

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

**NOVÉ FTALOCYANINOVÉ FOTOLENIZITIZÉRY
PRO FOTODYNAMICKOU TERAPII
NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Miloslav Macháček

Hradec Králové 2016

Kateřina Zvolánková

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli Mgr. Miloslavu Macháčkovi za odborné vedení mé diplomové práce, trpělivost a vytvoření přátelské pracovní atmosféry. Dále bych ráda poděkovala celému kolektivu Katedry biochemických věd a kolegům z laboratoře za jejich zájem a pomoc při řešení výzkumných problémů a doc. PharmDr. Veronice Novákové Ph.D. za pomoc při přípravě nosičových systémů. V neposlední řadě děkuji Grantové Agentuře Univerzity Karlovy (GAUK 1916214) a Specifickému vysokoškolskému výzkumu (SVV 260 294) za finanční podporu tohoto projektu.

Hradec Králové 2016

Kateřina Zvolánková

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne

podpis

1 ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Kateřina Zvolánková
Školitel: Mgr. Miloslav Macháček
Název diplomové práce: Nové ftalocyaninové fotosenzitizéry pro fotodynamickou terapii nádorových onemocnění

Nádorová onemocnění jsou již po řadu let závažným celosvětovým problémem. Významným faktorem jejich stále rostoucí incidence v lidské společnosti je dlouhověkost populace. Dalšími možnými vlivy jsou vyšší výskyt fyzikálních a chemických kancerogenů a lepší diagnostika zhoubných novotvarů. Světová zdravotnická organizace (WHO) uvádí, že ročně zemře v důsledku onkologického onemocnění téměř 8 milionů obyvatel naší planety, přičemž 1,7 milionů úmrtí připadá na oblast Evropy. Zhoubné nádory jsou v České republice (ČR), stejně jako ve světě, druhou nejčastější příčinou úmrtí po kardiovaskulárních chorobách, a to u obou pohlaví. Míra úmrtnosti na zhoubné nádory navzdory jejich rostoucí incidenci ve světě klesá. Tento pokles souvisí především s vyšší kvalitou lékařské péče a s dostupností nových diagnostických a terapeutických prostředků.

Terapie nádorových onemocnění je proto významným předmětem biomedicínského výzkumu. Snahou vědeckých týmů je vyvinout účinnou a vysoce selektivní terapii, která by cíleně zasáhla nádorové buňky a minimálně ovlivnila zdravou tkáň. Fotodynamická terapie (PDT) má výborný potenciál pro splnění těchto požadavků. V současné době je PDT stále především ve fázi preklinických a klinických testů, které jsou zásadní pro její další rozvoj. V klinické praxi se PDT využívá v současné době jen v USA, Kanadě, Japonsku a v některých evropských státech.

Hlavní komponenty PDT tvoří fotosenzitizér (PS), červená oblast viditelného světla a kyslík. Tyto složky samy o sobě nejsou toxické, avšak jejich kombinace iniciuje fotochemickou reakci, která je klíčovým momentem celé metody. Produktem této reakce jsou vysoce reaktivní formy kyslíku (ROS) navozující poškození buněčných

komponent a buněčnou smrt. Kromě přímého cytotoxického efektu vyvolává PDT také zánětlivou reakci a narušuje krevní zásobení nádoru.

Cílem této práce bylo hodnocení nových PS ze skupiny ftalocyaninů a jejich aza-analogů, které by mohly být v budoucnu s výhodou použity v klinické praxi. Tyto PS byly hodnoceny z hlediska jejich toxického efektu pro nádorové buňky. Cytotoxická účinnost byla stanovena v podmínkách *in vitro* na buněčné linii HeLa pocházející z maligního karcinomu děložního čípku. Životaschopnost buněk po kultivaci s PS a po ozáření světlem ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 15 min, 11,2 J/cm²) byla stanovena pomocí testu vychytávání neutrální červeně.

K hodnocení morfologických změn buněk po aktivaci PS byla použita fluorescenční mikroskopie a mikroskopie v diferenciatním interferenčním kontrastu. Pro vizualizaci mitochondriálních změn bylo použito fluorescenční barvení sondou MitoTracker Green, pro detekci změn v jádře byla použita kombinace propidium jodidu a fluorescenční sondy Hoechst 33342. Pro určení subcelulární lokalizace byla použita navíc fluorescenční sonda LysoTracker Blue.

Výsledky provedených experimentů ukázaly poměrně nízkou aktivitu sledovaného PS ze skupiny ftalocyaninů, aktivita jeho aza-analoga nebyla v našich podmínkách potvrzena. Vhodnou kombinací PS s nosičovým systémem se v průběhu studie nepodařilo nalézt vzhledem k vysoké toxicitě vybraných nosičů (Cremophor EL, různé typy Si nanočástic), či jejich limitované kapacitě pro příjem PS (liposomy).

2 ABSTRACT

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biochemical Sciences

Candidate: Kateřina Zvolánková
Supervisor: Mgr. Miloslav Macháček
Title of diploma thesis: Novel phthalocyanine photosensitizers for photodynamic therapy of tumorous diseases

Oncological diseases are considered to be a serious global problem for many years. One of the most significant factors of their expansion in human population is an increasing life expectancy. Higher incidence of physical and chemical carcinogens and better diagnostic methods of malignant neoplasms are farther possible factors. According to World Health Organisation (WHO) almost 8 million people in the world die from oncological disease every year, whereas 1.7 million of them are Europeans. Malign tumours in Czech Republic, as well as in the world, are the second most frequent causes of death right after cardiovascular diseases, in both genders. Despite increasing incidence of malign tumours in the world, the mortality rate is decreasing. This decline is connected especially with higher quality of medical care together with availability of new diagnostic and therapeutic means.

Thus the therapy of cancer is an important subject of biomedical research. Scientists have been trying to discover an effective and highly selective therapy which is capable of targeting cancer cells with a minimal impact on healthy tissue. Photodynamic therapy (PDT) has a potential to meet these requirements. PDT is currently in a stage of preclinical and clinical studies that are essential for its next development. It's clinically employed in USA, Canada, Japan and also in some european countries so far.

PDT requires three key elements: the photosensitizer (PS), the red region of a visible light and the oxygen. These components are nontoxic on their own, but their combination initiates photochemical reaction which is the key step of this approach. Products of photoreaction are highly reactive oxygen species (ROS) inducing damage to

cell components and eventually cell death. Besides the direct cytotoxic effect, PDT induces also inflammation and disruption of tumor vasculature.

The aim of this study was an evaluation of new PS from the group of phtalocyanines and their aza-analogues which could be used in a clinical application of PDT. Cytotoxic efficiency was evaluated *in vitro* using human cervical carcinoma cell line (HeLa). Cell viability after incubation with PS and illumination by a red light was assessed by neutral red uptake assay.

Fluorescence microscopy and microscopy in differential interference contrast were employed for evaluation of morphological changes after activation of PS by light. Visualization of mitochondrial changes due to PDT by the fluorescence probe MitoTracker Green and detection of changes in nucleus by combination of propidium iodide (PI) and the fluorescence probe Hoechst 33342 were used. For the subcellular localization assay also the fluorescence probe LysoTracker Blue was used.

The results of the experiments demonstrated relatively low activity of observed PS from the group of phtalocyanines against selected cell line. Cytotoxic activity of its aza-analogue was not confirmed. Appropriate combination of photosensitizer and carrier couldn't be found due to high toxicity of selected carriers (observed in Cremophor EL, various types of Si nanoparticles) or due to their limited capacity for photosensitizer (observed in liposomes).

3 OBSAH

1	ABSTRAKT	4
2	ABSTRACT	6
3	OBSAH	8
4	ÚVOD	11
5	SEZNAM ZKRATEK	12
6	TEORETICKÁ ČÁST	16
6.1	FOTODYNAMICKÁ TERAPIE	16
6.1.1	Historie PDT	16
6.1.2	Princip PDT	18
6.2	FOTOSENZITIZÉRY	21
6.2.1	Struktura fotosenzitizérů	21
6.2.2	Vlastnosti ideálního fotosenzitizéru	22
6.2.3	Photobleaching	23
6.2.4	Rozdělení fotosenzitizérů	24
6.2.5	První generace fotosenzitizérů	24
6.2.6	Druhá generace fotosenzitizérů	26
6.2.7	Třetí generace fotosenzitizérů	40
6.2.8	Farmakologie fotosenzitizérů	43
6.3	SVĚTLO VE FOTODYNAMICKÉ TERAPII	45
6.3.1	Dávka PDT	46
6.3.2	Zdroje světelného záření	47
6.4	BIOLOGICKÁ REAKCE NA PDT	49
6.4.1	Přímý cytotoxický efekt	49
6.4.2	Antivaskulární efekt v PDT	54
6.4.3	Rozvoj imunitní odpovědi	55

6.4.4	Cytoprotektivní mechanismy nádorové tkáně.....	56
6.5	PDT V KOMBINACI S OSTATNÍMI TERAPEUTICKÝMI PŘÍSTUPY.....	57
6.5.1	Kombinace PDT s antiangiogeními látkami	58
6.6	NOVÉ STRATEGIE FOTODYNAMICKÉ TERAPIE.....	59
6.6.1	Dvoufotonová PDT.....	59
6.6.2	Metronomická PDT	60
6.6.3	PDT Molecular Beacons	61
6.6.4	Nanotechnologie v PDT.....	61
6.6.5	Fotochemická internalizace.....	63
6.7	FOTODYNAMICKÁ TERAPIE V KLINICKÉ PRAXI	64
6.7.1	Kožní nádory	65
6.7.2	Nádorová onemocnění gastrointestinálního traktu.....	67
6.7.3	Rakovina prostaty.....	68
6.7.4	Bariéry klinické aplikace PDT	69
7	CÍLE PRÁCE	70
8	METODICKÁ ČÁST	71
8.1	MANIPULAČNÍ VYBAVENÍ PRO PRÁCI S BUŇKAMI	71
8.2	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....	71
8.3	LÁTKY UŽÍVANÉ PŘI KULTIVACI BUNĚK	72
8.4	OSTATNÍ REAGENCIA A CHEMIKÁLIE	72
8.5	POUŽITÉ FOTOSENZITIZÉRY	73
8.6	PŘÍPRAVA LIPOSOMŮ A CREMOHPOHRU EL.....	75
8.7	BUNĚČNÁ LINIE HeLa	75
8.8	KULTIVAČNÍ MÉDIUM.....	76
8.9	KULTIVACE BUNĚK, PASÁŽOVÁNÍ.....	76
8.10	POČÍTÁNÍ BUNĚK – STANOVENÍ POČTU ŽIVÝCH BUNĚK ..	77

8.11	NASAZOVÁNÍ BUNĚK NA EXPERIMENTY	78
8.12	PŘIDÁNÍ STUDOVANÝCH LÁTEK	78
8.13	AKTIVACE FOTOSENZITIZÉRŮ	79
8.14	STANOVENÍ ŽIVOTASCHOPNOSTI BUNĚK ZA VYUŽITÍ TESTU VYCHYTÁVÁNÍ NEUTRÁLNÍ ČERVENĚ.....	79
8.15	UPTAKE BUNĚK	80
8.16	VYHODNOCENÍ DAT	80
8.17	FOTOGRAFICKÁ DOKUMENTACE	81
8.17.1	Fluorescenční barvení jader	81
8.17.2	Fluorescenční barvení mitochondrií	82
8.17.3	Fluorescenční barvení lysozomů	82
9	VÝSLEDKY	83
9.1	CYTOTOXICITNÍ EXPERIMENTY	83
9.1.1	Ftalocyanin P9-0Zn	83
9.1.2	Azaftalocyanin ZIP21Zn.....	85
9.1.3	Porovnání cytotoxického působení studovaných fotosenzitizérů a jejich nosičových systémů.....	88
9.1.4	DMSO	89
9.2	FOTOGRAFICKÁ DOKUMENTACE	90
9.2.1	Subcelulární lokalizace	90
9.2.2	Morfologické změny buněk vyvolané PDT	92
10	DISKUZE	101
11	ZÁVĚRY	105
12	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	106

4 ÚVOD

Téma *Nové ftalocyaninové fotosenzitizéry pro fotodynamickou terapii nádorových onemocnění* jsem si pro vypracování své diplomové práce zvolila proto, že mě velice zaujala fotodynamická terapie jako metoda, která na rozdíl od konvenčních protinádorových léčebných postupů využívá netoxických látek aktivovaných zdravím neškodným viditelným zářením. Zároveň nabízí možnost selektivního zásahu patologicky změněné tkáně a do určité míry tak chrání pacienta před závažnými nežádoucími účinky. Práce na Katedře biochemických věd mi dala příležitost blíže se seznámit s laboratorním prostředím a podílet se na výzkumu, což byl další důvod mé volby tématu diplomové práce.

Údaje a výsledky obsažené v této práci mohou být použity pro další a hlubší studium účinnosti a toxicity daných látek prostřednictvím *in vitro* experimentů na buněčných liniích. Informace, které lze z této práce získat, umožňují bližší studium dějů vedoucích v důsledku fotodynamické terapie k poškození buněčných komponent a k buněčné smrti. Stejně tak mohou být tyto údaje zdrojem pro lepší pochopení mechanismu účinku daných látek a jejich buněčné lokalizace.

5 SEZNAM ZKRATEK

ABC transportéry	membránové transportéry (<i>ATP-binding cassette transporters</i>)
ALA	kyselina 5-aminolevulová (<i>5-aminolevulinic acid</i>)
AlPcS4	hlinitý flalocyanin tetrasulfonát
AMD	věkem podmíněná (senilní) makulární degenerace (<i>age-related macular degeneration</i>)
Apaf-1	faktor aktivující proteázy apoptózy (<i>apoptotic-protease activating factor-1</i>)
AzaPc	azaftalocyanin(y) (<i>azaphthalocyanine(s)</i>)
BA	biologická aktivita
Bak	proapoptotický protein (<i>Bcl-2 homologous antagonist killer</i>)
Bax	proapoptotický protein (<i>Bcl-2-associated X protein</i>)
BCC	bazální buněčný karcinom (<i>basal-cell carcinoma</i>)
Bcl-2	rodina proteinů regulujících apoptózu (<i>B-cell lymphoma 2</i>)
BPD	benzoporfyrinový derivát
COX-2	cyklooxygenáza 2
DCS	difúzní korelační spektroskopie (<i>diffuse correlation spectroscopy</i>)
DISC	proteinový komplex vytvořený během apoptózy (<i>death inducing signaling complex</i>)
D-L interval	časový interval mezi podáním fotosenzitizéru a ozářením (<i>drug-light interval</i>)
DIC	diferenciální interferenční kontrast, Nomarského kontrast
DMEM	kultivační médium (<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>)
DMF	dimethylformamid
DMSO	rozpouštědlo (<i>dimethylsulfoxid</i>)
EC ₅₀	střední efektivní koncentrace
EGF	epidermální růstový faktor (<i>epidermal growth factor</i>)
EPO	erytropoetin
ER	endoplazmatické retikulum
FASL	transmembránový protein účastnící se apoptózy
FAS/CD95	receptor pro FASL
FBS	fetální bovinní sérum (zde teplem inaktivované)

FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv v USA (<i>Food and Drug Administration</i>)
$\Phi\Delta$	kvantový výtěžek singletového kyslíku
ΦF	kvantový výtěžek fluorescence
GA	Golgiho aparát
GSH	glutathion
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
HAL	hexylester ALA
HEPES	pufr (<i>N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid</i>)
HpD	derivát hematoporfyrinu 13
HPPH	2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinyl pyrofeoforbid <i>a</i>
HSP	proteiny teplotního šoku (<i>heat shock proteins</i>)
IC ₅₀	střední inhibiční koncentrace
IL	interleukin
i. v.	intravenózní/intravenózně
KK638B	modifikované křemíkové nanočástice
KK638A NH ₃ ⁺	modifikované křemíkové nanočástice
LED	světlo emitující diody (<i>light emitting diodes</i>)
LDL	lipoprotein s nízkou hustotou (<i>low density lipoprotein</i>)
LOX	lipoxygenáza
MAL	methylester ALA
MBs	molecular beacons
MHC-I	transmembránový histokompatibilní komplex I (<i>major histocompatibility komplex class I</i>)
mPDT	metronomická fotodynamická terapie (<i>metronomic photodynamic therapy</i>)
mTOR	serin/threonin proteinkináza (<i>mammalian target of rapamycin</i>)
mTHPC	meta-tetrahydroxyphenylchlorin
nBCC	nodulární bazální buněčný karcinom (<i>nodular basal-cell carcinoma</i>)
Nc	naftalocyanin(y) (<i>naphthalocyanine(s)</i>)
NIR	oblast blízká infračervenému světlu (<i>near infrared</i>)
NMSD	nemelanomová kožní onemocnění (<i>nonmelanoma skin disorders</i>)
NPe6	N-aspartyl chlorin e6

NR	neutrální červeň (<i>neutral red</i>)
$^1\text{O}_2$	singletový kyslík
$\cdot\text{O}_2^-$	superoxid anion radikál
$\cdot\text{OH}$	hydroxylový radikál
PBS	pufr (<i>phosphate buffered saline</i>)
Pc	ftalocyanin(y) (<i>phthalocyanine(s)</i>)
Pc4	křemičitý ftalocyanin
P9-0Zn	zinečnatý ftalocyanin
PDT	fotodynamická terapie (<i>photodynamic therapy</i>)
PI	propidium jodid (<i>propidium iodide</i>)
PPIX	protoporfyrin IX
PS	fotosenzitizér(y) (<i>photosensitizer(s)</i>)
P/S	penicilin/streptomycin
PSA	prostatický specifický antigen (<i>prostate-specific antigen</i>)
QSAR	studie kvantitativních vztahů mezi chemickou strukturou a biologickou aktivitou látek (<i>quantitative structure–activity relationship</i>)
RIP1	kináza, která je součástí multiproteinového komplexu vznikajícího během buněčné smrti (<i>receptor interacting protein 1</i>)
ROS	reaktivní formy kyslíku (<i>reactive oxygen species</i>)
sBCC	povrchový bazální buněčný karcinom (<i>superficial basal-cell carcinoma</i>)
SCC	spinocelulární karcinom (<i>squamous-cell carcinoma</i>)
SCM	DMEM médium obsahující sérum a další suplementy (<i>serum containing medium</i>)
SOD	superoxiddismutáza
T/E	trypsin/EDTA
TC ₅₀	střední toxická koncentrace
TGF β	transformující růstový faktor beta (<i>transforming growth factor- β</i>)
TNF	tumor nekrotizující faktor (<i>tumour necrosis factor</i>)
TNFR1/2	receptory pro TNF
TRAIL	apoptózu indukující ligand patřící do skupiny TNF (<i>TNF-related apoptosis inducing ligands</i>)
TRAILR1/2	receptory pro TRAIL (<i>TRAIL receptor 1/2</i>)

VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
WST09	padoporfin (Tookad®)
WST11	padeliporfin (Tookad® Soluble, Stakel®)
ZnPc	zinečnatý ftalocyanin
ZIP21Zn	zinečnatý azaftalocyanin (tetrapyrazinoporfyrazin)

6 TEORETICKÁ ČÁST

6.1 FOTODYNAMICKÁ TERAPIE

Fotodynamická terapie je moderní, klinicky schválenou, minimálně invazivní léčebnou metodou, kterou lze aplikovat v terapii maligních i nemaligních onemocnění.

I přesto, že v současné době máme mnohem detailnější znalosti o vlastnostech a metabolismu nádorových buněk, které umožnily přípravu nových, cíleně působících léčiv, stále se nepodařilo nalézt účinnou a zároveň maximálně selektivní protinádorovou terapii. Proto se pozornost obrátila také na jiné než klasické léčebné postupy. PDT má dobrý potenciál k naplnění požadavků, které jsou kladeny na úspěšnou protinádorovou terapii. Ačkoli je tento přístup znám již řadu let, stále se jedná o metodu ne zcela doceněnou, která zůstává především ve fázi výzkumu. (Agostinis a kol. 2011, Yoon a kol. 2013)

Výhodou PDT je absence nežádoucích účinků, které jsou typické pro konvenční protinádorové léčebné metody jako chemoterapie či radioterapie. U některých pacientů sice může PDT vyvolávat bolest a přetrvávající fotosenzitivitu kůže, invazivnost terapie však zůstává ve srovnání s ostatními protinádorovými postupy minimální. PDT může být použita samostatně nebo v kombinaci s tradičními metodami onkologické léčby, kterými jsou chirurgické odstranění nádoru, chemoterapie a radioterapie. Kombinovaná terapie přispívá účinkům radikální i paliativní terapie u většiny onkologických pacientů. Velkou nadějí představuje zvláště pro pacienty se zvýšeným rizikem recidivy nádoru po chirurgickém zákroku. (Agostinis a kol. 2011, Filonenko 2013)

6.1.1 Historie PDT

Terapeutický potenciál světla byl objeven již ve starověku na území Indie, Egypta a Číny. Tamní civilizace využívaly sluneční záření k léčbě kožních onemocnění, jakými jsou vitiligo, psoriáza či ekzém, a zároveň pozorovaly jeho příznivé účinky na duševní zdraví. Od samého počátku si však byli lidé také vědomi negativních vlivů slunečního záření. Metoda založená na účincích UV záření či viditelného světla je

dodnes známa jako fototerapie, která nachází uplatnění především v oborech dermatologie, porodnictví a psychiatrie/psychologie. (Ormond a Freeman 2013, Zimcik a Miletin 2009)

Počátky fotodynamické terapie sahají do roku 1900, kdy byl na univerzitě v Mnichově poprvé detailněji popsán efekt fotosenzitizace. Tamní student medicíny Oscar Raab, pod dohledem prof. H. von Tappeinera, zaznamenal během své experimentální práce letální účinek akridinové oranže v kombinaci se současně působícím světlem na modelovém organismu, jímž byl prvok z rodu *Paramecium* (treпка). Akridinová oranž je přitom bez přítomnosti světla chemicky inertním barvivem. (Filonenko 2013) V roce 1924 francouzský fyzik Policard zaznamenal, že nádorová tkáň vykazuje výrazně vyšší fluorescenci než tkáň zdravá. Tento poznatek využila dvojice Figge a Rasmussen-Taxdal se svým výzkumným týmem, kteří v období 40. až 60. letech začali s podáváním přírodních porfyrinů pacientům a zvířatům trpícím nádorovým onemocněním ve snaze lépe detekovat nádorovou tkáň pomocí fluorescence. V šedesátých letech byly ke stejným účelům poprvé použity syntetické porfyriny – tetrafenylporfíny. (Macdonald a Dougherty 2001, Zimcik a Miletin 2009)

Kromě porfyrinů byly v průběhu 20. století zkoušeny také další fotosenzitivní látky, např. eosin, které jsou schopné v přítomnosti světla indukovat buněčnou smrt. Zároveň se ukázalo, že pro letální efekt je vyžadována přítomnost molekulárního kyslíku. (Allen a kol. 2001)

Rok 1960 znamenal pro fotodynamickou terapii zásadní posun, a to díky spolupráci Richarda Lipsona a Samuela Schwartz. Schwartz dokázal z nádorové tkáně izolovat derivát hematoporfyrinu (HpD), který byl záhy použit jako tumor detekující činidlo při experimentální práci Lipsona. Díky těmto pokusům se začalo prvně uvažovat, že HpD by se mohl uplatnit jako fotosenzitizér při destrukci nádorových buněk. (Macdonald a Dougherty 2001)

V sedmdesátých letech byl identifikován hlavní cytotoxický produkt fotochemické reakce – singletový kyslík ($^1\text{O}_2$). Jako fotosenzitizéry byly blíže zkoumány látky porfyrinového typu, které produkovaly $^1\text{O}_2$ ve vysoké míře a vykazovaly absorpční maximum světla v červené oblasti spektra. V této oblasti bylo totiž popsáno tzv. optické okno tkáně, jehož vlastnosti jsou pro PDT ideální z hlediska dostatečně hluboké penetrace světelného paprsku a zároveň vysoké produkce $^1\text{O}_2$. (Macdonald a Dougherty 2001, Yoon a kol. 2013) Pozornost byla věnována především izolaci a identifikaci aktivních frakcí HpD. Podařilo se získat čistou látku nazvanou

Photofrin. Ten byl v roce 1993 v Kanadě schválen pro léčbu rakoviny močového měchýře a započal tak historii PDT v klinické praxi. Od doby zavedení Photofrinu do klinické praxe byla nasyntetizována řada nových fotosenzitizérů a vývoj PDT včetně jejích modifikací stále pokračuje. (Macdonald a Dougherty 2001, Josefsen a Boyle 2008)

6.1.2 Princip PDT

Mechanismus PDT je založen na třech zásadních komponentech: PS, světlo a kyslík. Tato kombinace iniciuje fotochemickou reakci, jejímž produktem jsou ROS. Tyto molekuly jsou zodpovědné za poškození buňky, které může vést až k buněčné smrti cestou apoptózy, nekrózy či buněčné smrti spojené s autofagií. (Agostinis a kol. 2011)

Fotochemická reakce je zahájena v okamžiku, když PS absorbuje světlo specifické vlnové délky a následně přenáší svoji energii na okolní kyslík. Výsledkem je vznik ROS, z nichž za nejdůležitější je považován $^1\text{O}_2$. (Machacek a kol. 2015, Zimeik a kol. 2010)

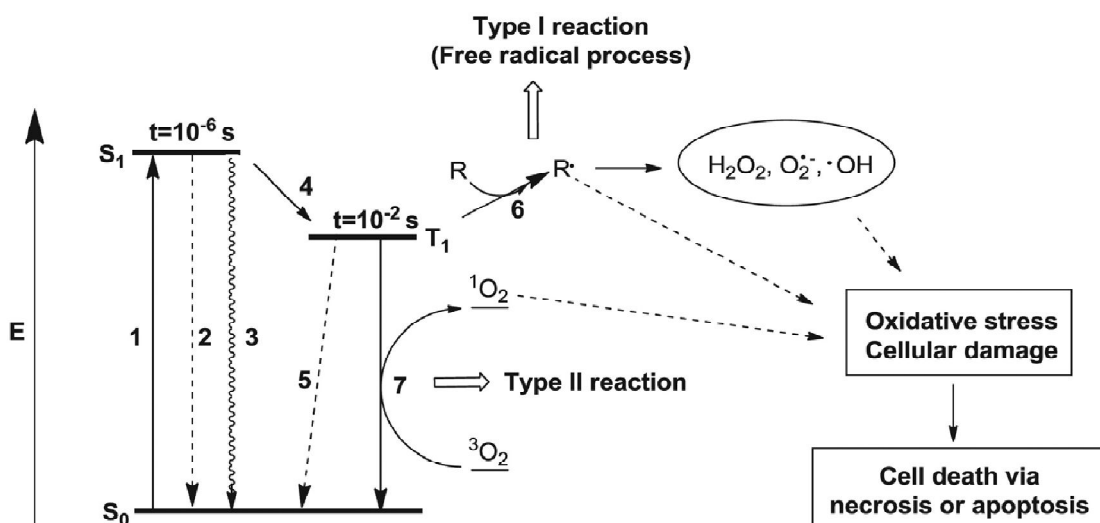
Ozáření PS vyvolává jeho excitaci ze základního singletového do excitovaného singletového stavu o vysoké energii. Trvání tohoto excitovaného nestabilního stavu je velmi krátké, řádově ns, a dochází k návratu PS na základní energetickou hladinu prostřednictvím uvolnění absorbované energie v podobě fluorescence nebo dochází k vnitřní konverzi molekuly. Další možností je přechod PS z excitovaného singletového stavu na energetický mezistupeň nazývaný jako excitovaný tripletový stav. Ten je pro PDT nejvýznamnější. Oproti singletovému excitovanému stavu je stabilnější a jeho trvání se pohybuje řádově v μs . (Allen a kol. 2001, Yoon a kol. 2013) Tento excitovaný tripletový stav je ukončen návratem PS do stavu základního prostřednictvím dvou typů fotoreakcí, případně PS uvolňuje energii během srážek s dalšími molekulami či v podobě fosforescence. (Macdonald a Dougherty 2001, Yoon a kol. 2013)

6.1.2.1 Fotoreakce typu I

V podmínkách bez přítomnosti kyslíku může PS v excitovaném stavu přímo reagovat s organickými substráty na principu oxidačně-redukčních reakcí, které vedou ke vzniku oxidovaného substrátu a redukováného PS. Pokud se nejedná o zcela anoxické prostředí, pak může redukováný PS reagovat s kyslíkem za vzniku ROS zahrnujících především superoxidový anion radikál ($\cdot\text{O}_2^-$), peroxid vodíku (H_2O_2) a hydroxylový radikál ($\cdot\text{OH}$). Tyto reakce jsou označovány jako fotoreakce typu I, závisí na koncentraci cílového substrátu a nabývají proto na významu zejména při vysokých koncentracích PS a za hypoxických podmínek. Preferovány jsou také ve více polárním prostředí, kde jsou radikály stabilizovány. (Macdonald a Dougherty 2001, Zimcik a Miletin 2009)

6.1.2.2 Fotoreakce typu II

V přítomnosti kyslíku přenáší chromofor ochotně svou energii na molekulární kyslík v základním tripletovém energetickém stavu, což vede k jeho konverzi na $^1\text{O}_2$. Tyto reakce, které nazýváme jako fotoreakce typu II, jsou charakteristické závislostí na přítomnosti kyslíku. V průběhu fotodynamického děje dominují nad reakcemi typu I, obvykle se však oba typy reakcí objevují současně. (Macdonald a Dougherty 2001, Zimcik a Miletin 2009)



Obrázek 1 Modifikovaný Jablonského diagram popisující fotofyzikální jevy během PDT: 1) absorpce, 2) fluorescence, 3) vnitřní konverze, 4) přechod na energetický mezistupeň (excitovaný tripletový stav), 5) fosforescence, 6) tvorba volných radikálů v důsledku fotoreakce typu I, 7) tvorba 1O_2 prostřednictvím fotoreakce typu II (Yoon a kol. 2013)

1O_2 je dominantním cytotoxickým agens PDT. Jedná se o vysoce reaktivní formu kyslíku vznikající změnou spinu jednoho elektronu, který se nachází v nejbližší vrstvě od jádra. 1O_2 se primárně váže na dvojně vazby a reaguje tak s biologickými molekulami zahrnujícími lipidy, proteiny i nukleové kyseliny. Životnost 1O_2 je díky jeho značné reaktivitě velice krátká (3-4 μs ve vodě, 0,2 μs v buňce). (Bacellar a kol. 2015, Zimcik a Miletin 2009) Tím je limitována difúze 1O_2 do vzdálenosti cca 10-55 nm. Pokud porovnáme maximální vzdálenost difúze s velikostí lidských buněk (řádově 10-30 μm v průměru) či intracelulárních organel (např. mitochondrie o tloušťce cca 500 nm), je zřejmé, že fotodynamický efekt bude lokalizován v bezprostřední blízkosti vzniku 1O_2 (lokalizace PS). (Agostinis a kol. 2011, Bacellar a kol. 2015)

Protinádorový efekt PDT je kromě přímého cytotoxického vlivu 1O_2 způsoben také narušením vaskularizace nádoru a vznikem mohutné zánětlivé reakce. Poměrné zastoupení těchto mechanismů závisí na druhu a dávce použitého PS, na intervalu mezi podáním PS a ozářením nádoru (D-L interval), na celkové dávce světla a jeho fluenci, tj. počtu částic, které prošly jednotkou plochy v daném čase. Proto definovat optimální podmínky pro použití PDT je poměrně náročné a vyžaduje interdisciplinární spolupráci. (Agostinis a kol. 2011)

