 |
| 4 | 0,205 | 0,155 | 0,192 | 0,205 | 0,268 | 0,321 | 0,382 | 0,403 | 0,472 |
| 5 | 0,179 | 0,179 | 0,268 | 0,359 | 0,472 | 0,635 | 0,796 | 0,943 | 1,149 |
| 6 | 0,238 | 0,238 | 0,285 | 0,321 | 0,403 | 0,523 | 0,635 | 0,728 | 0,83 |
| 7 | 0,218 | 0,092 | 0,132 | 0,192 | 0,319 | 0,416 | 0,488 | 0,601 | 0,728 |
| 8 | 0,192 | 0,144 | 0,192 | 0,235 | 0,321 | 0,448 | 0,606 | 0,796 | 0,943 |
| 9 | 0,192 | 0,132 | 0,166 | 0,221 | 0,268 | 0,285 | 0,34 | 0,403 | 0,523 |
| 10 | 0,218 | 0,218 | 0,218 | 0,285 | 0,34 | 0,382 | 0,472 | 0,549 | 0,635 |
| průměr | 0,206 | 0,177 | 0,232 | 0,291 | 0,371 | 0,457 | 0,548 | 0,642 | 0,754 |
| S.D. | 0,019 | 0,047 | 0,067 | 0,082 | 0,091 | 0,115 | 0,139 | 0,175 | 0,207 |

Tabulka 2 Pokusná skupina č. 2, ftalocyanin 1mg/ml, PDT za 30minut

| Myš číslo | dny pokusu/objem tumoru (cm ³) | | | | | | | | |
|---------------|--|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | 1 | 4 | 8 | 12 | 16 | 20 | 24 | 28 | 32 |
| 1 | 0,184 | 0,307 | 0,509 | 0,657 | 0,796 | 0,837 | 0,923 | 1,211 | 1,432 |
| 2 | 0,218 | 0,321 | 0,472 | 0,606 | 0,796 | 0,865 | 0,943 | 1,149 | 1,336 |
| 3 | 0,192 | 0,268 | 0,34 | 0,448 | 0,606 | 0,791 | 0,905 | 1,193 | 1,238 |
| 4 | 0,221 | 0,382 | 0,496 | 0,606 | 0,728 | 0,83 | 1,023 | 1,288 | 1,488 |
| 5 | 0,179 | 0,285 | 0,336 | 0,496 | 0,628 | 0,791 | 0,886 | 0,98 | 1,193 |
| 6 | 0,205 | 0,397 | 0,496 | 0,654 | 0,865 | 0,943 | 1,193 | 1,383 | 1,642 |
| 7 | 0,254 | 0,352 | 0,403 | 0,519 | 0,692 | 0,865 | 1,063 | 1,336 | 1,595 |
| 8 | 0,195 | 0,397 | 0,472 | 0,628 | 0,865 | 1,023 | 1,149 | 1,326 | 1,486 |
| 9 | 0,179 | 0,321 | 0,454 | 0,664 | 0,83 | 1,056 | 1,149 | 1,288 | 1,539 |
| 10 | 0,218 | 0,402 | 0,661 | 0,755 | 0,779 | 0,943 | 1,108 | 1,395 | 1,635 |
| průměr | 0,205 | 0,343 | 0,464 | 0,603 | 0,759 | 0,894 | 1,034 | 1,255 | 1,458 |
| S.D. | 0,022 | 0,047 | 0,089 | 0,087 | 0,088 | 0,088 | 0,108 | 0,119 | 0,15 |

Tabulka 3 Kontrolní skupina č. 1, bez PDT

| Myš číslo | dny pokusu/objem tumoru (cm ³) | | | | | | | | |
|---------------|--|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | 1 | 4 | 8 | 12 | 16 | 20 | 24 | 28 | 32 |
| 1 | 0,205 | 0,323 | 0,466 | 0,635 | 0,865 | 1,023 | 1,193 | 1,336 | 1,488 |
| 2 | 0,254 | 0,378 | 0,509 | 0,654 | 0,791 | 0,969 | 1,145 | 1,282 | 1,383 |
| 3 | 0,179 | 0,282 | 0,416 | 0,59 | 0,721 | 0,943 | 1,063 | 1,193 | 1,288 |
| 4 | 0,195 | 0,321 | 0,496 | 0,628 | 0,83 | 0,98 | 1,063 | 1,211 | 1,431 |
| 5 | 0,205 | 0,352 | 0,59 | 0,664 | 0,796 | 0,934 | 1,063 | 1,288 | 1,539 |
| 6 | 0,218 | 0,34 | 0,448 | 0,572 | 0,728 | 0,865 | 0,969 | 1,104 | 1,238 |
| 7 | 0,205 | 0,294 | 0,385 | 0,496 | 0,59 | 0,728 | 0,886 | 0,98 | 1,186 |
| 8 | 0,179 | 0,335 | 0,472 | 0,601 | 0,779 | 0,943 | 1,023 | 1,288 | 1,595 |
| 9 | 0,192 | 0,309 | 0,385 | 0,509 | 0,779 | 0,9 | 0,104 | 1,282 | 1,434 |
| 10 | 0,221 | 0,382 | 0,496 | 0,628 | 0,75 | 0,886 | 0,934 | 1,238 | 1,65 |
| průměr | 0,205 | 0,332 | 0,466 | 0,598 | 0,763 | 0,917 | 1,044 | 1,22 | 1,423 |
| S.D. | 0,021 | 0,031 | 0,059 | 0,055 | 0,071 | 0,077 | 0,09 | 0,101 | 0,145 |

Tabulka 4 Kontrolní skupina č. 2, PDT bez ftalocyaninu

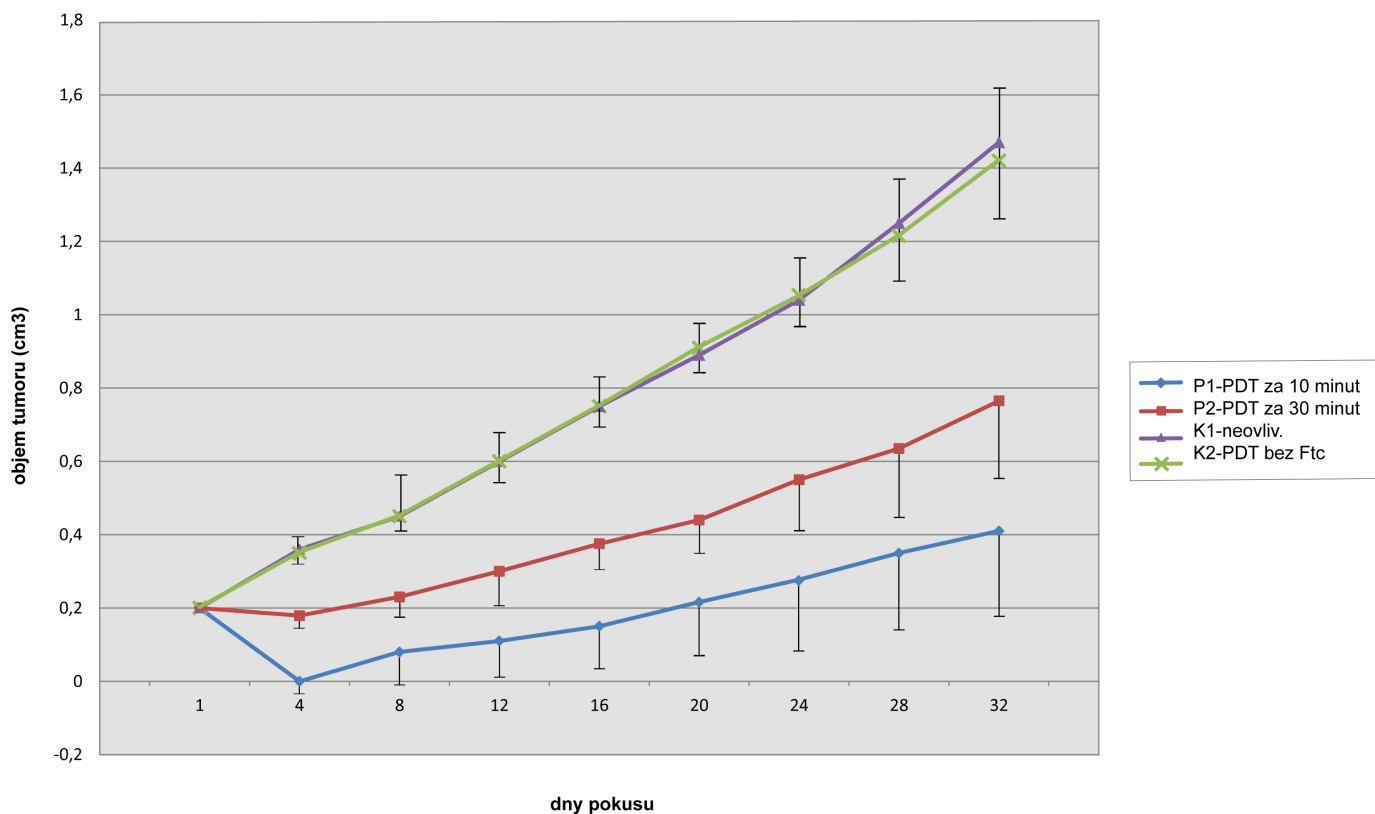
7.1.2 Statistické a grafické vyhodnocení

| | 1 | 4 | 8 | 12 | 16 | 20 | 24 | 28 | 32 |
|------|---|---|---|----|----|----|----|----|----|
| 1:02 | N | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 1:03 | N | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 1:04 | N | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 2:03 | N | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 2:04 | N | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 3:04 | N | N | N | N | N | N | N | N | N |

Tabulka 5 Statistické hodnocení T test - hladiny významnosti z dat tab. 1-4

| | 1 | 4 | 8 | 12 | 16 | 20 | 24 | 28 | 32 |
|------|---------|---------|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1:02 | 1,0000 | 0,0000 | 0,0004 | 0,0004 | 0,0003 | 0,0022 | 0,0035 | 0,0089 | 0,0056 |
| 1:03 | 0,8964 | 2,172E- | 1,979E- | 6,428E-10 | 6,428E-10 | 2,222E-08 | 3,412E-08 | 6,145E-08 | 1,949E-08 |
| 1:04 | 0,09502 | 1,27E27 | 4,254E- | 5,397E-10 | 3,903E-10 | 2,338E-08 | 5,032E-08 | 1,561E-07 | 3,371E-08 |
| 2:03 | 0,205 | 6,619E- | 9,213E- | 3,413E-07 | 3,095E-08 | 7,372E-08 | 2,311E-07 | 2,002E-07 | 2,953E-07 |
| 2:04 | 0,218 | 5,194E- | 3,406E- | 8,94E-08 | 1,126E-08 | 588E-08 | 1,611E-07 | 4,829E-07 | 5,642E-07 |
| 3:04 | 0,9388 | 0,5468 | 0,9470 | 0,8721 | 0,9081 | 0,5683 | 0,8318 | 0,5146 | 0,6190 |

Tabulka 6 Statistické hodnocení T test - vypočítané hodnoty z dat tab. 1-4



Graf 5 Vliv časového intervalu mezi topickou aplikací preparátu s ftalocyaninem a následnou PDT na růst karcinomu colon (linie HCT-116) v podkoží nu/nu myši

7. 2. Vliv různých dávek ftalocyaninu v liposomálním ftalocyaninovém preparátu na účinnost fotodynamické terapie karcinomu colon (linie SW-620)

V tomto pokuse byl testován vliv různých dávek ftalocyaninu v liposomálním preparátu na účinnost fotodynamické terapie lidského karcinomu colon (SW-620). Současně byl zjišťován rozdíl v použití liposomů č. 608, který byl vyrobený v Akademii věd České republiky a liposomů 613 a 614 Lampertheim vyrobených v SRN.

