

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

FOTODYNAMICKÁ TERAPIE NÁDOROVÝCH
ONEMOCNĚNÍ

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Miloslav Macháček

Hradec Králové 2016

Marie Halašková

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému vedoucímu práce Mgr. Miloslavu Macháčkovi za odborné vedení, za pomoc, cenné rady a připomínky při zpracování této práce. Velké díky patří především mé rodině a přátelům za jejich podporu.

Prohlášení

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

V Hradci Králové dne

.....

podpis

1 OBSAH

1	OBSAH.....	4
2	ÚVOD.....	6
3	SEZNAM ZKRATEK.....	7
4	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	9
5	SEZNAM TABULEK.....	9
6	TEORETICKÁ ČÁST.....	10
6.1	FOTODYNAMICKÁ TERAPIE.....	10
6.2	HISTORIE.....	11
6.3	MECHANIZMUS PDT.....	14
6.4	OXIDAČNÍ STRES.....	16
6.5	REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU.....	18
6.5.1	Superoxid anion radikál.....	19
6.5.2	Peroxid vodíku.....	19
6.5.3	Hydroxylový radikál.....	20
6.5.4	Singletový kyslík.....	21
6.6	DŮSLEDKY ZVÝŠENÍ ROS V NÁDOROVÝCH BUŇKÁCH.....	21
6.6.1	Oxidace DNA.....	21
6.6.2	Oxidace proteinů.....	22
6.6.3	Peroxidace lipidů.....	22
6.7	SVĚTLO.....	23
6.7.1	Zdroje světla.....	24
6.8	FOTOSENZITIZÉRY.....	25
6.8.1	Struktura fotosenzitizérů.....	26
6.8.2	Rozdělení fotosenzitizérů do generací.....	27
6.8.3	Vlastnosti ideálního fotosenzitizéru.....	28
6.8.4	První generace fotosenzitizérů.....	29
6.8.5	Druhá generace fotosenzitizérů.....	30
6.8.5.1	Porfyriny.....	30
6.8.5.2	Chloriny.....	32
6.8.5.3	Feoforbidy.....	33
6.8.5.4	Ftalocyaniny.....	34
6.8.6	Třetí generace fotosenzitizérů.....	35

7	ZÁVĚR.....	38
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	39

2 ÚVOD

Má práce na téma *Fotodynamická terapie nádorových onemocnění* bude pojednávat zejména o fotodynamické terapii (PDT) jako celku, o jejím vývoji, základním principu a o jednotlivých součástech terapie. PDT je velmi slibná a klinicky schválená neinvazivní terapeutická metoda pro léčbu určitých maligních i nemaligních stavů.

Základem je společná účast tří hlavních komponent: kyslíku, světla a fotosenzitizéru (PS). PDT spočívá v podání a selektivní akumulaci PS v cílové tkáni, který po ozáření světlem o vhodné vlnové délce a v přítomnosti kyslíku následně vede ke vzniku toxických produktů. Ty způsobují usmrcení tumorových buněk, poškození cévního systému a vyvolání místní zánětlivé reakce.

PDT je stále předmětem výzkumu, zejména ve vývoji a zkoušení nových PS, které by překonaly některé nevýhody současných klinicky schválených PS. Současné klinické studie ukazují, že PDT je velmi účinná léčebná metoda, především u časných stádií rakoviny, a může značně prodloužit přežití u pacientů a významně zlepšit kvalitu jejich života.

3 SEZNAM ZKRATEK

ABCG2	ABC membránový transportér (<i>ATP-binding cassette sub-family G member 2</i>)
AK	aminokyselina
ALA	kyselina 5-aminolevulová (<i>5-aminolevulinic acid</i>)
AlPcS4	ftalocyanin tetrasulfonát
AMD	věkem podmíněná makulární degenerace (<i>age-related macular degeneration</i>)
ATP	adenosintrifosfát (<i>adenosine triphosphate</i>)
BPD	benzoporfyrinový derivát (<i>benzoporphyrin derivative</i>)
Ce6-PVP	chlorin e6-polyvinylpyrolidon
Fe ²⁺	železnaté ionty
FHIT	<i>fragile histidine triad protein</i>
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
HO [·]	hydroxylový iont
Hp	hematoporfyrin
HpD	derivát hematoporfyrinu (<i>hematoporphyrin derivative</i>)
HPPH	2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinyl pyropheophorbid-a
HSP	proteiny tepelného šoku (<i>heat-shock protein</i>)
i.v.	intravenózně/intravenózní
LDL	lipoprotein s nízkou hustotou (<i>low density lipoprotein</i>)
MACE	mono-(L)-aspartylchlorin-e6
mtDNA	mitochondriální DNA