6.2 FOTOLENIZITIZÉRY

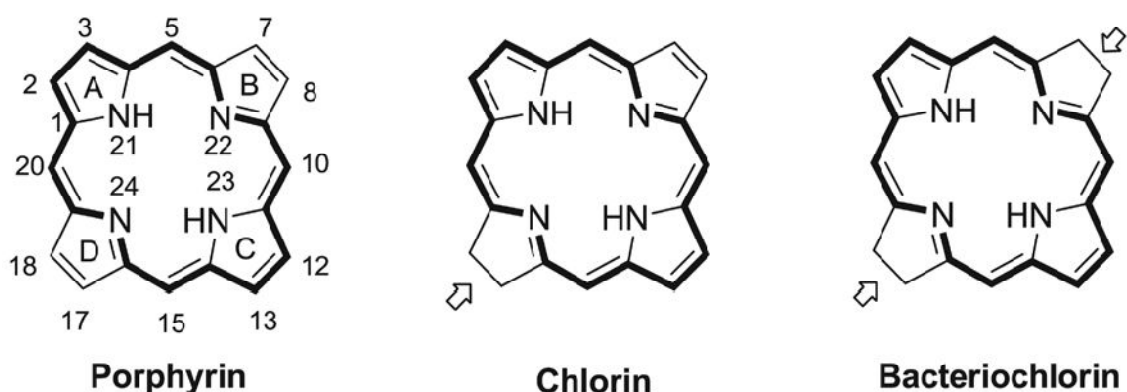
Fotosenzitizéry jsou molekuly schopné absorbovat světlo a tím přecházet do excitovaného stavu o vysoké energii, která může být následně využita ke spuštění fotochemických reakcí. PS je sám o sobě, bez ozáření světlem vhodné vlnové délky, neúčinnou látkou. Po jeho podání do těla pacienta (i.v., p.o., topicky) je PS přednostně vychytáván nádorovou tkání. Díky krátké životnosti $^1\text{O}_2$ a jeho dosahu v tkáni je účinek omezen pouze na buňku obsahující PS. Takto dochází k redukci nežádoucích účinků na zdravou tkáň. (Josefsen a Boyle 2012, Kala a kol. 2009)

Důležitým faktorem pro PDT je mimo jiné i D-L interval, který spolu s farmakokinetickými vlastnostmi PS ovlivňuje jeho distribuci. Při použití kratšího D-L intervalu bude PDT působit zejména v krevním řečišti nádoru vzhledem k lokalizaci PS uvnitř cév. Rovněž PS, které jsou rychle eliminovány z těla, vyžadují aktivaci bez delšího časového prodloužení. Pokud se jedná o PS s delším poločasem, pak prodloužení D-L intervalu může navodit přímé cytotoxické účinky v nádorové tkáni, kam se PS stačil distribuovat. (Chen a kol. 2006)

6.2.1 Struktura fotosenzitizérů

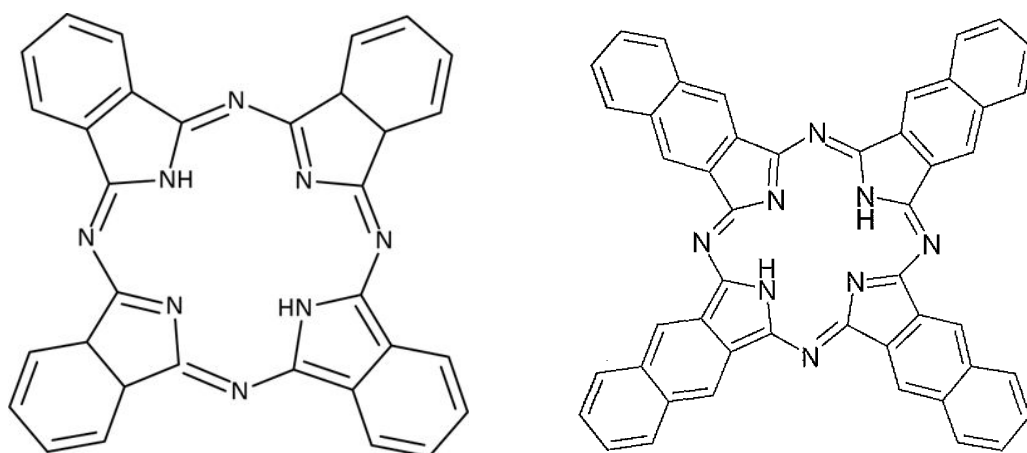
Fotosenzitizéry užívané v PDT nádorových onemocnění pochází zejména ze skupiny porfyrinů, chlorinů, bakteriochlorinů, taxafrinů nebo ftalocyaninů a naftalocyaninů. Obecně se jedná o planární aromatické molekuly složené nejčastěji ze čtyř symetricky uspořádaných pyrolových jednotek. Tetrapyrolové jádro obsažené v PS nacházíme rovněž v přírodních molekulách, jako je např. protoporfyrin obsažený v krevním barvivu hemoglobinu. (Agostinis a kol. 2011, Macdonald a Dougherty 2001)

Porfyriny, chloriny a bakteriochloriny obsahují ve své struktuře methinové můstky spojující pyrolové jednotky. Porfyriny jsou plně konjugované, chloriny mají redukovanou jednu dvojnou vazbu, bakteriochloriny mají redukované dvě dvojně vazby. Redukce dvojně vazby způsobuje posun absorpčního maxima k vyšším vlnovým délkám v červené oblasti spektra. Zatímco porfyriny mají absorpční maximum při vlnových délkách okolo 630 nm, u chlorinů nabývá hodnot 650-680 nm a u bakteriochlorinů 730-800 nm. (Josefsen a Boyle 2012, Macdonald a Dougherty 2001)



Obrázek 2 Srovnání struktury porfyrinů, chlorinů a bakteriochlorinů s vyznačením redukce dvojných vazeb (Yoon a kol. 2013)

Odlíšnou strukturu mají ftalocyaniny (Pcs) a naftalocyaniny (Ncs), pro které je typická přítomnost čtyř fenylových respektive naftylových skupin. Absorpční maximum Pcs se nachází v oblasti nad 650 nm, přítomnost dalšího benzenového kruhu posouvá absorpci Ncs k hodnotám nad 760 nm. (Zimcik a Miletin 2009)



Obrázek 3 Struktura ftalocyaninu (vlevo) a naftalocyaninu (vpravo)

6.2.2 Vlastnosti ideálního fotosenzitizéru

S ideálním PS se v praxi jen těžko setkáme, přesto byly vzhledem k hledání nových struktur definovány požadavky, které jsou na ideální PS kladeny.

Ideální PS by měla být chemicky čistá stabilní látka o známém složení, která je dostupná a lze ji poměrně snadno nasyntetizovat. PS i jeho degradační produkty by měly mít nízkou či nulovou vlastní toxicitu (toxicita bez přítomnosti aktivujícího záření) a poměrně rychlou clearance ze zdravé tkáně, která by minimalizovala nežádoucí účinky terapie. Absorpční maximum PS by se mělo nacházet v rozmezí vlnových délek 680-800 nm červené oblasti spektra. Absorpce světla o vlnové délce nad 800 nm totiž neposkytuje dostatečnou energii pro excitaci kyslíku do jeho singletového stavu, který je pro fotodynamický efekt zásadní. Protože s vlnovou délkou roste hloubka penetrace do tkáně, PS absorbující světlo o vlnové délce blízké 800 nm se zdají být pro terapii nevhodnější. Dále by PS měl být dobrým producentem $^1\text{O}_2$ a dalších ROS. Tato produkce je vyjádřena jako kvantový výtěžek singletového kyslíku ($\Phi\Delta$) tzn. počet molekul $^1\text{O}_2$ vytvořených po absorpci jednoho fotonu světla. V ideálním případě by mělo platit, že $\Phi\Delta \geq 0,5$. PS by se měl kumulovat preferenčně v nádorové tkáni, aby byly co možná nejvíce redukovány systémové nežádoucí účinky terapie. (Agostinis a kol. 2011, Josefsen a Boyle 2008, Zimcik a Miletin 2009)

6.2.3 Photobleaching

Samotný PS není zcela odolný vůči aplikovanému světlu a v důsledku sebedestrukce postupně ztrácí schopnost absorpce. Tento proces se nazývá photobleaching („vysvícení“) a lze jej měřit *in vitro* na základě poklesu fluorescence. Platí, že čím vyšší vlnové délky světla PS absorbuje, tím nižší je jeho stabilita. (Macdonald a Dougherty 2001, Zimcik a Miletin 2009)

Photobleaching může být způsoben $^1\text{O}_2$, ale i jinými mechanismy nezávislými na přítomnosti kyslíku. Experimenty ukázaly, že Photofrin přítomný ve vodném roztoku je degradován pomalu, zřejmě z důvodu jeho vysoké agregace. Předpokládá se, že tato mírná degradace je způsobena mechanismy, které závisí na přítomnosti kyslíku. Na druhé straně, Photofrin v deoxygenovaném roztoku je degradován velice rychle a v tomto případě je fotodestrukce zřejmě založena na principu fotoreakce typu I. Agregace PS ve vodném prostředí inhibuje fotoreakce typu I a tím i fotodestrukci molekul. Fotoreakce typu I jsou proto považovány za hlavní příčinu degradace PS a převládají nad mechanismy závislými na kyslíku. (Macdonald a Dougherty 2001)

Dříve byl photobleaching považován za nežádoucí, dosud ale nebylo prokázáno, zda tento jev ovlivňuje účinnost PDT. Vědci se naopak shodují v tom, že v praxi působí photobleaching především protektivně. Díky destrukci PS v průběhu ozařování se snižuje riziko nadměrné dávky světla. Ubývání PS ve zdravé tkáni chrání tuto tkáň před poškozením a přispívá tak k selektivitě terapie. (Agostinis a kol. 2011, Macdonald a Dougherty 2001, Zimcik a Miletin 2009)

6.2.4 Rozdělení fotosenzitizérů

Obecně lze PS rozdělit do tří generací. První generace vychází z porfyrinů a řadíme do ní především HpD, komerčně známý jako Photofrin. Ve snaze překonat nevýhody Photofrinu byly syntetizovány nové PS patřící do druhé generace. Nejnovější třetí generace zahrnuje struktury druhé generace, které byly konjugovány s látkami, jako např. cholesterol, liposomy či protilátky, ve snaze zvýšit jejich selektivitu. (Yoon a kol. 2013)

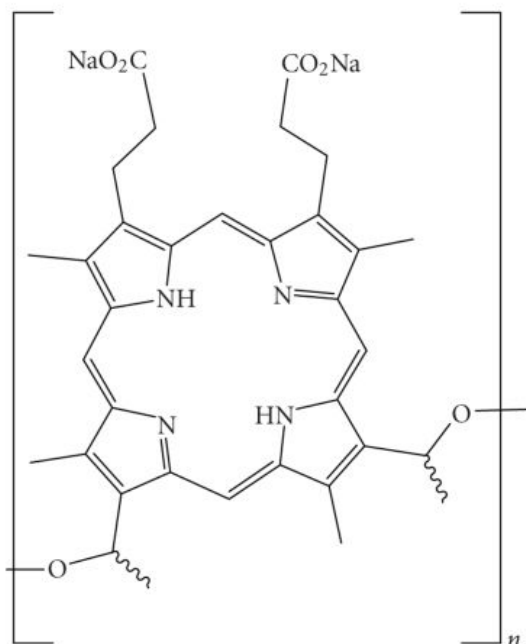
6.2.5 První generace fotosenzitizérů

6.2.5.1 *PORFYRINY*

Porfirmer sodný (Photofrin)

Porfirmer sodný, komerčně známý jako Photofrin, je prvním a nejběžněji užívaným PS v PDT. Jedná se o směs monomerů, dimerů a oligomerů o ne zcela známém poměrném zastoupení. Byl připraven synteticky reakcí hematoporfyrinu (látko získaná z krevního barviva hem) se směsí kyseliny sírové a octové za vzniku mono- a di- acetátu hematoporfyrinu. Jeho následnou zásaditou hydrolyzou vznikla směs porfyrinů známá jako HpD. Čistá frakce Photofrinu, skládající se z jedné až devíti porfyrinových jednotek, byla získána z HpD pomocí chromatografie, během které byly odstraněny nízkomolekulární sloučeniny, a byla izolována frakce oligomerů, které jsou

zodpovědné za selektivnější akumulaci uvnitř nádoru. (Macdonald a Dougherty 2001, Zimcik a Miletin 2009)



Obrázek 4 Struktura Photofrinu (n=1-9)

Struktura Photofrinu je pro PDT v některých ohledech nevýhodná. Jak již bylo uvedeno, z chemického hlediska se nejedná o jednotnou látku, nýbrž směs látek (mono-, di-, oligomery porfyrinů). Photofrin má poměrně slabé absorpční maximum světla o vlnové délce 630 nm. Světlo o takové hodnotě vlnové délky může PS v nádorové tkáni aktivovat jen zhruba do hloubky 5 mm. K dosažení terapeutického efektu je tedy nutné podávat vysoké dávky PS i světla. Další nevýhodou Photofrinu je jeho výrazná kumulace v kůži, která způsobuje její přetrvávající fotosenzitivitu. Proto je třeba, aby se pacient vyvaroval slunečnímu záření i jinému intenzivnímu světlu a chránil tělesný povrch oblečením a slunečními brýlemi. Toto opatření by mělo trvat ještě zhruba šest týdnů od posledního podání PS. (Macdonald a Dougherty 2001, Zimcik a Miletin 2009)

Photofrin se stal prvním PS schváleným v klinické praxi. Stalo se tak v roce 1993 v Kanadě a indikací k PDT byla rakovina močového měchýře. V následujících letech byl Photofrin schválen rovněž v Japonsku, USA a v některých evropských státech pro použití při léčbě karcinomu jícnu a nemalobuněčného karcinomu plic. (Josefsen a Boyle 2008)

6.2.6 Druhá generace fotosenzitizérů

Tato nová generace PS čítá několik stovek plně definovaných chemických sloučenin, potenciálně vhodných k použití v PDT. Patří sem především barviva porfyrinového typu, např. ftalocyaniny, chloriny, bakteriochloriny, benzochloriny či purpuriny.

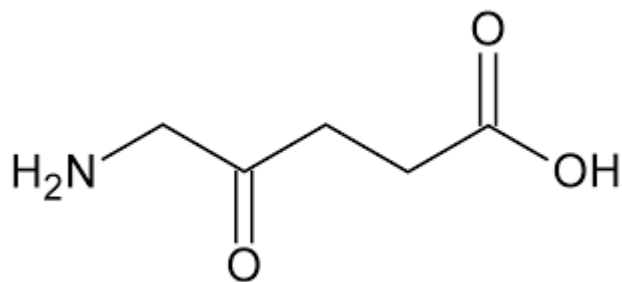
PS druhé generace mají oproti první generaci absorpční maximum světla o vyšších vlnových délkách (670-800 nm), které mohou penetrovat hlouběji do tkáně (2-3 cm) a proto jsou pro terapii vhodnější. Další výhodou nových PS je jejich stabilita a vynikající schopnost generovat $^1\text{O}_2$. V neposlední řadě je třeba zmínit pouze minimální výskyt prolongované fotosenzitivity kůže. (Macdonald a Dougherty 2001, Zimcik a Miletin 2009)

Bohužel, tyto látky stále postrádají dostatečnou selektivitu k nádorové tkáni. V současné době se proto PS druhé generace kombinují s různými typy nosičů, díky kterým mohou lépe zasáhnout cílovou tkáň. Takto vzniklé konjugáty pak lze označit za třetí generaci PS. (Zimcik a Miletin 2009)

6.2.6.1 PORFYRINY

Kyselina 5-aminolevulová (Levulan)

Kyselina 5-aminolevulová (ALA) je endogenním metabolitem, který se přirozeně vytváří v mitochondriích reakcí sukcinyl-CoA a glycinu za účasti enzymu ALA-syntetáza. Konjugací osmi jednotek ALA pak vzniká protoporfyrin IX (PPIX), který je pomocí enzymu ferochelatáza konvertován na hem nesoucí dvoumocné železo. (Wachowska a kol. 2011)



Obrázek 5 Struktura ALA

ALA sama o sobě není aktivní molekulou, ale jedná se o klíčový prekurzor v biosyntéze fotosenzitivního PPIX. Proto je ALA chápána jako proléčivo. Hem, vznikající enzymatickou konverzí PPIX, postrádá fotodynamickou aktivitu v důsledku přítomnosti centrálního atomu železa, který výrazně redukuje délku trvání excitovaného stavu. (Josefsen a Boyle 2008)

Za normálních podmínek vyšší koncentrace hemu inhibuje syntézu ALA na principu negativní zpětné vazby. Jestliže dodáme exogenní molekulu ALA do organismu, zvýší se produkce PPIX, který však nemůže být dostatečně rychle konvertován na hem z důvodu limitované kapacity enzymu ferochelatáza. Tím dochází k akumulaci PPIX uvnitř buněk. Zároveň se ukázalo, že míra syntézy a akumulace PPIX v nádorových buňkách je vyšší než v buňkách zdravé tkáně. Důvodem je nižší aktivita ferochelatázy a limitovaná dostupnost železa v nádorových buňkách. (Macdonald a Dougherty 2001, Wachowska a kol. 2011) Vysoká kumulace v nádorové tkáni přispívá k selektivě PDT a nabízí také použití ALA v diagnostice nádorů vzhledem k charakteristické fluorescenci PPIX. (Lange a kol. 1999)

ALA je polární, vysoce hydrofilní molekula, která obtížně penetruje přes kůži a buněčné membrány. V praxi je tedy její použití limitováno pouze na povrchové léze. Z těchto důvodů byly do terapie zavedeny modifikace ALA, které zvýšily lipofilitu molekuly se současným zachováním její aktivity. Jako nejvhodnější se ukázala esterifikace ALA pomocí alifatických či aromatických kyselin. Největšího úspěchu dosáhly methylester (MAL) a hexylester (HAL). (Wachowska a kol. 2011, Zimcik a Miletin 2009)

Podání ALA může být ve formě intravenózní, perorální či topické. V odstupu 4-6 hodin po aplikaci, kdy je nasyntetizováno dostatečné množství PPIX, je cílová tkáň ozářena světlem o vlnové délce 630 nm. Fotosenzitizace kůže je vzhledem k rychlé

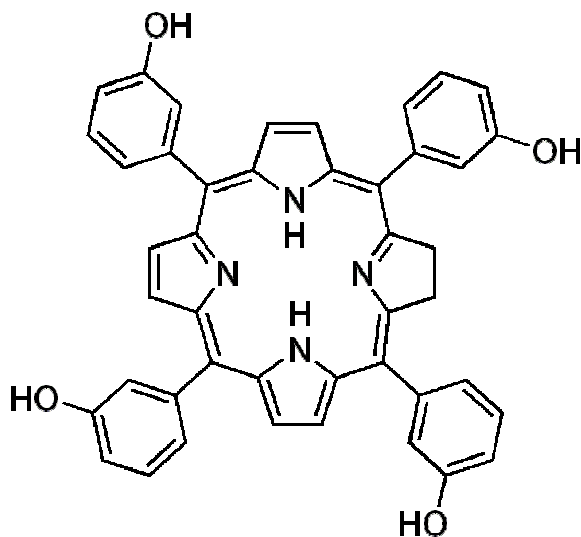
systemové clearance PPIX pouze mírná a krátkodobá. Častým nežádoucím účinkem je ale bolest, která terapii provází. (Allison a kol. 2004, Wachovska a kol. 2011)

ALA byla zavedena do PDT v roce 1990, kdy byla dvojicí Kennedy a Pottier aplikována u pacientů s povrchovým kožním onemocněním. V současné době je její topické podání schváleno pro terapii aktinické keratózy, Bowenovy choroby a bazálního buněčného karcinomu (BCC). Deriváty ALA našly uplatnění jak v terapii, tak v oboru diagnostiky nádorových onemocnění. Methylester ALA (Metvix) byl schválen pro léčbu aktinické keratózy, hexylester ALA (Hexvix) je oficiálně užíván pro fotodiagnostické účely. (Zimcik a Miletin 2009)

6.2.6.2 CHLORINY

Temoporfin (Foscan)

Temoporfin neboli meta-tetrahydroxyphenylchlorin (mTHPC) je čistá, syntetická molekula ze skupiny chlorinů, jejíž farmaceutická forma je známá jako Foscan.



Obrázek 6 Struktura temoporfinu

Absorpční maximum temoporfinu se nachází při vlnové délce světla 650 nm. PS je aktivován také světlem v zelené oblasti spektra o vlnové délce 514 nm. Vzhledem k nízké hloubce penetrace je zelené světlo vhodné zejména pro terapii lézí tenkostěnných orgánů např. pro terapii maligních a premaligních onemocnění jícnu. Při použití zeleného světla v této indikaci zároveň výrazně snížíme riziko perforace jícnu. (Senge a Brandt 2011)

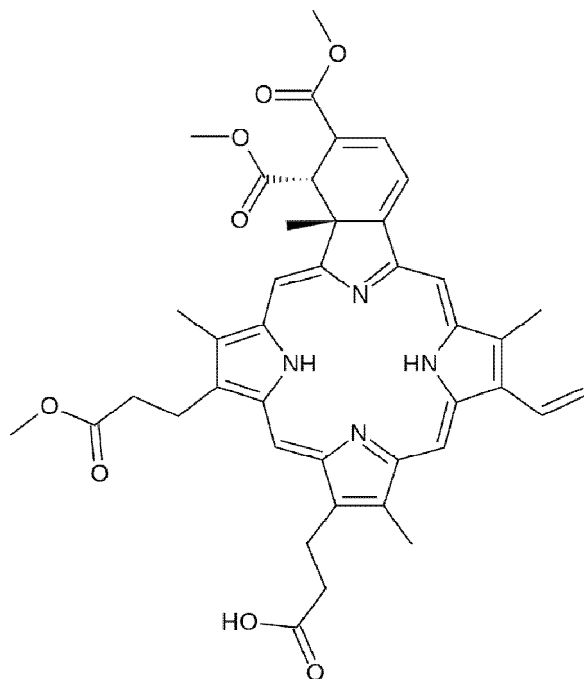
Temoporfin patří k nejúčinnějším PS, proto je možné jej podávat v dávce nepřevyšující 0,15 mg/kg. (Zimcik a Miletin 2009) K aktivaci PS postačují nízké dávky záření, redukována je rovněž doba terapie. Fotoaktivita temoporfinu je přibližně 100krát vyšší než fotoaktivita Photofrinu, proto se jedná o velice nadějnýho zástupce druhé generace PS. (Josefsen a Boyle 2008, Senge a Brandt 2011)

Selektivita k nádorové tkáni je vysoká, ale temoporfin vyžaduje zhruba 4 dny, než se v cílové tkáni nakumuluje v dostatečné koncentraci. V praxi se toto projevuje delším D-L intervalem. Hlavní nevýhodou temoporfinu je kožní fotosenzitivita, která obvykle přetrvává minimálně 15 dní. Ozáření káně proto vyžaduje vysokou přesnost.

V roce 2001 byl temoporfin v Evropské unii schválen pro PDT pokročilých stádií nádorů hlavy a krku a doposud zůstává jediným PS, který byl pro tento typ nádoru schválen. (Zimcik a Miletin 2009)

Verteporfin (Visudyne)

Verteporfin je benzoporfyrinovým derivátem (BPD), který byl vyvinut v Kanadě pod obchodním názvem Visudyne. (Josefsen a Boyle 2008)



Obrázek 7 Struktura verteporfinu

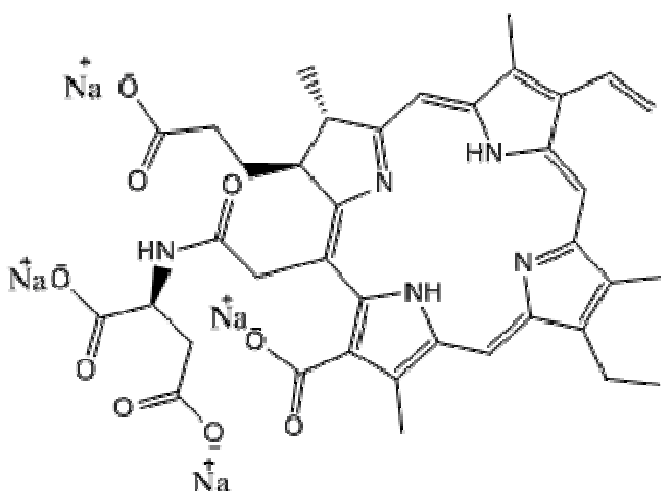
Vetreporfin silně absorbuje světlo o vlnové délce okolo 690 nm. Vzhledem ke své špatné rozpustnosti ve vodě musí být podáván ve formě liposomů. Na druhé straně se díky své lipofilitě dobře váže na buněčné membrány. (Zimcik a Miletin 2009)

Verteporfin je velmi rychle vylučován ze séra i ze tkáně, včetně nádorových lézí. Po uplynutí 3 hodin od intravenózní aplikace dosáhne verteporfin maximální koncentrace v nádorové tkáni, která však následně rychle klesá. Vetreporfin vykazuje poměrně nízkou selektivitu k nádorovým buňkám, jelikož se nachází ve vysoké koncentraci v cirkulaci a tím se dostává do ostatních tkání. Dobré uplatnění však našel v očním lékařství. (Macdonald a Dougherty 2001)

Pod obchodním názvem Visudyne (tzv. verteporfin pro injekce) byl schválen k léčbě věkem podmíněné makulární degenerace (AMD), která je považována za nejčastější příčinu ztráty zraku u starších osob. Používá se rovněž u jiných očních onemocnění, která jsou spojena s novotvorbou cév v cévnatce (choroidální neovaskularizace). Visudyne je podáván intravenózně 15 minut před ozářením oka. Účinek Visudynu je principiálně založen na jeho akumulaci v abnormálních cévách. Nejčastějším nežádoucím účinkem je bolest provázející aplikaci, fotosenzitivita kůže je vzhledem k rychlé eliminaci PS minimální a trvá v průměru 1-2 dny. (Allen a kol. 2001, Josefsen a Boyle 2008, Pogue a kol. 2003)

Talaporfin (Laserphyrin)

Talaporfin je semisyntetickým derivátem chlorinu e6, který lze získat z chlorofylu a. Spojením chlorinu e6 s kyselinou asparagovou získáme mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6) neboli talaporfin. (Zimcik a Miletin 2009)



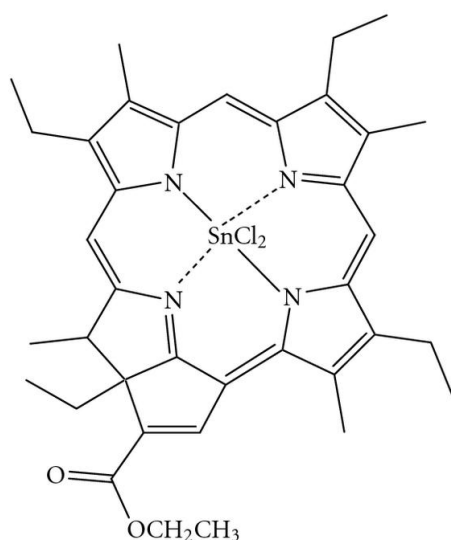
Obrázek 8 Struktura talaporfinu (ve formě tetrasodné soli)

Talaporfin vykazuje maximální absorpci při vlnové délce 664 nm. Ve formě sodné soli se podává intravenózně, kožní fotosenzitivita přetrvává nejdéle 2 týdny od aplikace. (Nanashima a Nagayasu 2015)

Sodná sůl talaporfinu, komerčně známá jako Laserphyrin, byla v Japonsku schválena pro terapii počátečního stádia karcinomu plic. V současné době probíhá klinická studie pro použití talaporfinu v terapii hepatocelulárního karcinomu, karcinomu jícnu a žlučníku. (Nanashima a Nagayasu 2015, Yoon a kol. 2013) Talaporfin je také potenciálně vhodným PS pro PDT fibrosarcomu, nádorového onemocnění mozku a ústní dutiny. (Ormond a Freeman 2013)

Rostaporfin (Purlytin, Photrex)

Rostaporfin neboli cínčitý etiopurpurin byl připraven v roce 1988 pomocí inzerce kovu do pupurinového derivátu reakcí s SnCl_2 v prostředí kyseliny octové.



Obrázek 9 Struktura rostaporfinu

Jedná se o hydrofóbní látku, která musí být podávána spolu se sulobilizačním činidlem. Obvyklá dávka je 1,2 mg/kg a k aktivaci PS dochází 24 hodin po jeho podání. (Zimcik a Miletin 2009) Díky centrálně uloženému atomu cínu dochází k posunu absorpčního maxima k hodnotě 660 nm. (Allison a Sibata 2010) Rostaporfin se ukládá v kůži, kde vyvolává fotoreakci ještě 1-2 týdny po podání PS. (Josefsen a Boyle 2008)

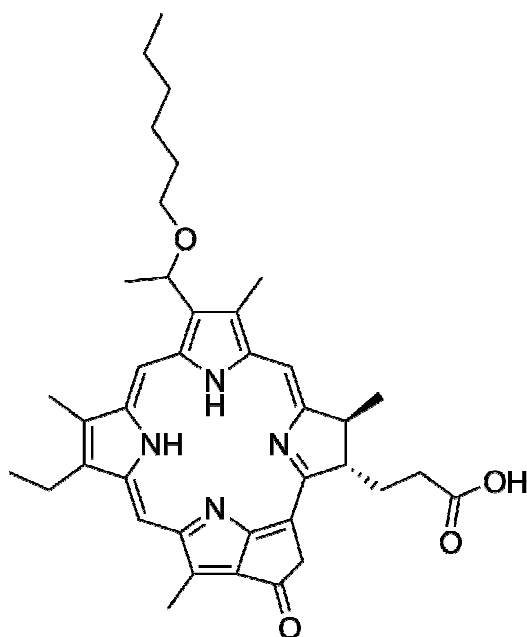
Pod označením Purlytin byl rostaporfin hodnocen v terapii metastatického adenokarcinomu prsu, bazálního buněčného karcinomu a Kaposiho sarkomu u pacientů trpících AIDS. Dále dokončil 3. fázi klinického hodnocení pro použití v terapii AMD. Prozatím však k této indikaci nebyl schválen, jelikož FDA požaduje více klinických testů, které by potvrdily účinnost a bezpečnost PS. (Josefsen a Boyle 2008, Ormond a Freeman 2013)

6.2.6.3 FEOFORBIDY

2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinyl pyropheophorbide-a (HPPH, Photochlor)

HPPH patří do skupiny feoforbidů, které jsou odvozeny od přirozeně se vyskytujících porfyrinů – chlorofylu. Jedná se o extrémně hydrofóbní sloučeninu, která se vyznačuje příznivými fotofyzikálními a farmakokinetickými vlastnostmi. Z tohoto

důvodu je HPPH považován za nejúčinnější PS v protinádorové terapii. (Wu a kol. 2013)



Obrázek 10 Struktura HPPH

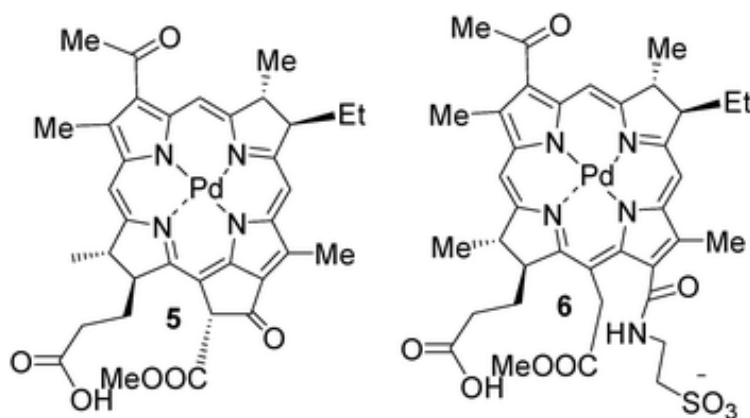
Maximální absorpci HPPH nacházíme při vlnové délce 665 nm. Vzhledem k hydrofobnímu charakteru molekuly je nutné podávat HPPH spolu s vhodným nosičem. V současné době je také s úspěchem testováno použití HPPH ve formě nanokrystalické suspenze. Obvyklá dávka PS se pohybuje v rozmezí 2-6 mg/m². Navzdory nízké rozpustnosti sloučeniny je HPPH rychle odstraňován z kůže, proto je kožní fotosenzitivita po terapii minimální. (Wu a kol. 2013, Zimcik a Miletin 2009)

HPPH je dosud ve fázi klinického hodnocení pro terapii nádorového onemocnění jícnu, plic, hlavy a krku, ústní dutiny, hltanu a BCC. (Ormond a Freeman 2013)

6.2.6.4 BAKTERIOCHLORINY

Padoporfin (WST-09, Tookad), Padeliporfin (WST-11, Tookad Soluble, Stakel)

Padoporfin je představitelem rodiny bakterioforbidů s chelatovaným atomem paladia uvnitř makrocyklu. Byl syntetizován z molekuly přirozeně se vyskytujícího bakteriochlorofylu izolovaného z bakterií. Padeliporfin je rozpustným derivátem padoporfinu syntetizovaným pro farmaceutické účely. (Lepor 2008, Ormond a Freeman 2013)



Obrázek 11 Struktura padoporfinu (vlevo) a padeliporfinu (vpravo)

Díky redukci dvojných vazeb dochází k aktivaci bakteriofeoforbidů při vyšších vlnových délkách – pro padoporfin 763 nm, pro padeliporfin 753-757 nm. (Lepor 2008) Tento posun absorpčního maxima k vyšším vlnovým délkám umožňuje hlubší penetraci aktivujícího světla do tkáně. Další výhodou obou látek je jejich rychlá exkrece z těla, nízká kumulace v kůži a tedy i minimální kožní fotosenzitivita. (Berdugo 2008, Ormond a Freeman 2013, Zimcik a Miletin 2009)

Molekula padoporfinu je nerozpustná ve vodě, proto se podává spolu s nosičem typu Cremophor EL. Padeliporfin je naopak ve vodě dobře rozpustný a jeho aplikace je proto snazší. Účinky obou látek jsou lokalizovány zejména v krevním řečišti nádorové tkáně, kde vyvolávají uzávěr cév. Vzhledem k rychlé clearance začíná ozáření tkáně již v průběhu i.v. podání PS či krátce po něm.