Uspořádání pokusu:

Pokusná skupina č. 1: lidský karcinom ca colon (SW-620), liposom č. 608, ftalocyanin 1,8mg/ml + PDT

Pokusná skupina č. 2: lidský karcinom ca colon (SW-620), liposom č. 608, ftalocyanin 4,5mg/ml + PDT

Pokusná skupina č. 3: lidský karcinom ca colon (SW-620), liposom č. 608, ftalocyanin 6,0mg/ml + PDT

Pokusná skupina č. 4: lidský karcinom ca colon (SW-620), liposom č. 608, ftalocyanin 9,0mg/ml + PDT

Pokusná skupina č. 5: lidský karcinom ca colon (SW-620), liposom č. 608, ftalocyanin 18,0mg/ml + PDT

Pokusná skupina č. 6: lidský karcinom ca colon (SW-620), liposom č. 613 Lampertheim, ftalocyanin 18,0mg/ml + PDT

Pokusná skupina č. 7: lidský karcinom ca colon (SW-620), liposom č. 614 Lampertheim, ftalocyanin 18,0mg/ml + PDT

Kontrolní skupina: lidský karcinom ca colon (SW-620) – bez léčby

Celkem bylo testováno 5 dávek ftalocyaninu, kontrolní skupina byla bez liposomů a ftalocyaninů. Každá pokusná skupina zahrnovala 5 myší (celkem 40).

Výsledky:

Výsledky jsou znázorněny v tabulkách 7-14 a grafech 6, 7. Z výsledků vyplynulo, že preparát s nízkým obsahem ftalocyaninu (1,8;4,5 a 6mg/ml) byl méně účinný v terapii lidského karcinomu ca colon. Se vzrůstajícím obsahem ftalocyaninu se účinnost PDT statisticky významně zvyšovala. Získané výsledky byly statisticky hodnoceny nepárovým Studentovým t-testem tab. 15,16.

7.2.1 Tabulky

| Myš číslo | den pokusu | | | | | | | | |
|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | 1 | 4 | 8 | 11 | 15 | 18 | 22 | 26 | 30 |
| 1 | 0,333 | 0,112 | 0,245 | 0,312 | 0,628 | 0,745 | 1,442 | 2,062 | 5,327 |
| 2 | 0,302 | 0,302 | 0,472 | 0,692 | 0,83 | 1,149 | 1,488 | 2,144 | 4,291 |
| 3 | 0,352 | 0,144 | 0,235 | 0,549 | 0,692 | 0,943 | 1,488 | 2,805 | 5,078 |
| 4 | 0,256 | 0,122 | 0,378 | 0,419 | 0,732 | 0,837 | 1,622 | 2,423 | 4,478 |
| 5 | 0,319 | 0,186 | 0,294 | 0,402 | 0,684 | 0,952 | 1,705 | 3,046 | 5,174 |
| průměr | 0,312 | 0,173 | 0,325 | 0,475 | 0,712 | 0,925 | 1,549 | 2,496 | 4,87 |
| S.D. | 0,033 | 0,069 | 0,089 | 0,132 | 0,065 | 0,135 | 0,099 | 0,378 | 0,408 |

Tabulka 7 Pokusná skupina č. 1, ftalocyanin 1,8mg/ml, liposom 608

| Myš číslo | den pokusu | | | | | | | | |
|---------------|--------------|----------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | 1 | 4 | 8 | 11 | 15 | 18 | 22 | 26 | 30 |
| 1 | 0,382 | 0 | 0,148 | 0,382 | 0,522 | 0,814 | 1,683 | 2,12 | 3,851 |
| 2 | 0,319 | 0,319 | 0,359 | 0,403 | 0,549 | 0,664 | 0,943 | 1,288 | 1,65 |
| 3 | 0,302 | 0,103 | 0,192 | 0,34 | 0,635 | 0,865 | 1,436 | 2,074 | 3,403 |
| 4 | 0,302 | 0 | 0,197 | 0,385 | 0,661 | 0,981 | 1,949 | 2,479 | 3,589 |
| 5 | 0,268 | 0 | 0,218 | 0,279 | 0,454 | 0,732 | 1,432 | 2,146 | 2,948 |
| průměr | 0,315 | 0 | 0,223 | 0,358 | 0,564 | 0,811 | 1,489 | 2,021 | 3,088 |
| S.D. | 0,038 | 0 | 0,072 | 0,044 | 0,076 | 0,109 | 0,333 | 0,394 | 0,777 |

Tabulka 8 Pokusná skupina č. 2, ftalocyanin 4,5mg/ml, liposom 608

| Myš číslo | den pokusu | | | | | | | | |
|---------------|--------------|----------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | 1 | 4 | 8 | 11 | 15 | 18 | 22 | 26 | 30 |
| 1 | 0,256 | 0 | 0,122 | 0,215 | 0,345 | 0,614 | 0,987 | 1,22 | 1,615 |
| 2 | 0,352 | 0 | 0,118 | 0,23 | 0,382 | 0,549 | 0,83 | 1,193 | 1,595 |
| 3 | 0,319 | 0,132 | 0,155 | 0,192 | 0,268 | 0,448 | 0,635 | 0,943 | 1,383 |
| 4 | 0,335 | 0 | 0,132 | 0,169 | 0,307 | 0,452 | 0,68 | 0,785 | 1,244 |
| 5 | 0,302 | 0 | 0,142 | 0,179 | 0,294 | 0,486 | 0,706 | 1,189 | 1,813 |
| průměr | 0,313 | 0 | 0,134 | 0,197 | 0,319 | 0,51 | 0,768 | 1,066 | 1,53 |
| S.D. | 0,033 | 0 | 0,013 | 0,023 | 0,04 | 0,063 | 0,127 | 0,173 | 0,197 |

Tabulka 9 Pokusná skupina č. 3, ftalocyanin 6,0mg/ml, liposom 608

| Myš číslo | den pokusu | | | | | | | | |
|---------------|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | 1 | 4 | 8 | 11 | 15 | 18 | 22 | 26 | 30 |
| 1 | 0,302 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0,34 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 0,256 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 0,382 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 0,268 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Průměr | 0,31 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S.D. | 0,047 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabulka 10 Pokusná skupina č. 4, ftalocyanin 9,0mg/ml, liposom 608

| Myš číslo | den pokusu | | | | | | | | |
|---------------|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | 1 | 4 | 8 | 11 | 15 | 18 | 22 | 26 | 30 |
| 1 | 0,302 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0,254 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 0,323 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 0,352 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 0,319 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| průměr | 0,31 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S.D. | 0,032 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabulka 11 Pokusná skupina č. 5, ftalocyanin 18,0mg/ml, liposom 608

| Myš číslo | den pokusu | | | | | | | | |
|---------------|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | 1 | 4 | 8 | 11 | 15 | 18 | 22 | 26 | 30 |
| 1 | 0,378 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0,34 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 0,256 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 0,323 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 0,279 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| průměr | 0,315 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S.D. | 0,043 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabulka 12 Pokusná skupina č. 6, ftalocyanin 18,0mg/ml, liposom 613

| Myš číslo | den pokusu | | | | | | | | |
|---------------|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | 1 | 4 | 8 | 11 | 15 | 18 | 22 | 26 | 30 |
| 1 | 0,268 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0,352 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 0,34 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 0,285 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 0,312 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| průměr | 0,311 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S.D. | 0,032 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabulka 13 Pokusná skupina č. 7, ftalocyanin 18,0mg/ml, liposom 614

| Myš číslo | den pokusu | | | | | | | | |
|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | 1 | 4 | 8 | 11 | 15 | 18 | 22 | 26 | 30 |
| 1 | 0,402 | 0,628 | 0,83 | 0,915 | 1,226 | 2,623 | 3,139 | 5,607 | 7,698 |
| 2 | 0,336 | 0,422 | 0,721 | 0,898 | 1,37 | 1,949 | 2,948 | 4,119 | 5,375 |
| 3 | 0,279 | 0,312 | 0,614 | 0,918 | 1,469 | 1,717 | 2,546 | 3,684 | 4,567 |
| 4 | 0,256 | 0,378 | 0,523 | 0,796 | 1,023 | 1,436 | 2,144 | 3,053 | 4,508 |
| 5 | 0,312 | 0,513 | 0,791 | 1,063 | 1,334 | 2,12 | 2,964 | 4,567 | 6,579 |
| průměr | 0,317 | 0,451 | 0,696 | 0,918 | 1,284 | 1,969 | 2,748 | 4,206 | 5,745 |
| S.D. | 0,051 | 0,11 | 0,113 | 0,085 | 0,152 | 0,4 | 0,359 | 0,861 | 1,23 |

Tabulka 14 Kontrolní skupina bez léčby (bez liposomů a ftalocyaninů)

7.2.2 Statistické a grafické vyhodnocení

| | | | | | | | | | |
|------|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1:02 | N | N | N | N | 5 | N | N | N | 1 |
| 1:03 | N | 5 | 5 | 5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 1:04 | N | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 1:05 | N | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 1:06 | N | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 1:07 | N | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 1:08 | N | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 5 | N |
| | | | | | | | | | |
| 2:03 | N | N | N | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 2:04 | N | N | N | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 2:05 | N | N | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 2:06 | N | N | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 2:07 | N | N | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 2:08 | N | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | | | | | | | | | |
| 3:04 | N | N | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 3:05 | N | N | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 3:06 | N | N | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 3:07 | N | N | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 3:08 | N | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | | | | | | | | | |
| 4:05 | N | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze |
| 4:06 | N | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze |
| 4:07 | N | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze |
| 4:08 | N | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | | | | | | | | | |
| 5:06 | N | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze |
| 5:07 | N | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze |
| 5:08 | N | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | | | | | | | | | |
| 6:07 | N | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze |
| 6:08 | N | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | | | | | | | | | |
| 7:08 | N | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