mTHPC	m-tetrahydroxyphenylchlorin
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
NO	oxid dusnatý
NPe6	N-aspartyl chlorin e6
NPs	polymerní nanočástice (<i>polymeric nanoparticles</i>)
$^1\text{O}_2$	singletový kyslík
$^3\text{O}_2$	molekulární kyslík
$\cdot\text{O}_2^-$	superoxid anion radikál
$\cdot\text{OH}$	hydroxylový radikál
ONOO $^-$	peroxynitrit
PBR	periferní benzodiazepinový receptor (<i>peripheral benzodiazepine receptor</i>)
Pc	ftalocyanin (<i>phthalocyanine</i>)
Pc4	křemičitý ftalocyanin
PDT	fotodynamická terapie (<i>photodynamic therapy</i>)
PEPT1	peptidový transportér 1 (<i>peptid transporter 1</i>)
PPIX	protoporfyrin IX
PS	fotosenzitizér (<i>photosensitizer</i>)
ROO \cdot	peroxylový radikál
ROS	reaktivní formy kyslíku (<i>reactive oxygen species</i>)
SnEt2	ethyletiopurpurin cíničitý
SOD	superoxid dismutáza

4 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Fotofyzikální procesy zobrazené pomocí modifikovaného Jablonského diagramu.	16
Obr. 2 Optické okno tkáně.	23
Obr. 3 Fotosenzitizérem iniciovaná buněčná smrt.....	25
Obr. 4 Základní struktury porfyrinových fotosenzitizérů	26
Obr. 5 Typické absorpční spektrum porfyriu.....	27
Obr. 6 Struktura Photofrinu®	29
Obr. 7 Struktura kyseliny 5-aminolevulové.....	31
Obr. 8 Struktura PPIX.....	31
Obr. 9 Verteporfin.....	32
Obr. 10 Temoporfin	33
Obr. 11 Photochlor®.....	34
Obr. 12 Photosens®	35

5 SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Klinicky aplikované fotosenzitizéry	37
---	----

6 TEORETICKÁ ČÁST

6.1 FOTODYNAMICKÁ TERAPIE

PDT je léčebná metoda, která je běžně používaná v úspěšné léčbě mnoha maligních rakovinných onemocnění a poruch, jako jsou např. nádory plic, gastrointestinálního traktu, močového měchýře a kůže, včetně těch přítomných v oblasti hlavy a krku. Je také úspěšně používaná v léčbě nenádorových stavů – většinou podmíněná makulární degenerace (AMD), psoriáza, ateroskleróza a vykazuje také účinnost v antivirové léčbě zahrnující herpes (Josefsen & Boyle, 2008)(Hopper, 2000).

Jedná se o minimálně invazivní techniku, která může být aplikována opakovaně na stejném místě (na rozdíl od ionizujícího záření). To má zvláštní význam v onkologii, jelikož použití chemoterapie, ionizujícího záření nebo chirurgického zákroku nijak nebrání současnému užití PDT u pacienta (Hopper, 2000). Tato terapie má za následek sekvenci fotochemických a fotobiologických procesů, které způsobují nevratné fotopškození nádorové tkáně (Dougherty et al., 1998).

Princip PDT je založen na mnoha stupňovém procesu. První z těchto fází představuje podání PS se zanedbatelnou toxicitou, buď systémově nebo lokálně, v nepřítomnosti světla (Josefsen & Boyle, 2008). PDT se skládá ze 3 základních komponent: PS, světlo a kyslík. Jednotlivě není žádná z těchto složek pro organismus toxická, ovšem společně vyvolávají fotochemickou reakci (Agostinis et al., 2011). Při této reakci dojde k aktivaci PS pomocí světla o vhodné vlnové délce, který následně reaguje s molekulárním kyslíkem za vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS) a radikálů (Josefsen & Boyle, 2008). To později může rychle způsobit významnou cytotoxicitu vedoucí až k buněčné smrti prostřednictvím apoptózy či nekrózy. Protinádorové účinky PDT pocházejí ze tří vzájemně propojených mechanismů: přímé cytotoxické účinky na nádorové buňky, poškození cévního systému nádoru a indukce prudké zánětlivé reakce, což může vést k rozvoji systémové imunity (Agostinis et al., 2011).