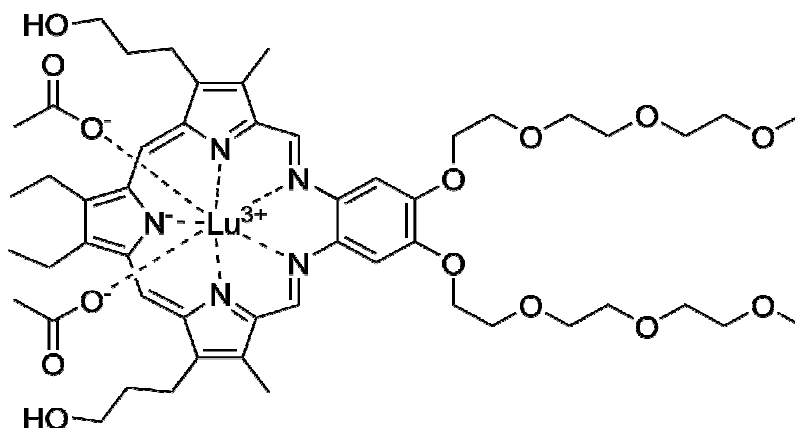
Oba PS jsou v současné době s úspěchem hodnoceny pro terapii karcinomu prostaty. Vzhledem k jejich cílenému působení v cévách mají dobrý potenciál také pro léčbu choroidální neovaskularizace. (Lepor 2008, Zimcik a Miletin 2009)

6.2.6.5 *TEXAPYRINY*

Motexafin Lutecium (Lu-Tex)

Motexafin lutecium je člen skupiny texapyrinů, která jsou syntetickými analogy porfyrinoidů. Jádrem texapyrinů je rozšířené a nese 5 atomů dusíku. Na principu oxidační reakce je do makrocyklu zaveden atom lutecia.

Lu-Tex je ve vodě dobře rozpustný, po podání absorbuje světlo o vlnové délce 732 nm. (Josefsen a Boyle 2008, Ormond a Freeman 2013, Zimcik a Miletin 2009)

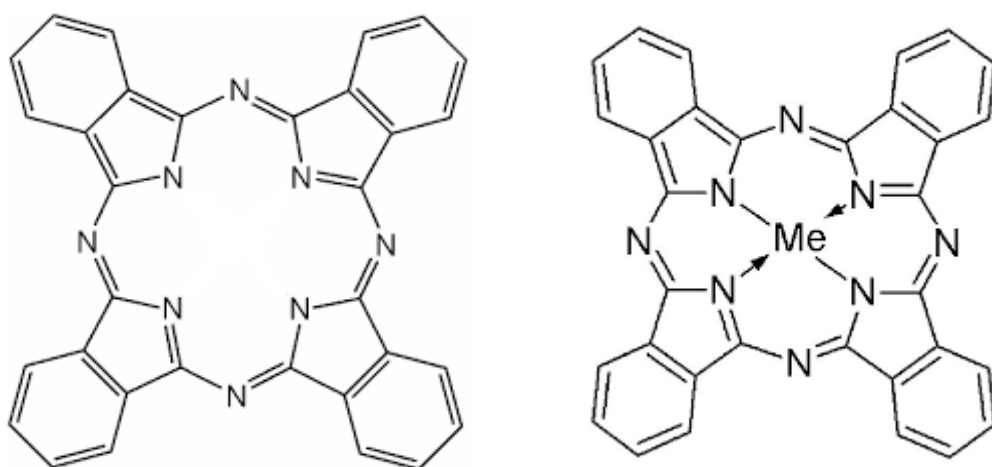


Obrázek 12 Struktura motexafin lutecia

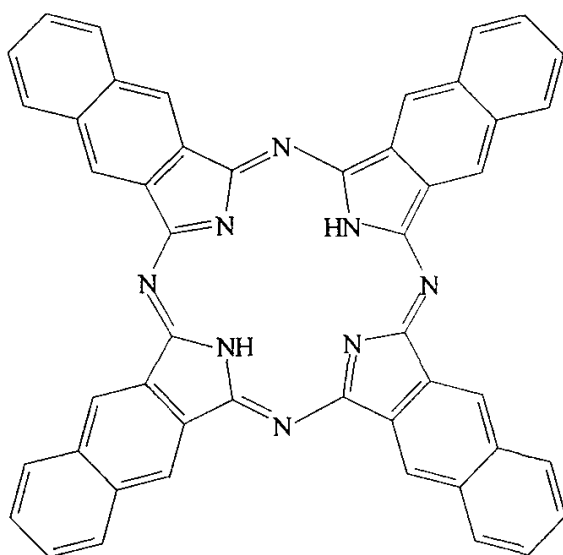
Lu-Tex je pod názvem Lutrin klinicky hodnocen pro terapii rakoviny prostaty, karcinomu děložního čípku, rakoviny prsu a maligního melanomu. Pod obchodním názvem Optrin je dále klinicky testován pro léčbu AMD. Díky schopnosti PS akumulovat se v cévách a v přítomných aterosklerotických plátech je hodnoceno jeho použití ve fotoangioplastice – nové metodě užívané v terapii arteriálních onemocnění na úrovni koronárního i periferního řečiště. V této diagnóze užívá Lu-Tex obchodní název Antrin. (Josefsen a Boyle 2008, Ormond a Freeman 2013)

6.2.6.6 FTALOCYANINY, NAFTALOCYANINY

Ftalocyaniny jsou spolu se svými objemnějšími homology naftalocyaniny syntetická makrocyclická barviva, která se strukturálně podobají porfyrinům. Na β -pozici tetrapyrrolového jádra jsou však připojeny čtyři benzenové kruhy, v případě naftalocyaninů čtyři naftalenové kruhy. Přítomnost těchto aromatických kruhů posiluje absorpci v oblasti blízké infračervenému světlu (NIR). Dalším charakteristickým znakem je přítomnost azoniových namísto methinových můstků. (Zimcik a Miletin 2009)



Obrázek 13 Struktura ftalocyaninu a jeho komplexu s chelatovaným kovem (Me = Zn, Al, Mg, Si, Pd,...)



Obrázek 14 Struktura naftalocyaninu

V současné době jsou Pcs používány jako funkční materiály v mnoha oborech. Důležitou vlastností, která nabízí široké možnosti uplatnění Pcs, je přítomnost 18 π elektronů konjugovaných v kruhu. Reakce Pcs jsou téměř univerzálně založeny na přenosu těchto elektronů. Silná absorpce světla v červené oblasti viditelného spektra jim dodává modré až zelené zbarvení. Z toho důvodu jsou Pcs hojně užívány jako průmyslová barviva. Po ozáření jsou schopné produkovat velké množství $^1\text{O}_2$ a stávají se tak vhodnými PS pro PDT. Jelikož vykazují silnou fluorescenci, jsou také s výhodou užívány v rozvoji nových fluorescenčních senzorů. (Novakova a kol. 2015, Sakamoto a Ohno-Okumura 2009)

Syntéza Pcs a jim příbuzných látek vychází z aromatických ortho-dicarbonitrilů. V prvním kroku dochází k reakci s terc. tetrastylthiolátem. Jedná se o nukleofilní substituci halogenu (Cl, Br), který je v aromatickém kruhu vázán na silně elektron-deficitní uhlík. Tímto mechanismem vznikají čtyři základní jednotky, které jsou následně uspořádány do cyklu procesem cyklotetramerizace. (Novakova a kol. 2015)

Pcs i Ncs ochotně vytváří komplexy s řadou kovů, jejichž přítomnost je zásadní pro PDT. Tyto komplexy se vyznačují dlouhou životností tripletového stavu a vysokými hodnotami $\Phi\Delta$. Jako nejvhodnější se jeví komplexy zinečnaté, hlinité a křemičité, přičemž charakter centrálního kovu ovlivňuje fotofyzikální vlastnosti PS (délka tripletového stavu). (Zimcik a Miletin 2009)

Absorpční maximum Pcs se nachází v rozmezí vlnových délek 670-700 nm. (Ormond a Freeman 2013) Ncs absorbují světlo o ještě vyšších vlnových délkách než Pcs (740-780 nm), proto mohou být zaváděny hlouběji do tkáně. Zavedením atomu dusíku na místo aromatického C-H fragmentu v benzenovém či naftalenovém kruhu získáme aza-analoga Pcs a Ncs. Tímto dochází k posunu absorpce světla k nižším vlnovým délkám a vyšším energiím. V případě Ncs je posun výraznější, pokud dochází k substituci na vnitřním benzenovém jádře (posun o 55 nm) než na vnějším benzenovém jádře (posun o 34 nm). (Novakova a kol. 2015)

Nevýhodou Pcs a jejich analog je charakteristicky nízká rozpustnost ve vodě a tendence k tvorbě agregátů. Ncs jsou v porovnání s Pcs méně rozpustné a mají vyšší tendenci k agregaci. K tvorbě agregátů dochází v důsledku přítomnosti planárního makrocyclického jádra, které umožňuje π -elektronové interakce. Agregace snižuje životnost tripletových stavů PS a produkci $^1\text{O}_2$, čímž je limitována použitelnost látek v PDT. Tento nežádoucí jev byl potlačen syntézou modifikovaných Pcs, které na své periferii váží osm objemných alifatických substituentů. Další zvýšení rozpustnosti

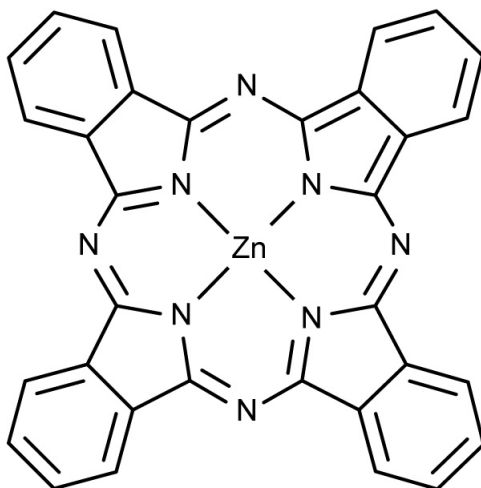
umožňuje přítomnost kladného náboje, který lze do molekuly zavést např. procesem kvarternalizace dusíku. Nižší agregace molekul je dána působením odpudivých elektrostatických sil. (Machacek a kol. 2015, Moreira a kol. 2008, Zimcik a Miletin 2009)

Ačkoli jsou Pcs potenciálně vhodnými látkami pro PDT, jejich účinnost zatím nebyla ověřena dostatkem klinických testů. V současné době probíhá hodnocení 3 zástupců Pcs.

Zinečnatý ftalocyanin (ZnPc, CGP55847)

Jedná se o nejjednodušší z klinicky testovaných Pcs. Vzhledem ke své nízké rozpustnosti ve vodě je připraven v kombinaci s liposomy. Po intravenózním podání tvoří ZnPc komplexy s LDL. Jeho maximální absorpce při vlnové délce 671 nm poskytuje výborný průnik světla do tkáně. Další výhodou ZnPc je jeho rychlá eliminace ledvinami. Po uplynutí 6 hodin od podání injekce dosahuje plazmatická koncentrace Pcs 50%. Tímto dochází ke snížení rizika nežádoucí prodloužené fotosenzitivity.

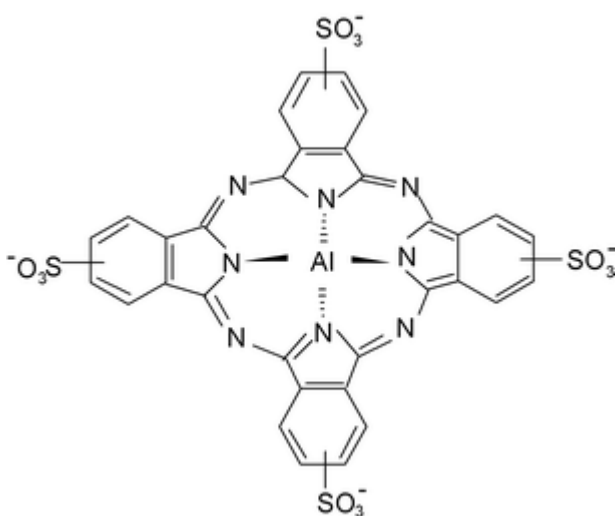
Experimentální studie ukázaly, že ZnPc je potenciálně vhodným PS pro léčbu onemocnění spojených s choroidální neovaskularizací, především pak AMD. V závislosti na dávce PS a dávce světla způsobuje ZnPc selektivní uzávěr choroidálních kapilár. Na rozdíl od dalších PS zkoušených v této indikaci (např. verteporfín) způsobuje ZnPc jen minimální poškození retinálního pigmentového epitelu a vykazuje vysokou selektivitu k choroidálním cévám. Pro bližší vyhodnocení mechanismu a účinnosti PDT s liposomálními komplexy ZnPc jsou vyžadovány další preklinické a klinické studie. (Schmidt-Erfurth a kol. 2009)



Obrázek 15 Struktura ZnPc

Photosens (AlPcS4)

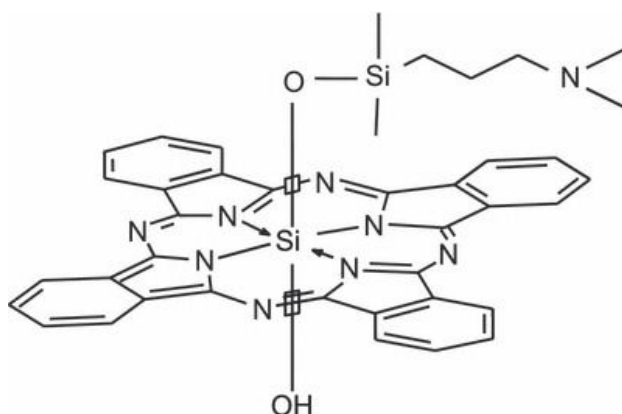
Photosens, neboli hlinitý flalocyanin tetrasulfonát, patří do skupiny sulfonovaných Pcs, které jsou charakteristické zvýšenou rozpustností ve vodě a mohou být podávány jako intravenózní roztok. Absorpční maximum AlPcS4 se nachází při vlnové délce 676 nm. Pod označením Photosens je užíván v Rusku v terapii rakoviny žaludku, kůže, ústní dutiny a karcinomu prsu. Jeho nevýhodou je rozvoj kožní fotosenzitivity přetrvávající 4-6 týdnů. (Ormond a Freeman 2013, Zimcik a Miletin 2009)



Obrázek 16 Struktura AlPcS4

Křemičitý ftalocyanin (Pc4)

Třetím klinicky testovaným Pc je křemičitý komplex Pc4, který absorbuje světlo o vlnové délce 675 nm. V rámci klinických studií byla dokončena první fáze klinického hodnocení jeho účinnosti v terapii aktinické keratózy, Bowenovy choroby a rakoviny kůže. Účinnost a bezpečnost použití Pc4 se projevila také v terapii Mycosis fungoides – kožního T-lymfomu, včetně leukemické formy zvané Sézaryho syndrom. (Baron a kol. 2010, Ormond a Freeman 2013)



Obrázek 17 Struktura Pc4

6.2.7 Třetí generace fotosenzitizérů

Mnohé PS první a druhé generace nelze podat intravenózně z důvodů jejich nízké rozpustnosti ve vodě, zejména při fyziologickém pH. Proto byly vyvinuty přenašečové systémy, jako např. nanočástice, emulgátory (např. Cremophor EL), nebo liposomy.

Třetí generací proto rozumíme konjugáty PS druhé generace, které se vyznačují výhodnějšími fyzikálně-chemickými vlastnostmi a umožňují cílené působení PS. Výsledkem konjugace je lepší přechod přes buněčnou membránu, vyšší rozpustnost molekuly a selektivnější lokalizace v nádorových buňkách. (Allen a kol. 2001, Josefsen a Boyle 2012)

V současné době vědci usilují o řízené navázání PS na specifické buněčné receptory. Za tímto účelem jsou studovány PS nesoucí kovalentně vázanou molekulu, která funguje jako ligand s afinitou k cílovým receptorům nádorových buněk. Tento

nosič je zodpovědný za lokalizaci PS a samotný PS tak může být volen pouze na základě svých fotochemických vlastností. Takto byly syntetizovány např. konjugáty s lipoproteiny LDL, monoklonálními protilátkami, proteiny jako je inzulin, transferin či epidermální růstový faktor (EGF), některými polysacharidy, somatostatinem a mnoha dalšími molekulami. (Agostinis a kol. 2011) Experimentálně se ukázalo, že dobrý potenciál mají především částice LDL. Nádorové buňky totiž často exprimují na svém povrchu velký počet LDL receptorů, jelikož díky své značné proliferaci vyžadují zvýšený příjem cholesterolu pro tvorbu membrán. LDL částice proto mohou přenášet PS k receptorům nádorových buněk a PS je dále na principu internalizace receptoru inkorporován dovnitř buňky. (Allen a kol. 2001, Macdonald a Dougherty 2001)

Oligomery vázané na sérové lipoproteiny, stejně jako některé velké agregáty, mohou cirkulovat v krvi ještě 24-48 hodin po injekční aplikaci v terapii. To má zřejmě souvislost s fotosenzitivitou kůže, která je nežádoucím účinkem mnoha PS. (Macdonald a Dougherty 2001) Zvýšená retence PS v nádorové tkáni je také zapříčiněna převahou propustných, zkroucených nádorových cév, vznikajících v rámci abnormální neovaskularizace, a nedostatečnou lymfatickou drenáží. (Agostinis a kol. 2011)

Tabulka 1 Fotosenzitizéry schválené pro PDT či hodnocené v klinických studiích (Ormond a Freeman 2013)

Název/komerční název fotosenzitizéru	Struktura	Absorpční maximum (nm)	Použití
Porfirmer sodný/Photofrin	porfyrin	632	Kanada (1993) – karcinom močového měchýře; USA (1995) – karcinom jícnu; USA (1998) – karcinom plic; USA (2003) – Barrettův jícen; Japonsko – karcinom děložního čípku; Evropa, Kanada, Japonsko, USA, Velká Británie – karcinom plic
5-ALA/Levulan	prekurzor porfyrinu	632	USA (1999) – aktinická keratóza
MAL/Metvix	prekurzor porfyrinu	632	USA (2004) – aktinická keratóza
HAL/Hexvix	prekurzor porfyrinu	632	USA (2010) – diagnostika nádoru močového měchýře
Temoporfin/Foscan	chlorin	652	Evropa – nádory hlavy a krku
Verteporfin/Visudyne	chlorin	689	USA (1999) – AMD
Rostaporfin/Purlytin	chlorin	664	Klinické studie – karcinom prsu, bazální buněčný karcinom, Kaposiho sarkom, AMD
Talaporfin/Laserphyrin	chlorin	664	Japonsko (2003) – rakovina plic
Padoporfin/Tookad	bakteriochlorin	763	Klinické studie – karcinom prostaty
Padeliporfin/Stakel, Tookad Soluble	bakteriochlorin	753	Klinické studie – karcinom prostaty
(HPPH)/Photochlor	feoforbid	665	Klinické studie – karcinom jícnu, bazální buněčný karcinom, karcinom plic, Barrettův jícen
Křemičitý ftalocyanin (Pc4)	ftalocyanin	675	Klinické studie – aktinická keratóza, Bowenova nemoc, nádory kůže, Mycosis fungoides
AlPcS4/Photosens	ftalocyanin	675	Rusko (2001) – karcinom žaludku, kůže, rtu, dutiny ústní, jazyka, prsu

Motexafin lutecium/ Lutrin, Optrin, Antrin	texapyrin	732	Klinické studie – karcinom prostaty, AMD, karcinom prsu, karcinom děložního čípku, ischemická choroba srdeční
---	-----------	-----	--

6.2.8 Farmakologie fotosenzitizérů

6.2.8.1 *QSAR*

Nástrojem pro identifikaci optimálních PS jsou studie kvantitativních vztahů mezi chemickou strukturou a biologickou aktivitou látek (QSAR). Většina těchto studií se zaměřuje na porfyriny a jejich modifikace.

V živém organismu se vyskytuje řada překážek, v podobě např. sérových bílkovin a krevních buněk, se kterými mohou použité látky interagovat. PS proto může být na základě znalostí vztahů struktury a biologické aktivity teoreticky navržen, avšak v praxi je látka s optimálními vlastnostmi získána až během jejího opakovaného zkoušení. (Macdonald a Dougherty 2001)

Jedním ze základních požadavků, které jsou na strukturu PS kladeny, je její selektivita. Vyšší selektivita znamená vyšší akumulaci látky v nádorových buňkách a nižší výskyt nežádoucích účinků. Zajištění cíleného transportu PS na správné místo uvnitř buňky, kde má dojít k tvorbě $^1\text{O}_2$, je proto důležité k optimalizaci účinnosti PDT. (Mehraban a Freeman 2015)

Předpokládá se, že biologická aktivita PS je určena jeho schopností vázat se na cílový receptor v tkáni. Afinita k tomuto receptoru souvisí se sterickým uspořádáním a dále s hydrofobními a nábojovými interakcemi mezi látkou a receptorem. (Macdonald a Dougherty 2001)

Biologickou aktivitu dané látky proto můžeme vyjádřit následující rovnicí:

$$BA = \sum \text{sterické interakce} + \sum \text{hydrofobní interakce} + \sum \text{nábojové interakce}$$

(Macdonald a Dougherty 2001)

Hydrofobní/hydrofilní charakter fotosenzitizérů

Většina relativně hydrofobních PS se dobře váže na buněčné membrány. To platí i pro ve vodě rozpustné látky jako NPe6 nebo sulfonované porfyriny/ftalocyaniny díky přítomnosti velkého hydrofobního kruhu v jejich struktuře. Hydrofobní molekula ($\log P$ cca 9,3) o průměrné velikosti porfyriu může vstoupit do buňky prostřednictvím difúze přes buněčnou membránu. Ochotně reaguje s plazmatickými proteiny a buněčnými membránami. Hydrofilní stejně tak jako agregované PS se dostávají do buňky pomocí endocytózy/pinocytózy, akumulují se převážně v endozomech, které mohou fúzovat s lysozomy. Hovoříme tedy o endolysozomálním kompartmentu. (Bacellar a kol. 2015, Mehraban a Freeman 2015)

Výhodami hydrofilních PS jsou jejich nízká tendence k agregaci ve vodním prostředí, dobrá distribuce a biologická dostupnost a rychlá exkrece z těla. Nevýhodou zůstává jejich obtížná penetrace přes buněčné membrány. Hydrofobní PS naopak dobře prochází buněčnými membránami, ale vzhledem k jejich vysoké agregaci v prostředí vody nemohou být podány bez příslušného nosičového systému. V porovnání s hydrofilními PS jsou tyto látky v těle déle zadržovány. (Mehraban a Freeman 2015)

Agregované PS, které jsou charakteristické kratší životností excitovaného tripletového stavu a nižšími hodnotami $\Phi\Delta$, jsou považovány za méně účinné. Nadměrné agregaci lze v některých případech zabránit přidáním emulgujících činidel, jako je Cremophor EL, polysorbáty, polyethylenglykol, DMSO nebo etanol. Tyto látky mají za úkol zvýšit rozpustnost snadno agregovatelných sloučenin.

In vitro studie ukázaly, že PS amfifilního charakteru jsou fotodynamicky aktivnější než sloučeniny čistě hydrofobní či hydrofilní. Tato vlastnost umožňuje látkám vázat se na hydrofobně-hydrofilní rozhraní buněčných membrán a také na povrch proteinů. Amfifilní molekuly jsou ve vodě málo agregované a proto fotodynamicky aktivní. (Macdonald a Dougherty 2001)

Náboj fotosenzitizéru

Fotodynamickou aktivitu dále ovlivňuje náboj PS. Obecně lze říct, že s rostoucím počtem záporných nábojů chromoforu se jeho fotodynamická aktivita snižuje. Výrazně aniontové sloučeniny jsou méně efektivními PS. Deriváty benzoporfyrinů obsahující jednu kyselou funkční skupinu jsou *in vitro* zhruba desetkrát aktivnější než deriváty obsahující ve své struktuře dvě karboxylové funkční skupiny. Avšak v podmínkách *in vivo* je jejich použití limitováno rychlou clearance z tkáně, včetně tkáně nádorové. (Machacek a kol. 2016) Výjimkou je Photofrin ve formě diacetátu, který přesto dosahuje vysokých koncentrací v nádorové tkáni a je fotodynamicky aktivní. *In vitro* pokusy dokázaly, že kationové PS se selektivně vychytávají ve zvýšené koncentraci v mitochondriích, které se tak stávají senzitivním cílem pro účinky PDT. (Macdonald a Dougherty 2001) Novější studie však ukázaly, že kationické PS jsou ve velké míře lokalizovány v endolyzozomálním kompartmentu. Příčinou toho je zřejmě endocytóza, která je mechanismem vstupu velkých a elektricky nabitých sloučenin do buňky. (Machacek a kol. 2015)

6.3 SVĚTLO VE FOTODYNAMICKÉ TERAPII

PDT můžeme označit za dvoufázový proces. V první fázi je pacientovi podán PS, ve druhé fázi dochází k jeho aktivaci ozářením světlem vhodné vlnové délky. Přesnost ozáření nádorové tkáně, spolu se schopností PS lokalizovat se přednostně v nádorových buňkách, přispívá k selektivitě PDT. (Agostinis a kol. 2011)

Vhodné světlo pro PDT je takové, které je schopné penetrovat do požadované hloubky tkáně a zároveň poskytovat dostatek energie pro vznik fotochemické reakce. Hloubka penetrace závisí na optických vlastnostech dané tkáně a na vlnové délce světla. Modré světlo, mající vlnovou délku zhruba 430-520 nm, je z hlediska schopnosti penetrace do tkáně nejméně účinné. Světlo z červené (625-740 nm) a blízké infračervené (760-1000 nm) oblasti spektra proniká výrazně hlouběji do tkáně. (Agostinis a kol. 2011, Macdonald a Dougherty 2001)

Na průnik světla do tkáně má výrazný vliv jeho absorpce, rozptyl, odraz a kombinace těchto parametrů. Absorpce světla v tkáni je zprostředkována především

endogenními chromofory, mezi které patří hemoglobin, myoglobin, cytochromy a melanin. (Castano a kol. 2004)

Oblast v rozmezí 600-1200 nm je známá jako optické okno tkáně. Světlo o vlnové délce přesahující 800 nm ale neposkytuje dostatek energie k iniciaci fotochemické reakce a produkci dostatečného množství $^1\text{O}_2$. Navíc při vlnových délkách nad 1200 nm dochází k absorpci světla molekulami vody a následné konverzi jeho energie na teplo. Z těchto důvodů je pro PDT nejvhodnější oblast 600-800 nm. (Agostinis a kol. 2011, Macdonald a Dougherty 2001)

6.3.1 Dávka PDT

K základním údajům, které se v klinické PDT udávají, patří dávka PS, vlnová délka světla a doba ozáření tkáně. Celková dávka světla je mírou absorbované energie PS v daném objemu tkáně. Selektivní destrukce nádorové tkáně může být dosaženo, pokud akumulace PS v nádorové tkáni bude značně vyšší než v okolní zdravé tkáni. Ve skutečnosti však není dosaženo tak výrazného rozdílu mezi koncentrací PS v nádorové tkáni a v tkáni okolní. Proto musí být světlo podáno co možná nejpresněji do cílového místa, nejčastěji za použití optických vláken. (Macdonald a Dougherty 2001)

Cílem dozimetrie je stanovení optimálních dávek PS a světelné energie, tak aby PDT byla co možná nejúčinnější v nádorové tkáni a zároveň šetrná ke tkáni zdravé. Měření dozimetrie je však v organických nehomogenních tkáních značně složité. (Sheng a kol. 2004)

Existují tyto základní modely dozimetrie PDT:

- Přímá dozimetrie – měření množství $^1\text{O}_2$ produkovaného v tkáni v průběhu PDT
- Explicitní dozimetrie – měření různých parametrů fotochemické reakce
- Implicitní dozimetrie – měření jediného parametru fotochemické reakce, např. kinetika procesu zvaného photobleaching
- Dozimetrie prostřednictvím biologické odpovědi – měření např.: poklesu průtoku krve v průběhu PDT

Přímá dozimetrie kvantifikuje množství $^1\text{O}_2$ prostřednictvím detekce jeho luminiscence v oblasti 1270 nm (NIR). Vzhledem ke krátké životnosti $^1\text{O}_2$ v biologickém médiu je velice obtížné tento luminiscenční signál detekovat. Počáteční pokusy přímého měření $^1\text{O}_2$ v podmínkách *in vivo* byly neúspěšné z důvodů nízké citlivosti detekčních zařízení. Díky inovaci v podobě NIR-senzitivního fotonásobiče (Hamamatsu) se měření $^1\text{O}_2$ stalo jednodušší a spolehlivější. (Niedre a kol. 2002)

Model explicitní dozimetrie je založen na měření parametrů v průběhu celého procesu PDT – od absorpce světla až po produkci $^1\text{O}_2$. V praxi je proto monitorováno aktivující světlo, koncentrace PS a hladina tripletového kyslíku v tkáni. Koncentrace PS může být kvantifikována prostřednictvím fluorescence nebo absorpce signálu. Saturace tkáně kyslíkem souvisí s parciálním tlakem kyslíku, který lze měřit metodami na principu polarografie, fluorescence a fosforescence, případně pomocí markerů hypoxie.