Nelze = 0 proti 0 nelze počítat

N = nevýznamné

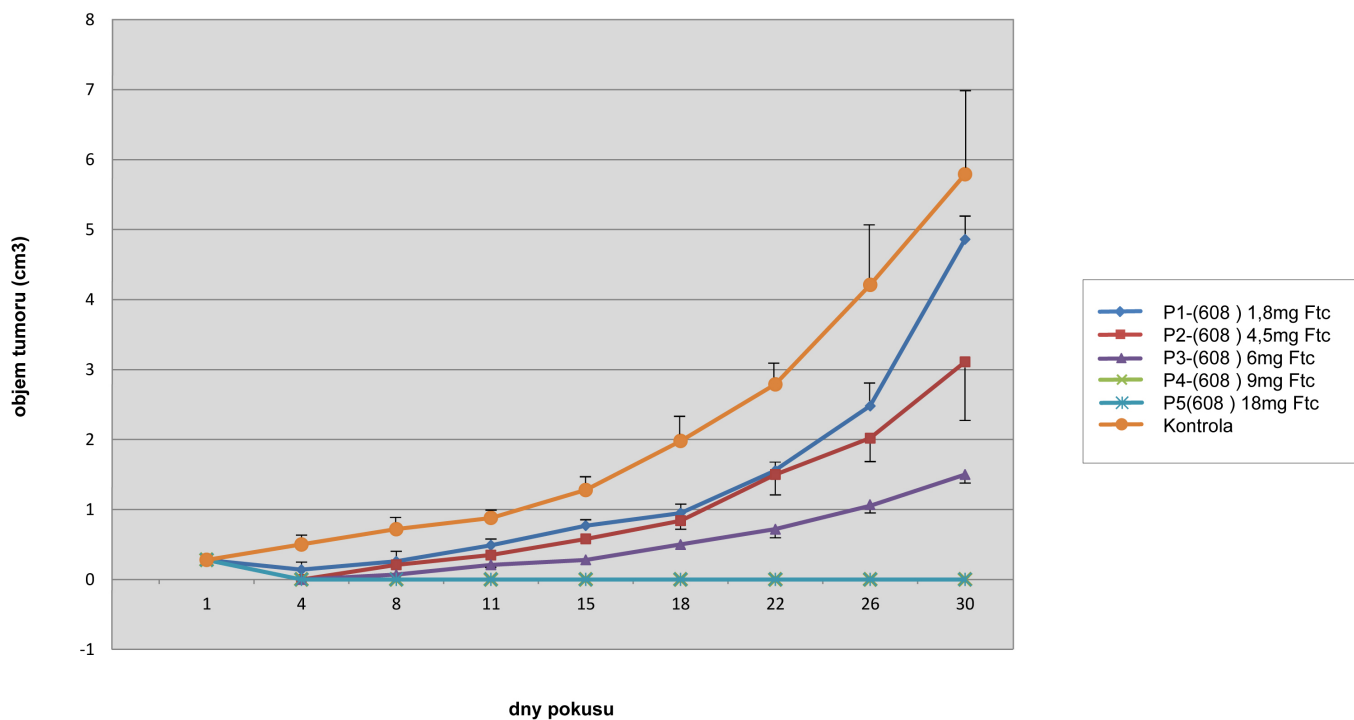
1 = 1% hladina významnosti

5 = 5% hladina významnosti

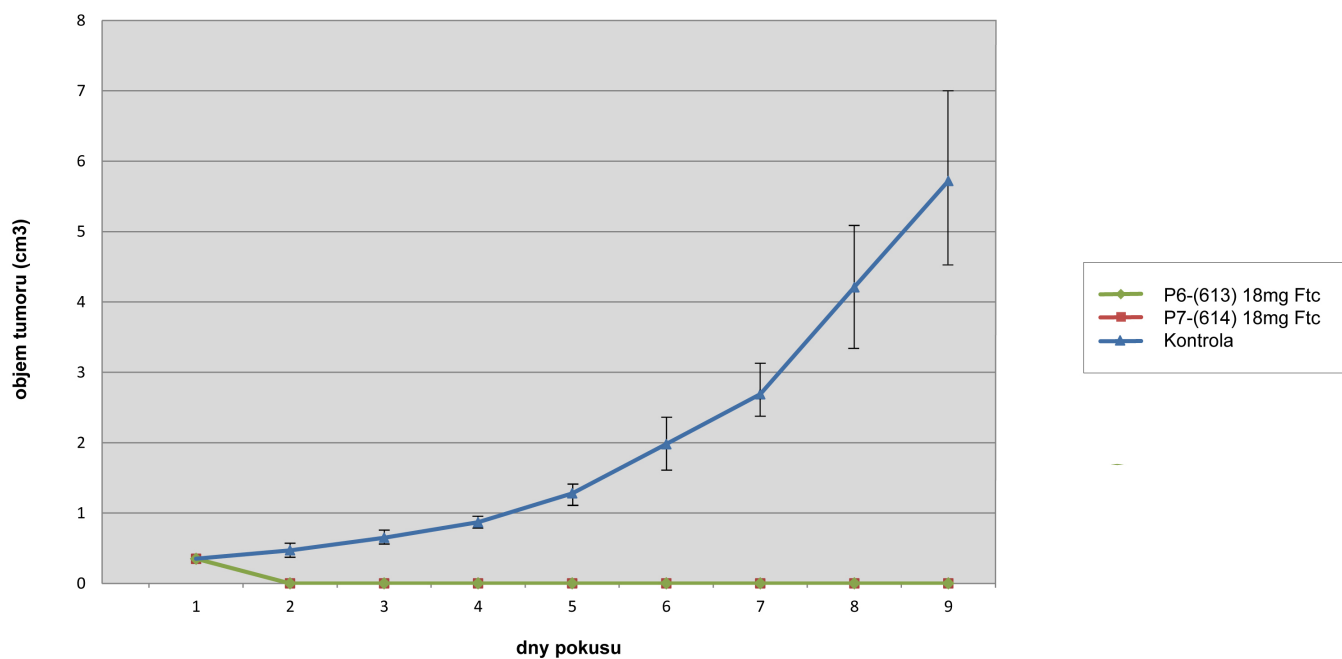
Tabulka 15 Statistické hodnocení T test - hladiny významnosti z dat tab. 7-14

| | | | | | | | | | |
|------|--------|--------|----------|----------|----------|----------|----------|--------|----------|
| 1:02 | 0,9317 | 0,2554 | 0,1146 | 0,1559 | 0,0184 | 0,2275 | 0,7428 | 0,1204 | 0,0065 |
| 1:03 | 0,9866 | 0,0108 | 0,0122 | 0,0128 | 0,0000 | 0,0017 | 1,61E-05 | 0,0006 | 8,46E-06 |
| 1:04 | 0,9242 | 0,0075 | 0,0019 | 0,0020 | 0,0000 | 0,0002 | 6,10E-06 | 0,0002 | 1,83E-05 |
| 1:05 | 0,9193 | 0,0075 | 0,0019 | 0,0020 | 0,0000 | 0,0002 | 6,10E-06 | 0,0002 | 1,83E-05 |
| 1:06 | 0,9206 | 0,0075 | 0,0019 | 0,0020 | 0,0000 | 0,0002 | 6,10E-06 | 0,0002 | 1,83E-05 |
| 1:07 | 0,9661 | 0,0075 | 0,0019 | 0,0020 | 0,0000 | 0,0002 | 6,10E-06 | 0,0002 | 1,83E-05 |
| 1:08 | 0,8829 | 0,0041 | 0,0010 | 0,0009 | 0,0007 | 0,0045 | 0,0018 | 0,0127 | 0,2359 |
| | | | | | | | | | |
| 2:03 | 0,9443 | 0,4256 | 0,0673 | 0,0007 | 0,0012 | 0,0026 | 0,0093 | 0,0054 | 0,0141 |
| 2:04 | 0,8715 | 0,2447 | 0,0034 | 8,73E-05 | 0,0001 | 0,0001 | 0,0009 | 0,0005 | 0,0014 |
| 2:05 | 0,8574 | 0,2447 | 0,0034 | 8,73E-05 | 0,0001 | 0,0001 | 0,0009 | 0,0005 | 0,0014 |
| 2:06 | 0,9838 | 0,2447 | 0,0034 | 8,73E-05 | 0,0001 | 0,0001 | 0,0009 | 0,0005 | 0,0014 |
| 2:07 | 0,8998 | 0,2447 | 0,0034 | 8,73E-05 | 0,0001 | 0,0001 | 0,0009 | 0,0005 | 0,0014 |
| 2:08 | 0,9413 | 0,0023 | 0,0002 | 2,32E-05 | 0,0002 | 0,0033 | 0,0009 | 0,0043 | 0,0087 |
| | | | | | | | | | |
| 3:04 | 0,9136 | 0,3739 | 3,80E-05 | 6,32E-05 | 9,04E-05 | 8,76E-05 | 0,0003 | 0,0002 | 0,0001 |
| 3:05 | 0,9063 | 0,3739 | 3,80E-05 | 6,32E-05 | 9,04E-05 | 8,76E-05 | 0,0003 | 0,0002 | 0,0001 |
| 3:06 | 0,9321 | 0,3739 | 3,80E-05 | 6,32E-05 | 9,04E-05 | 8,76E-05 | 0,0003 | 0,0002 | 0,0001 |
| 3:07 | 0,9527 | 0,3739 | 3,80E-05 | 6,32E-05 | 9,04E-05 | 8,76E-05 | 0,0003 | 0,0002 | 0,0001 |
| 3:08 | 0,8932 | 0,0005 | 0,0005 | 0,0000 | 0,0001 | 0,0016 | 0,0001 | 0,0015 | 0,0021 |
| | | | | | | | | | |
| 4:05 | 0,9891 | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze |
| 4:06 | 0,8647 | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze |
| 4:07 | 0,9508 | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze |
| 4:08 | 0,8349 | 0,0012 | 0,0003 | 0,0000 | 0,0001 | 0,0006 | 0,0001 | 0,0006 | 0,0007 |
| | | | | | | | | | |
| 5:06 | 0,8528 | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze |
| 5:07 | 0,9522 | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze |
| 5:08 | 0,8223 | 0,0012 | 0,0003 | 0,0000 | 0,0001 | 0,0006 | 0,0001 | 0,0006 | 0,0007 |
| | | | | | | | | | |
| 6:07 | 0,8915 | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze |
| 6:08 | 0,9583 | 0,0012 | 0,0003 | 2,75E-05 | 7,20E-05 | 0,0006 | 0,0001 | 0,0006 | 0,0007 |
| | | | | | | | | | |
| 7:08 | 0,8567 | 0,0012 | 0,0003 | 2,75E-05 | 7,20E-05 | 0,0006 | 0,0001 | 0,0006 | 0,0007 |

Tabulka 16 Statistické hodnocení T test - vypočítané hodnoty z dat tab. 7-14



Graf 6 Vliv různých dávek ftalocyaninu v gelu a následné PDT na lidský karcinom colon (linie SW-620)



Graf 7 Vliv liposomů Lampertheim (č. 613 a 614) na účinnost fotodynamické terapie karcinomu colon (linie SW-620)

7.3. Vliv různých dávek ftalocyaninu v liposomálním ftalocyaninovém preparátu na účinnost fotodynamické terapie lidského karcinomu mammy (linie MDA-MB-231)

V tomto pokuse byl testován vliv různých dávek ftalocyaninu na účinnost fotodynamické terapie lidského karcinomu mammy (linie MDA-MB-231)

Uspořádání pokusu:

Pokusná skupina č. 1: lidský karcinom mammy (MDA-MB-231), ftalocyanin 2mg/ml, PDT

Pokusná skupina č. 2: lidský karcinom mammy (MDA-MB-231), ftalocyanin 3mg/ml, PDT

Pokusná skupina č. 3: lidský karcinom mammy (MDA-MB-231), ftalocyanin 4mg/ml, PDT

Kontrolní skupina č. 1: lidský karcinom mammy (MDA-MB-231), bez léčby

Kontrolní skupina č. 2: lidský karcinom mammy (MDA-MB-231), bez PDT

Kontrolní skupina č. 3: lidský karcinom mammy (MDA-MB-231), ftalocyanin 4mg/ml

Výsledky:

Získané výsledky jsou uvedeny v tabulkách 17-22 a v grafech 8, 9.