Dvojitá selektivita PDT je tvořena tím, že daný PS je absorbován přednostně maligně transformovanou tkání, a také schopností omezit aktivitu tohoto PS v nádorové tkáni omezením osvětlení pouze cílové oblasti. Z tohoto důvodu umožňuje PDT

selektivní destrukci nádorů, zatímco normální tkáň nechává neporušenou (Sharman, Allen, van Lier JE, & van Lier, 1999).

Na rozdíl od chirurgie, radioterapie a chemoterapie, které jsou většinou imunosupresivní, vyvolává PDT akutní zánět, expresi proteinů tepelného šoku (HSP), invazi a infiltraci tumoru leukocyty a může zvýšit prezentaci nádorově odvozených antigenů T-buněk (A. Castano, Mroz, & Hamblin, 2006).

6.2 HISTORIE

Světlo sloužilo k léčbě onemocnění již od starověku. Bylo používáno ve starověkém Egyptě, Indii a Číně pro léčbu kožních onemocnění jako lupénka, vitiligo a rakovina, stejně tak rachitidy či psychózy. Staří Řekové využívali vystavení celého těla slunečnímu záření (helioterapii) také při léčbě nemocí. Za zakladatele helioterapie je považován slavný řecký lékař Herodotus, který zdůraznil význam slunečního záření pro uzdravení. V 18. a 19. století ve Francii bylo sluneční světlo používáno v léčbě mnoha různých stavů, jako jsou například tuberkulóza, rachitida, revmatismus, obrna, edém či svalová slabost. Fototerapii dále rozvinul dánský lékař Niels Finsen, který popsal úspěšnou léčbu neštovic pomocí červeného světla, které zabraňovalo hnisání puchýřků (Ackroyd, Kelty, Brown, & Reed, 2001). Finsen poté úspěšně demonstroval fototerapii s využitím uhlíkové obloukové lampy v léčbě kožní tuberkulózy známé jako *lupus vulgaris*, za což byl v roce 1903 oceněn Nobelovou cenou (Josefsen & Boyle, 2008).

Terapeutické používání světla, tak jak ho známe v PDT, začalo až v roce 1900 (Macdonald & Dougherty, 2001). V tomto roce německý student medicíny Oscar Raab, pracující s profesorem Herman von Tappeiner v Mnichově, úspěšně oznámil koncept indukované buněčné smrti následující po interakci světla a chemické látky (Mitton & Ackroyd, 2008). V průběhu své studie o působení akridinu na prvoky vyvolávající malárii objevil, že kombinace akridinové oranže a světla má letální účinek na prvoky rodu *Paramecium* (trepka).

První zprávu o parenterálním podání PS u lidí podal v roce 1900 francouzský neurolog Prime, který používal eosin (orálně) při léčbě epilepsie. Zjistil však, že tato léčba vyvolává dermatitidy na oblastech kůže, které jsou vystavené slunečnímu záření. Tento objev poté vedl k první medicínské aplikaci interakce mezi chemickou látkou a

světlem. Von Tappeiner a společně s ním i dermatolog Jesionek využili kombinaci lokálně podaného eosinu a bílého světla k léčbě kožních nádorů (Ackroyd et al., 2001). V roce 1904 von Tappeiner a Jodlbauer zjistili, že nedílnou součástí fotosenzitivní reakce je i kyslík. A následně v roce 1907 zavedli termín „fotodynamická akce“ (Mitton & Ackroyd, 2008).

První studie biologických efektů hematoporfyrinu (u zvířat) provedl Hausmann ve Vídni. Počáteční zmínka o lidské fotosenzitivitě porfyriny pochází z roku 1913, kdy německý vědec Friedrich Meyer-Betz popsal hlavní problém fotodynamické terapie. Ten spočíval v rychle způsobené celkové citlivosti kůže po injekčním podání hematoporfyrinu (Hp) vlivem slunečního záření – tento nežádoucí efekt zůstává u mnoha dnešních PS (Ackroyd et al., 2001)(Josefsen & Boyle, 2008).

Později v roce 1920 zjistil francouzský vědec Policard, že nádorové tkáně vyzařují více fluorescenčního záření než tkáně zdravé (Macdonald & Dougherty, 2001)(Ackroyd et al., 2001). První zpráva o fluorescenční lokalizaci porfyrinu v maligním tumoru se objevila v roce 1924, kdy Policard pozoroval charakteristickou červenou fluorescenci Hp u experimentálního krysího sarkomu osvětleného ultrafialovým světlem.