Implicitní dozimetrie sleduje kinetiku photobleachingu PS, ke kterému dochází působením ROS, stejně tak jako k destrukci tkáně. Photobleaching může být zaznamenán jako změna fluorescence. (Wilson a kol. 1997)

Model dozimetrie založené na biologických reakcích se opírá o fakt, že PDT ovlivňuje krevní cirkulaci v tkáni. Proto je výhodné monitorování lokálního průtoku krve, který v průběhu PDT klesá. K tomu se využívají metody difúzní korelační spektroskopie, Dopplerova laseru, Dopplerova ultrazvuku či angiografie s fluoresceinem. (Mesquita a kol. 2011)

6.3.2 Zdroje světelného záření

Světelné zdroje a způsob dodání záření s vhodnými dozimetrickými parametry jsou klíčové komponenty PDT v klinické praxi. (Yoon a kol. 2013)

Světlo aktivující PS je ve většině případů generováno lasery, dále pak zdroji nekoherentního záření, jako jsou obloukové lampy, či zdroji fluorescenčního záření. Dodání světla přesně do nádorové tkáně může být dosaženo kombinací vhodného zdroje záření a optického vlákna, ve kterém je světelný paprsek uzavřen. Neexistuje univerzální zdroj světla, který by byl ideální pro všechny indikace PDT. (Macdonald a Dougherty 2001)

Volba vhodného zdroje světla závisí na několika faktorech:

- absorpce použitého PS
- charakter onemocnění (lokalizace, velikost a přístupnost léze, vlastnosti tkáně)
- cena a rozměry zařízení

Při použití světla v rámci PDT je vždy nutné vzít v úvahu komplexní dozimetrii zahrnující celkovou dávku světla, dobu světelné expozice a režim aplikace světla, který může být jednorázový, frakcionovaný nebo metronomický. (Agostinis a kol. 2011)

6.3.2.1 LASERY

Hlavní výhoda laserů spočívá v produkci koherentního monochromatického světla o vysoké energii. Díky této vlastnosti může být světelný paprsek uzavřen do optického vlákna, jehož speciálně navržené zakončení v podobě např. mikročočky, cylindrického či sférického difuséru umožňuje přesnou aplikaci světla do cílového místa. Takto může být světlo efektivně dodáno i do těžko přístupných míst jako je močový měchýř nebo gastrointestinální trakt. (Huang 2005, Macdonald a Dougherty 2001)

Standardním a široce rozšířeným zdrojem světla je laser na bázi argonového barviva. Dále se užívají lasery s parami kovů, např. zlata, mědi. Řadu výhod přináší diodové lasery, které mají vysoký stabilní výstupní výkon a chlazení vzduchem, lze je snadno nainstalovat, jsou přenosné a finančně méně nákladné. (Yoon a kol. 2013)

6.3.2.2 NELASEROVÉ ZDROJE SVĚTLA

Mezi nelaserové zdroje záření patří širokospektré xenonové, wolframové, křemíkové či halogenové lampy s barevnými či tepelnými filtry. Tyto konvenční lampy mají výrazný tepelný efekt a při jejich použití dochází k ozáření okolní zdravé tkáně. Vzhledem k nevýhodným vlastnostem konvenčních lamp se v dnešní době k ozáření velkých ploch používají především elektroluminiscenční světlo emitující diody (LED). Mohou generovat světlo o vysoké energii a požadované vlnové délce. Jsou kompaktní a mohou být sestaveny v různých velikostech a geometrických uspořádáních. V současné

praxi se ovšem stále upřednostňují lasery a využití inkohherentních světelných zdrojů je v PDT spíše minimální. Preferenci nelaserových zdrojů záření však nacházíme v terapii kožních onemocnění, kdy je třeba ozářit větší plochu povrchu. (Huang 2005, Moreira a kol. 2008, Yoon a kol. 2013)

6.4 BIOLOGICKÁ REAKCE NA PDT

Základní mechanismy, kterými PDT působí na nádorovou tkáň, jsou:

- 1) Přímý cytotoxický účinek $^1\text{O}_2$ a dalších ROS
- 2) Uzavření cév, které omezuje zásobení nádorové tkáně kyslíkem a živinami
- 3) Rozvoj imunitní odpovědi proti nádorovým buňkám

(Zimcik a Miletin 2009)

6.4.1 Přímý cytotoxický efekt

Jak již bylo řečeno, životnost $^1\text{O}_2$ a dalších ROS je velice krátká a jejich difúze je proto limitována do hloubky pouze 10-55 nm. Z toho důvodu se přímá cytotoxicita projeví v bezprostřední blízkosti intracelulární lokalizace PS. Nejčastějšími cílovými organelami PS jsou lysozomy a mitochondrie. V průběhu PDT však mohou být zasaženy i další buněčné cíle jako jádro, endoplazmatické retikulum (ER), Golgiho aparát (GA) či cytoplazmatická membrána. Fragmentace DNA, objevující se po PDT, je považována spíše za důsledek nastalé apoptózy než přímého efektu PDT na buněčné jádro. (Agostinis a kol. 2011, Zimcik a Miletin 2009)

Lokalizace PS se může v průběhu terapie měnit a některé PS tak mohou zasáhnout více intracelulárních cílů. Obecně lze říci, že hydrofobní PS, které se do buňky dostávají pasivní difúzí, se váží na intracelulární membrány. Méně hydrofobní molekuly jsou do buňky přenášeny pomocí endocytózy a následně zůstávají v lysozomech. Barviva zadržovaná převážně v mitochondriích (např. některá kationická) patří k nejvíce toxickým PS. Mitochondriální lokalizace je také považována za nejdůležitější pro indukci apoptózy jako důsledek PDT. (Zimcik a Miletin 2009)

Tabulka 2 Subcelulární lokalizace vybraných fotosenzitizérů (Agostinis a kol. 2011, Castano a kol. 2004, Kessel 2006, Moreira a kol. 2008, Zimcik a Miletin 2009)

Fotosenzitizér	Subcelulární lokalizace
Porfirmer sodný	membrány, membránové organely
Talaporfin	lysozomy
Rostaporfin	lysozomy, ER
ALA	mitochondrie
Temoporfin	mitochondrie, ER
Verteoporfin	mitochondrie, ER, GA
Pc ₄	mnoho cílů, primárně mitochondrie
AlPc	lysozomy, ER

Je jisté, že subcelulární lokalizace PS a jeho dávka předurčují způsob buněčné smrti. Existují tři hlavní cesty, které vedou vlivem PDT k buněčné smrti: apoptóza, nekróza a smrt spojovaná s autofagií. Za hlavní jsou však považovány apoptóza a nekróza, autofagie je doplňkovým mechanismem. Obecně platí, že méně závažné poškození buňky je signálem k zahájení řízené buněčné smrti – apoptózy. Těžké buněčné poškození je spojeno se zásahem mitochondrií, které vede k zastavení tvorby ATP a buňka nekrotizuje. Závažnost poškození buňky je odrazem dávky PDT (typ a koncentrace PS, intenzita světla, doba ozáření). (Bacellar a kol. 2015, Josefsen a Boyle 2012, Macdonald a Dougherty 2001)

6.4.1.1 APOPTÓZA

Apoptóza, neboli řízená buněčná smrt, je velice komplexní, vícestupňový děj, který je geneticky zakódovaný v každé buňce těla. Je provázána řadou buněčných změn

detekovatelných mikroskopickými metodami (kondenzace chromatinu v jádře, tvorba apoptotických tělísek). (Macdonald a Dougherty 2001, Mroz a kol. 2011)

Apoptóza může být spuštěna mechanismem vnější či vnitřní cesty. V prvním případě je apoptóza vyvolána aktivací receptorů smrti na buněčném povrchu, v případě druhém uvolněním cytochromu c z mitochondrií. Obě cesty vedou k aktivaci společné apoptotické dráhy, která začíná aktivací kaskády efektorových kaspáz a způsobuje štěpení různých buněčných substrátů. V důsledku toho dochází k typickým biochemickým a morfologickým změnám, které lze pozorovat u umírajících buněk. (Klener a Klener jr. 2013, Mroz a kol. 2011)

Vnitřní cesta apoptózy

Mitochondrie hrají v průběhu apoptotické kaskády klíčovou roli skrze regulaci uvolňování celé řady molekul, které se jsou do procesu apoptózy zahrnuty. Nejvýznamnějším faktorem je cytochrom c, který je uvolněn z mitochondrií do cytosolu buňky v průběhu apoptózy, a je tak jedním z významných markerů tohoto procesu. Cytochrom c se následně váže na molekulu Apaf-1 (apoptotic-protease activating factor-1) a prokaspázu-9 a iniciuje tak tvorbu proteinového komplexu zvaného apoptozom. Tento komplex štěpí prokaspázu-9 za vzniku kaspázy-9, která jako iniciátorová kaspáza aktivuje tvorbu dalších efektorových kaspáz (kaspáza 3 a 7). (Debele a kol. 2015, Mroz a kol. 2011)

Kaspázy (**cysteinylní aspartic acid-proteases** = caspases) jsou enzymy z rodiny cysteinových proteáz, které katalyzují hydrolytické štěpení v průběhu apoptózy. Aktivací efektorových kaspáz 3 a 7 (společné pro obě apoptotické dráhy) se apoptóza stává ireverzibilním dějem a vyvolává charakteristické buněčné změny. Dochází ke štěpení aktinu, kondenzaci chromatinu, štěpení DNA na stejně dlouhé fragmenty, smrštění buňky a k závěrečnému rozpadu buňky na apoptotická tělíska ohraničená membránou. Tato tělíska jsou rozpoznána a fagocytována okolními makrofágy aniž by došlo k rozvoji významnější zánětlivé reakce. (Klener a Klener jr. 2013)

Vnější cesta apoptózy

Vnější (receptorová) cesta apoptózy je spuštěna po navázání ligandů (FasL, TnF- α , TRAIL) na své příslušné tzv. receptory smrti (FAS/CD95, TNFR1, TNFR2, TRAILR1, TRAILR2) na vnější straně buněčné membrány. Dochází k agregaci těchto receptorů, k jejich internalizaci a následné tvorbě proteinového efektorového komplexu, který je označován jako DISC (death inducing signaling komplex). DISC je místem aktivace kaspáz 8 a 10, které následně štěpí efektorové kaspázy 3 a 7. Zde se obě cesty apoptózy (vnitřní i vnější) setkávají.

Mezi hlavní regulátory buněčné apoptózy patří proteiny rodiny Bcl-2, které se dělí na proapoptotické a antiapoptotické. Hlavními proapoptotickými proteiny jsou Bak a Bax. Díky jejich schopnosti narušovat mitochondriální membránu, dochází k uvolnění proapoptotických molekul z mitochondrie a k iniciaci apoptózy. Úkolem antiapoptotických proteinů je naopak blokáda Bak a Bax (ve formě neaktivního komplexu). Řada maligních onemocnění je charakteristická zvýšenou expresí těchto proteinů inhibujících buněčnou apoptózu. (Klener a Klener jr. 2013)

Apoptóza a PDT

PS kumulované převážně v mitochondriích poškozují Bcl-2, vázané na buněčnou membránu. Tím dochází k inhibici antiapoptotických proteinů, k tvorbě pórů v mitochondriální membráně, zvýšení její propustnosti a uvolnění cytochromu c a dalších proapoptotických molekul do cytosolu. Poškození mitochondriální membrány předchází zejména tvorba ROS pod vlivem PDT. (Agostinis a kol. 2011, Allen a kol. 2001, Macdonald a Dougherty 2001, Moreira a kol. 2008, Mroz a kol. 2011)

Hydrofilní PS, které se kumulují převážně v lysozomech, působí různými mechanismy vedoucí k apoptóze. Jedním z nich je uvolnění lysozomálních proteolytických enzymů tzv. katepsinů z narušených lysozomů. V cytoplazmě pak mohou tyto enzymy aktivovat kaskádu kaspáz, která vede k buněčné smrti. (Kessel 2006, Macdonald a Dougherty 2001, Moreira a kol. 2008, Plaetzer a kol. 2003).

6.4.1.2 NEKRÓZA

V souvislosti s PDT je apoptóza obecně přijímána jako hlavní cesta buněčné smrti. Pokud je však dávka PDT vysoká (vysoká koncentrace PS, vysoká fluence světla), buňka s větší pravděpodobností podlehne nekróze. Z hlediska preference nekrotické buněčné smrti se uvažuje také o tom, že vysoké dávky PDT inaktivují klíčové enzymy a další komponenty apoptotické kaskády a vedou tak k nekróze. (Agostinis a kol. 2011, Mroz a kol. 2011)

Nekrózu lze charakterizovat jako náhlou, rychlou formu buněčné smrti, která postihuje velkou část buněčné populace. Z klasického pohledu je tedy brána jako náhodný, neprogramovaný děj. V průběhu nekrózy se rozvíjí typický obraz, zahrnující zvětšování buňky, destrukci organel, pyknózu jádra a rupturu plazmatické membrány spojenou s uvolněním buněčného obsahu a rozvojem zánětu. (Mroz a kol. 2011)

Mechanismus na molekulární úrovni je stále nejasný. Byly však popsány některé děje jako aktivace RIP1 (receptor interacting protein 1) kinázy, nadměrná produkce ROS v mitochondriích, poškození lysozomů a nadbytek intracelulárních vápenatých iontů. (Agostinis a kol. 2011)

6.4.1.3 AUTOFAGIE

Buňky zasažené PDT mohou stimulovat autofagii (makroautofagii), která může nepřímo vést k buněčné smrti nebo naopak k přežití buňky. Autofagie je řízena lysozomy, které tímto způsobem za běžných podmínek degradují a eliminují intracelulární proteiny a organely. Výsledkem této recyklace je udržování buněčné homeostázy. (Agostinis a kol. 2011, Klener a Klener jr. 2013)

Struktury, které mají být degradovány, jsou obalené dvojitou membránou a vytváří váčky zvané autofagozomy. Ty následně splývají s lysozomy za vzniku autofagolysozomu, ve kterém dochází k proteolytickému štěpení organel a proteinů na základní složky. Ty se pak stávají zdrojem energie pro buňku v prostředí chudém na živiny či kyslík. (Klener a Klener jr. 2013, Mroz a kol. 2011)

Autofagie byla pozorována u PS lokalizovaných v ER, mitochondriích, lysozomech a endozomech. (Mroz a kol. 2011)

Existuje řada stresových signálů, které mohou podnítit autofagii, přičemž důležitou roli hraje oxidační stres. Současné studie nahlíží na autofagii jako na mechanismus chránící životaschopnost buňky po jejím fotodynamickém poškození. PS, které se lokalizují primárně v lysozomech, mohou narušit schopnost fyziologické autofágie. Důsledkem toho je akumulace poškozených buněčných komponent a rozvoj buněčné smrti na principu apoptózy. Zatímco ztráta schopnosti autofágie zřejmě podporuje fotodynamicky navozenou buněčnou smrt, v případě nepřítomnosti apoptózy se samotná autofágie může stát důležitou cestou buněčné smrti. Další možnou funkcí autofágie je účast při rozpoznávání nádorové buňky imunitním systémem. (Agostinis a kol. 2011, Kessel 2015)

6.4.2 Antivaskulární efekt v PDT

Narušení krevního zásobení nádoru vede k rozvoji hypoxie až anoxie a k nedostatečnému přísunu živin. Viabilita nádoru je tak silně ohrožena. Během PDT může v cévách docházet k několika různým dějům, přičemž převládající mechanismus závisí na typu použitého PS. Podání porfirmeru sodného či hydrofobních Pcs je spojeno s vazokonstrikcí, vznik trombů lze pozorovat po aplikaci talaporfinu a pouze ke zvýšené permeabilitě cév vede podání disulfonovaných Pcs. (Zimcik a Miletin 2009)

Porucha mikrocirkulace byla prvně zaznamenána v roce 1963 ve studii vedené W. M. Starem. V jeho experimentech na laboratorních zvířatech došlo po podání porfirmeru sodného a následném ozáření nádorové tkáně k počáteční vazokonstrikci cév, která byla následována řadou různých reakcí jako úplná stáza průtoku krve, krvácení či agregace krevních destiček. Na základě těchto poznatků se lze domnívat, že primárním cílem PDT v podmínkách *in vivo* je endotel, který na úrovni cév iniciuje výše popsané reakce. Citlivost endoteliálních buněk na působení PDT byla zkoumána C. M. Westem. Při hodnocení výsledků experimentů byly endoteliální buňky výrazně citlivější a v průběhu terapie akumulovaly více PS oproti buňkám nádorovým. (Agostinis a kol. 2011)

Výrazný efekt PDT na cévy se projevuje především tehdy, pokud je PS podán intravenózně a pokud je mezi jeho aplikací a ozářením nádorové tkáně pouze krátký časový interval. Mechanismus poruchy krevního zásobení nádoru se zdá být zásadní

v případě PS s nízkou selektivitou k nádorovým buňkám či s rychlou clearance. (Zimcik a Miletin 2009)

V klinické praxi se antivaskulární efekt uplatňuje v rámci PDT zaměřené na cévy (VTP). Jejím primárním cílem je nádorová mikrocirkulace, PS je aplikován intravenózně a světlo je dodáno prostřednictvím optických vláken. V současné době se VTP klinicky používá v terapii AMD a karcinomu prostaty. (Lepor 2008)

6.4.3 Rozvoj imunitní odpovědi

Zánětlivá reakce představuje ochranný děj, který vzniká v důsledku poškození nádorové tkáně a jehož cílem je obnovení homeostázy a zachování integrity tkáně. Jedná se o několikafázový proces, který je jedním ze základních nástrojů vrozené imunity. (Agostinis a kol. 2011)

Stejně jako poranění tkáně či infekční onemocnění, také PDT často vyvolává zánětlivou reakci, kterou můžeme pozorovat jako lokalizovaný edém v místě působení PDT. Aktivace imunitní odpovědi v důsledku PDT není primárním mechanismem buněčné smrti, ale napomáhá v dlouhodobé kontrole nádorové tkáně. (Zimcik a Miletin 2009)

Tkáň ovlivněná fotodynamickým efektem uvolňuje řadu zánětlivých a chemotakticky působících signálů, souhrnně označených jako cytokiny. Cévy nádorové tkáně se stávají výrazně propustnější pro krevní bílkoviny a proadhezivní pro buňky účastnící se zánětlivé reakce. Do místa působení PDT jsou transportovány neutrofilové, žírné buňky a monocyt/makrofágy. Jejich primárním cílem je eliminace nečistot v zasažené tkáni, včetně poškozených a mrtvých buněk. (Agostinis a kol. 2011, Macdonald a Dougherty 2001)

Ukázalo se, že vyčerpání buněk účastnících se zánětlivé reakce či jejich inhibice po skončení terapie snižuje celkový efekt terapie. Významnou roli v regulaci zánětlivé reakce mají zejména interleukiny IL-1 β a IL-6. Blokáda funkce těchto molekul byla nepříznivá pro výsledky terapie. Naopak blokadou protizánětlivých cytokinů (IL-10 a TGF- β - transforming growth factor β) bylo dosaženo lepších výsledků léčby. (Agostinis a kol. 2011)

Nejen vrozená imunita (rozvoj zánětlivé reakce), ale také imunita získaná je zapojena do komplexní odpovědi na PDT. Početné preklinické a klinické studie

ukázaly, že některé reakce na terapii vyústily potenciací adaptivní imunitní reakce, zatímco jiné imunosupresí. Přesný mechanismus těchto dvou jevů není znám, ale předpokládá se závislost na terapeutickém režimu, místě léčby a typu použitého PS. Během PDT jsou aktivovány CD8 T-lymfocyty prostřednictvím rozponání transmembránového komplexu MHC-I (major histocompatibility komplex class I).

T-lymfocyty napadají zbývající nádorové buňky, které se nachází na vzdálených místech, např. v ložiscích metastáz. Bylo dokázáno, že nádory postrádající molekuly MHC-I jsou odolné vůči buňkami zprostředkované imunitní reakci. Rovněž u pacientů s narušenou imunitou mělo nádorové onemocnění delší průběh a častěji docházelo k recidivě. Míra imunitní odpovědi by v praxi mohla být zvýšena i podáním imunostimulancií před léčbou PDT. (Agostinis a kol. 2011, Macdonald a Dougherty 2001, Zimcik a Miletin 2009)

Imunitní reakce vznikající jako následek fotodynamického efektu nabízí vynikající možnost použití PDT i v případech metastazujících onemocnění či jako doplňkovou terapii v kombinaci s dalšími onkologickými metodami. (Agostinis a kol. 2011) Předpokládá se, že schopnost PDT navodit nádorově specifickou imunitní reakci by mohla být v budoucnosti využita pro vývoj účinných protinádorových vakcín. (Zimcik a Miletin 2009)

6.4.4 Cytoprotektivní mechanismy nádorové tkáně

Nádorové buňky jsou do určité míry schopné bránit se toxickým vlivům PDT. Je dokázáno, že ROS mohou způsobit poškození DNA a iniciovat tak nádorové bujení. Na druhé straně mohou ROS navodit buněčnou smrt a působit jako protinádorové agens. Proto jsou nádorové buňky vybavené účinným antioxidačním systémem, jehož úkolem je udržet přijatelnou hladinu intracelulárních ROS a zabránit tak oxidačnímu poškození buněk. Tento systém zahrnuje v první řadě účinky antioxidačních enzymů, mezi které patří superoxid dismutáza (SOD), glutathion peroxidáza, glutathion reductáza či kataláza. Protektivně působí také neenzymatické antioxidy, jako jsou glutathion (GSH), vitamín C a E, některé aminokyseliny či koenzym Q. (Reuter a kol. 2010)

Další obranný mechanismus je založen na expresi genů a následné tvorbě specifických proteinů, které jsou z velké části součástí signální dráhy regulující buněčnou apoptózu. Některé proteiny se účastní reparace lézí způsobených oxidačním

stresem. Protektivní funkci při aplikaci PDT mají také proteiny teplotního šoku (HSP, heat shock proteins), které jsou schopné vázat se na zoxidované proteiny a působit jako chaperony. Nemalou úlohu plní rovněž ubikvitin-proteazómový systém, jehož princip je založen na značení proteinů pomocí malé molekuly ubikvitin. Takto označené proteiny jsou určeny k degradaci v proteazomu a tím je znemožněna tvorba toxických proteinových agregátů. (Agostinis a kol. 2011)

Antioxidanty se nachází prakticky ve všech nádorových buňkách, avšak jejich hladina je velice variabilní a záleží na typu buňky. Tento fakt přispívá k rozdílné citlivosti buněk na PDT. V současné době je předmětem klinických studií použití kombinace PDT a specifických inhibitorů antioxidantů za účelem zvýšení toxických účinků terapie v nádorových buňkách. Potenciálně vhodnými se zdají být zejména inhibitory SOD. (Agostinis a kol. 2011, Kimani a kol. 2012)

6.5 PDT V KOMBINACI S OSTATNÍMI TERAPEUTICKÝMI PŘÍSTUPY

Pro dosažení vyššího terapeutického indexu léčby se v moderní onkologii běžně využívá kombinace různých terapeutických metod s nepřekrývající se toxicitou. Stejně tomu je i v případě PDT, která může být kombinována se standardními protinádorovými metodami, jako jsou chirurgické zákroky, radioterapie či chemoterapie. Potenciace toxicity navozená kombinovanou terapií není systémová, ale vztahuje se pouze na ozářenou oblast těla. Proto lze tyto postupy s výhodou aplikovat i u starších či oslabených pacientů, kteří obecně hůře snášejí intenzivní terapeutické režimy. (Agostinis a kol. 2011)

Z obecného pohledu existují dva hlavní přístupy, které zvyšují účinnost protinádorové terapie:

- zvýšení citlivosti tzv. senzitivace nádorových buněk k terapii
- interference s cytoprotektivními ději

Citlivost k PDT může být podpořena selektivní dodávkou PS k nádorovým buňkám. K tomu se využívá PS konjugovaných s molekulami, které dokážou vyhledat a cíleně zasáhnout nádorové buňky. Molekuly vhodné ke konjugaci zahrnují sacharidy,

peptidy, proteiny, monoklonální protilátky, LDL částice a další. Syntéza nových konjugátů PS našla využití jak v terapeutických tak v diagnostických ozařovacích metodách. Zvláště důležitý význam mají v případě, kdy musí být během terapie ozářena velká plocha lidského těla nebo je žádaná nejvyšší možná selektivita terapie. (Agostinis a kol. 2011, Tomanová a Jurášek 2014)

Nejen vyšší dávka, ale také nižší ztráty PS podporují účinnost PDT. K tomu se využívá látek bránících efluxu PS. Tato kombinace je však výhodná pravděpodobně pouze u takových PS, které jsou substráty membránových transportních systémů jako ABC transportérů (ATP-binding cassette transporters). Další možností je využití inhibice molekul HSP, které v nádorových buňkách opravují či odstraňují zoxidované proteiny. Nedostatečná reparace proteinů vede k jejich akumulaci a agregaci a zvyšuje se tak pravděpodobnost buněčné smrti. Význam má také blokáda enzymů účastnících se vychytávání ROS, jako např. SOD. (Agostinis a kol. 2011)

6.5.1 Kombinace PDT s antiangiogeními látkami

Angiogeneze je definována jako tvorba nových z již existujících cév. Jedná se o kaskádu dějů, které jsou regulovány rovnováhou mezi pro- a antiangiogeními molekulami. Prvním krokem angiogeneze je zvýšená propustnost a rozšíření původních cév. Následuje migrace a proliferace endoteliálních buněk, které se vzájemně spojují a vytváří lumen nové kapiláry. Cévy následně vyzrávají za vzniku stabilního cévního řečiště. Aby mohla být celá kaskáda úspěšně absolvována, musí dojít k vyvážené souhře angiogeních faktorů. (Dubská 2009)

Mezi hlavní aktivátory angiogeneze patří vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), na který se zaměřila většina posledních výzkumů. Za fyziologických okolností je VEGF zásadním faktorem stimulujícím růst a proliferaci endotelových buněk. Udržuje adekvátní průtok krve a tím zajišťuje dostatečný přísun kyslíku a živin. Zároveň hraje důležitou roli i pro rozvoj patologické angiogeneze, která provází nádorová, stejně tak jako mnohá ischemická či zánětlivá onemocnění.

Je známo mnoho rizikových faktorů vedoucích ke zvýšenému uvolňování VEGF a spuštění angiogeneze. Mezi ně patří metabolický stres (např. nedostatek kyslíku, hypoglykémie či nízké pH), mechanický stres (např. tlak generovaný proliferujícími buňkami), imunitní/zánětlivá odpověď, genetické mutace (např. aktivace onkogenů či

delece tumor supresorových genů kontrolujících produkci regulátorů angiogeneze). (Carmeliet a Jain 2000, Dubská 2009).

V průběhu PDT dochází vlivem poškození krevního zásobení nádoru k rozvoji hypoxie až anoxie a k restrikci přísunu živin. Tento stav také aktivuje celou řadu angiogenních růstových faktorů a tím i proces angiogeneze jako jeden z nežádoucích účinků PDT. Poprvé byla tato aktivace angiogenních růstových faktorů popsána při použití Photofrinu. Tyto poznatky vedly k použití antiangiogenních preparátů, resp. látek blokuujících VEGF, v kombinaci s PDT v praxi. Bylo dokázáno, že kombinovaná terapie signifikantně snižuje expresi VEGF a podporuje účinnost PDT.

Dobré výsledky přinesla kombinace ranizumabu a PDT s Visudyнем. Ranibizumab je fragment rekombinační humanizované monoklonální protilátky zaměřený proti VEGF A. Svou vazbou na molekulu VEGF A brání růstu neovaskulárních membrán. Malá velikost molekuly umožňuje intravitrealní podání a snadnou prostupnost skrze sítnici k neovaskulární membráně. Proto může být s výhodou využit v oftalmologii. Účinnost této kombinace byla hodnocena v multicentrické, randomizované, jednoduše zaslepené studii FOCUS. Do této studie bylo zařazeno 162 pacientů s převážně klasickou formou choroidální neovaskularizace, kteří byli rozděleni do 2 skupin. Skupině čítající 106 pacientů byl aplikován 1krát měsíčně intravitrealně ranibizumab v dávce 0,5 mg. Zbýlých 56 pacientů dostávalo 1krát měsíčně placebo. Všem pacientům byla na počátku studie, týden před první injekcí, aplikována jedna kúra PDT s Visudyнем, která byla čtvrtletně opakována dle výsledků. Po 24 měsících terapie bylo prokázáno zlepšení zraku (hodnoceno jako zlepšení o 15 a více písmen ETDRS optotypů) u 25% pacientů léčených kombinovanou terapií, oproti 7% pacientů léčených pouze PDT. (Antoszyk a kol. 2008, Spitzer a kol. 2008)

6.6 NOVÉ STRATEGIE FOTODYNAMICKÉ TERAPIE

6.6.1 Dvoufotonová PDT

V současné době je ve fázi preklinického zkoušení nový, v zásadě odlišný přístup terapie, který je založen na jiných fyzikálně-chemických vlastnostech i fotobiologických mechanismech účinku. (Agostinis a kol. 2011)

Standardní metoda spočívá v podání organického PS, který je následně aktivován kontinuálním proudem světla. Ve dvoufotonové terapii je molekula PS excitována současným působením dvou fotonů, přičemž každý dodává polovinu potřebné energie. První foton excituje molekulu ze základního do přechodného excitovaného energetického stavu, současně absorbovaný druhý foton dokončí excitaci z přechodného do singletového excitovaného stavu. (Agostinis a kol. 2011, Probohdh a Cramb 2012)

Jelikož každý foton přispívá poloviční energií, lze v případě dvoufotonové PDT použít světlo v blízkosti infračervené oblasti, ve které absorpce jediného fotonu nedokáže excitovat molekuly do vyššího energetického stavu. Výhodou tohoto NIR světla je jeho hlubší penetrace do tkáně. V praxi byl prokázán efekt terapie na nádory velikosti až 3 cm. (Ogawa a Kobuke 2013)

Absorpce dvou fotonů vyžaduje silný proud světla, kterého lze dosáhnout použitím krátkého (cca 100 fs), silně fokusovaného laserového paprsku. Ztráty světelné energie jsou nižší, jelikož nedochází k jejímu pohlcování hemoglobinem ani k výraznému rozptylu světla. Díky prostorové selektivitě, způsobené vysokou fokusací světelného paprsku, může dvoufotonová terapie zasáhnou např. jednotlivé cévy, přičemž okolní tkáň zůstává chráněna. Proto lze s výhodou použít metodu dvoufotonové PDT v oblasti neovaskularizace nádoru a excitovat tak PS pouze v patologicky vytvořených cévách. V praxi se dvoufotonová PDT používá v terapii AMD. (Agostinis a kol. 2011, Ogawa a Kobuke 2013, Probohdh a Cramb 2012)

6.6.2 Metronomická PDT

Princip metronomické PDT (mPDT) spočívá v kontinuálním, pomalém podávání nízkých dávek světla i PS. Vzhledem k nízké rychlosti terapie se délka jedné procedury pohybuje v řádech hodin až dnů. Postižená oblast se někdy ozařuje ve frakcích, kdy celkové energie světelného záření je dosaženo postupnými iradiacemi. Cílem metody je dosažení selektivnější buněčné smrti resp. apoptózy v nádorové tkáni a současně minimalizace nekrózy jak v nádorové, tak ve zdravé tkáni. (Bisland a kol. 2004)

Probíhající preklinické studie jsou zaměřeny především na použití mPDT v léčbě maligních nádorů mozku, kde je obzvláště důležitá ochrana okolní mozkové tkáně. Pozorována byla prozatím reakce nádorových buněk na nízko-dávkový režim

PDT s ALA v kombinaci s optickým vláknem. Tato studie probíhalav podmínkách *in vitro* na intrakraniálním modelu a její výsledky ukázaly vyšší incidenci apoptózy probíhající selektivně u nádorových buněk bez současné apoptózy či nekrózy zdravé tkáně. Není však jisté, zda by obdobný přístup mohl fungovat i na jiných typech nádorů a s použitím jiného PS. mPDT v podmínkách *in vivo* zůstává předmětem výzkumu. (Agostinis a kol. 2011, Bisland a kol. 2004)

6.6.3 PDT Molecular Beacons

Koncept PDT Molecular Beacons (MBs) vychází z použití MBs jako fluorescenčních sond pro mikrobiologickou diagnostiku. Princip PDT MBs spočívá v aktivaci PS až po dosažení svého cíle působení. (Agostinis a kol. 2011, Pavlík a Pavlíková 2004)

PS je spojen s tzv. zhášedlem (quencher), díky kterému zůstává po dobu transportu inaktivní a nedochází tak k produkci $^1\text{O}_2$ ve zdravé tkáni. Teprve v cílové tkáni je spojovací můstek mezi PS a zhášedlem rozštěpen specifickým enzymem, PS se uvolní, není dále inhibován zhášedlem a může proto být aktivován absorbovaným světlem. (Agostinis a kol. 2011)

6.6.4 Nanotechnologie v PDT

Nanočástice můžeme definovat jako částice o rozměrech 1000 nm a méně, které mají specifické fyzikální, chemické, magnetické a strukturální vlastnosti. Díky těmto vlastnostem nachází široké využití jako nosiče léčiv, jako senzitivizéry a dále v diagnostických, terapeutických či zobrazovacích metodách. (Debele a Peng 2015)

Nanočástice mohou být v PDT potenciálně využity trojím způsobem: jako nosič PS, jako samotný PS či pro transformaci energie. Použití nanočástic v rámci PDT se obecně zdá být velmi výhodné, jelikož v jejich přítomnosti není nezbytná korelace fotofyzikálních a fotochemických vlastností PS s procesem jeho transportu a aktivace. (Agostinis a kol. 2011)