Nejlepších, statisticky významných výsledků bylo dosaženo s dávkou ftalocyaninu 4mg/ml v preparátu, kdy došlo k vyléčení 9 pokusných myší z 10. Pro lidský karcinom mammy by obsah ftalocyaninu v preparátu měl být ještě vyšší, cca 6-9 mg/ml. Výsledky byly statisticky hodnoceny nepárovým Studentovým t-testem tab. 23,24.

7.3.1 Tabulky

| Myš číslo | den pokusu | | | | | | | | | | % TGI |
|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| | 1 | 4 | 7 | 11 | 14 | 18 | 21 | 25 | 28 | 30 | |
| 1 | 0,112 | 0,058 | 0,032 | 0,095 | 0,122 | 0,179 | 0,268 | 0,34 | 0,429 | 0,575 | |
| 2 | 0,122 | 0,144 | 0,205 | 0,25 | 0,321 | 0,382 | 0,472 | 0,549 | 0,635 | 0,796 | |
| 3 | 0,095 | 0,036 | 0,024 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 4 | 0,103 | 0,122 | 0,144 | 0,179 | 0,205 | 0,285 | 0,321 | 0,403 | 0,472 | 0,549 | |
| 5 | 0,132 | 0,166 | 0,192 | 0,235 | 0,285 | 0,352 | 0,445 | 0,496 | 0,635 | 0,728 | |
| 6 | 0,113 | 0,113 | 0,113 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 7 | 0,132 | 0,095 | 0,042 | 0,042 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 8 | 0,098 | 0,155 | 0,205 | 0,25 | 0,321 | 0,359 | 0,448 | 0,448 | 0,496 | 0,519 | |
| 9 | 0,122 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,053 | 0,095 | 0,132 | 0,192 | 0,218 | |
| 10 | 0,132 | 0,155 | 0,218 | 0,269 | 0,319 | 0,397 | 0,416 | 0,519 | 0,696 | 0,796 | |
| průměr | 0,116 | 0,104 | 0,118 | 0,132 | 0,157 | 0,201 | 0,247 | 0,289 | 0,356 | 0,418 | 52,82% |
| S.D. | 0,013 | 0,054 | 0,082 | 0,11 | 0,141 | 0,164 | 0,193 | 0,219 | 0,268 | 0,316 | |

Tabulka 17 Pokusná skupina č. 1, ftalocyanin 2mg/ml

| Myš číslo | den pokusu | | | | | | | | | | % TGI |
|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| | 1 | 4 | 7 | 11 | 14 | 18 | 21 | 25 | 28 | 30 | |
| 1 | 0,095 | 0,095 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 2 | 0,095 | 0,072 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 3 | 0,122 | 0,155 | 0,179 | 0,205 | 0,268 | 0,321 | 0,382 | 0,472 | 0,606 | 0,728 | |
| 4 | 0,119 | 0,132 | 0,132 | 0,179 | 0,221 | 0,285 | 0,302 | 0,403 | 0,472 | 0,523 | |
| 5 | 0,122 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 6 | 0,132 | 0,192 | 0,265 | 0,359 | 0,448 | 0,575 | 0,664 | 0,83 | 0,943 | 1,063 | |
| 7 | 0,144 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 8 | 0,113 | 0,141 | 0,141 | 0,141 | 0,155 | 0,192 | 0,235 | 0,268 | 0,321 | 0,382 | |
| 9 | 0,095 | 0,113 | 0,144 | 0,179 | 0,235 | 0,285 | 0,34 | 0,403 | 0,523 | 0,606 | |
| 10 | 0,132 | 0,155 | 0,192 | 0,268 | 0,302 | 0,448 | 0,606 | 0,728 | 0,796 | 0,83 | |
| průměr | 0,117 | 0,106 | 0,105 | 0,133 | 0,163 | 0,211 | 0,253 | 0,31 | 0,366 | 0,413 | 53,39% |
| S.D. | 0,016 | 0,062 | 0,093 | 0,122 | 0,15 | 0,198 | 0,24 | 0,296 | 0,339 | 0,378 | |

Tabulka 18 Pokusná skupina č. 2, ftalocyanin 3mg/ml

| Myš číslo | den pokusu | | | | | | | | | | % TGI |
|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| | 1 | 4 | 7 | 11 | 14 | 18 | 21 | 25 | 28 | 30 | |
| 1 | 0,095 | 0,066 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 2 | 0,112 | 0,095 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 3 | 0,124 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 4 | 0,126 | 0,112 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 5 | 0,122 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 6 | 0,115 | 0,095 | 0,066 | 0,095 | 0,124 | 0,124 | 0,126 | 0,132 | 0,136 | 0,138 | |
| 7 | 0,132 | 0,053 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 8 | 0,095 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 9 | 0,122 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 10 | 0,103 | 0,035 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| průměr | 0,115 | 0,061 | 0,011 | 0,016 | 0,021 | 0,021 | 0,021 | 0,022 | 0,023 | 0,023 | 97,40% |
| S.D. | 0,012 | 0,05 | 0,027 | 0,051 | 0,051 | 0,051 | 0,051 | 0,054 | 0,056 | 0,056 | |

Tabulka 19 Pokusná skupina č. 3, ftalocyanin 4mg/ml

| Myš číslo | den pokusu | | | | | | | | | |
|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | 1 | 4 | 7 | 11 | 14 | 18 | 21 | 25 | 28 | 30 |
| 1 | 0,095 | 0,132 | 0,218 | 0,285 | 0,378 | 0,445 | 0,46 | 0,519 | 0,612 | 0,852 |
| 2 | 0,112 | 0,144 | 0,252 | 0,275 | 0,354 | 0,512 | 0,556 | 0,618 | 0,645 | 0,995 |
| 3 | 0,108 | 0,124 | 0,144 | 0,205 | 0,285 | 0,396 | 0,416 | 0,472 | 0,584 | 0,896 |
| 4 | 0,112 | 0,136 | 0,214 | 0,275 | 0,312 | 0,356 | 0,455 | 0,512 | 0,622 | 0,855 |
| 5 | 0,119 | 0,142 | 0,232 | 0,296 | 0,328 | 0,394 | 0,482 | 0,545 | 0,645 | 0,814 |
| 6 | 0,124 | 0,136 | 0,198 | 0,244 | 0,299 | 0,348 | 0,412 | 0,586 | 0,714 | 0,906 |
| 7 | 0,122 | 0,144 | 0,166 | 0,192 | 0,221 | 0,268 | 0,321 | 0,448 | 0,549 | 0,728 |
| 8 | 0,113 | 0,179 | 0,23 | 0,34 | 0,382 | 0,403 | 0,429 | 0,523 | 0,575 | 0,696 |
| průměr | 0,113 | 0,142 | 0,207 | 0,264 | 0,32 | 0,39 | 0,441 | 0,528 | 0,618 | 0,843 |
| S.D. | 0,009 | 0,015 | 0,034 | 0,045 | 0,05 | 0,067 | 0,063 | 0,052 | 0,048 | 0,091 |

Tabulka 20 Kontrolní skupina č. 1, bez léčby (bez ftalocyaninů)

| Myš číslo | den pokusu | | | | | | | | | |
|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | 1 | 4 | 7 | 11 | 14 | 18 | 21 | 25 | 28 | 30 |
| 1 | 0,122 | 0,15 | 0,192 | 0,235 | 0,285 | 0,385 | 0,488 | 0,601 | 0,664 | 0,796 |
| 2 | 0,113 | 0,144 | 0,192 | 0,235 | 0,268 | 0,402 | 0,549 | 0,635 | 0,635 | 0,728 |
| 3 | 0,095 | 0,188 | 0,23 | 0,285 | 0,369 | 0,466 | 0,519 | 0,549 | 0,635 | 0,943 |
| 4 | 0,132 | 0,155 | 0,179 | 0,205 | 0,285 | 0,34 | 0,382 | 0,429 | 0,523 | 0,728 |
| 5 | 0,119 | 0,141 | 0,192 | 0,268 | 0,321 | 0,34 | 0,382 | 0,472 | 0,606 | 0,796 |
| 6 | 0,132 | 0,144 | 0,205 | 0,285 | 0,321 | 0,403 | 0,448 | 0,523 | 0,635 | 0,83 |
| 7 | 0,132 | 0,155 | 0,221 | 0,302 | 0,429 | 0,472 | 0,549 | 0,606 | 0,635 | 0,943 |
| průměr | 0,121 | 0,154 | 0,202 | 0,259 | 0,325 | 0,401 | 0,474 | 0,545 | 0,619 | 0,823 |
| S.D. | 0,013 | 0,015 | 0,017 | 0,032 | 0,052 | 0,049 | 0,067 | 0,07 | 0,042 | 0,083 |

Tabulka 21 Kontrolní skupina č. 2, bez PDT

| Myš číslo | den pokusu | | | | | | | | | |
|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | 1 | 4 | 7 | 11 | 14 | 18 | 21 | 25 | 28 | 30 |
| 1 | 0,132 | 0,155 | 0,205 | 0,25 | 0,321 | 0,403 | 0,523 | 0,635 | 0,728 | 0,943 |
| 2 | 0,095 | 0,122 | 0,155 | 0,192 | 0,265 | 0,403 | 0,496 | 0,549 | 0,606 | 0,905 |
| 3 | 0,095 | 0,144 | 0,25 | 0,321 | 0,403 | 0,523 | 0,575 | 0,635 | 0,696 | 0,83 |
| 4 | 0,122 | 0,179 | 0,205 | 0,285 | 0,34 | 0,397 | 0,466 | 0,519 | 0,575 | 0,696 |
| 5 | 0,103 | 0,132 | 0,192 | 0,279 | 0,359 | 0,403 | 0,475 | 0,519 | 0,575 | 0,796 |
| 6 | 0,132 | 0,155 | 0,192 | 0,218 | 0,25 | 0,34 | 0,378 | 0,416 | 0,575 | 0,791 |
| 7 | 0,095 | 0,122 | 0,205 | 0,294 | 0,378 | 0,429 | 0,496 | 0,543 | 0,601 | 0,865 |
| průměr | 0,111 | 0,144 | 0,201 | 0,263 | 0,331 | 0,414 | 0,487 | 0,545 | 0,622 | 0,832 |
| S.D. | 0,016 | 0,019 | 0,026 | 0,042 | 0,052 | 0,051 | 0,056 | 0,07 | 0,059 | 0,076 |