V roce 1942 Auler a Banzer z Berlína popsali lokalizaci a fluorescenci exogenně podaných porfyrinů u zhoubných nádorů. Toto zjištění vedlo Figga a Weilanda hlouběji prozkoumat vlastnosti porfyrinů v souvislosti s lokalizací v tumorech, ve snaze rozvinout tuto aplikaci v diagnostice a léčbě nádorových onemocnění. U normálních tkání fluorescence pozorována nebyla – výjimkou jsou lymfatické uzliny, omenta, fetální a placentární tkáně a hojící se rány. Tato afinita k lymfatickým tkáním vedla Figga k závěru, že porfyriny vázané s radioaktivními sloučeninami mohou mít potenciální využití v léčbě lymfocytárních leukémií. Roku 1955 Rassmussen-Taxdal *et al.* studovali efekty intravenózní (i.v.) infuze hydrochloridu hematoporfyrinu podávaného pacientům před excizí různých benigních a maligních lézí.

V předchozích studiích bylo zjištěno, že po podání Hp vyzařují fluorescenční záření nejen nádorové a lymfatické tkáně, ale také žlučník a žlučové cesty. Roku 1955 začal tento jev dále zkoumat Peck *et al.*, aby posoudil potencionální aplikaci v žlučnickové chirurgii. Došel k závěru, že žlučové struktury mohou být detekovány po

podání Hp, a že tato aplikace vyžaduje nižší dávku a kratší časový interval po podání, než bylo potřeba pro lokalizaci tumorové a lymfatické tkáně (Ackroyd et al., 2001).

Hlavní nevýhodou Hp jako diagnostického nástroje pro léčbu rakoviny byla jeho velká dávka, která byla potřebná k vytvoření konzistentní absorpce PS. Což vedlo také k nepříjemné fototoxicitě. Samuel Schwartz *et al.* v roce 1955 ukázali, že Hp používaný v předchozích studiích byla směs porfyrinů s rozdílnými vlastnostmi. Dokázal, že po částečné purifikaci způsobuje čistý Hp lokalizaci u nádorů pouze velmi špatně. Oproti tomu zbylé komponenty směsi měly velkou afinitu k nádorovým tkáním (Ackroyd et al., 2001). S. Schwartz izoloval tyto nádor lokalizující nečistoty z hematoporfyrinových přípravků, a ty byly později nazvány hematoporfyrinové deriváty (HpD).

Richard Lipson přišel na to, jak detekovat nádorové tkáně sledováním intratumorální fluorescence Hp. Jelikož se mu ale nedařilo získat reprodukovatelné výsledky s Hp, začal experimentovat se Schwartzovým HpD (Macdonald & Dougherty, 2001). Na počátku roku 1960 se R. Lipson, společně s Baldesem, začal zajímat o potencionální využití HpD v detekci nádorů (Ackroyd et al., 2001) a uznali, že může být použit jako PS ke zničení nádorové tkáně (Macdonald & Dougherty, 2001).

Jeden z hlavních milníků ve vývoji PDT nastal v roce 1975, kdy Dr. Tom Dougherty a jeho spolupracovníci v Buffalu informovali o první úspěšné kompletní nádorové léčbě po podání HpD a jeho aktivaci červeným světlem v léčbě experimentálních zvířecích tumorů. Později pak v roce 1978 Dougherty představil první velkou sérii pacientů úspěšně léčených pomocí PDT. Následně, v průběhu posledních více než 20 let, byla PDT úspěšně použita v léčbě mnoha různých typů tumorů (Ackroyd et al., 2001).

Weishaupt *et al.* zjistil, že hlavním cytotoxickým produktem fotochemické reakce je singletový kyslík ($^1\text{O}_2$). Porfyriny byly poté testovány jako PS, protože jsou účinnými generátory $^1\text{O}_2$ a mají absorpční maximum v červené oblasti elektromagnetického spektra. Nakonec Dougherty zjistil, že Schwartzův HpD, který byl již tou dobou známý, má vysoký kvantový výtěžek $^1\text{O}_2$, absorpční maximum v červené oblasti spektra, a že je selektivně zadržován v nádorových tkáních. Po několika letech strávených izolováním a identifikováním aktivních frakcí HpD byla vytvořena purifikovaná verze nazvaná Photofrin[®] (porfimer sodný) (Macdonald & Dougherty,

2001)(Ackroyd et al., 2001). Tento fotosenzitizér byl po další purifikaci poprvé schválen v roce 1993 kanadskou zdravotnickou organizací pro léčbu rakoviny močového měchýře. Později v Japonsku, USA a v částech Evropy byl použit také proti některým druhům nádorů jícnu a nemalobuněčnému karcinomu plic (Josefsen & Boyle, 2008). Kromě schválených indikací byla PDT v klinických studiích použita pro léčbu nádorů mozku, kůže, dutiny ústní, hlavy a krku, metastází prsních nádorů a gynekologických malignit (Macdonald & Dougherty, 2001).