Nanočástice dokážou zvýšit hydrofilní charakter látek, a proto se s výhodou používají jako nosiče ve vodě nerozpustných PS. Předností nanočástic je také snadná

modifikace jejich povrchu, díky které mohou být označeny různými protilátkami či peptidy zvyšující cílené působení. Další výhodou je schopnost preferenční akumulace v nádorové tkáni prostřednictvím „efektu zvýšené permeability a retence“. (Agostinis a kol. 2011, Yoon a kol. 2013)

Předmětem výzkumu jsou nyní biodegradabilní polymery, křemíkové a kovové (zlato, oxidy železa) nanočástice či magnetické nanočástice, u kterých aplikace magnetického pole zvyšuje lokalizaci PS do nádoru. Nanočástice byly také použity ve spojení s dvoufotonovou PDT, jelikož PS schopné absorpce dvou fotonů jsou typicky málo rozpustné ve vodě. Nanočástice tak fungují jako jejich přenašeče. V současné době se klinicky využívají liposomální nanočástice, které přenášejí ve vodě nerozpustný verteporfin. (Agostinis a kol. 2011)

Nanočástice zlata

Nanočástice zlata se zdají být vhodnými nosiči PS, jelikož snižují hydrofilní charakter látek a zvyšují tak jejich průnik do nádorové tkáně a penetraci přes buněčné membrány. S výhodou se tyto nanočástice využívají v rámci fototermální terapie, která je založena na lokálním zahřívání nádorové tkáně (více než 43 °C) prostřednictvím absorpce záření v oblasti NIR. Nanočástice zlata konjugované s Pc4 byly použity ve studii Y. Chenga, kde bylo dosaženo výrazně vyšší penetrace PS do nádorové tkáně. (Yoon a kol. 2013)

Křemíkové nanočástice

Křemíkové nanočástice jsou samy schopné generovat $^1\text{O}_2$ a nabízí tak jejich přímé použití jako PS. (Agostinis a kol. 2011) Ještě větší význam však mají jako tzv. převodníky energie. Většina PS používaná v konvenční PDT může být aktivována pouze viditelným světlem, které nedokáže penetrovat do hloubky tkáně. Hlubší penetrace je dosaženo použitím světla v oblasti NIR, které je zároveň méně škodlivé pro okolní zdravou tkáň. Energie NIR záření je však nízká a nedostačující pro aktivaci PS, proto je zapotřebí tuto energii zvýšit. K tomu mohou být použity převodníky v podobě křemíkových nanočástic, které absorbují hluboko penetrující NIR záření a následně jej konvertují na záření o kratší vlnové délce a vyšší energii potřebné k aktivaci

připojeného PS. Tato konverze energie záření umožňuje aktivovat PS ve větší hloubce tkáně. (Idris a kol. 2012)

6.6.5 Fotochemická internalizace

Je známo, že PDT může být vhodně kombinována s konvenční chemoterapií. Byla navržena řada technologií ve snaze podpořit příjem protinádorových léčiv maligními buňkami, který se děje prostřednictvím endocytózy. Makromolekulární chemoterapeutikum vstupuje do buňky, kde se nachází uvnitř endocytického váčku (endozomu). Fotochemická internalizace byla navržena s cílem usnadnit uvolnění léčiva z endozomu do cytosolu. (Agostinis a kol. 2011)

Podstata metody spočívá v použití PS, které se prostřednictvím endocytózy dostávají dovnitř buňky a lokalizují se v membráně endozomu. Obdobnou cestou do buňky vstupuje také makromolekulární chemoterapeutikum, které v buňce zůstává uzavřeno uvnitř endozomu. Jak chemoterapeutikum, tak PS jsou voleny tak, aby nedokázaly penetrovat skrz buněčnou membránu a byly proto transportovány procesem endocytózy. Po následující expozici světlu se PS aktivuje, iniciuje tvorbu $^1\text{O}_2$, který způsobí rupturu membrány vezikulu. Chemoterapeutikum se tímto uvolní do cytosolu buňky a může se navázat na cílový receptor. Bez přítomnosti světla může být chemoterapeutikum degradováno v lysozomu. (Agostinis a kol. 2011, Berg a Moan 1994, Selbo 2002)

Z hlediska fyzikálně-chemických vlastností je nezbytným požadavkem amfifilní charakter PS, který brání jeho samovolné penetraci membránou a vyžaduje transport prostřednictvím endocytózy. Metoda fotochemické internalizace by mohla být vhodně použita pro aktivaci chemoterapeutik pouze v cílové oblasti, která je vystavena světlu, přičemž okolní tkáně by měly zůstat nedotčené. Bylo dokázáno, že fotochemická internalizace zvyšuje biologickou aktivitu molekul, které neochotně penetrují plazmatickou membránou, jako např. ribozom-inaktivující proteiny, plazmidy, adenoviry, různé oligonukleotidy a nekonjugovaná léčiva jako je neomycin či doxorubicinu. Avšak klinická dokumentace účinnosti makromolekulárních terapeutik zaměřených na intracelulární cíle nádorových buněk je velice omezená. (Agostinis a kol. 2011)

6.7 FOTODYNAMICKÁ TERAPIE V KLINICKÉ PRAXI

Počátky zavedení PDT do klinické praxe se datují od konce 70. let 20. století, kdy probíhala studie s HpD v kombinaci se světlem vhodné vlnové délky. Studii bylo podrobena 5 pacientů s rakovinou močového měchýře. V roce 1978 byla stejným PS s úspěchem léčena další, tentokrát již mnohem početnější, skupina pacientů. V této studii vedené Doughertym byla pozorována úplná či částečná odpověď na terapii u 111 ze 113 maligních lézí. Od doby počátečních studií proběhlo více než 200 klinických studií hodnotících účinnost PDT. (Agostinis a kol. 2011)

Výhodou PDT, na rozdíl např. od radioterapie, je možnost jejího opakování bez kumulující se toxicity. Proto může být PDT součástí léčby recidivujících nádorů, kdy pacienti většinou nemohou podstoupit další cyklus radioterapie či chirurgickou léčbu. (Stewart a kol. 1998)

Protože žádný z dosud klinicky schválených PS se nekumuluje v buněčném jádře, má PDT jen velmi omezený efekt na DNA a není považována za kancerogenní, na rozdíl od radioterapie a mnoha cytotoxických chemoterapeutik. (Agostinis a kol. 2011, Macdonald a Dougherty 2001, Moan a kol. 1991)

Vzhledem k omezené hloubce penetrace světla do tkáně se použití PDT soustředí především na povrchová onemocnění, jako jsou kožní léze a onemocnění dutých orgánů. Terapie dutých orgánů se provádí za využití flexibilního cylindrického difusoru vloženého do endoskopu. Z výsledků dosavadních studií vyplývá, že PDT je vhodnou volbou léčby maligních a premaligních nemelanomových kožních onemocnění (NMSD). Dále bylo prokázáno výhodné použití PDT v léčbě Barretova jícnu a neoperovatelného cholangiokarcinomu. Účinnost terapie u ostatních typů nádorových onemocnění nebyla dosud jednoznačně prokázána. Hlavním důvodem je dosavadní nedostatek kontrolovaných randomizovaných studií, které by objektivně zhodnotily fotodynamický efekt na dalších typech zasažených tkání. S jistotou lze říci, že PDT je vhodnou doplňkovou léčbou v kombinaci s chirurgickým výkonem či ozařováním, která přináší možnost dlouhodobé kontroly nad nádorovým onemocněním. (Agostinis a kol. 2011)

6.7.1 Kožní nádory

Dermatologické léze patří k prvním onemocněním, které byly studovány ve spojení s PDT, jelikož jsou dobře přístupné pro PS i světlo. Vhodnými indikacemi pro PDT se zdají být nemaligní a maligní kožní léze, s výjimkou pigmentovaných maligních melanomů, vzhledem k limitované penetraci světla. (Huang 2005) Souhrnně se tato onemocnění označují jako nemelanomová kožní onemocnění, mezi která patří BCC a spinocelulární karcinom (SCC).

Při léčbě kožního onemocnění, ať už maligního či benigního, je pro pacienta vždy důležitý kosmetický výsledek. Konvenční terapeutické metody, v podobě chirurgické léčby, zmrazování, ionizujícího záření či kytetáže, jsou často provázené jizvením tkáně, fibrózou, změnami pigmentace a prodlouženou dobou hojení. Naproti tomu PDT dosahuje velice dobrých kosmetických výsledků. (Braathen a kol. 2007)

Za nejvhodnější PS pro PDT kožních onemocnění je považována topicky aplikovaná ALA a její ester m-ALA. Jako účinné se ukázalo také použití porfirmeru sodného, avšak vzhledem k jeho systémovému podání docházelo k rozvoji fotosenzitivity kůže. V současné době je PDT schválena pro léčbu aktinické keratózy (USA, Kanada, Evropská unie) a pro léčbu BCC (Kanada, EU). Účinnost PDT byla prokázána rovněž v léčbě SCC (Bowenova choroba), avšak ve více než polovině případů docházelo k recidivě nádoru. Jisté výsledky také přineslo použití PDT v terapii Pagetovy choroby. (Agostinis a kol. 2011)

Aktinická keratóza

Aktinická keratóza, premaligní léze způsobená nadměrnou expozicí slunečnímu záření, se stala první schválenou dermatologickou indikací PDT. (Huang 2005)

Účinnost PDT v léčbě aktinické keratózy byla hodnocena na základě randomizovaných kontrolovaných studií se systémově podávaným porfirmerem sodným a topicky podávanou kyselinou ALA a jejím esterem m-ALA. (Agostinis a kol. 2011) Multicentrické klinické studie ukázaly, že kombinace ALA (Levulan) a modrého světla dosahuje míry kompletní odpovědi, která je v porovnání s placebem výrazně vyšší. Tyto studie prokázaly účinnost, bezpečnost a dobrou toleranci PDT s ALA, což vedlo v roce

2000 k jejímu schválení v USA. Také ester m-ALA (Metvix) byl v některých zemích schválen pro léčbu aktinické keratózy. (Huang 2005)

Účinnost PDT v léčbě aktinické keratózy byla porovnána s účinností dalších metod jako je kryoterapie nebo topická aplikace krému s obsahem 5-fluorouracilu. Výsledky kontrolované randomizované studie, které se účastnilo 119 pacientů s aktinickou keratózou v oblasti hlavy a obličeje, ukázaly vysokou míru odpovědi jak v případě PDT (89%), tak v případě kryoterapie (86%). Avšak při použití PDT bylo dosaženo výrazně lepších kosmetických výsledků. Obdobné srovnání proběhlo také s použitím m-ALA, přičemž výsledky se v zásadě nelišily. (Agostinis a kol. 2011)

BCC, SCC

Další významnou indikací PDT je bazocelulární karcinom. BCC je onemocnění ze skupiny NMSD, které jen zřídka metastazuje a které může mít podobu superficiální (sBCC) nebo nodulární (nBCC). Rozsáhlá klinická studie 3. fáze prokázala, že PDT s ALA či m-ALA je vhodnou volbou pro léčbu sBCC, vzhledem k míře celkové odpovědi 80-97%. (Braathen a kol. 2007, Peng a kol. 1997) Jelikož nBCC zasahuje obecně hlouběji do tkáně, byl u pacientů trpících tímto onemocněním zaznamenán pokles celkové odpovědi na 71%. (Agostinis a kol. 2011)

Srovnání efektu PDT s ALA či m-ALA s chirurgickým výkonem ukázalo, že po aplikaci PDT dochází k častější recidivě BCC, ať už nodulární či superficiální formy. V randomizované kontrolované studii, které bylo podrobena 196 pacientů s sBCC, byla míra recidivy nádoru po PDT 9,3%, zatímco po chirurgické léčbě 0%. Pacienti byli sledováni 12 měsíců po ukončení terapie. PDT ovšem jednoznačně vynikala lepšími kosmetickými výsledky. (Agostinis a kol. 2011)

Spinocelulární karcinom je druhým typem NMSD, který byl rovněž hodnocen jako potenciální indikace PDT. Na rozdíl od BCC je SCC schopný metastazovat a tím se stává pro terapii komplikovaným. Celková míra odpovědi zaznamenaná po aplikaci PDT byla zpočátku poměrně vysoká (54-100%), později však docházelo k recidivě nádoru. Nebyla tedy prokázána vyšší účinnost PDT oproti konvenčním terapeutickým metodám. (Peng a kol. 1997)

6.7.2 Nádorová onemocnění gastrointestinálního traktu

Premaligní a maligní léze lokalizované v oblasti jícnu, žaludku, žlučového, tlustého střeva a rekta jsou pro chirurgickou léčbu velice rizikové a stávají se proto vhodnými indikacemi pro endoskopickou PDT. (Huang 2005)

Účinek PDT je nejlépe prostudován na diagnóze Barretova jícnu, který je pro PDT teoreticky ideální indikací. Jedná se o prekancerózu s vysokým stupněm dysplázie, jejíž rozvoj je spojen s patologickým gastroesofageálním refluxem. Takto změněná tkáň jícnu může být předstupněm vzniku adenokarcinomu. Standardní léčba Barretova jícnu původně spočívala v odstranění distální části jícnu. Tato metoda však byla spojena s vysokou morbiditou a až 5% mortalitou. Proto se od resekce jícnu postupně opouštělo a do popředí se dostaly alternativní endoskopické metody včetně PDT. (Agostinis a kol. 2011)

Celkem bylo provedeno sedm randomizovaných klinických studií hodnotících efekt PDT u pacientů s Barretovým jícnem. Zatím však nelze stanovit, zda PDT je v rámci léčby Barretova jícnu více účinná než ostatní ablativní léčebné metody. Dosud provedené studie nebyly totiž nijak rozsáhlé, většina z nich sledovala skupinu čítající méně než 50 pacientů. Výskyt nežádoucích účinků a jejich závažnost byl ale prokazatelně nižší ve srovnání s ostatními metodami. Nejčastěji docházelo v důsledku PDT k rozvoji přetrvávající fotosenzitivity kůže a ke konstrikci jícnu. Klinické studie se zaměřily především na použití Phofrinu, který byl na podkladě výsledků schválen v několika zemích pro PDT Barretova jícnu a rakoviny jícnu. (Huang 2005, Agostinis a kol. 2011)

Patologické změny v oblasti jícnu byly sledovány a hodnoceny jako hlavní, avšak nikoli jediné indikace PDT zaměřené na gastrointestinální trakt. Další studie demonstrovaly, že PDT s Photofrinem je účinnou paliativní léčbou cholangiokarcinomu. Klinická studie 3. fáze srovnávala účinnost kombinované metody stentování + PDT (n=20) se samotným stentováním (n=19). Výsledky ukázaly, že u skupiny pacientů léčených kombinovanou terapeutickou metodou došlo k prodloužení života o téměř 1 rok. Bylo potvrzeno, že endoskopické ozáření žlučového je bezpečné a účinné u neoperovatelného cholangiokarcinomu a může významně snížit cholestázu a dlouhodobě zvýšit kvalitu života. V současné době probíhají v USA a Kanadě

multicentrické klinické studie, které usilují o schválení PDT pro pacienty s diagnostikovaným cholangiokarcinomem. (Huang 2005, Agostinis a kol. 2011)

Účinky PDT byly sledovány rovněž u pacientů s neoperovatelným nádorem slinivky břišní, s rakovinou rekta a u pacientů s nálezem polypů v oblasti tlustého střeva. Studie věnované těmto nádorovým onemocněním mají ale především experimentální charakter a prozatím nebyly získány potřebné údaje, které by PDT mohly schválit jako terapii těchto diagnóz. (Agostinis a kol. 2011)

6.7.3 Rakovina prostaty

Současná konvenční terapie karcinomu prostaty zahrnuje radikální přístupy jako chirurgické zákroky, radioterapie, kryoterapie, termoterapie nebo hormonální léčba. Míra kompletní odpovědi je u těchto metod poměrně vysoká, avšak vzhledem k blízkosti přirozených struktur jako močový měchýř, rektum a síť nervů dochází často k rozvoji nežádoucích účinků zahrnujících inkontinenci či erektilní dysfunkci. (Nathan a kol. 2002)

PDT s využitím optických vláken nabízí vyšší selektivitu s redukcí toxických účinků ve zdravé tkáni. PDT se používá jako metoda navazující na radioterapii (EBRT, external beam radiotherapy), po které došlo k opětovnému nádorovému bujení. (Trachtenberg a kol. 2007)

V rámci klinických studií byly kromě Photofrinu hodnoceny zejména PS druhé generace, konkrétně m-TPHC, motexafin lutecium a padoporfin. Nathan a kol. sledoval účinky m-TPHC v první a druhé fázi klinických studií. Léčeno bylo 14 pacientů, u kterých došlo k opětovnému nárůstu PSA (prostate specific antigen) po absolvování radioterapie. PS byl aplikován intravenózně a tkáň byla ozářena uvnitř žlázy s použitím optických vláken. Léčba byla obecně dobře tolerována a snížení PSA bylo zaznamenáno u 9 pacientů. Nežádoucí účinek v podobě stresové inkontinence se objevil u 4 pacientů, což je v porovnání s konvenčními metodami mírné zlepšení. Incidence sexuální dysfunkce byla však vysoká, k jejímu rozvoji došlo u 4 ze 7 pacientů, kteří byli před zahájením terapie schopni pohlavního styku. U jednoho pacienta se následkem terapie rozvinula urektální fistula. (Nathan a kol. 2002)

Dobrý potenciál pro léčbu rakoviny prostaty má padoporfin, jehož účinek je založen na narušení krevního zásobení nádoru. Klinické studie první fáze se účastnilo

24 pacientů, u kterých biopsie prokázala zhoubný nález po ukončení radioterapie. Tookad byl podáván intravenózně za téměř současného ozáření tkáně prostřednictvím optických vláken. Tato studie potvrdila bezpečnost antivaskulárního efektu PDT s padoporfinem. Následovala 2. fáze studie, ve které bylo 28 pacientů léčeno PDT s rostoucí dávkou světla. Odpověď na terapii byla hodnocena pomocí biopsie s odstupem 6 měsíců od ukončení léčby. Takto byla prokázána účinnost PDT s padoporfinem. U žádného z pacientů nedošlo k rozvoji inkontinence či k narušení erektilní funkce. U dvou pacientů byla zaznamenána uretrorektální fistula. (Agostinis a kol. 2011, Trachtenberg a kol. 2007)

6.7.4 Bariéry klinické aplikace PDT

Ačkoli byla PDT použita u onkologických pacientů již kolem roku 1900, její průnik do rutinní klinické praxe stále zůstává relativně pomalý. V současné době je známo několik indikací, pro které je PDT vysoce účinná. V mnoha případech představuje pro pacienty zejména alternativní a paliativní léčebnou metodu, či je aplikována v rámci klinických testů. Významu nabývá jako léčebná metoda navazující na chirurgickou léčbu, radioterapii či chemoterapii u pacientů s perzistujícím onemocněním. Jednu z hlavních bariér představuje nedostatek 3. fáze klinických zkoušek, které by jasně demonstrovaly výhody PDT, které převyšují konvenční, běžně užívané metody. Nízký počet klinických studií může také souviset s jejich finanční náročností. Problém lékaři spatřují také v samotné aplikaci terapie, která vyžaduje přesnou manipulaci a také znalost individuální dozimetrie. Vhodná je proto spolupráce s radiologem či lékařským fyzikem. V neposlední řadě může být použití PDT omezeno také prolongovanou fotosenzitivitou kůže. (Agostinis a kol. 2011, Kessel 2015)

Bariéry pro zařazení PDT mezi rutinně užívané metody klinické praxe by mohly být překonány detailnějšími poznatky z dozimetrie, dokonalejšími laserovými technologiemi se snazším ovládním a samozřejmě také hledáním nových PS s redukovanými nežádoucími účinky. (Agostinis a kol. 2011)

7 CÍLE PRÁCE

- studium světlem indukované toxicity (EC_{50}) nově syntetizovaných ftalocyaninových fotosenzitizérů **P9-0Zn** a **ZIP21Zn** na buněčné linii lidského cervikálního karcinomu (HeLa)
- studium vlastní toxicity (TC_{50}) a stability emulgujících přísad a nosičů (Cremophor EL, DMSO, liposomy, Si nanočástice, modifikované Si nanočástice) – samostatně a v kombinaci s PS
- posouzení vhodné kombinace PS a emulgátoru/nosiče
- studium subcelulární lokalizace PS
- pokusit se blíže popsat jevy, které probíhají během buněčného poškození vlivem PDT

8 METODICKÁ ČÁST

8.1 MANIPULAČNÍ VYBAVENÍ PRO PRÁCI S BUŇKAMI

- kultivační láhve T75 (TPP, Švýcarsko) – plastové, sterilní, plocha dna 75 cm²
- kultivační mikrotitrační destičky (TPP, Švýcarsko) – plastové, sterilní, 96-jamkové
- Petriho misky (TPP, Švýcarsko) – plastové, sterilní, dno o průměru 6 cm
- centrifugační zkumavky (TPP, Švýcarsko) – plastové, sterilní, o objemu 15 ml a 50 ml
- mikrozukavky (Eppendorf, Německo) – sterilní, o objemu 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml; 5 ml
- sérologické pipety (TPP, Švýcarsko) – sterilní, plastové, o objemu 1 ml; 2 ml; 5 ml; 10 ml; 25 ml
- pipetovací nástavce Biohit Midi Plus (Biohit, Finsko) a SwiftPet+ (HTL, Polsko)
- automatické pipety (Eppendorf, Německo) – různé rozsahy
- multikanálové pipety elektronické (Biohit, Finsko) – 8 kanálů, 50-1200 μl
- špičky pro pipety (Eppendorf, Německo) – sterilní, plastové, roznoho rozsahu
- Pasteurovy pipety (Brand, Německo) – sterilní, plastové
- vaničky – sterilní, plastové
- laboratorní sklo (Thermo Fisher Scientific, Česká republika) – sterilní
- Bürkerova komůrka (Brand, Německo)
- sklíčka pro mikroskopii – podložní, krycí

8.2 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

- box s laminárním prouděním BioAir TopSafe 1,2 (Euroclone, Itálie)
- buněčný inkubátor (Sanyo, Esco)
- vodní lázeň (Mettler, Německo)

- xenonová lampa (Newport Corporation, USA) – 450W, s vodním a long-pass filtrem Newport OG570
- třepačka mikrotitračních destiček Heidolph Titramax 100 (Heidolph Instruments, Německo)
- čtečka mikrotitračních destiček Tecan Infinite M200 (Tecan Group Ltd., Švýcarsko)
- centrifuga Hermle Z 300
- invertovaný fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Japonsko)
- invertovaný fluorescenční mikroskop Nikon Ti E (Nikon, Japonsko)

8.3 LÁTKY UŽÍVANÉ PŘI KULTIVACI BUNĚK

- kultivační médium DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; Lonza, Belgie) neobsahující fenolovou červeň a L-glutamin
- fetální bovinní sérum FBS (Lonza, Belgie) – tepelně inaktivované
- pufr HEPES (Sigma, Německo)
- roztok P/S (Lonza, Belgie)
- pufr PBS (Phosphate buffered saline; MP Biomedicals, USA)
- roztok trypsinu s EDTA (Lonza, Belgie)

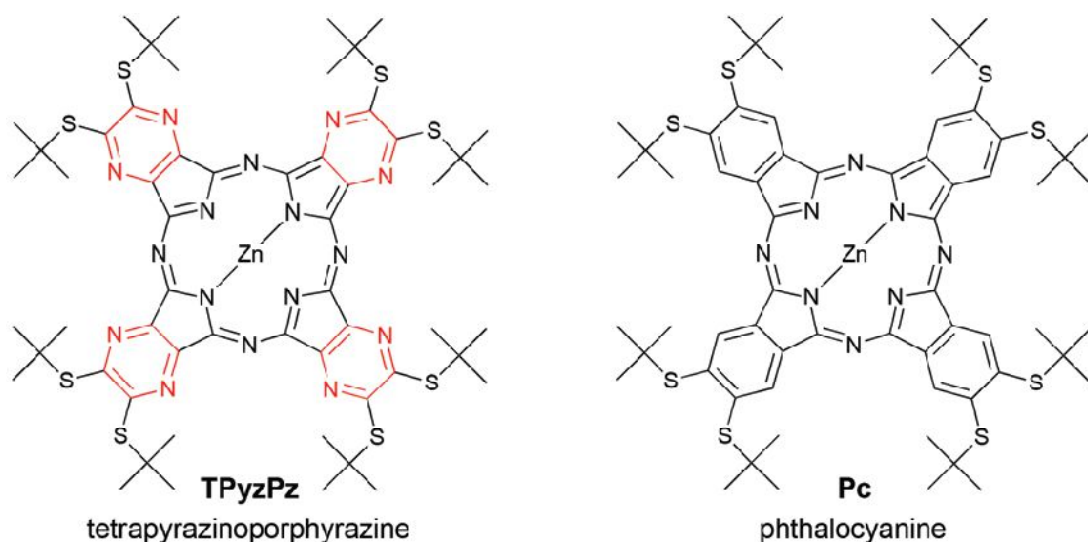
8.4 OSTATNÍ REAGENCIA A CHEMIKÁLIE

- peroxid vodíku (Fluka; Sigma, Německo)
- trypanová modř (Sigma, Německo)
- fixační roztok – hexahydrát chloridu vápenatého (Sigma, Německo) v 0,5% formaldehydu (Penta, Česká republika)
- lyzační roztok pro stanovení neutrální červeně – 1% roztok kyseliny octové (Penta, Česká republika) v 50% roztoku etanolu (Penta, Česká republika)
- neutrální červeň (Sigma, Německo) – zásobní roztok 3,3 mg/ml, pracovní roztok 80 µg/ml
- propidium jodid (Molecular Probes, USA)

- *aqua purificata* (Millipore, USA)
- fotosenzitizéry ftalocyanin P9-0Zn a azaftalocyanin ZIP21Zn (vědecká skupina doc. PharmDr. Petra Zimčíka, Ph.D., Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové)
- Cremophor EL (připraven ve spolupráci s doc. PharmDr. Veronikou Novákovou, Ph.D.)
- liposomy (připraveny ve spolupráci s doc. PharmDr. Veronikou Novákovou, Ph.D.)
- Si nanočástice (Ing. Kamil Lang, CSc., Oddělení materiálové chemie, Ústav anorganické chemie AV ČR)
- KK638A NH₃⁺ modifikované Si nanočástice (Ing. Kamil Lang, CSc.)
- KK638B modifikované Si nanočástice (Ing. Kamil Lang, CSc.)
- DMSO (Sigma, Německo)

8.5 POUŽITÉ FOTSENZITIZÉRY

Jako fotosenzitizéry byly pro všechny experimenty použity látky ze skupiny periferně (β) substituovaných ftalocyaninů a azaftalocyaninů, které byly pro naše účely připraveny na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové vědeckou skupinou doc. PharmDr. Petra Zimčíka, Ph.D. Konkrétně se jednalo o ftalocyanin P9-0Zn (phtalocyanine, Pc) a jeho aza-analog ZIP21Zn (tetrapyrazinoporphyrazine, TpyzPz).



Obrázek 18 Struktury použitých fotosenzitizérů P9-0Zn (vpravo) a ZIP21Zn (vlevo) (Novakova a kol. 2015)

Isosterická záměna aromatického C-H fragmentu za atom dusíku způsobuje posun absorpčního maxima o zhruba 50 nm. Absorpční maximum P9-0Zn dosahuje hodnot 707 nm, zatímco absorpční maximum jeho aza-analogu ZIP21Zn nalezneme při 657 nm. Kvantové výtěžky fluorescence Φ_F se u obou sloučenin pohybují v hodnotách okolo 0,25. Kvantové výtěžky singletového kyslíku Φ_Δ v DMF se nacházejí v hodnotách nad 0,60 a ukazují na vysokou produkci 1O_2 a tedy i vhodnost látek pro jejich použití v rámci PDT. (Novakova a kol. 2015)

Ftalocyanin i jeho aza-analog byly zkoušeny v kombinaci s činidly zabraňující agregaci PS ve vodném prostředí. Jako tyto nosiče jsme použili Cremophor EL, Si nanočástice, modifikované Si nanočástice KK638B a KK638A NH_3^+ , liposomy a DMSO.

Tabulka 3 Základní informace o fotosenzitizérech studovaných v této práci

Fotosenzitizér	Typ jádra	λ_{\max}/nm	Φ_Δ	Φ_F
P9-0Zn	Pc	707	0,63	0,24
ZIP21Zn	AzaPc	657	0,65	0,27

8.6 PŘÍPRAVA LIPOSOMŮ A CREMOHPOHRU EL

Liposomy byly připraveny rozpuštěním 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholinu (DOPC) v chloroformu *p.a.* (0,05 mmol finální koncetrace, 15 ml celkový objem) a odpařeny dosucha ve vakuové odparce. K vysušenému filmu bylo přidáno 250 μ l zásobního roztoku PS v tetrahydrofuranu *p.a.* (200 μ M) a opět odpařeno do sucha (teplota lázně < 35°C, tlak < 10 mbar, 20 min). K filmu DOPC s PS bylo opatrně přidáváno bezsérové médium (SFM). Následovalo důkladné roztřepání na vortexu (2-3 min), hydratace (3-4 h) a opětovné roztřepání vortexem (5 min). Posledním krokem je extruze v extruderu (21 opakování), čímž se získá homogenní suspenze liposomů (25 mM DOPC, 25 μ M PS) o jednotné velikosti.

Prvním krokem přípravy mikroemulze Cremophoru EL bylo rozpuštění 0,5 g MCT a 1,25 g Cremophoru EL v 10 ml chloroformu *p.a.* a zhomogenizování. Následovalo přidání 5 ml roztoku PS (200 μ M v tetrahydrofuranu *p.a.*) a promíchání. Směs se důkladně odpařila na vakuové odparce (40 °C, < 10 mbar, 30 min). Mikroemulze byla připravena přidáním SFM a důkladným promíchání (1 h) na třepačce, dokud nebyl roztok zcela transparentní.

V obou případech byly nosičové systémy v SFM před aplikací smíseny v poměru 1:1 s médiem obsahujícím dvojnásobné množství séra. Monomerní stav a koncentrace PS byly kontrolována fluorimetricky.

Příprava probíhala ve spolupráci s doc. PharmDr. Veronikou Novákovou, Ph.D.

8.7 BUNĚČNÁ LINIE HeLa

Buněčná linie HeLa byla pro experimentální práci získána z Americké banky buněčných kultur (American Type Cell Culture Collection, ATCC, USA). Jedná se o buněčnou linii nádorově transformovaných epitelových buněk původně odebraných v roce 1951 z maligního karcinomu děložního čípku. Dnes mají buňky HeLa velice široké uplatnění a patří k nejčastěji užívaným buněčným modelům v biologickém výzkumu. (Adey a kol. 2013, Landry a kol. 2013)

Výhodou těchto buněk je jejich velice rychlá a v podstatě nepřetržitá proliferace, proto o nich také mluvíme jako o tzv. nesmrtelné buněčné linii. Nevýhodou však

zůstává možná přítomnost provirů např. lidského papilomaviru v genomu, proto je třeba s tímto rizikem při experimentální práci počítat.

8.8 KULTIVAČNÍ MÉDIUM

HeLa buňky byly kultivovány v základním médiu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) s absencí fenolové červeně. K základnímu médiu bylo přidáno 50 ml hiFBS (heat inactivated Fetal bovine serum), 5 ml pufru HEPES o koncentraci 1 M, 5 ml roztoku P/S (Penicilin/Steptomycin) a 10 ml L-glutaminu. Po důkladném promíchání bylo připravené kultivační médium uchováváno v lednici překryté vydezinfikovanou aluminiovou fólií. Takto připravované médium obsahující sérum je označováno jako SCM (serum-containing medium).

8.9 KULTIVACE BUNĚK, PASÁŽOVÁNÍ

Buňky byly kultivovány v kultivačních lahvích s plochou dna 75 cm². Kultivace probíhala v inkubátoru za standardních podmínek (37 °C, 5% CO₂, konstantní humidita). Buňky jsme pravidelně mikroskopicky kontrolovali, abychom se ujistili, že nedochází k jejich abnormálním morfologickým změnám či zda není přítomna kontaminace.