Tabulka 22 Kontrolní skupina č. 3, ftalocyanin 4mg/ml

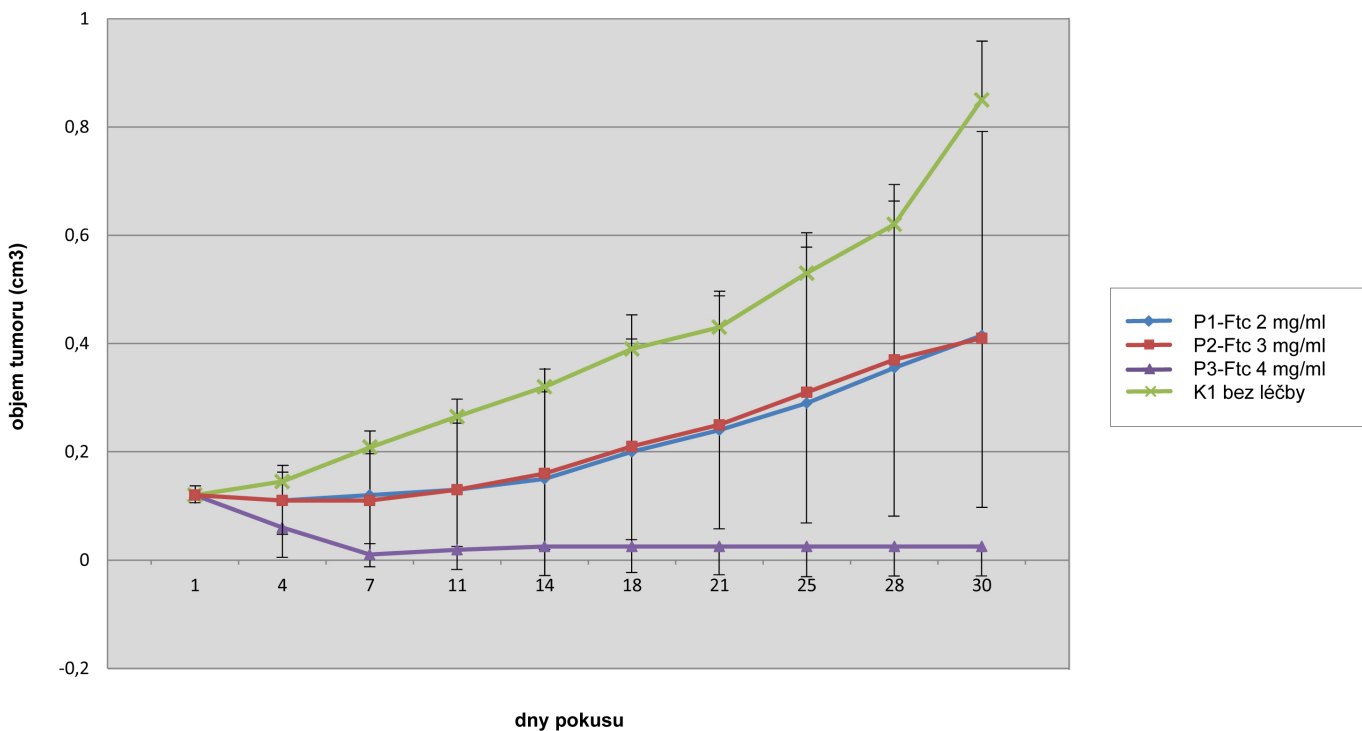
7.3.2 Statistické a grafické vyhodnocení

| | | | | | | | | | | |
|------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1:02 | N | N | N | N | N | N | N | N | N | 1 |
| 1:03 | N | 5 | 1 | 1 | 5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 1:04 | N | N | 5 | 1 | 1 | 1 | 5 | 1 | 5 | 1 |
| 1:05 | N | 5 | 5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 5 | 1 |
| 1:06 | N | N | 5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 5 | 1 |
| | | | | | | | | | | |
| 2:03 | N | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 2:04 | N | N | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | N | N | 1 |
| 2:05 | N | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | N | 5 |
| 2:06 | N | N | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | N | 1 |
| | | | | | | | | | | |
| 3:04 | N | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 3:05 | N | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 3:06 | N | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | | | | | | | | | | |
| 4:05 | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N |
| 4:06 | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N |
| | | | | | | | | | | |
| 5:06 | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N |

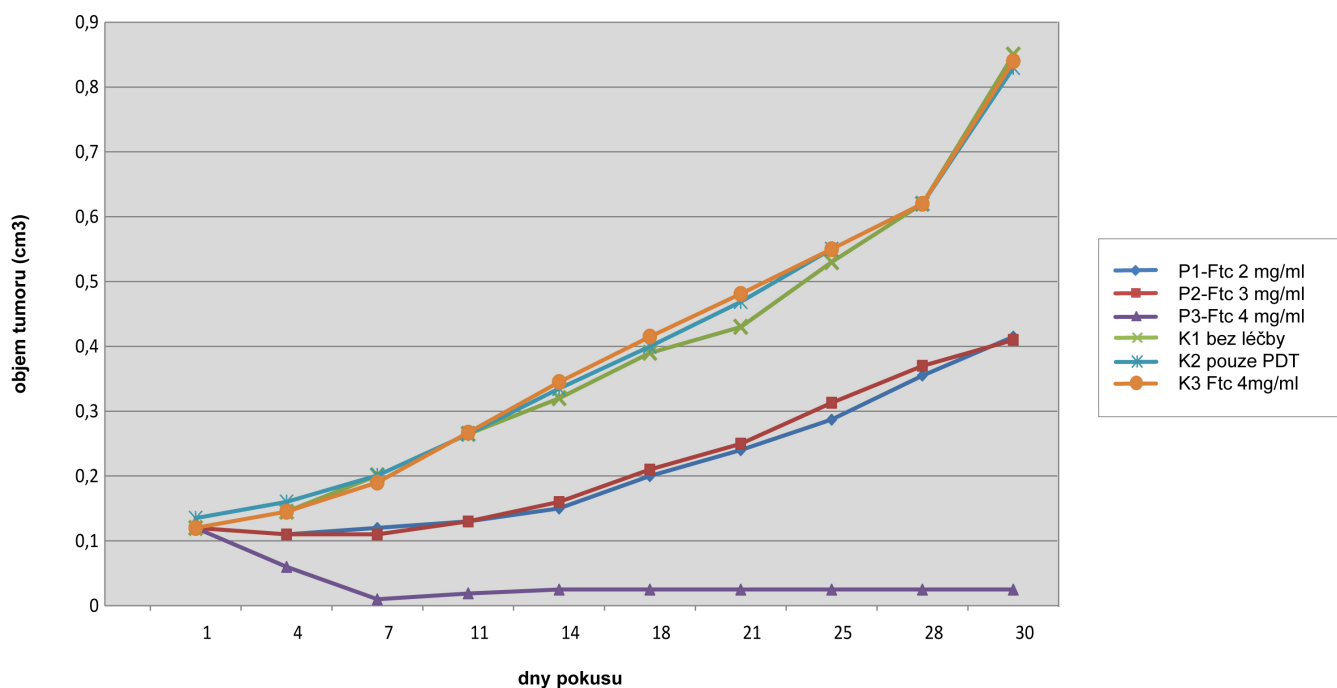
Tabulka 23 Statistické hodnocení T test – hladiny významnosti z dat tab. 17-22

| | | | | | | | | | | |
|------|---------|---------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 1:02 | 0,91122 | 0,96819 | 0,77114 | 0,98422 | 0,93595 | 0,90927 | 0,95098 | 0,86173 | 0,94217 | 0,97653 |
| 1:03 | 0,80829 | 0,01952 | 0,00273 | 0,00877 | 0,01339 | 0,00738 | 0,00530 | 0,00431 | 0,00396 | 0,00392 |
| 1:04 | 0,59779 | 0,06997 | 0,01141 | 0,00877 | 0,00766 | 0,00809 | 0,01542 | 0,00975 | 0,01667 | 0,00284 |
| 1:05 | 0,50947 | 0,02373 | 0,01358 | 0,00877 | 0,00664 | 0,00535 | 0,00685 | 0,00701 | 0,01640 | 0,00385 |
| 1:06 | 0,50245 | 0,06393 | 0,01562 | 0,00693 | 0,00546 | 0,00364 | 0,00461 | 0,00699 | 0,01578 | 0,00334 |
| | | | | | | | | | | |
| 2:03 | 0,74175 | 0,02893 | 0,01116 | 0,01449 | 0,01535 | 0,01489 | 0,01501 | 0,01468 | 0,01236 | 0,01137 |
| 2:04 | 0,56253 | 0,11538 | 0,01058 | 0,01195 | 0,01322 | 0,02630 | 0,04624 | 0,05660 | 0,05364 | 0,00783 |
| 2:05 | 0,47403 | 0,04612 | 0,01274 | 0,01356 | 0,01150 | 0,01886 | 0,02412 | 0,04426 | 0,05294 | 0,01011 |
| 2:06 | 0,47403 | 0,10518 | 0,01416 | 0,01266 | 0,00956 | 0,01365 | 0,01770 | 0,04415 | 0,05140 | 0,00894 |
| | | | | | | | | | | |
| 3:04 | 0,61599 | 4,31 E- | 3,43E- | 4,68E- | 7,07E-09 | 7,58E-08 | 7,07E-09 | 1,94E-09 | 3,40E-13 | 2,17E-09 |
| 3:05 | 0,61599 | 1,44E- | 6,49E- | 4,13E- | 1,84E-07 | 8,46E-09 | 1,50E-07 | 6,95E-08 | 1,26E-12 | 1,85E08 |
| 3:06 | 0,61599 | 3,44E- | 1,41E- | 2,04E- | 1,59E-07 | 1,11E-08 | 8,29E-09 | 6,90E-08 | 3,40E-13 | 4,63E-09 |
| | | | | | | | | | | |
| 4:05 | 0,23900 | 0,18514 | 0,72740 | 0,83142 | 0,84882 | 0,74172 | 0,38510 | 0,63111 | 0,97655 | 0,69523 |
| 4:06 | 0,73679 | 0,83951 | 0,71536 | 0,95854 | 0,70700 | 0,48201 | 0,18800 | 0,62819 | 0,89544 | 0,82425 |
| | | | | | | | | | | |
| 5:06 | 0,25020 | 0,34734 | 0,93845 | 0,86071 | 0,86071 | 0,66488 | 0,71739 | 0,99723 | 0,91324 | 0,85031 |

Tabulka 24 Statistické hodnocení T test – vypočítané hodnoty z dat tab. 17-22



Graf 8 Vliv dávek ftalocyaninu (2, 3 a 4mg/ml) v gelu na účinnost fotodynamické terapie lidského karcinomu prsu (linie MDA-MB-231)



Graf 9 Vliv různých dávek ftalocyaninu (2, 3 a 4mg/ml) na účinnost fotodynamické terapie lidského karcinomu prsu (linie MDA-MB-231)

7.4. Vliv různých dávek ftalocyaninu v liposomálním ftalocyaninovém preparátu na účinnost fotodynamické terapie lidského neuroblastomu (UKF-NB-3)

V pokuse byl testován vliv různých dávek ftalocyaninu (2, 4 a 6mg/ml) v liposomálním preparátu na účinnost fotodynamické terapie lidského neuroblastomu (UKF-NB-3).