Při dosažení konfluency 80-90%, k čemuž docházelo každý 3. - 4. den inkubace, bylo nutné buňky zpasážovat. Pojem pasážování, tzv. subkultivace, znamená cílené udržování a rozmnožování buněk v podmínkách *in vitro*. Jedná se o opakovaný přenos poměrné části buněk do čerstvého kultivačního média za účelem rozmnožení buněk a zabránění jejich nežádoucím změnám. Poměr buněk a média byl volen na základě aktuálního počtu buněk a poměru předchozí pasáže.

Z původní kultivační láhve jsme odebrali staré médium a buňky jsme dvakrát opláchlí 5 ml předeřátého sterilního PBS. Takto jsme odstranili zbytky séra, které obsahuje trypsin inaktivující složky. Následně byl přidán 1 ml předeřátého roztoku trypsinu s EDTA, který jsme rovnoměrně rozprostřeli po celém dně láhve. Láhev byla uzavřena a umístěna do inkubátoru na dobu max. 5 min. Za tento čas se buňky v přítomnosti trypsinu oddělí ode dna a je možné s nimi dále pracovat. Po překročení

uvedené doby ovšem začíná být trypsin pro buňky toxický, proto je třeba časový interval dodržet. Inaktivace trypsinu byla provedena přidáním 9 ml přehřátého SCM. Následně byly buňky důkladně opláchnuty a resuspendovány opakovaným nasátím a vypuštěním proti dnu láhve. Poměrná část buněčné suspenze byla přenesena do nové kultivační láhve obsahující 15 ml čerstvého přehřátého SCM. Pomocí pipety byly buňky řádně promíchány a následně rovnoměrně rozprostřeny po dnu kultivační láhve. Láhev byla umístěna do inkubátoru, kde byly buňky kultivovány za standardních podmínek do dalšího pasážování.

Zbylou buněčnou suspenzi jsme použili na nasazení buněk pro samotné experimenty.

8.10 POČÍTÁNÍ BUNĚK – STANOVENÍ POČTU ŽIVÝCH BUNĚK

Počet živých buněk byl stanoven mikroskopickou metodou pomocí Bürkerovy komůrky a barvení trypanovou modří.

Do mikrozkušavky o objemu 0,5 ml jsme nepipetovali 100 μ l trypanové modři o koncentraci 0,4%. Následně jsme do téže mikrozkušavky přidali 100 μ l důkladně resuspendované buněčné suspenze, pocházející z výše popsaného pasážování, a pomocí mikropipety dobře promíchali. Buňky byly inkubovány spolu s barvivem při laboratorní teplotě po dobu zhruba 5 min. Poté byla suspenze opět promíchána a nanášena na Bürkerovu komůrku, 10 μ l na každou polovinu. Pod mikroskopem byly počítány neobarvené buňky.

Trypanová modř je barvivo, které dobře prochází přes plazmatickou membránu buněk. Mrtvé buňky nejsou schopny toto barvivo opět vypuzovat z nitra ven a zůstávají obarvené. Naproti tomu buňky živé si zachovávají schopnost barvivo extracelulárně transportovat a v mikroskopu se jeví jako světlé útvary na lehce modrém pozadí. Buňky byly počítány pod mikroskopem při desetinásobném zvětšení a to v pěti čtvercích každé poloviny Bürkerovy komůrky. Výsledný počet buněk byl přepočítán na 1 ml suspenze.

8.11 NASAZOVÁNÍ BUNĚK NA EXPERIMENTY

Aby byly zachovány maximálně shodné podmínky a byla tak zajištěna reprodukovatelnost výsledků, bylo nezbytné pro daný pokus použít vždy stejný počet buněk a stejné kultivační nádoby. Pro cytotoxicitní experimenty byla připravena suspenze buněk o koncentraci $100 \cdot 10^3$ buněk/ml. Tuto koncentraci jsme získali po naředění suspenze, která zbyla po pasážování, předeřátým kultivačním médiem. Takto připravenou suspenzi jsme nanесли pomocí multikanálové automatické pipety na 96-jamkové destičky po 100 μ l do každé jamky. Každá jamka tak obsahovala přibližně 10 000 buněk. Destičku jsme nechali inkubovat v inkubátoru při 37 °C, 5% CO₂ a za konstantní humidity po dobu 24 hodin.

8.12 PŘIDÁNÍ STUDOVANÝCH LÁTEK

Po 24 hodinách byly k buněčné suspenzi přidány studované látky. Jeden sloupec sloužil jako tzv. blank – negativní kontrola. K buňkám v tomto sloupci byla přidána letální dávka roztoku peroxidu vodíku (200 μ M). Kontrolním buňkám bylo vyměněno médium za čerstvé.

Studovanými látkami byly ftalocyanin P9-0Zn a jeho aza-analog ZIP21Zn v nosičovém systému. Z jejich zásobních roztoků v kultivačním médiu byla připravena koncentrační řada roztoků o koncentraci 0,01-50%. K ředění zásobních roztoků bylo využito předeřáté SCM. Současně byly studovány také čisté nosičové systémy. Buňkám bylo odebráno staré médium a následně nahrazeno 100 μ l pracovních roztoků o dané koncentraci.

Jelikož ftalocyaniny patří mezi látky citlivé na světlo (princip jejich cytotoxického účinku), práce s nimi musela probíhat za tmy či minimálního osvětlení, aby se zabránilo jejich předčasné aktivaci. Ze stejného důvodu byly destičky před vložením do inkubátoru obaleny hliníkovou fólií. Inkubace se studovanými látkami před ozářením aktivujícím světlem trvala 12 hodin.

8.13 AKTIVACE FOTOSENZITIZÉRŮ

Po 12 h inkubaci se studovanými látkami byly buňky opláchnuty SCM a 100 μl čerstvého média bylo přidáno. Fototoxicita byla následně indukována ozařením buněk červenou částí viditelného světla ($\lambda > 570 \text{ nm}$; $12,4 \text{ mWcm}^{-2}$; $11,2 \text{ J cm}^{-2}$). Zdrojem tohoto světla byla 450 W xenonová lampa osazená long-pass a vodním filtrem k odfiltrování nežádoucích vlnových délek. Ozáření probíhalo po dobu 15 min. Poté byly buňky přemístěny do inkubátoru na 24 hodin a následně vyhodnocena jejich viabilita pomocí testu vychytávání neutrální červeně.

8.14 STANOVENÍ ŽIVOTASCHOPNOSTI BUNĚK ZA VYUŽITÍ TESTU VYCHYTÁVÁNÍ NEUTRÁLNÍ ČERVENĚ

Neutrální červeň (NR, neutral red) je supravitální, slabě kationické barvivo, které je schopné difundovat v nenabité formě přes buněčnou membránu a akumulovat se v lysozomech. Vychytávání NR závisí na schopnosti buňky udržovat pH gradient prostřednictvím syntézy ATP. V živých buňkách je lysozomální pH kyselější než pH cytoplazmy. Barvivo je v tomto kyselém prostředí protonizováno a v důsledku toho nemůže difundovat zpět do cytosolu a zůstává uvnitř lysozomů. Pokud je však membrána lysozomů poškozena, dochází k narušení pH gradientu a barvivo se snadno vymývá. Počet živých buněk lze proto stanovit na základě přímé úměry k množství zadržovaného barviva. (Repetto a kol. 2008)

K buňkám bylo přidáno 100 μl pracovního roztoku NR v médiu o koncentraci 80 $\mu\text{g/ml}$ a buňky s NR byly inkubovány v CO_2 inkubátoru 2 h. Následně bylo médium odstraněno a nahrazeno 100 μl fixačního roztoku (1% CaCl_2 v 0,5% formaldehydu). Fixace probíhala při laboratorní teplotě 15 min. Poté byly buňky dvakrát opláchnuty 100 μl PBS. Následně byl k buňkám napipetován lyzační roztok (1% roztok kys. octové v 50% roztoku etanolu), 200 μl do každé jamky. Destičky byly umístěny na deskovou třepačku a po dobu 30 min byly lyzovány při laboratorní teplotě.

Vyhodnocení experimentu bylo provedeno spektrofotometricky za využití čtečky mikrotitračních destiček TECAN Infinite 200M. Byla měřena absorbance při 540 nm a životaschopnost buněk byla vyjádřena jako procenta kontroly.

8.15 UPTAKE BUNĚK

Uptake buněk je experiment umožňující stanovit časový profil akumulace testované látky uvnitř buňky. V našem případě byla studovanou látkou ftalocyanin P9-0Zn v Cremophoru EL. Buněčná suspenze byla nanášena na Petriho misky o průměru 6 cm, na každou misku 5 ml suspenze ve finální koncentraci $4,5 \times 10^4$ buněk na misku a nechaly se 24 h růst. V časových intervalech 12; 8; 6; 4; 2; 1; 0,5 a 0 h před ukončením experimentu jsme k buňkám nanasly studovanou látku ve finální koncentraci 0,1 obj. % (poslední netoxická koncentrace). Následně byly buňky třikrát opláchnuty 5 ml předeřátého PBS a ihned bylo přidáno 5 ml předeřátého média. Buňky byly ze dna misek seškrábány, přeneseny do centrifugačních zkumavek o objemu 15 ml a stočeny na cetrifuze (5 min, $70 \times g$). Supernatant byl odstraněn, nahrazen 2 ml čerstvého média a peleta buněk byla opatrně resuspendován a znovu zcentrifugována. Médium ve zkumavce jsme odsáli a přidali 0,5 ml DMF. Vzorky byly poté lyzovány přes noc při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, rozeřátý na pokojovou teplotu, nanaseny na černou 96-jamkovou destičku s transparentním dnem a pomocí čtečky mikrotitračních destiček byla změřena fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 364\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 709\text{ nm}$).

8.16 VYHODNOCENÍ DAT

Výsledky měření byly zpracovány pomocí programu Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, USA). Grafické a statistické zpracování pak probíhalo pomocí softwaru GraphPad Prism v.6.04 (GraphPad Software, USA). Bylo využito jednofaktorové analýzy rozptylu (one-way ANOVA) s Bonferroniho *post hoc* metodou. Výsledky byly brány jako statisticky významné, pokud $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ a $***p < 0.001$. Data jsou vyjádřeny jako procenta neovlivněné kontroly a variabilita výsledků znázorněna jako směrodatná odchylka. Všechny experimenty byly provedeny minimálně ve třech opakováních ($n \geq 3$).

8.17 FOTOGRAFICKÁ DOKUMENTACE

Pomocí fotografické dokumentace byly zaznamenány morfologické změny buněk a subcelulární lokalizace PS, která je zásadní pro určení typu buněčné smrti indukované PDT. Hodnocení je založeno na vlastní fluorescenci PS, která je detekována fluorescenčním mikroskopem.

Vizualizace jednotlivých buněčných kompartmentů (jádra, mitochondrie, lysozomy) byla provedena pomocí specifických sond. Pro fotografickou dokumentaci byl použit invertovaný epifluorescenční mikroskop Nikon TiE (Nikon, Japonsko) s chlazenou sCMOS kamerou Andor Zyla 5.5 (Andor Technology, Spojené Království).

Pro tyto experimenty byly nasazeny buňky na Petriho misky vhodné pro konfokální mikroskopii (WillCo Wells, Nizozemí) a inkubovány s P9-0Zn v Cremophoru EL či Si nanočásticích. Po 24 hodinách od nasazení bylo buňkám vyměněno médium a následně byly ozařovány Xe lampou po dobu 15 min. Ozařování bylo uplatněno pouze pro posouzení morfologických změn buněk vyvolaných fotodynamickou aktivitou PS. Buňky byly dvakrát opláchnuty přehřátým PBS, poté byly přidány 2 ml čerstvého bezsérového média s požadovanými fluorescenčními sondami.

8.17.1 Fluorescenční barvení jader

Pro vizualizaci jader buněk byla použita fluorescenční sonda Hoechst 33342 (2 $\mu\text{g/ml}$) v kombinaci s propidium jodidem (PI; 0,5 $\mu\text{g/ml}$).

PI je červené fluorescenční barvivo vázající se na DNA/RNA interkalací mezi bázemi. Za normálních podmínek se nachází mimo buňky, jelikož neprochází přes neporušené membrány. Pokud však dojde k poškození buněčné/jaderné membrány, PI snadno proniká do buňky a jádra. Tohoto jevu se používá k identifikaci buněk ve fázi pozdní apoptózy a nekrózy.

Hoechst 33342 je modrá fluorescenční sonda, která je schopná procházet membránami a barvit tak nukleové kyseliny všech buněk. Toto barvivo je velmi citlivé ke konformaci DNA a chromatinu v buňkách a lze jej proto použít k identifikaci buněk podstupující různé fáze apoptózy.

8.17.2 Fluorescenční barvení mitochondrií

Pro zobrazení mitochondrií při fotografické dokumentaci byla použita fluorescenční sonda MitoTracker Green (2 μM), která se koncentruje v aktivních mitochondriích a vykazuje zelenou fluorescenci nezávislou na membránovém potenciálu. Z tohoto důvodu se hodí ke studiu mitochondriální morfologie.

8.17.3 Fluorescenční barvení lysozomů

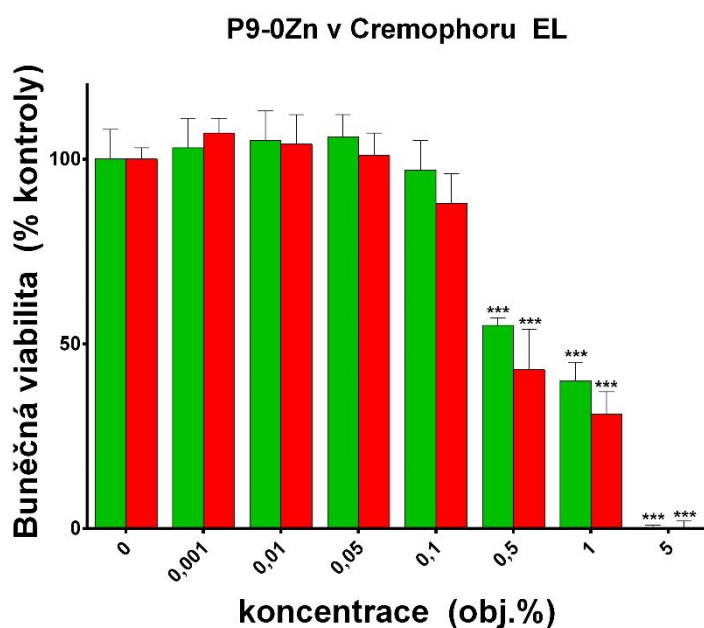
Pro fluorescenční zviditelnění lysozomů jsme použili sondu LysoTracker Blue (2 μM). Jedná se o modré fluorescenční barvivo, které se vychytává v subcelulárních kompartmentech s nízkou hodnotou pH. Mezi takové organely patří právě lysozomy.

9 VÝSLEDKY

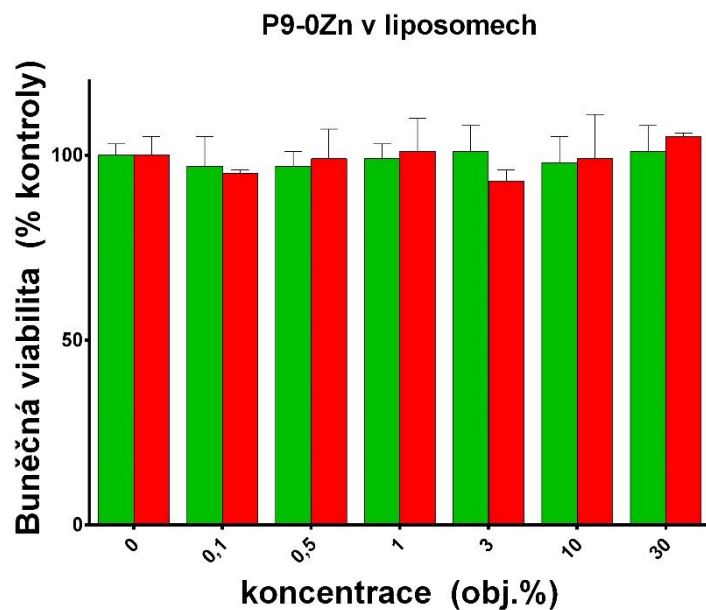
9.1 CYTOTOXICITNÍ EXPERIMENTY

9.1.1 Ftalocyanin P9-0Zn

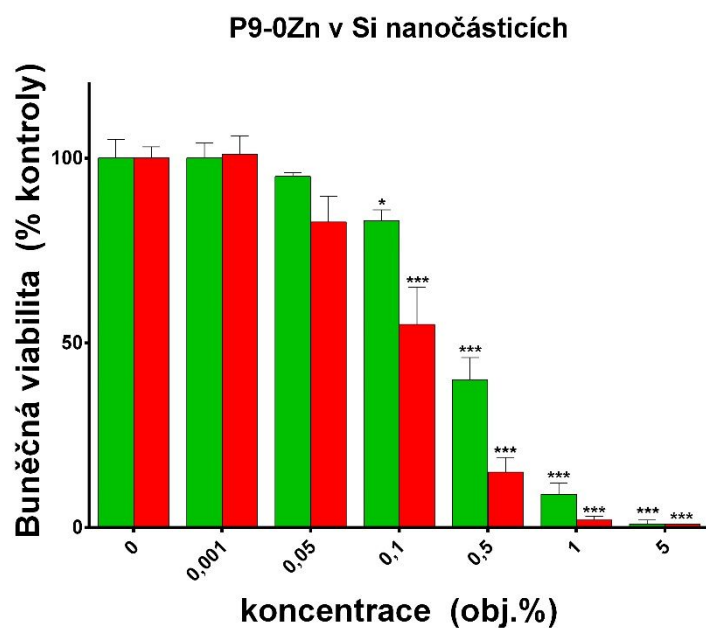
Účinek látky po aktivaci světlem byl sledován na buněčné linii HeLa ve škále různých koncentrací PS. Při hodnocení fototoxicity byl ftalocyanin P9-0Zn postupně kombinován se třemi různými, potenciálně vhodnými nosičovými systémy: Cremophor EL (Obr. 19), liposomy (Obr. 20) a Si nanočástice (Obr. 21). Výsledky byly zpracovány graficky, přičemž v jednotlivých grafech je zelenou barvou označen vždy prázdný nosičový systém, vlastní látka je znázorněna červeně.



Obrázek 19 Viabilita buněk HeLa vystavených rostoucí koncentraci ftalocyaninu P9-0Zn na nosiči Cremophor EL (červená) a prázdnému nosičovému systému (zelená) v přítomnosti aktivujícího záření. Experiment byl proveden v pěti opakováních, každý v kvadruplikátu; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ a *** $p < 0.001$.



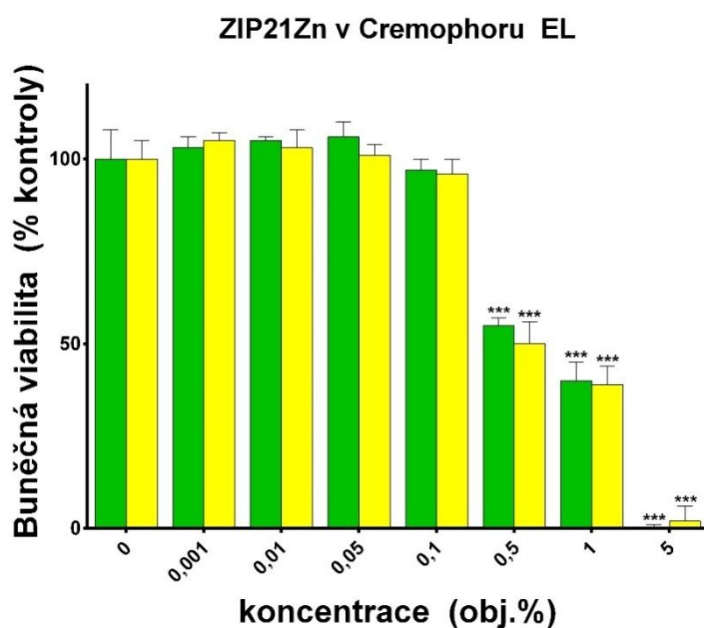
Obrázek 20 Viabilita buněk HeLa vystavených rostoucí koncentraci ftalocyaninu P9-0Zn v kombinaci s liposomy (červená) a prázdnému nosičovému systému (zelená) v přítomnosti aktivujícího záření. Experiment byl proveden ve třech opakováních, každý v kvadruplikátu; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ a *** $p < 0.001$.



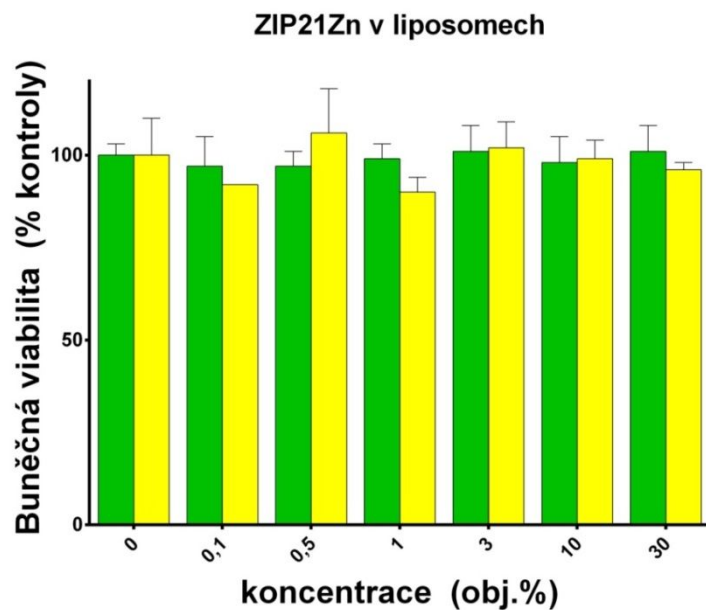
Obrázek 21 Viabilita buněk HeLa vystavených rostoucí koncentraci ftalocyaninu P9-0Zn v Si nanočásticích (červená) a prázdnému nosičovému systému (zelená) za přítomnosti aktivujícího záření. Experiment byl proveden ve čtyřech opakováních, každý v kvadruplikátu; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ a *** $p < 0.001$.

9.1.2 Azaftalocyanin ZIP21Zn

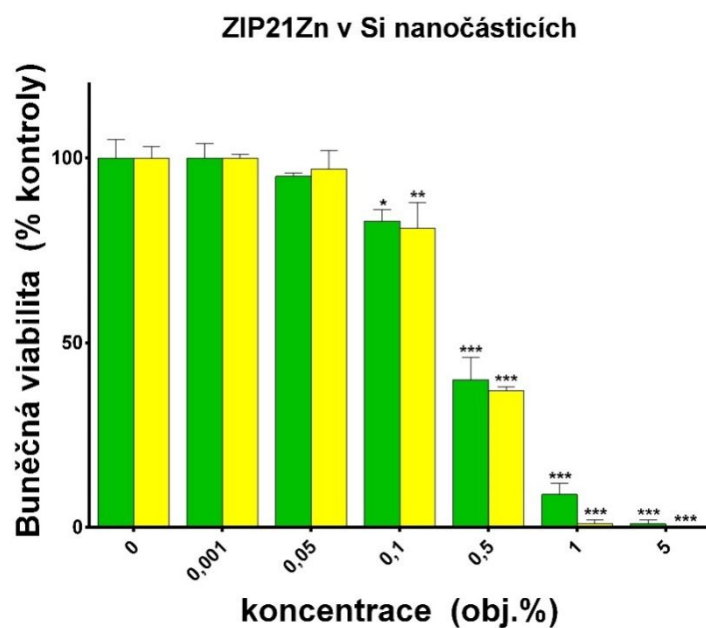
Účinek azaftalocyaninu ZIP21Zn po aktivaci světlem byl taktéž sledován na buněčné linii HeLa v různých koncentracích látky. AzaPc byl v tomto hodnocení kombinován s následujícími nosičovými systémy: Cremophor EL (Obr. 22), liposomy (Obr. 23), Si nanočástice (Obr. 24) a modifikované Si nanočástice KK638B (Obr. 25) a KK638A NH₃⁺ (Obr. 26). Výsledky byly zpracovány do grafů, ve kterých zelená barva zastupuje samotný nosičový systém, žlutou barvou je vyjádřen sledovaný PS.



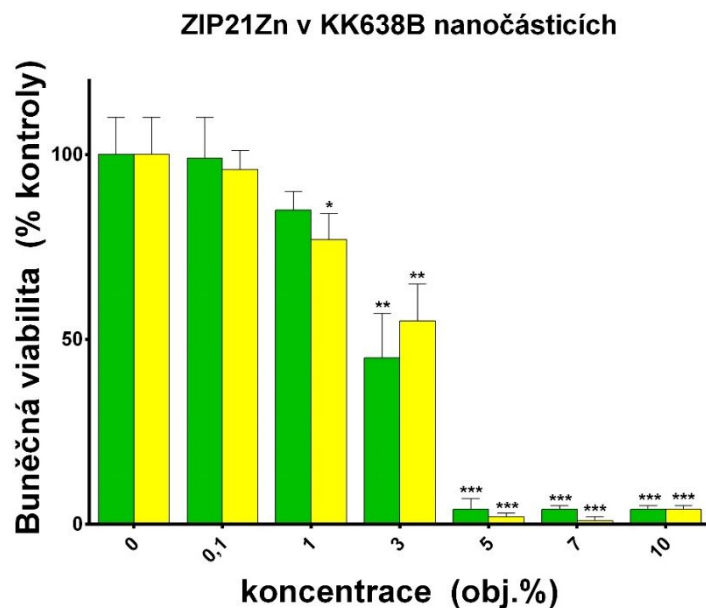
Obrázek 22 Viabilita buněk HeLa vystavených rostoucí koncentraci azaftalocyaninu ZIP21Zn v Cremophoru EL (žlutá) nebo čistému nosičovému systému (zelená) za přítomnosti aktivujícího záření. Experiment byl proveden v pěti opakováních, každý v kvadruplikátu; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ a *** $p < 0.001$.



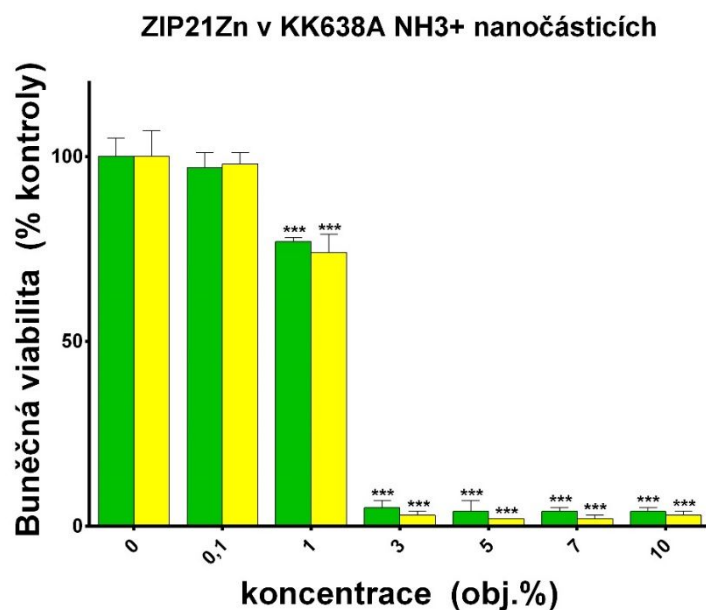
Obrázek 23 Viabilita buněk HeLa vystavených rostoucí koncentraci azaftalocyaninu ZIP21Zn v liposomech (žlutá) nebo čistému nosičovému systému (zelená) za přítomnosti aktivujícího záření. Experiment byl proveden ve třech opakováních, každý v kvadruplikátu; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ a *** $p < 0.001$.



Obrázek 24 Viabilita buněk HeLa vystavených rostoucí koncentraci azaftalocyaninu ZIP21Zn v kombinaci s nosičem v podobě Si nanočástic (žlutá) nebo čistému nosičovému systému (zelená) za přítomnosti aktivujícího záření. Experiment byl proveden ve čtyřech opakováních, každý v kvadruplikátu; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ a *** $p < 0.001$.



Obrázek 25 Viabilita buněk HeLa vystavených rostoucí koncentraci azaftalocyaninu ZIP21Zn v KK638B nanočásticích za přítomnosti aktivujícího záření (žlutá) nebo bez přítomnosti světla (zelená). Experiment byl proveden ve dvou opakováních, každý v kvadruplikátu; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ a *** $p < 0.001$.



Obrázek 26 Viabilita buněk HeLa vystavených rostoucí koncentraci azaftalocyaninu ZIP21Zn v KK638A NH₃⁺ nanočásticích za přítomnosti aktivujícího záření (žlutá) nebo bez přítomnosti světla (zelená). Experiment byl proveden ve dvou opakováních, každý v kvadruplikátu; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ a *** $p < 0.001$.

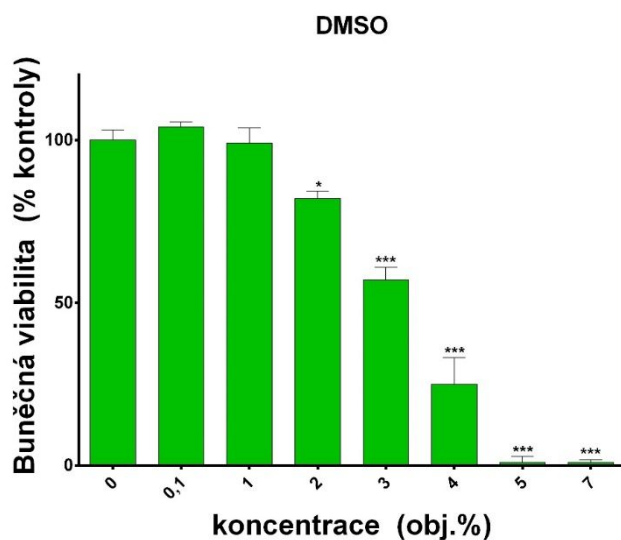
9.1.3 Porovnání cytotoxického působení studovaných fotosensitizerů a jejich nosičových systémů

Po zpracování experimentálně získaných výsledků bylo možné vyhodnotit, že cytotoxické působení P9-0Zn se jeví jako výhodnější. Důkazem toho je postupně klesající viabilita buněk HeLa se zvyšující se objemovou koncentrací PS oproti skupině neobsahující PS, který byl aktivován světlem vhodné vlnové délky. ZIP21Zn v porovnání s P9-0Zn vyžaduje vyšší koncentrace, aby mohl v přítomnosti aktivujícího záření působit jako cytotoxické agens. P9-0Zn však oproti ZIP21Zn prokázal schopnost poškozovat buňky po ozáření – především v Si nanočásticích (Obr. 21). Bohužel se tato aktivita projevila až v koncentracích, kdy se již výrazně projevila i toxicita nosičových systémů.

Při porovnání jednotlivých nosičových systémů je zřejmé, že liposomy jsou z hlediska cytotoxicity nejvhodnější. Viabilita buněk zůstává i při zvyšující se objemové koncentraci nosiče téměř nezměněna. Bohužel se ale neprojevily cytotoxické vlastnosti studovaného PS, který byl spolu s tímto nosičem aplikován na buňky a aktivován světlem příslušné vlnové délky (Obr. 20 a Obr. 23), což je dáno nízkou koncentrací PS v nosičovém systému. Ostatní nosičové systémy (Cremophor EL, Si nanočástice, KK638B nanočástice a KK638A NH_3^+ nanočástice) jsou v porovnání s liposomy výrazně toxičtější.

9.1.4 DMSO

Toxicita vyvolaná aktivujícím zářením byla hodnocena rovněž pro nosič DMSO v různých koncentracích látky. Účinky DMSO byly sledovány opět na buněčné linii HeLa a výsledky byly graficky zpracovány (Obr. 27).



Obrázek 27 Viabilita buněk HeLa vystavených rostoucí koncentraci látky DMSO za přítomnosti aktivujícího záření. Experiment byl proveden v pěti opakováních, každý v kvadruplikátu; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ a *** $p < 0.001$.

Z grafického zpracování výsledků je patrný velký nárůst toxicity látky nad 1 obj. %. Tato hodnota je limitní koncentrací DMSO, kterou by teoreticky bylo ještě možné použít za účelem solubilizačního činidla pro bezpečnou aplikaci PS v našem experimentálním uspořádání. V praxi se ale ukázalo, že i v nízkých koncentracích použitého PS, který je v DMSO rozpustný, dochází po smísení s vodnými rozotky (včetně SFM a SCM) k vykrystalizování studované látky, a tudíž plné ztráty její účinnosti. Další experimenty proto nebylo možné provést.

9.2 FOTOGRAFICKÁ DOKUMENTACE

Veškerá fotografická dokumentace probíhala za použití buněčné linie HeLa a P9-0Zn. PS byl pro tyto účely hodnocen v kombinaci se dvěma typy nosičů v podobě Cremophoru EL a Si nanočástic. Kontrolními buňkami jsou buňky, ke kterým nebyl přidán PS. Všechny fotografie byly pořízeny invertovaným epifluorescenčním mikroskopem Nikon TiE.

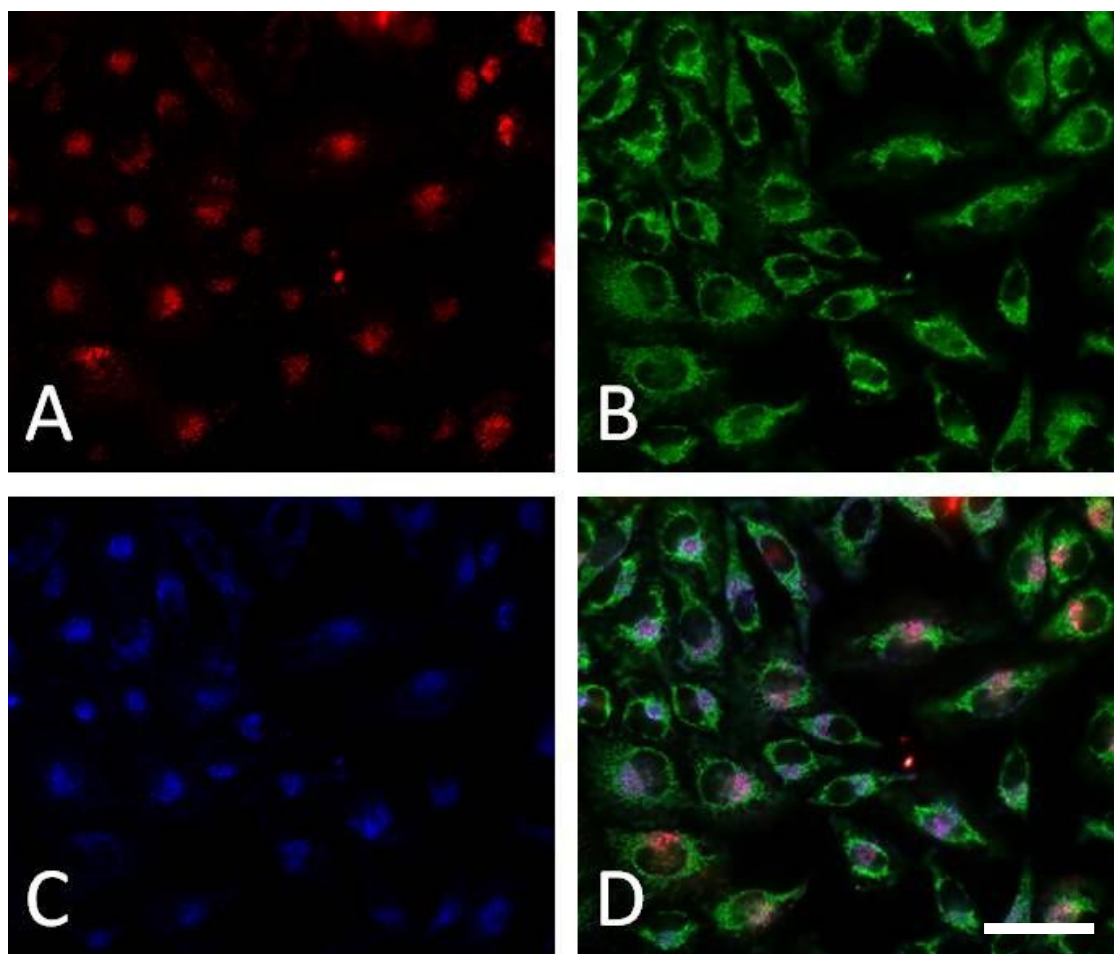
9.2.1 Subcelulární lokalizace

Pro hodnocení subcelulární lokalizace P9-0Zn byla použita sonda MitoTracker Green (zelené fluorescenční barvení mitochondrií, fluorescenční filtry pro kanál FITC) a sonda LysoTracker Blue (modré fluorescenční barvení lysozomů, fluorescenční filtry pro kanál DAPI). Vizualizace P9-0Zn je založena na vlastní fluorescenci PS, kterou lze pozorovat fluorescenčním mikroskopem s použitím filtrů pro kanál Cy5. Subcelulární lokalizace byla hodnocena za postupného použití dvou typů nosičů PS - Cremophor EL (Obr. 28) a Si nanočástice (Obr. 29).

Na snímcích označených písmenem A můžeme pozorovat strukturu lysozomů, která je viditelná díky červenému signálu hodnoceného PS. Jedná se o bodovitou fluorescenci především v oblasti okolo jádra, jak je patrné na snímku D. Mitochondrie jsou zobrazeny na snímcích B. Zelený signál fluorescenční sondy umožňuje identifikovat charakteristický tvar mitochondrií, který je vřetenovitý až vláknitý. Snímky C poskytují vizualizaci lysozomů. Signál této fluorescenční sondy je bodovitého charakteru a je kolokalizován se signálem PS. Překryv fluorescenčních kanálů je zobrazen na snímku D.

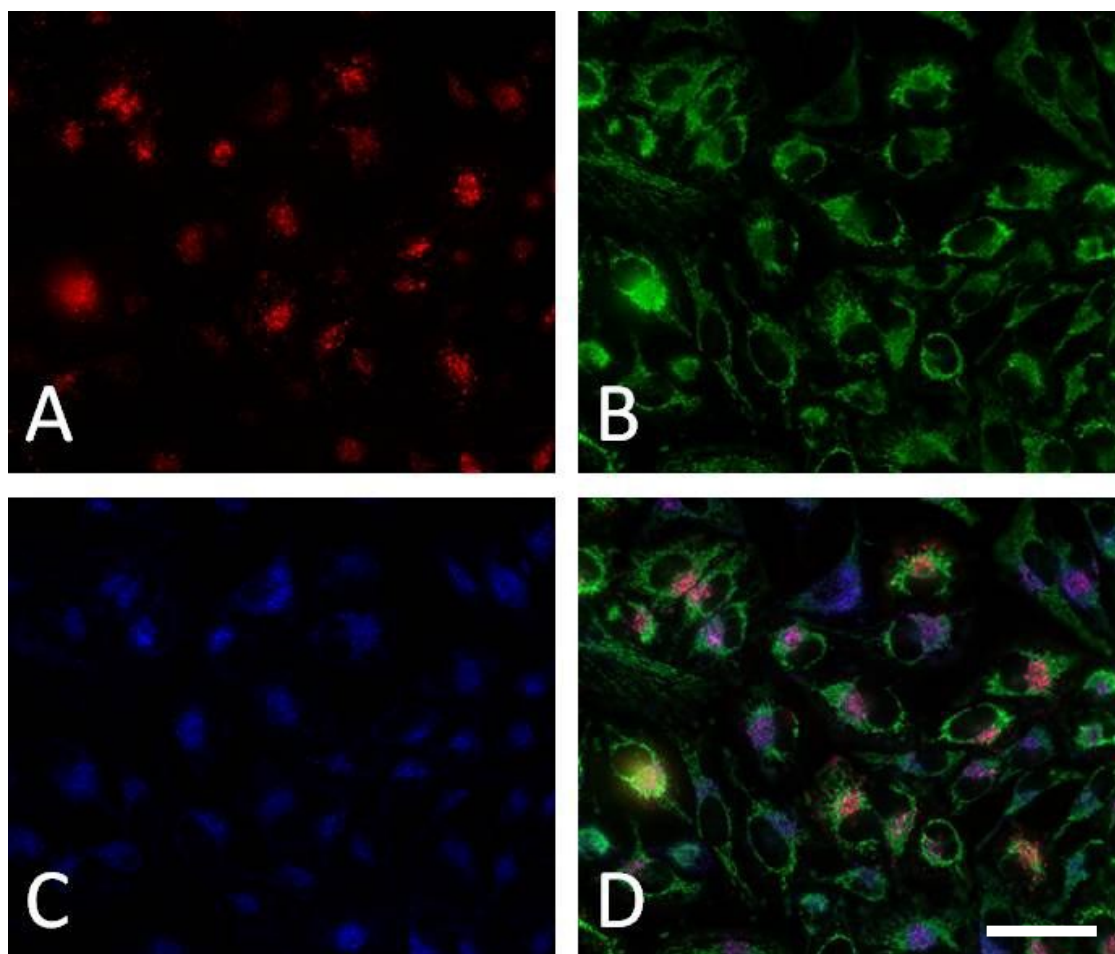
Z pořízených mikrofotografií je patrné, že červený fluorescenční signál PS se překrývá téměř exkluzivně pouze se signálem fluorescenční sondy značící lysozomy. P9-0Zn je tedy lokalizován převážně v lysozomech, resp. v endolysozomálním kompartmentu.

P9-0Zn + Cremophor EL



Obrázek 28 Subcelulární lokalizace P9-0Zn v Cremophor EL na buněčné linii HeLa vizualizovaná fluorescenční mikroskopií po inkubaci se specifickými sondami. A) P9-0Zn, B) MitoTracker Green, C) LysoTracker Blue, D) překryv signálů. Měřítko odpovídá 100 μ m.

P9-0Zn + Si nanočástice



Obrázek 29 Subcelulární lokalizace P9-0Zn + Si nanočástice na buněčné linii HeLa vizualizovaná fluorescenční mikroskopií po inkubaci se specifickými sondami. A) P9-0Zn, B) MitoTracker Green, C) LysoTracker Blue, D) překryv signálů. Měřítko odpovídá 100 μm .

9.2.2 Morfologické změny buněk vyvolané PDT

Morfologické změny buněk, ke kterým dochází v důsledku aktivace P9-0Zn, byly sledovány v diferenciálním interferenčním kontrastu (DIC) a za použití fluorescenční mikroskopie.

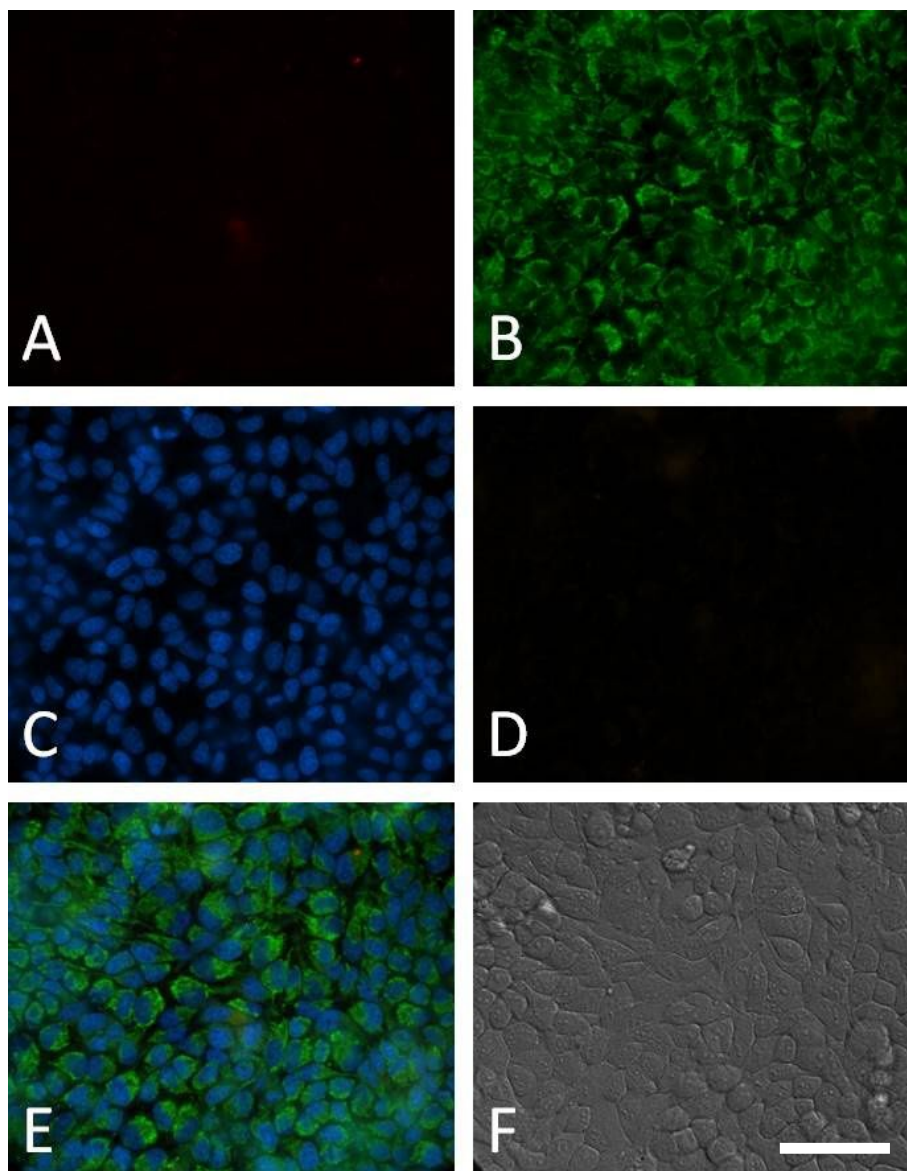
Pro zobrazení jaderných změn byla použita fluorescenční sonda Hoechst 33342 (kanál DAPI) spolu s PI (kanál Cy3). Kontrolní buňky jsou zbarveny pouze modře fluorescenční sondou Hoechst 33342, která proniká i nepoškozenými buněčnými membránami a barví jádra všech buněk. Jedná se tedy o buňky, jejichž životaschopnost nebyla ovlivněna.

Pro zobrazení mitochondrií byla použita fluorescenční sonda MitoTracker Green (kanál FITC), která vykazuje zelenou fluorescenci v různé míře u aktivních i poškozených mitochondrií.

Při použití DIC lze na snímcích pozorovat změnu tvaru buněk, která souvisí s buněčným stresem a poškozením cytoskeletu a buněčné membrány. Živé buňky jsou převážně vřetenovitého tvaru (kontrolní buňky), vlivem PDT dochází k zaoblení buněk s možnou tvorbou morfologických alterací, které jsou důsledkem probíhající buněčné smrti.

Kontrolní buňky

Kontrolními buňkami jsou životaschopné buňky, jejichž přirozenou strukturu neovlivněnou vnějším zásahem můžeme sledovat na Obr. 30. Na snímku A není viditelná žádná intracelulární struktura, jelikož k buňkám nebyl přidán PS, jehož přítomnost by způsobila vizualizaci endolyzozomálního systému. Zelená fluorescence na snímku B poskytuje informace o struktuře mitochondrií, která je typicky vřetenovitá až vláknitá. Nepoškozené mitochondrie mají protáhlý, vřetenovitý tvar. Jádra, která jsou na snímku C obarvena pomocí modré fluorescenční sondy, jsou celistvá, bez známek změn ve struktuře chromatinu. Protože membrána nepoškozených jader není prostupná pro PI, na snímku D není viditelný oranžový signál PI. Na snímku E můžeme pozorovat prolínání všech barevných signálů. Snímek F je záznamem DIC, který dokládá přirozený tvar buněk.

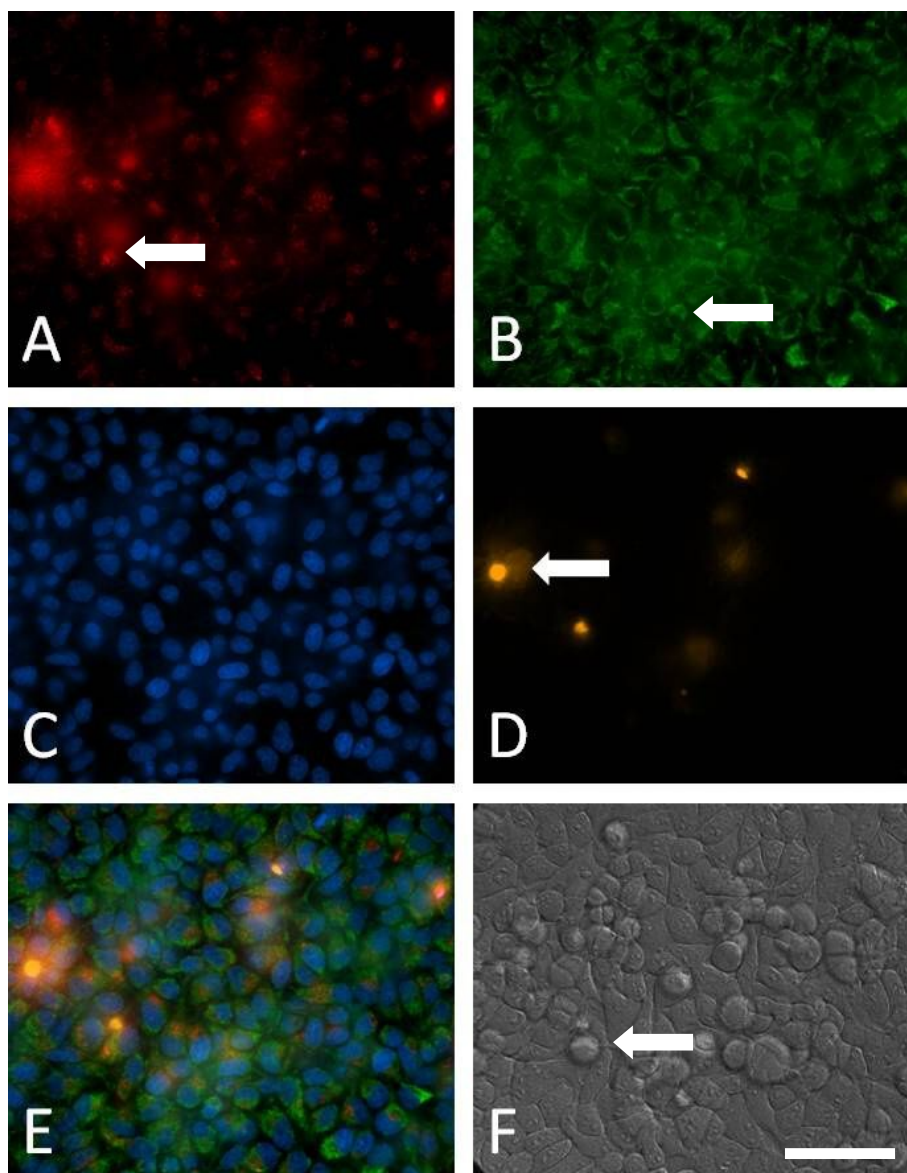


Obrázek 30 Kontrolní buňky HeLa. A) Fluorescenční kanál Cy5, B) MitoTracker Green, C) Hoechst 33342, D) Propidium jodid, E) překryv fluorescenčních signálů, F) DIC. Měřítka odpovídá 200 μm .

P9-0Zn v Cremophor EL

Morfologické změny buněk po aktivaci PS v kombinaci s Cremophorem EL popisují jednotlivé snímky na Obr. 31. Na snímku A pozorujeme vlastní fluorescenci PS, která je blíže popsána v kapitole 9.2.1 Subcelulární lokalizace. Mitochondrie (B) ztrácí svou vláknitou strukturu, zkracují se. Modrá fluorescence jader (C) se příliš neliší od fluorescence kontrolních buněk, avšak snímek D poskytuje důkaz o poškození jaderné membrány průnikem PI do jádra, ve kterém se barvivo vmezeřuje (interkaluje)

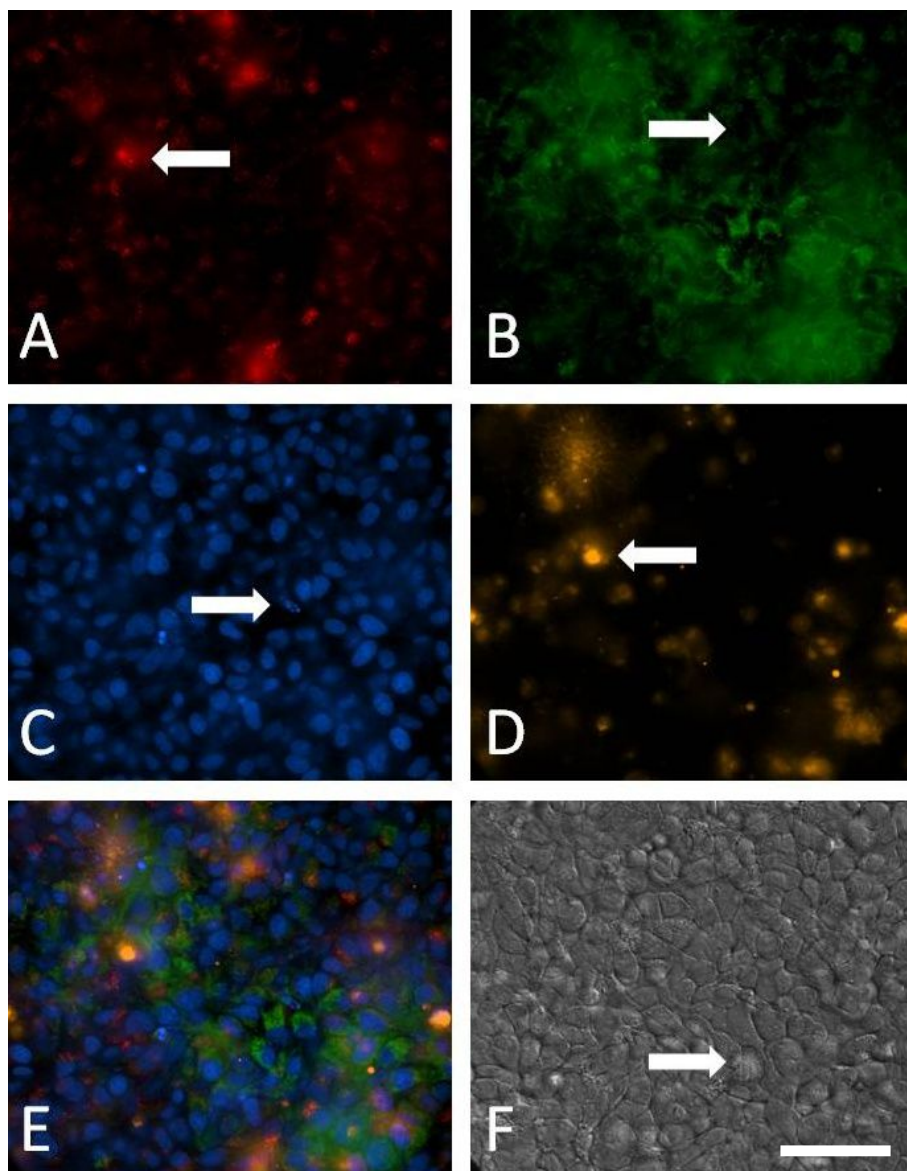
do DNA. Jednotlivé barevné signály se překrývají na snímku E. DIC (F) dokládá, že během PDT dochází ke změně tvaru buněk – velká část je zaoblená.



Obrázek 31 Morfologické změny buněk HeLa po aktivaci P9-0Zn v nosičovém systému Cremophor EL. A) P9-0Zn + Cremophor EL (Cy5), B) MitoTracker Green (FITC), C) Hoechst 33342 (DAPI), D) Propidium jodid (Cy3), E) překryv signálů, F) DIC. Šípkami jsou vyznačeny změny popsané v textu. Měřítko odpovídá 200 μm .

P9-0Zn v Si nanočástice

Aktivovaný PS v nosiči v podobě Si nanočástic vyvolává morfologické změny buněk, které lze pozorovat na Obr. 32. Vlastní fluorescence PS je zaznamenána na snímku A. Změna tvaru a struktury mitochondrií je zachycena na snímku B – dochází ke ztrátě typické vláknité struktury. Modré fluorescenční barvení (C) poskytuje důkaz o probíhajících jaderných změnách. Na tomto snímku je zachycena karyorhexe (fragmentace jádra) a jeho rozpad. Poškození jaderné membrány je doloženo průnikem PI a oranžovým barvením jádra (D). Na snímku E jsou pomocí DIC zobrazeny změny tvaru buněk, které se v průběhu PDT zakulacují.



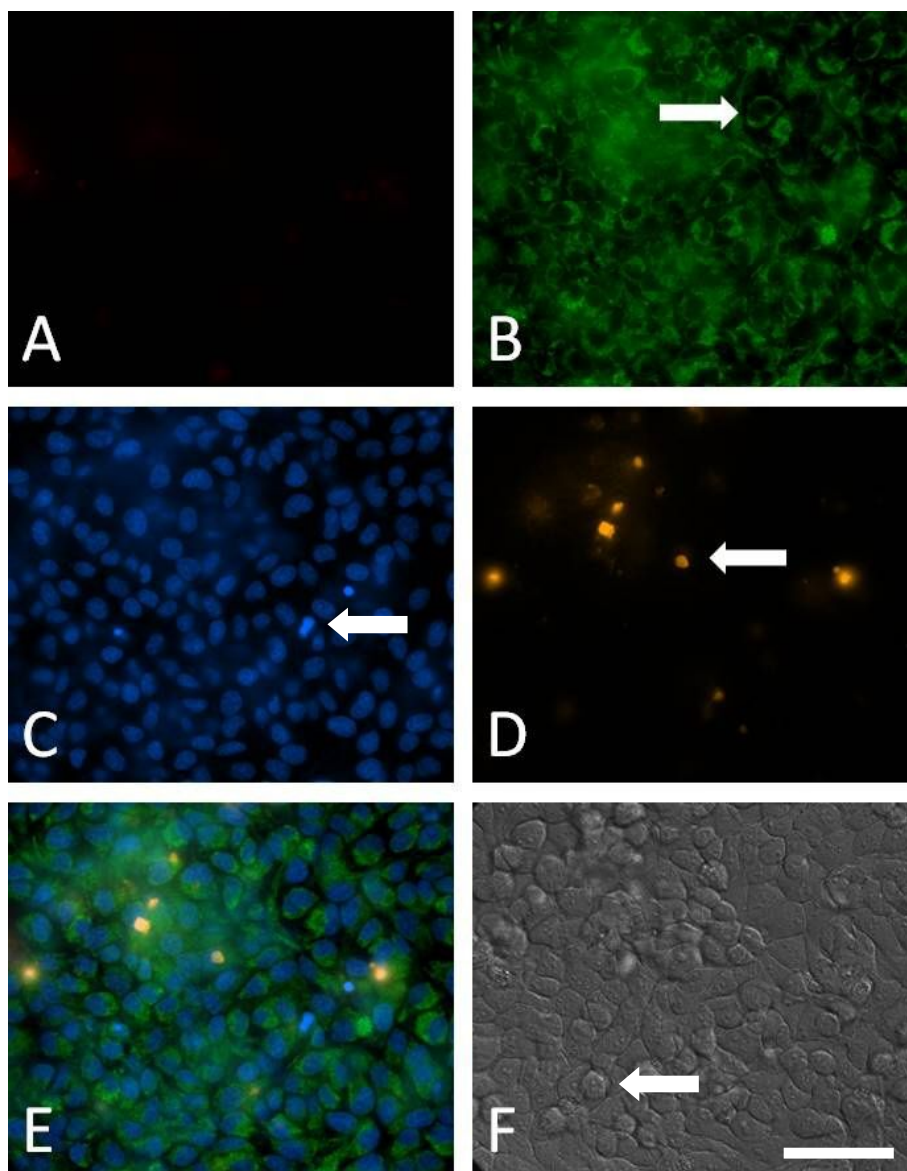
Obrázek 32 Morfologické změny buněk HeLa po aktivaci P9-0Zn v nosičovém systému v podobě Si nanočástic. A) P9-0Zn + Si nanočástice (Cy5), B) MitoTracker Green (FITC), C) Hoechst 33342 (DAPI), D) Propidium jodid (Cy3), E) překryv fluorescenčních signálů F) DIC. Šipky poukazují na důležité změny, které jsou blíže popsány v textu. Měřítka odpovídá 200 μm .

Cremophor EL

Sledovány byly také morfologické změny působením samotného nosiče Cremophor EL ve stejné koncentraci, v jakém byl nanášen spolu s PS. Tyto změny jsou viditelné na Obr. 33.

Snímek A zůstává bez fluorescenčního signálu v důsledku nepřítomnosti PS. Viditelné změny jsou zachyceny na zeleně značených mitochondriích (B) – opět se zde projevila změna tvaru (ztráta typické vláknité struktury). Modrá fluorescence

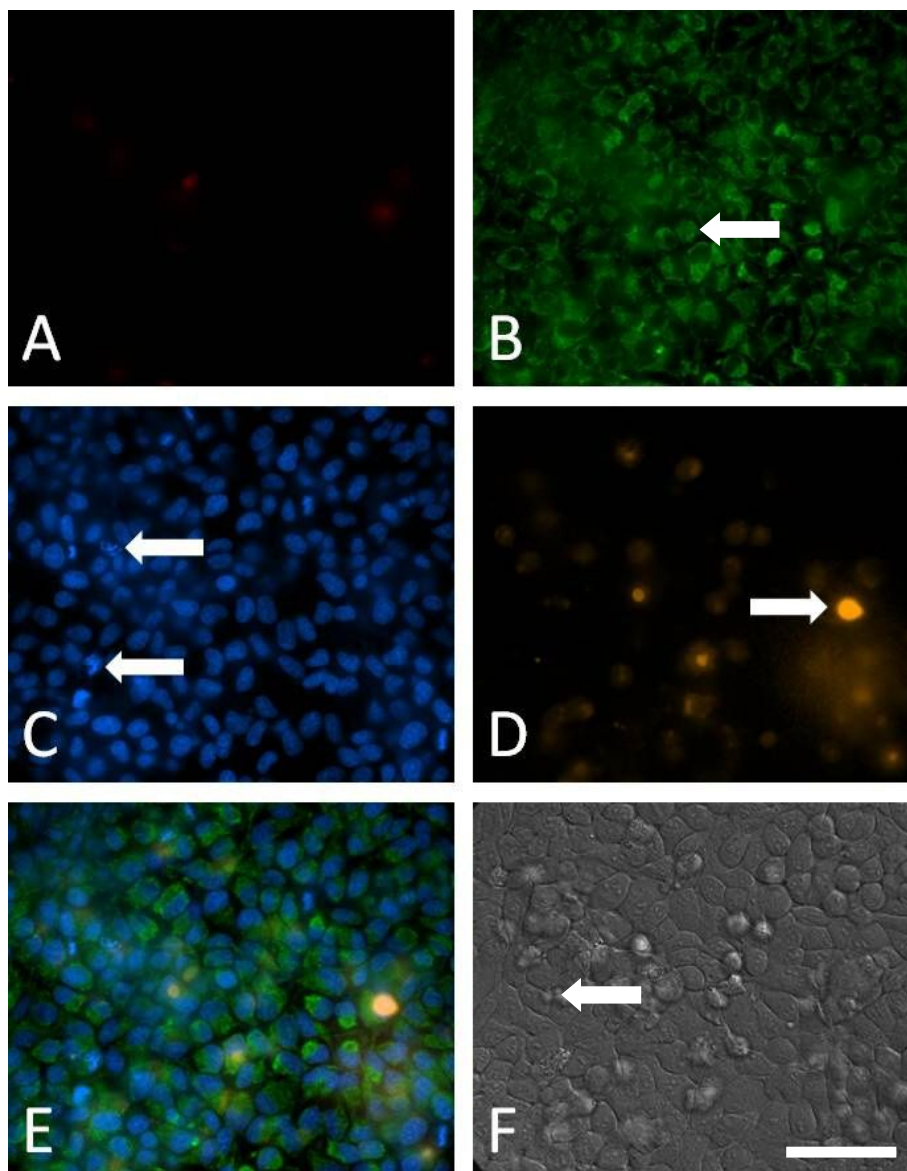
Hoechst 33342 značící strukturu jader (C) je doplněna o oranžovou fluorescenci PI (D), který proniká do jádra poškozené buňky. Na snímku C jsou vidět jádra s kondenzovaným chromatinem (silnější signál). Snímek F dokládá ztrátu typického vřetenovitého tvaru některých buněk, ke kterému dochází v důsledku toxického působení Cremophoru EL.