Uspořádání pokusu:

Pokusná skupina č. 1: lidský neuroblastom (UKF NB-3), liposomální gel s ftalocyaninem (obsah ftalocyaninu 2mg/1ml gelu), PDT za 10 minut, 10 myší.

Pokusná skupina č. 2: lidský neuroblastom (UKF NB-3), liposomální gel s ftalocyaninem (obsah ftalocyaninu 4mg/1ml gelu), PDT za 10 minut, 10 myší.

Pokusná skupina č. 3: lidský neuroblastom (UKF NB-3), liposomální gel s ftalocyaninem (obsah ftalocyaninu 6mg/1ml gelu), PDT za 10 minut, 10 myší.

Kontrolní skupina č. 1: bez léčby, 8 myší.

Kontrolní skupina č. 2: pouze PDT, 8 myší.

Kontrolní skupina č. 3: pouze liposomální gel s ftalocyaninem (obsah ftalocyaninu 6mg/1ml gelu), 8 myší.

Výsledky:

Získané výsledky jsou znázorněny v tabulkách 25-30 a grafech 10,11. Ke kompletnímu vyléčení nádorového procesu (neuroblastomu UKF-NB-3) na nu/nu myších došlo, jestliže byla prováděna PDT s liposomálním preparátem s dávkou ftalocyaninu 4 a 6mg/ml. Mezi oběma pokusnými skupinami nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl, oba preparáty byly stejně účinné. Rozdíly ve výsledcích terapie mezi nízkou dávkou ftalocyaninu 2mg/ml a dávkami 4 a 6mg/ml preparátu, byly statisticky

významné jen v některých intervalech pokusu, 4. -11. den a na konci pokusu 28. a 30. den a to pouze na 5% hladině významnosti. Výsledky byly statisticky hodnoceny nepárovým Studentovým t-testem tab. 31,32.

7.4.1 Tabulky

| Myš číslo | den pokusu | | | | | | | | | |
|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | 1 | 4 | 7 | 11 | 14 | 18 | 21 | 25 | 28 | 30 |
| 1 | 0,122 | 0,122 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0,113 | 0,095 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 0,132 | 0,155 | 0,155 | 0,179 | 0,192 | 0,221 | 0,235 | 0,268 | 0,321 | 0,382 |
| 4 | 0,192 | 0,205 | 0,192 | 0,144 | 0,144 | 0,179 | 0,192 | 0,221 | 0,285 | 0,34 |
| 5 | 0,155 | 0,155 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 0,122 | 0,132 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 0,144 | 0,166 | 0,192 | 0,221 | 0,268 | 0,34 | 0,403 | 0,448 | 0,523 | 0,606 |
| 8 | 0,155 | 0,179 | 0,179 | 0,155 | 0,113 | 0,144 | 0,179 | 0,221 | 0,268 | 0,321 |
| 9 | 0,113 | 0,122 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 0,216 | 0,23 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| průměr | 0,146 | 0,156 | 0,072 | 0,07 | 0,072 | 0,088 | 0,101 | 0,116 | 0,14 | 0,165 |
| S.D. | 0,033 | 0,039 | 0,088 | 0,088 | 0,095 | 0,118 | 0,136 | 0,154 | 0,183 | 0,214 |

Tabulka 25 Pokusná skupina č. 1, liposomální gel s ftalocyaninem (ftalocyanin 2mg/ml), PDT za 10minut

| Myš číslo | den pokusu | | | | | | | | | |
|---------------|--------------|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | 1 | 4 | 7 | 11 | 14 | 18 | 21 | 25 | 28 | 30 |
| 1 | 0,179 | 0,192 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0,166 | 0,166 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 0,122 | 0,113 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 0,113 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 0,132 | 0,095 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 0,155 | 0,132 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 0,144 | 0,144 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 8 | 0,205 | 0,179 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | 0,132 | 0,144 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 0,179 | 0,113 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| průměr | 0,153 | 0,128 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S.D. | 0,028 | 0,052 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabulka 26 Pokusná skupina č. 2, liposomální gel s ftalocyaninem (ftalocyanin 4mg/ml), PDT za 10minut

| Myš číslo | den pokusu | | | | | | | | | |
|---------------|--------------|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | 1 | 4 | 7 | 11 | 14 | 18 | 21 | 25 | 28 | 30 |
| 1 | 0,132 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0,155 | 0,155 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 0,179 | 0,144 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 0,122 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 0,166 | 0,122 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 0,218 | 0,155 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 0,122 | 0,122 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 8 | 0,132 | 0,144 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | 0,113 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 0,155 | 0,155 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| průměr | 0,149 | 0,1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S.D. | 0,031 | 0,066 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabulka 27 Pokusná skupina č. 3, liposomální gel s ftalocyaninem (ftalocyanin 6mg/ml), PDT za 10minut

| Myš číslo | den pokusu | | | | | | | | | |
|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| | 1 | 4 | 7 | 11 | 14 | 18 | 21 | 25 | 28 | 30 |
| 1 | 0,122 | 0,179 | 0,192 | 0,321 | 0,403 | 0,523 | 0,635 | 0,83 | 1,063 | 1,383 |
| 2 | 0,155 | 0,192 | 0,285 | 0,448 | 0,549 | 0,721 | 1,018 | 1,244 | 1,591 | 2,949 |
| 3 | 0,132 | 0,221 | 0,34 | 0,403 | 0,549 | 0,696 | 0,865 | 1,018 | 1,288 | 1,479 |
| 4 | 0,179 | 0,25 | 0,312 | 0,519 | 0,83 | 0,98 | 1,145 | 1,479 | 2,011 | 2,494 |
| 5 | 0,122 | 0,155 | 0,25 | 0,335 | 0,519 | 0,721 | 1,104 | 1,431 | 2,003 | 2,885 |
| 6 | 0,112 | 0,179 | 0,192 | 0,378 | 0,628 | 0,728 | 0,943 | 1,145 | 1,539 | 2,721 |
| 7 | 0,192 | 0,221 | 0,321 | 0,403 | 0,635 | 0,943 | 1,238 | 1,76 | 2,722 | 3,053 |
| 8 | 0,132 | 0,132 | 0,192 | 0,285 | 0,429 | 0,519 | 0,696 | 0,83 | 1,149 | 1,436 |
| průměr | 0,143 | 0,191 | 0,261 | 0,387 | 0,568 | 0,729 | 0,956 | 1,217 | 1,671 | 2,3 |
| S.D. | 0,027 | 0,036 | 0,059 | 0,07 | 0,126 | 0,157 | 0,2 | 0,307 | 0,518 | 0,69 |

Tabulka 28 Kontrolní skupina č. 1, bez léčby

| Myš číslo | den pokusu | | | | | | | | | |
|---------------|--------------|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | 1 | 4 | 7 | 11 | 14 | 18 | 21 | 25 | 28 | 30 |
| 1 | 0,166 | 0,221 | 0,285 | 0,382 | 0,496 | 0,83 | 1,193 | 1,436 | 1,705 | 2,074 |
| 2 | 0,113 | 0,155 | 0,235 | 0,319 | 0,496 | 0,728 | 0,905 | 1,193 | 1,436 | 1,65 |
| 3 | 0,132 | 0,179 | 0,268 | 0,403 | 0,606 | 0,905 | 1,104 | 1,488 | 1,826 | 2,423 |
| 4 | 0,122 | 0,192 | 0,285 | 0,448 | 0,549 | 0,76 | 1,023 | 1,336 | 1,767 | 2,646 |
| 5 | 0,179 | 0,268 | 0,382 | 0,523 | 0,696 | 0,98 | 1,288 | 1,767 | 2,351 | 2,722 |
| 6 | 0,179 | 0,221 | 0,235 | 0,302 | 0,448 | 0,575 | 0,76 | 0,98 | 1,193 | 1,595 |
| 7 | 0,113 | 0,144 | 0,205 | 0,321 | 0,403 | 0,549 | 0,635 | 0,796 | 0,943 | 1,336 |
| 8 | 0,155 | 0,192 | 0,268 | 0,403 | 0,549 | 0,791 | 1,056 | 1,383 | 1,826 | 2,351 |
| průměr | 0,145 | 0,197 | 0,27 | 0,388 | 0,53 | 0,765 | 0,996 | 1,297 | 1,631 | 2,1 |
| S.D. | 0,026 | 0,037 | 0,05 | 0,07 | 0,086 | 0,139 | 0,204 | 0,285 | 0,406 | 0,487 |

Tabulka 29 Kontrolní skupina č. 2, pouze PDT

| Myš číslo | den pokusu | | | | | | | | | |
|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | 1 | 4 | 7 | 11 | 14 | 18 | 21 | 25 | 28 | 30 |
| 1 | 0,113 | 0,122 | 0,155 | 0,268 | 0,34 | 0,606 | 0,83 | 1,149 | 1,488 | 1,948 |
| 2 | 0,179 | 0,235 | 0,321 | 0,472 | 0,575 | 0,76 | 1,063 | 1,288 | 1,595 | 2,211 |
| 3 | 0,155 | 0,268 | 0,403 | 0,575 | 0,692 | 0,98 | 1,336 | 1,65 | 2,011 | 2,646 |
| 4 | 0,122 | 0,122 | 0,179 | 0,285 | 0,472 | 0,728 | 1,149 | 1,539 | 2,074 | 2,885 |
| 5 | 0,155 | 0,192 | 0,235 | 0,403 | 0,728 | 0,943 | 1,193 | 1,336 | 1,65 | 1,944 |
| 6 | 0,132 | 0,166 | 0,221 | 0,34 | 0,575 | 0,791 | 1,063 | 1,436 | 1,595 | 2,074 |
| 7 | 0,103 | 0,144 | 0,268 | 0,397 | 0,664 | 0,886 | 1,003 | 1,383 | 1,595 | 1,948 |
| 8 | 0,192 | 0,285 | 0,416 | 0,59 | 0,779 | 0,865 | 1,093 | 1,149 | 1,479 | 1,885 |
| průměr | 0,144 | 0,192 | 0,275 | 0,416 | 0,603 | 0,82 | 1,091 | 1,366 | 1,686 | 2,193 |
| S.D. | 0,03 | 0,06 | 0,091 | 0,114 | 0,135 | 0,115 | 0,137 | 0,165 | 0,213 | 0,349 |

Tabulka 30 Kontrolní skupina č. 3, pouze liposomální gel s ftalocyaninem (ftalocyanin 6mg/ml)