Obrázek 33 Morfologické změny buněk HeLa působením samotného nosičového systému Cremophor EL. A) kanál Cy5, B) mitochondrie, C) jádra (Hoechst 33342), D) jádra (Propidium jodid), E) překryv fluorescenčních signálů, F) DIC. Šipky ukazují na charakteristické změny, které jsou blíže rozebrány v textu. Měřítka odpovídá 200 μm .

Si nanočástice

Morfologické změny po aplikaci nosičového systému v podobě Si nanočástic bez přítomnosti PS jsou zachyceny na jednotlivých snímcích Obr. 34. Obdobně jako v případě aplikace samotného Cremophoru EL zůstává snímek A bez signálu v důsledku nepřítomnosti PS. Mitochondrie (B) opět ztrácí svůj charakteristický tvar a vláknitou strukturu. Výraznější změny lze pozorovat na snímku C – fragmentovaná jádra procházející procesem karyorhexe a směřující k jejich rozpadu. V důsledku poškození buněčné i jaderné membrány dochází k interkalaci PI v jaderné DNA. DIC (F) zaznamenává morfologické změny (tvaru buněk).



Obrázek 34 Morfologické změny buněk HeLa vyvolané působením Si nanočástic. A) kanál Cy5, B) MitoTracker Green, C) Hoechst 33342, D) Propidium jodid, E) překryv signálů, F) DIC. Šípky poukazují na významné změny, které jsou blíže probrány v textu. Měřítko odpovídá 200 μm .

10 DISKUZE

Nádorová onemocnění patří mezi globální problémy a jejich terapie je významným předmětem biomedicínského výzkumu. Snahou vědeckých týmů je vyvinout nejen účinnou, ale také maximálně selektivní terapii s cíleným působením na nádorové buňky.

Fotodynamická terapii je moderní, klinicky schválenou, minimálně invazivní léčebnou metodou, která disponuje dobrým potenciálem pro naplnění požadavků úspěšné protinádorové terapie. Výhodou PDT je především absence nežádoucích účinků typických pro konvenční onkologické metody jako chemoterapie či radioterapie. Metoda je postavena na třech základních komponentech (PS, světlo a kyslík), které jsou samy o sobě netoxické, avšak jejich kombinace vyvolává prostřednictvím fotochemické reakce tvorbu ROS, které iniciují buněčnou smrt. (Agostinis a kol. 2011)

V průběhu PDT dochází k absorpci světla vhodné vlnové délky molekulou PS, k jeho excitaci a dále pak k přenosu energie excitovaného PS na okolní kyslík. Z následně vzniklých ROS je nejdůležitější $^1\text{O}_2$, který je zodpovědný za poškození buněčných struktur následované buněčnou smrtí prostřednictvím apoptózy či nekrózy. (Zimcik a kol. 2010)

Ideální PS by měla být stabilní, chemicky čistá látka známého složení s nízkou či nulovou vlastní toxicitou a poměrně rychlou clearance ze zdravé tkáně. Absorpční maximum PS by se mělo nacházet v rozmezí vlnových délek 680-800 nm červené oblasti spektra, přičemž nejvhodnější se zdají být vlnové délky blízké 800 nm, které penetrují hlouběji do tkáně. PS by měl disponovat vysokou produkcí $^1\text{O}_2$ ($\Phi_{\Delta} \geq 0.5$) a přednostní kumulací v nádorové tkáni (Agostinis a kol. 2011, Josefsen a Boyle 2008, Zimcik a Miletin 2009), ačkoli se ukázalo, že i látky s výrazně nižší produkcí $^1\text{O}_2$ ($\Phi_{\Delta} = 0.33$) ve vodě mohou být velice účinnými PS. (Makhseed a kol. 2013)

Ve snaze přiblížit se tomuto ideálnímu modelu jsou v současné době syntetizovány nové účinnější a selektivnější PS, které mohou nahradit původní generaci PS. Do skupiny druhé generace PS patří také ftalocyaniny a jejich dusíkaté izostery, které jsou hlavním tématem této práce.

Absorpční maximum Pcs se nechází v rozmezí 670-700 nm. (Ormond a Freeman 2013) Pro PDT jsou zásadní zejména komplexy Pcs s kovy, které se vyznačují dlouhou životností tripletového stavu a vysokými hodnotami Φ_{Δ} . Jako nejvhodnější se jeví

komplexy zinečnaté, hlinité, křemičité, popř. paladnaté. (Zimcik a Miletin 2009) Nevýhodou Pcs i jejich aza-analog je jejich velmi nízká rozpustnost ve vodě a tendence k tvorbě agregátů, které výrazně snižují produkci $^1\text{O}_2$ a limitují tak použitelnost látek v PDT. Za účelem zvýšení rozpustnosti jsou tyto PS vázány na nosičové systémy v podobě nanočástic, emulgátorů či liposomů. Další možností zvýšení rozpustnosti je vhodná periferní substituce. (Moreira a kol. 2008, Zimcik a Miletin 2009)

Doposud byly klinicky hodnoceny tři zástupci Pcs: ZnPc v kombinaci s liposomy, Photosens a Pc4. Do klinické praxe byl zaveden pouze Photosens a to v Rusku v terapii rakoviny žaludku, kůže, ústní dutiny a karcinomu prsu. (Zimcik a Miletin 2009)

Pro všechny naše experimenty byly použity deriváty ftalocyaninů připravené na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové vědeckou skupinou doc. PharmDr. Petra Zimčíka, Ph.D. Jednalo se o zinečnatý ftalocyanin P9-0Zn a jeho aza-analog ZIP21Zn. Oba jsou periferně substituovány objemnými substituenty v pozici β , které redukuje agregaci PS. Abychom mohli PS aplikovat *in vitro* v živném médiu pro buňky, bylo třeba je dodat spolu s vhodným nosičovým systémem popř. solubilizačním činidlem. Mezi použité nosiče patřil Cremophor EL, Si nanočástice, modifikované Si nanočástice KK638B a KK638A NH_3^+ , liposomy a DMSO. Oba PS vykazují vysoké kvantové výtěžky $^1\text{O}_2$ ($\Phi_{\Delta} > 0,60$), a proto se jeví jako vhodné pro PDT. P9-0Zn má navíc výše položené maximum absorpce (707 nm) umožňující hlubší průnik do tkáně. (Novakova a kol. 2015)

Hodnocení fotodynamické aktivity probíhalo na nádorové buněčné linii HeLa, která je k působení použitých látek dostatečně citlivá, a která je v *in vitro* hodnocení běžně používaná. Po aktivaci PS vhodným světlem se jako více cytotoxicky aktivní projevil Pc P9-0Zn. Aktivitu jeho aza-analoga se nepodařilo dokázat.

Obdobné porovnání účinnosti periferně substituovaných (β) zinečnatých Pc a jejich aza-analog na buněčné linii HeLa proběhlo již ve dřívějších studiích. Machacek a kol., 2015 dokládá vyšší účinnost β -substituovaných kationických Pc ($\text{IC}_{50} = 0,71 \mu\text{M}$) než jejich aza-analog ($\text{IC}_{50} = 5,00 \mu\text{M}$). Sledovaný Pc zároveň prokázal výrazně nižší vlastní toxicitu, hodnota TC_{50} přesahovala $1500 \mu\text{M}$. Charakter centrálně vázaného kationtu vlastní toxicitu Pc výrazně neovlivnil – hodnoty TC_{50} byly obdobné pro zinečnaté i hořečnaté Pc. Vzhledem k nízkým hodnotám Φ_{Δ} se fototoxická aktivita

hořečnatých komplexů neprojevila ani u koncentrací až do hodnoty 100 μM . (Machacek a kol. 2015)

Ačkoli se v našich experimentech prokázal P9-0Zn jako aktivní, ani jeho fototoxicita nebyla dostatečně vysoká na to, aby se projevila ve spojení PS s nosičem. Při nárůstu koncentrace systému nosič-PS se zvyšuje toxicita nejen aktivovaných PS, ale bohužel také toxicita nosičů Cremophor EL a Si nanočástic. V praxi to znamenalo, že po aplikaci na buněčné kultury se projeví toxicita nosičového systému dříve než toxicita vlastního PS.

Použití Si nanočástic jako nosičových systémů pro hydrofobní Pc bylo hodnoceno v již dříve publikovaných studiích. Lin a kol. 2011 ve své studii hodnotil pomocí spektroskopických metod fotochemické vlastnosti periferně substituovaného zinečnatého Pc (TBPC, tetra-tert-butyl zinc(II) phthalocyanine), který byl enkapsulován do Si nanočástic. V porovnání s volným TBPC byla kombinace TBPC + Si nanočástice výrazně stabilnější, s nízkou tendencí k agregaci ve vodném prostředí a s vyšší produkcí $^1\text{O}_2$ (Lin a kol. 2011)

Důvodem proč studované lipofilní PS (se slibnými fotofyzikálními a fotochemickými vlastnostmi) enkapsulované v nosičovém systému mají nízkou aktivitu, může být omezená difúze $^1\text{O}_2$. Ten nemusí být schopen se v dostatečném množství dostat k buněčným cílům (reakce s komponenty nosičového systému, velikost částic). Tato domněnka byla vyvrácena ve spolupráci s RNDr. Pavlem Kubátem, CSc., Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR. Metodou časově-rozlišené luminiscence $^1\text{O}_2$ v blízké infračervené oblasti bylo možné v D_2O detekovat vznikající $^1\text{O}_2$ z obou PS nesených Si nanočásticemi. V tuto chvíli nejsme tedy schopni uspokojivě objasnit, co je příčinou nízké aktivity studovaných PS v kombinaci s použitými nosičovými systémy.

Liposomy, které jsme hodnotily v kombinaci s Pc i s jeho aza-analogem, prokázaly v obou případech velice nízkou toxicitu. Pro tuto vlastnost se zdají být vhodnými adepty na funkci nosičů PS. Jejich použití však značně limituje skutečnost, že liposomy mohou pojmout jen velmi malé množství PS, při kterém se neprojevila jeho fototoxicita.

Nízká toxicita PS po aktivaci zářením ve spojení s vysokou toxicitou nosičů Cremophor EL a Si nanočástic byla doložena také fotografickou dokumentací za použití specifických fluorescenčních sond a fluorescenčního mikroskopu. Z pořízených snímků je patrné, že morfologické změny buněk vyvolané aplikací PS s příslušným nosičem jsou téměř shodné s buněčnými změnami, které jsou vyvolány samotným nosičem.

Spojení PS s organickým rozpouštědlem DMSO nemohlo být experimentálně hodnoceno, jelikož i nízké koncentrace PS v tomto rozpouštědle vyvolaly po aplikaci roztoku na buňky jeho krystalizaci.

Prostřednictvím fotografické dokumentace byla dále hodnocena subcelulární lokalizace aktivnějšího P9-0Zn na nosiči v podobě Cremophoru EL a Si nanočástic. Ze získaných snímků je zřejmé, že PS se lokalizuje zejména v lysozomech a k nim přiléhajících vezikulech (endolyzozomální kompartment). Stejný buněčný cíl byl určen naší vědeckou skupinou (Machacek a kol. 2015, Makhseed a kol. 2013), ale i dalšími autory (Agostinis a kol. 2011, Bacellar a kol. 2015, Castano a kol. 2011, Kessel 2006, Macdonald a Dougherty 2001, Moreira a kol. 2008, Ormond a Freeman 2013) již dříve pro celou řadu dalších PS.

Výsledky, které jsou uvedené v této práci, doplňují již dříve publikované poznatky o ftalocyaninech, azaftalocyaninech a jejich fotodynamické aktivitě (Machacek a kol. 2015, Makhseed a kol. 2013, Novakova a kol. 2015). Potvrzení těchto domněnek ale vyžaduje další studium látek nejen v podmínkách *in vitro*, ale také v živém organismu, ve kterém se projeví komplexní systémová odpověď na působení PDT. Kritickým bodem je nalezení vhodného nosičového systému, který by byl sám o sobě minimálně toxický a zároveň dokázal pojmout dostatečné množství lipofilních PS o vyšší fotodynamické aktivitě.

11 ZÁVĚRY

- Fotosenzitizér P9-0Zn prokázal, že je v přítomnosti aktivujícího záření schopný indukovat buněčnou smrt u buněčné linie lidského cervikálního karcinomu (HeLa). Aktivita fotosenzitizéru ZIP21Zn nebyla v našich podmínkách potvrzena. I přes průkazně výhodnější cytotoxické vlastnosti ftalocyaninu P9-0Zn nebylo možné hodnotu EC_{50} určit vzhledem k vysoké toxicitě nosičových systémů, která zastínila aktivitu vlastního PS.
- Všechny studované nosičové systémy, s výjimkou liposomů, prokázaly značnou toxicitu, která limituje jejich použití v kombinaci s fotosenzitizéry. Toxicita liposomů se naopak ukázala jako minimální až nulová ve všech použitých koncentracích. PS rozpuštěný v organickém rozpouštědle DMSO měl tendenci vypadávat z roztoku už při velice nízkých koncentracích. DMSO se proto ukázalo jako zcela nevhodné emulgující agens.
- Nepodařilo se nalézt vhodnou kombinaci lipofilního PS a nosiče/emulgátoru. Vzhledem ke své nízké vlastní toxicitě se jako potenciálně vhodné nosiče zdály být liposomy, v praxi bylo jejich použití vyloučeno vzhledem k nízké kapacitě pro příjem PS.
- Oba studované fotosenzitizéry jsou v buňkách lokalizovány přednostně v endolyzozomálním kompartmentu.
- Mezi morfologické změny, ke kterým dochází v důsledku působení PDT, patří zejména fragmentace jader (karyorhexe) a ztráta vláknité struktury mitochondrií. Tvar buněk HeLa ztrácel v průběhu PDT svůj typický vřetenovitý charakter.

12 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ADEY, A.; BURTON, J. N.; KITZMAN, J. O.; HIATT, J. B.; LEWIS, A. P.; MARTIN, B. K.; QIU, R.; LEE, C.; SHENDURE, J. The haplotype-resolved genome and epigenome of the aneuploid HeLa cancer cell line. *Nature*, 2013, 8, 500 (7461), 207-211.

AGOSTINIS, P.; BERG, K.; CENGEL, K. A.; FOSTER, T. H.; GIROTTI, A. W.; GOLLNICK, S. O.; HAHN, S. M.; HAMBLIN, M. R.; JUZENIENE, A.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; MROZ, P.; NOWIS, D.; PIETTE, J.; WILSON, B. C.; GOLAB, J. Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2011, 61(4), 250-281.

ALLEN, C. M.; SHARMAN, W. M.; VAN LIER, J. E. Current status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2001, 5(2), 161-169.

ALLISON, R. R.; DOWNIE, G. H.; CUENCA, R.; HU, X.; CHILDS, C. JH.; SIBATA, C. H. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2004, 1(1), 27-42.

ALLISON, R. R.; SIBATA, C. H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2010, 7(2), 61-75.

ANTOSZYK, A. N.; TUOMI, L.; CHUNG, C. Y.; SINGH, A.; FOCUS STUDY GROUP. Ranibizumab combined with verteporfin photodynamic therapy in neovascular age-related macular degeneration (FOCUS): year 2 results. *American journal of ophthalmology*, 2008, 145(5), 862-874.

AUSTRALIAN INSTITUTE OF HEALTH AND WELFARE, *Cancer mortality trends and projections: 2013 to 2025* [online], [cit. 2015-11-10]. Dostupné z: <http://www.aihw.gov.au/cancer/mortality-trends-projections>.

BACELLAR, I. O. L.; TSUBONE, T. M.; PAVANI, C.; BAPTISTA, M. S. Photodynamic Efficiency: From Molecular Photochemistry to Cell Death. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16, 20523-20559.

BARON, E. D.; MALBASA, C. L.; SANTO-DOMINGO, D.; FU, P.; MILLER, J. D.; HANNEMAN, K. K.; HSIA, A. H.; OLEINICK, N. L.; COLUSSI, V. C.; COOPER, K. D. Silicon phthalocyanine (Pc 4) photodynamic therapy is a safe modality for cutaneous neoplasms: Results of a phase 1 clinical trial. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2010, 42(10), 728-735.

BERDUGO, M.; BEJJANI, R. A.; VALAMANESH, F.; SAVOLDELLI, M.; JEANNY, J-C.; BLANC, D.; FICHEUX, H.; SCHERZ, A.; SALOMON, Y.; BENEZRA, D.; BEHAR-COHEN, F. Evaluation of the new photosensitizer Stakel (WST-11) for photodynamic choroidal vessel occlusion in rabbit and rat eyes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2008, 49(4), 1633-1644.

BISLAND, S. K.; LILGE, L.; LIN, A.; RUSNOV, R.; WILSON, B. C. Metronomic Photodynamic Therapy as a New Paradigm for Photodynamic Therapy: Rationale and Preclinical Evaluation of Technical Feasibility for Treating Malignant Brain Tumors. *Photochemistry and Photobiology*, 2004, 80, 22–30.

BRAATHEN, L. R.; SZEIMIES, R. M.; BASSET-SEGUIN, N.; FOLEY, P.; PARISER, D.; ROELANDTS, R.; WENNERBERG, A. M.; MORTON, C. A. Guidelines on the use of photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer: an international consensus. International Society for Photodynamic Therapy in Dermatology, 2005. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2007, 56(1), 125-143.

CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 2000, 407(6801), 249-257.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2004, 1(4), 279-293.

DEBELE, T. A.; PENG, S.; TSAI, H. C. Drug Carrier for Photodynamic Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015,16, 22094-22136.

DUBSKÁ, Z. Problematika věkem podmíněné makulární degenerace a současné možnosti její léčby se zaměřením na biologickou terapii. *Klinická farmakologie a farmacie*, 2009, 23(3), 125-137.

FILONENKO, E. V. The History of Development of Fluorescence Diagnosis and Photodynamic Therapy and Their Capabilities in Oncology. *Russian Journal of General Chemistry*, 2015, 85(1), 211-216.

FRIMAYANTI, N.; YAM, M. L.; LEE, H. B.; OTHMAN, R.; ZAIN, S. M.; RAHMAN, N. A. Validation of Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) Model for Photosensitizer Activity Prediction. *International Journal of Molecular Sciences*, 2011, 12, 8626-8644.

HUANG, Z. A Review of Progress in Clinical Photodynamic Therapy. *Technol Cancer Res Treat*, 2005, 4(3), 283-293.

CHEN, B.; POGUE, B. W.; HOOPEES, P. J.; HASAN, T. Combining vascular and cellular targeting regimens enhances the efficacy of photodynamic therapy. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 2005, 61(4), 1216-1226.

CHEN, B.; POGUE, B. W.; HOOPEES, P. J.; HASAN, T. Vascular and cellular targeting for photodynamic therapy. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, 2006, 16(4), 279-305.

IDRIS, N. M.; GNANASAMMANDHAN, M. K.; ZHANG, J.; HO P.C.; MAHENDRAN, R.; ZHANG, Y. *In vivo* photodynamic therapy using upconversion nanoparticles as remote-controlled nanotransducers. *Nature Medicine*, 2012, 18, 1580-1585.

JARVI, M. T.; NIEDRE M. J.; PATTERSON, M. S.; WILSON, B. C. Singlet oxygen luminescence dosimetry (SOLD) for photodynamic therapy: Current status, challenges and future prospects. *Photochemistry and Photobiology*, 2006, 82, 1198-1210.

JOSEFSEN, L. B.; BOYLE R. W. Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. *Metal-Based Drugs*, 2008, 2008: 1-23.

JOSEFSEN, L. B.; BOYLE, R. W. Unique diagnostic and therapeutic roles of porphyrins and phthalocyanines in photodynamic therapy, imaging and theranostics. *Theranostics*, 2012, 2(9), 916-966.

KALA, Z.; KISS, I.; VÁLEK, V.; a kol. *Nádory podjaterní oblasti, Diagnostika a léčba*, Grada Publishing, a.s., Praha, 2009.

KANCELÁŘ WHO V ČESKÉ REPUBLICE, 4. únor - Světový den proti rakovině [online], [cit. 2015-11-15]. Dostupné z: <http://www.who.cz/mediaonas/118-4-unor-svetovy-den-proti-rakovine.html>.

KESSEL, D. Death pathways associated with photodynamic therapy. *Medical Laser Application*, 2006, 21(4), 219-224.

KIMANI, S. G.; PHILLIPS, J. B.; BRUCE, J. I.; MacROBERT, A. J.; GOLDING, J. P. Antioxidant inhibitors potentiate the cytotoxicity of photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 2012, 88(1), 175-187.

KLENER, P.; KLENER, P. jr. *Principy systémové protinádorové léčby*. Grada Publishing, a.s., Praha, 2013.

LANDRY, J. J. M.; PYL, P. T.; RAUSCH, T.; ZICHNER, T.; TEKKEDIL, M. M.; STUTZ, A. M.; JAUCH, A.; AIYAR, R. S.; PAU, G.; DELHOMME, N.; GAGNEUR, J.; KORBEL, J. O.; HUBER, W.; STEINMETZ, L. M. The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. *G3: Genes|Genomes|Genetics*, 2013, 3(8), 1213-1224.

LANGE, N.; JICHLINSKI, P.; ZELLWEGER, M.; FORRET, M.; MARTI, A.; GUILLOU, L.; KUCERA, P.; WAGNIERES, G.; VAN DEN BERGH, H. Photodetection of early human bladder cancer based on the fluorescence of 5-aminolaevulinic acid hexylester-induced protoporphyrin IX: a pilot study. *British journal of cancer*, 1999, 80(1-2), 185-193.

LEPOR, H. Vascular targeted photodynamic therapy for localized prostate cancer. *Reviews in urology*, 2008, 10(4), 254-261.

LIN, R.; ZHOU, L.; LIN, Y.; WANG, A.; ZHOU J. H.; WEI, S. H. Property study of a new silica nanoparticle delivery system of hydrophobic phthalocyanine using spectroscopic method. *Spectroscopy*, 2011, 26(3), 179-185.

LUCENA, S. R.; SALAZAR, N.; GRACIA-CAZANA, T.; ZAMARRÓN, A.; GONZÁLEZ, S.; JUARRANZ, Á.; GILABERTE, Y. Combined Treatments with Photodynamic Therapy for Non-Melanoma Skin Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16, 25912-25933.

MACDONALD, I. J.; DOUGHERTY, T. J. Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2001, 5(02), 105-129.

MAČÁK, J.; MAČÁKOVÁ, J. *Patologie*. Grada Publishing, a.s., Praha, 2004.

MACHACEK, M.; CIDLINA, A.; NOVAKOVA, V.; SVEC, J.; RUDOLF, E.; MILETIN, M.; KUCERA, R.; SIMUNEK, T.; ZIMCIK, P. Far-red-absorbing cationic phthalocyanine photosensitizers: Synthesis and evaluation of the photodynamic anticancer activity and the mode of cell death induction. *Journal of medicinal chemistry*, 2015, 58(4), 1736-1749.

MACHACEK, M.; KOLLAR, J.; MILETIN, M.; KUCERA, R.; SIMUNEK, T.; NOVAKOVA, V.; ZIMCIK, P. Anionic hexadeca-carboxylate tetrapyrazinoporphyrazine: synthesis and in vitro photodynamic studies of water-soluble non-aggregating photosensitizer. *RCS Advances*, 2016, 6, 10064-10077.

MAKHSEED, S.; MACHACEK, M.; ALFADLY, W.; TUHL, A.; VINODH, M.; SIMUNEK, T.; NOVAKOVA, V.; KUBAT, P.; RUDOL, E.; ZIMCIK, P. Water-soluble non-aggregating zinc phthalocyanine and *in vitro* studies for photodynamic therapy. *Chemical Communications*, 2013, 49(95), 11149-11151.

MEHRABAN, N.; FREEMAN, H. S. Developments in PDT Sensitizers for Increased Selectivity and Singlet Oxygen Production. *Materials*, 2015, 8, 4421-4456.

MESQUITA, R. C.; DURDURAN, T.; YU, G.; BUCKLEY, E. M.; KIM, M. N.; ZHOU, C.; CHOE, R.; SUNAR, U.; YODH, A. G. Direct measurement of tissue blood flow and metabolism with diffuse optics. *Philosophical transactions Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences*, 2011, 369(1955), 4390–4406.

MOAN, J.; KVAM, E.; HOVIG, E.; BERGAND, K.; RIKLIS, E. Effects of PDT on DNA and chromosomes. In: *Photobiology*, Riklis, E., Ed.; Plenum Press, New York, 1991, 821–829.

MOREIRA, L. M.; DOS SANTOS, F. V.; LYON, J. P.; MAFTOUM-COSTA, M.; PACHECO-SOARES, C.; DA SILVA, N. S. Photodynamic therapy: porphyrins and phthalocyanines as photosensitizers. *Australian journal of chemistry*, 2008, 61(10), 741-754.

MROZ, P.; YAROSLAVSKY, A.; KHARKWAL, G. B.; HAMBLIN, M. R. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers*, 2011, 3(2), 2516-2539.

NANASHIMA, A.; NAGAYASU, T. Current Status of Photodynamic Therapy in Digestive Tract Carcinoma in Japan. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(2), 3434–3440.

NATHAN, T. R.; WHITELAW, D. E.; CHANG, S. C.; LEES, W. R.; RIPLEY, P. M.; PAYNE, H.; JONES, L.; PARKINSON, M. C.; EMBERTON, M.; GILLAMS, A. R.; MUNDY, A. R.; BOWN, S. G. Photodynamic therapy for prostate cancer recurrence after radiotherapy: a phase I study. *The Journal of urology*, 2002, 168, 1427-1432.

NIEDRE, M.; PATTERSON, M. S.; WILSON, B. C. Direct near-infrared luminiscence detection of singlet oxygen generated by photodynamic therapy in cells *in vitro* and tissues *in vivo*. *Photochemistry and Photobiology*, 2002, 75(4), 382-391.

NOVAKOVA, V.; REIMEROVA, P.; SVEC, J.; SUCHAN, D.; MILETIN, M.; RHODA, H. M.; NEMYKIN, V. N.; ZIMCIK, P. Systematic investigation of phthalocyanines, naphthalocyanines, and their aza-analogues. Effect of the isosteric aza-replacement in the core. *Dalton Trans.*, 2015, 44, 13220-13233.

OGAWA, K.; KOBUKE, Y. Two-Photon Photodynamic Therapy by Water-Soluble Self-Assembled Conjugated Porphyrins. *BioMed Research International*, 2013, 2013, 1-11.

ORMOND, A. B.; FREEMAN, H. S. Dye sensitizers for photodynamic therapy. *Materials*, 2013, 6(3), 817-840.

PAVLÍK, E.; PAVLÍKOVÁ, A. Molekulárně biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku - část 11. *Labor aktuell Czech*, 2004, 3, 10-13.

PENG, Q.; WARLOE, T.; BERG, K.; MOAN, J.; KONGSHAUG, M.; GIERCKSKY, K. E.; NESLAND, J. M. 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: Clinical research and future challenges. *Cancer*, 1997, 79, 2282-2308.

PLAETZER, K.; KIESSLICH, T.; VERWANGER, T.; KRAMMER, B. The modes of cell death induced by PDT: an overview. *Medical Laser Application*, 2003, 18(1), 7-19.

POGUE, B. W.; O'HARA, J. A.; DEMIDENKO, E.; WILMOT, C. M.; GOODWIN, I. A.; CHEN, B.; SWARTZ, H. M.; HASAN, T. Photodynamic Therapy with Verteporfin in the Radiation-induced Fibrosarcoma-1 Tumor Causes Enhanced Radiation Sensitivity. *Cancer Res*, 2003, 63, 1025-1103.

PROBODH, I.; CRAMB, D. T. Two-Photon Excitation Photodynamic Therapy: Working Toward a New Treatment for Wet Age-Related Macular Degeneration. In: *Age*

Related Macular Degeneration - The Recent Advances in Basic Research and Clinical Care; Ying, G. S., Ed.; InTech, 2012, 213-226.

QIU, H.; GU, Y.; WANG, Y.; HUANG, N. Twenty years of clinical experience with a new modality of vascular-targeted photodynamic therapy for port wine stains. *Dermatologic Surgery*, 2011, 37(11), 1603-1610.

REPETTO, G.; PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, 2008, 3(7), 1125-1131.

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med.*, 2010, 49(11), 1603-1616.

SAKAMOTO, K.; OHNO-OKUMURA, E. Syntheses and Functional Properties of Phthalocyanines. *Materials*, 2009, 2, 1127-1179.

SELBO, P. K.; HØGSET, A.; PRASMICKAITE, L.; BERG, K. Photochemical internalisation: a novel drug delivery system. *Tumour biology*, 2002, 23(2), 103-112.

SENGE, M. O.; BRANDT, J. C. Temoporfin (Foscan, 5,10,15,20-Tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin) – A Second-generation Photosensitizer. *Photochemistry and Photobiology*, 2011, 87, 1240-1296.

SHENG, C.; POGUE, B. W.; WANG, E.; HUTCHINS, J. E.; HOOPEES, P. Assessment of photosensitizer dosimetry and tissue damage assay for photodynamic therapy in advanced-stage tumors. *Photochemistry and Photobiology*, 2004, 79(6), 520-525.

SPITZER, M.; ZIEMSEN, F.; BARTZ-SCHMIDT, K. U.; GELISKEN, F.; SZURMAN, P. Treatment of age-related macular degeneration: focus on ranibizumab. *Clinical Ophthalmology*, 2008, 2(1), 1-14.

STEWART, F.; BAAS, P.; STAR, W. What does photodynamic therapy have to offer radiation oncologists (or their cancer patients)? *Radiotherapy and Oncology*, 1998, 48, 233-248.

TOMANOVÁ, P.; JURÁŠEK, M. Konjugáty porfyrinů. *Chemické listy*, 2014, 108, 843-852.

TRACHTENBERG, J.; BOGAARDS, A.; WEERSINK, R. A.; HAIDER, M. A.; EVANS, A.; McCLUSKEY, S. A.; SCHERZ, A.; GERTNER, M. R.; YUE, C.; APPU, S.; APRIKIAN, A.; SAVARD, J.; WILSON, B. C.; ELHILALI, M. Vascular targeted photodynamic therapy with palladium-bacteriopheophorbide photosensitizer for recurrent prostate cancer following definitive radiation therapy: assessment of safety and treatment response. *The Journal of urology*, 2007, 178(5), 1974-1979.

WACHOWSKA M.; MUCHOWICZ, A.; FIRSZUK, M.; GABRYSIK, M.; WINIARSKA, M.; WANCZYK, M.; BOJARCZUK, K.; GOLAB, J. Aminolevulinic Acid (ALA) as a Prodrug in Photodynamic Therapy of Cancer. *Molecules*, 2011, 16, 4140-4164.

WILSON, B. C.; PATTERSON, M. S.; LILGE, L. Implicit and explicit dosimetry in photodynamic therapy: A new paradigm. *Lasers in medical science*, 1997, 12, 182-199.

WU, D., LIU, Z., FU, Y., ZHANG, Y., TANG, N., WANG, Q., TAO, L. Efficacy of 2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinyl pyropheophorbide-a in photodynamic therapy of human esophageal squamous cancer cells. *Oncology Letters*, 2013, 6(4), 1111-1119.

YOON, I.; LI J. Z.; SHIM Y. K. Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. *Clinical Endoscopy*, 2013, 46(1), 7-23.

ZIMCIK, P.; MILETIN, M. Photodynamic therapy. In: *Dyes and Pigments: New Research*; Lang, A. R., Ed.; Nova Science Publishers, Inc.: New York, 2009, 1-62.

ZIMCIK, P.; MILETIN, M.; RADILOVA, H.; NOVAKOVA, V.; KOPECKY, K.; SVEC, J.; RUDOLF, E. Synthesis, properties and *in vitro* photodynamic activity of

water-soluble azaphthalocyanines and azanaphthalocyanines. *Photochemistry and Photobiology*, 2010, 86(1), 168-175.