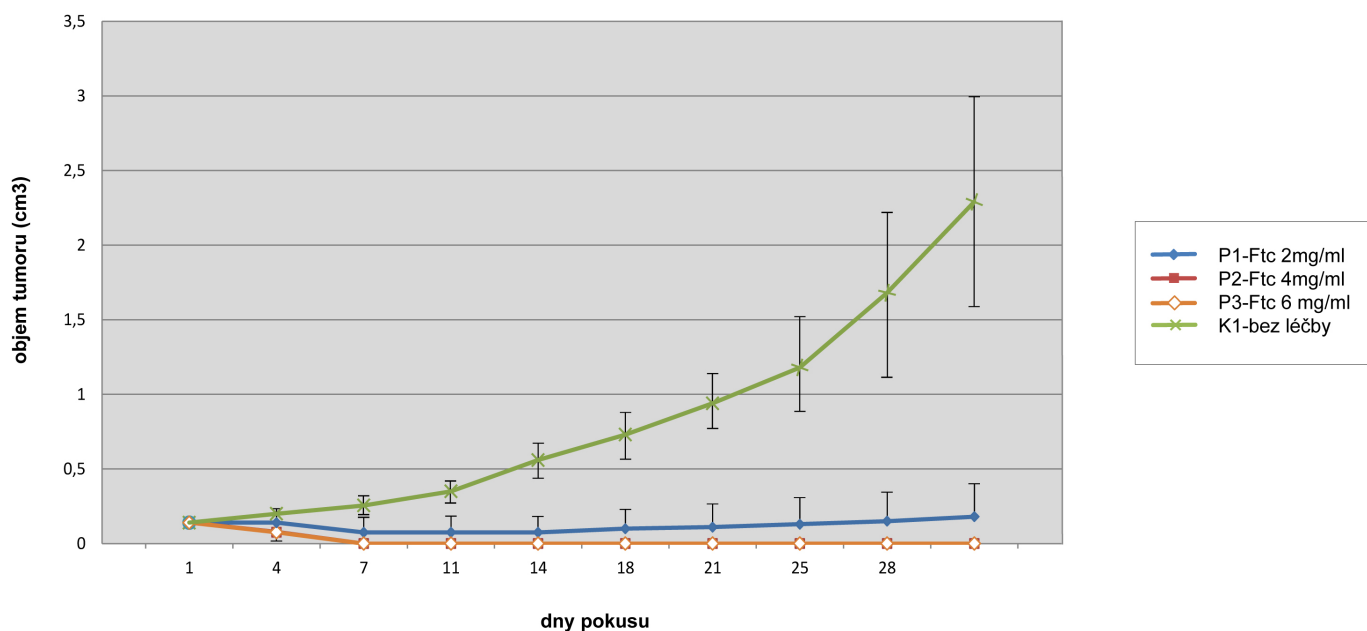
7.4.2 Statistické a grafické vyhodnocení

| | | | | | | | | | | |
|------|---|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1:02 | N | N | 5 | 5 | N | N | N | N | 5 | 5 |
| 1:03 | N | 5 | 5 | 5 | N | N | N | N | 5 | 5 |
| 1:04 | N | N | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 1:05 | N | N | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 1:06 | N | N | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | | | | | | | | | | |
| 2:03 | N | N | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze |
| 2:04 | N | 5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 2:05 | N | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 2:06 | N | 5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | | | | | | | | | | |
| 3:04 | N | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 3:05 | N | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 3:06 | N | 5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | | | | | | | | | | |
| 4:05 | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N |
| 4:06 | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N |
| | | | | | | | | | | |
| 5:06 | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N |

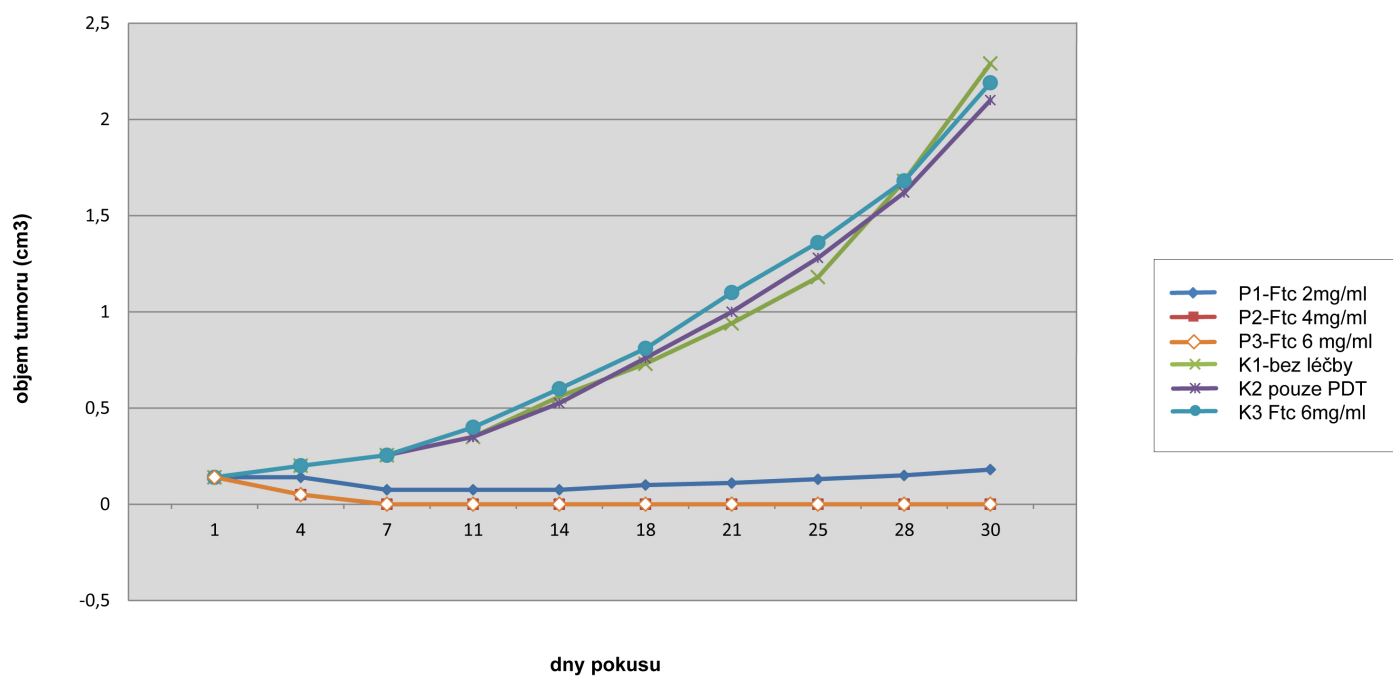
Tabulka 31 Statistické hodnocení T test – hladiny významnosti z dat tab. 25-30

| | | | | | | | | | | |
|------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1:02 | 0,66537 | 0,20638 | 0,03766 | 0,04035 | 0,05038 | 0,05110 | 0,05295 | 0,05011 | 0,04765 | 0,04648 |
| 1:03 | 0,84300 | 0,04424 | 0,03766 | 0,04035 | 0,05038 | 0,05110 | 0,05295 | 0,05011 | 0,04765 | 0,04648 |
| 1:04 | 0,83625 | 0,08120 | 0,00011 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00001 | 0,00001 | 0,00001 | 0,00006 | 0,00005 |
| 1:05 | 0,91919 | 0,05177 | 0,00011 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00001 | 0,00000 |
| 1:06 | 0,87383 | 0,20014 | 0,00046 | 0,00002 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 |
| | | | | | | | | | | |
| 2:03 | 0,81354 | 0,32950 | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze | nelze |
| 2:04 | 0,50544 | 0,01076 | 0,00001 | 0,00000 | 0,00001 | 0,00001 | 0,00000 | 0,00002 | 0,00006 | 0,00005 |
| 2:05 | 0,57454 | 0,00706 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00001 | 0,00001 | 0,00001 |
| 2:06 | 0,55365 | 0,04205 | 0,00009 | 0,00003 | 0,00001 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 |
| | | | | | | | | | | |
| 3:04 | 0,67684 | 0,00322 | 0,00001 | 0,00000 | 0,00001 | 0,00001 | 0,00000 | 0,00002 | 0,00006 | 0,00005 |
| 3:05 | 0,75547 | 0,00224 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00001 | 0,00001 | 0,00001 |
| 3:06 | 0,72042 | 0,01062 | 0,00009 | 0,00003 | 0,00001 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 |
| | | | | | | | | | | |
| 4:05 | 0,91142 | 0,78778 | 0,73866 | 0,97640 | 0,52809 | 0,65768 | 0,71691 | 0,62000 | 0,87505 | 0,54123 |
| 4:06 | 0,96782 | 0,98161 | 0,73402 | 0,56767 | 0,62004 | 0,23772 | 0,16389 | 0,28219 | 0,94453 | 0,72068 |
| | | | | | | | | | | |
| 5:06 | 0,94788 | 0,86231 | 0,91327 | 0,58190 | 0,25303 | 0,43311 | 0,2370 | 0,59031 | 0,75742 | 0,68805 |

Tabulka 32 Statistické hodnocení T test – vypočítané hodnoty z dat tab. 25-30



Graf 10 Vliv různých dávek ftalocyaninu (2,4,6 mg/ml) v liposomálním gelu na účinnost fotodynamické terapie lidského neuroblastomu (linie UKF-NB-3)



Graf 11 Vliv různých dávek ftalocyaninu (2,4,6 mg/ml) v liposomálním gelu na účinnost fotodynamické terapie lidského neuroblastomu (linie UKF-NB-3)

8. ZÁVĚR

V současné době je zvýšený zájem o výzkum nových fotosensitizerů, který zahrnuje mechanismus PDT, molekulární a tkáňové hladiny, zvýšení účinnosti PDT a rozšiřující se potenciál klinických indikací. Fotodynamická terapie je způsob léčeni neoplastických a neneoplastických nádorů a dalších lézí. V této studii byla stanovována účinnost PDT s ftalocyaninem pro léčení následujících nádorů - karcinom colon, karcinom mammy a lidský neuroblastom, v experimentu na nu/nu myších. Zkoušíme nabídnout pacientům novou možnost léčení s uvedenými nádory v počátečních stádiích, nebo pro paliativní léčení pacientů s pozdním, nebo pokročilým karcinomem. Účinnost PDT je většinou limitována penetrací světla do tkáně 5-8mm, takže může být použita pouze pro malé léze a musí být používána opakovaně. V této formě zatím nemůže PDT být jako léčebná procedura pro velké a metastazující nádory, ale může významně upravovat kvalitu života pacientů a prodloužit přežití. Hlavní výhodou je, že pacienti nepotřebují anestézii, zákroky probíhají bez velkých krevních ztrát.

Práce potvrzuje výzkumné práce zahraničních studií, že se vzrůstající dávkou fotosensitizeru v preparátu se zvyšuje terapeutická účinnost fotodynamické terapie. V mém případě byl nejvíce rezistentní na PDT karcinom colon, který pro úspěšnou terapii vyžadoval nejvyšší dávky ftalocyaninu v preparátu (9 a 18mg/ml).

Klíčovým aspektem v této práci bylo vyvinutí fotosensitizeru hydroxyhlinitého ftalocyaninu, který po své topické aplikaci na povrch nádoru je možné ozářit již za 10 minut, aby následně došlo k celkovému vymizení nádorového procesu, zatímco u většiny již schválených léčiv je tento interval podstatně delší, a to 2-4h (METVIX apod.)

Jedinečnost tohoto preparátu byla prokázána v roce 2008, kdy byl udělen český patent č. 298978. Poté byla podána mezinárodní patentová přihláška PCT, která byla schválena s potvrzením o originalitě a na základě toho bylo požádáno o světový patent EPO

(Evropská patentová kancelář) a zažádána patentová přihláška o patentovou ochranu ve všech zemích EU, dále ve Švýcarsku, Norsku, Chorvatsku, Kanadě a USA.

Fotodynamická terapie si postupně získává důvěryhodnost, je ovšem důležité, aby jí lékaři i vědci věnovali více pozornosti a zařadili ji do seznamu léčby nemocí. V současnosti se tato technika využívá v 70 výzkumných centrech po celém světě, z nichž 45 se nachází ve Spojených státech a Kanadě. Porovnává se její účinnost s konvenčními metodami léčby rakoviny plic a močového měchýře, léčby gynekologických a kolorektálních nádorů, jakož i metastáz rakoviny prsu. Zdá se být velmi slibným nástrojem pro včasné diagnostování a šetrnou léčbu nádorů, které jsou jinak těžko zjistitelné.

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Jesionek A., von Tappeiner H.: Zur Behandlung der Hautcarcinoma mit fluorescierenden Stoffen. Muench. Med. Wochenschr., 1903, 47, 1042.
2. Jodlbauer A., von Tappeiner H.: On the participation of oxygen in the photodynamic effect of fluorescent substances. Muench. Med. Wochenschr. 1904, 52, 1139-1141
3. Policard R.: Studies of experimental tumours under Woods light. Comp. Rend. Soc. Biol. 1924: 91, 1423-1428
4. Korbler J. (1931, 1932) cituje Moan J., Christensen T.: Porphyrins as tumor localizing agents and their possible use in photochemotherapy of cancer. Tumor Res. 15, 1980: 1-10
5. Auler H., Banzer G.: Investigations on the role of porphyrins in tumor-bearing humus and animals. Z. Krebsforsch 1942: 53, 65-68
6. Figge F. H., Weiland G. S., Manganiello L.O.: Cancer detection and therap. Affinity of neoplastic, embryonic and traumatized tissue for porphyrins and metallo porphyrins. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1948, 68, 64-641
7. Lipson R. I., Baldes EJ.: The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivate. Arch. Dermatol. 1960: 82, 508-516
8. Lipson R. I., Baldes EJ., Olsen AM.: The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. Cancer Inst. 1961: 26, 1-11
9. Y. Mie, K. Sonoda, M. Kishita, E. Krestýn, S. Neya, N. Funasaki, I. Taniguchi, Effect of rapid heme rotation on electrochemistry of myoglobin, Electrochim Acta 45 (2000), 2903-2909.
10. Winkelman JW.: The distribution of tetraphenyl porphinesulfonate in the tumor-bearing rat. Cancer Res. 1962: 22, 589-596

11. Kessel D., Dougherty T. J.: Agents used in photodynamic therapy. *Rev. Contemp. Pharmacother.* 10, 1999, 19-24
12. Dougherty T. J., Kaufman J. E., Goldfarb A., Weishaupt K. R., Boyle D., Mittleman A.: Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumours. *Cancer Res.* 38, 1978, 2628-2635.
13. C. Tanielian, C. Wolff, and M. Esch, Singlet Oxygen Production in Water: Aggregation and Charge-Transfer Effects, *J.Phys.Chem.*, 100 (1996) 6555-6560.
14. Agarwal R., Kornal N. J., Mohan R. R., Feyes D.K., Jawed S., Zaim M.T., Muhkar H.: Apoptosis in an early event during phthalocyanine photodynamic therapy – induced ablation of chemically induced squamous papillomas in mouse skin. *Photochem. Photobiol.* 63, 1996, 547-552.
15. Li R., Bounds DJ, Granville D, Ip SH, Jiang H., Margaron P., Hunt DV.: Rapid induction of apoptosis in human keratinocytes with the photosensitizer QLT0074 via a direct mitochondrial action. *Apoptosis* 8, 2003, 269-275.
16. B. W. Henderson, T.J. Dougherty, How does photodynamic therapy work? *Photochem. Photobiol.* 55 1992: 145–157.
17. K. Berg, P.K. Selbo, A. Weyergang, A. Dietze, L. Prasmickaite, A. Bonsted, B.O. Engesaeter, E. Petersen, T. Warloe, N. Frandsen, A. Hogset, Porphyrin-related photosensitizers for cancer imaging and therapeutic applications, *J. Microsc.* 218 (2005) 133–147.
18. D. E. Dolmans, D. Fukumura, R. K. Jain, Photodynamic therapy for cancer, *Nat. Rev., Cancer* 3 (2003) 380–387.
19. T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B.W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, Q. Peng, Photodynamic therapy, *J. Natl. Cancer Inst.* 90 1998: 889–905.
20. Brancalion L, Moseley H., Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* (2002) 17(3):173-186.

21. Kiss I., Tomášek J.: Rakovina tlustého střeva a konečníku [cit. 2011-06-13]
URL:<http://www.linkos.cz/pacienti/traveni_clanek.php>
22. Chovanec J., Dostálová Z., Navrátilová J.: Breast cancer – an actual problem. Interní. Med. 2008; 10 (2): 84–89
23. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [cit. 2011-06-13]
URL:<<http://www.svod.cz/analyse.php?modul=incmor#>>
24. Mališ J., Vícha A., Stejskalová E.: Neuroblastom vysokého rizika. Lékařské listy 49/2003
25. Mezei M, Gulasekharam V. Liposomes – a selective drug delivery system for the topical route administration. I. Lotion dosage forms. Life Sci 1980; 26: 1473–1477.
26. Mezei M, Gulasekharam. Liposomes – a selective drug delivery system for the topical route administration: Gel dosage form. J Pharm Pharmacol 1982; 34: 473–474.
27. Šentjurc M, Vrhovnik K, Kristl J. Liposomes as a topical delivery system: the role of size on transport studied by the EPR imaging method. J Controlled Release 1999; 59: 87–97.
28. Cevc G. Transferosomes, liposomes and other lipid suspensions on the skin: Permeation enhancement, vesicle penetration and transdermal drug delivery. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 1996; 13: 257–388.
29. Verma DD, Verma S, Blume G, Fahr A. Liposomes increase skin permeation of entrapped and non-trapped hydrophilic substances into human skin: A skin permeation and confocal laser scanning microscopy study. Eur J Pharm Biopharm 2003; 55: 271–277.
30. Inaba M, Tazuko T, Fujimoto S, Sakurai MK, Ohnishi Y, Ueyama Y, Nomura T. 1986. Evaluation of response rates to variol antitumor agent sof human gastrin tumors implanted in nude mice. Jap J Cancer 77: 190-196.

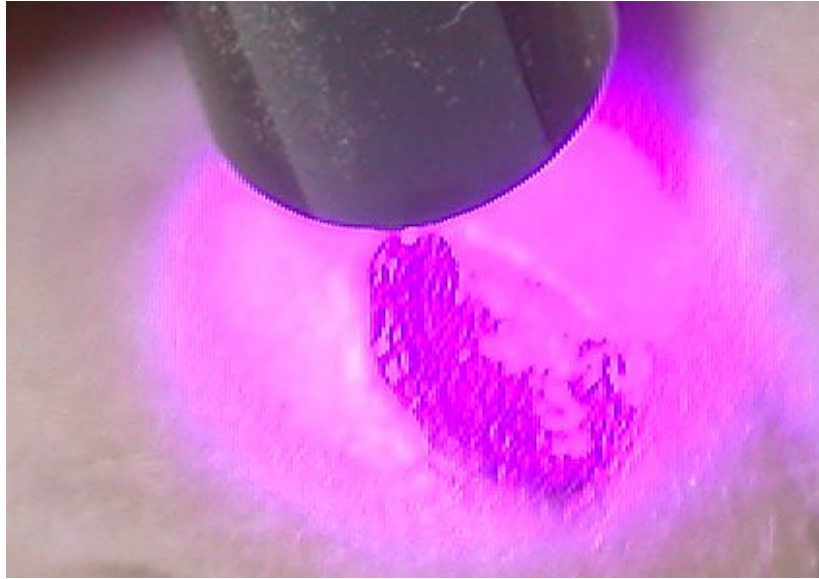
31. Nekvasil M, Zadinová M, Tahotná L, Klepáček I, Poučková P, Ježek P.: An optimum modality for photodynamic therapy of tumors: gels containing liposomes with hydrophobic photosensitizers. *Drug Development Research* 68, 235-252, 2007.
32. Poučková P: Fotodynamická terapie maligních nádorů a protinádorový účinek ribonukleáz v experimentu, Habilitační práce, 2003, 212s., Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta.
33. Krestýn E: Vliv fyzikálních a chemických faktorů na nádorové buňky, Dizertační práce, 2009, 99s., lékařská fakulta Univerzity Palackého Olomouc
34. Ježek P, Nekvasil M, Skobisová E, Urbánková E, Jirsa M, Zadinová M, Poučková P, Klepáček I.: Experimental photodynamic therapy with meso-tetrakisphenylporphyrin (TPP) in liposomes leads to disintegration of human amelanotic melanoma implanted to nude mice. *Int. J. Cancer* 2003; 103: 693-702

10. Příloha

FOTODYNAMICKÁ TERAPIE s liposomálním preparátem s ftalocyaninem
(fotogalerie)



Nu/nu myš před začátkem terapie



Ozáření nádoru červeným světlem (Xenonovou lampou)



Nu/nu myš – 7. den po PDT



Nu/nu myš - 14. den po PDT



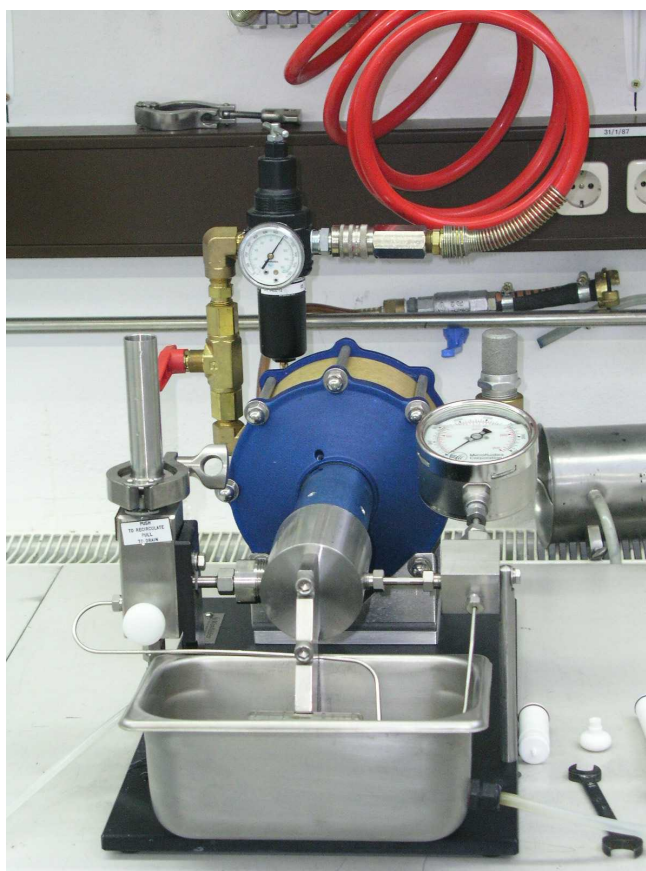
Nu/nu myš - 21. den po PDT



Nu/nu myš – 30.den po PDT



Lokální pohled na nekrózu po vypálení



Mikrofluidizér 110 S



Mikrofluidizér 110 S