Photofrin[®] nebyl ani zdaleka ideálním PS a nesl s sebou nevýhody prodloužené fotosenzitivity pacienta a slabé absorpce dlouhých vlnových délek (630 nm). To vedlo k vývoji zlepšených PS (druhá generace), zahrnující Verteporfin (benzoporfyriinový derivát, známý také jako Visudyne[®]). V poslední době je také rozvoj třetí generace fotosenzitizérů založených na cílených strategiích, jako třeba protilátkou cílené PS (Josefsen & Boyle, 2008).

6.3 MECHANIZMUS PDT

PS může interagovat s molekulárním kyslíkem ($^3\text{O}_2$) a produkovat radikály a ROS. To ale ovšem jen pokud se PS nachází v jeho excitovaném stavu. To je zásadní zejména pro fotoreakce Typu II, které jsou považovány jako převládající ve PDT. ROS zahrnují např. $^1\text{O}_2$, hydroxylové radikály ($\cdot\text{OH}$) a superoxid anion radikál ($\cdot\text{O}_2^-$) a mohou interagovat s buněčnými biomolekulami (lipidy, bílkoviny a nukleové kyseliny). Jestliže následuje dostatečné oxidační poškození buněčných struktur, tak ve výsledku dojde ke smrti cílové buňky (Josefsen & Boyle, 2008).

Většina PS v jejich základním (singletovém) stavu má dva elektrony s opačnými spiny lokalizovanými v energeticky výhodnějším molekulárním orbitalu. Jestliže chromofor, jako je cyklická tetrapyrolová molekula, absorbuje foton elektromagnetického záření ve formě světelné energie, elektron přestoupí do molekulárního orbitalu s vyšší energetickou hladinou. Tento excitovaný PS je velmi nestabilní a emituje tuto přebytečnou energii ve formě fluorescence či tepla (Agostinis et al., 2011)(Josefsen & Boyle, 2008).

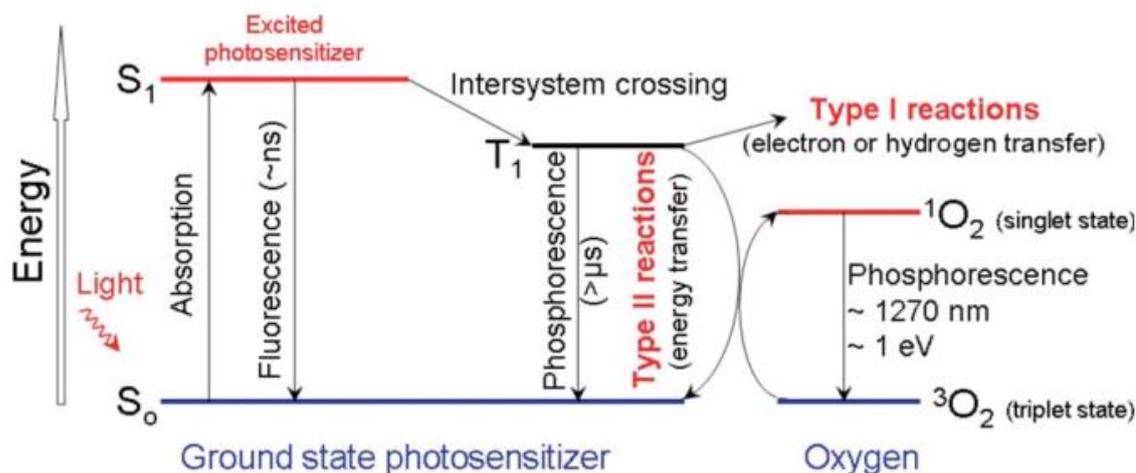
Excitovaný PS v tripletovém stavu reaguje dvěma způsoby označovanými jako proces Typu I a Typu II. Proces Typu I může zahrnovat excitovaný singletový nebo

tripletový PS. Avšak díky krátké životnosti excitovaného singletového stavu může PS reagovat pouze, je-li úzce spojen se substrátem. V obou případech jde o interakci se snadno oxidovatelnými či redukovatelnými substráty. Proces Typu II vyžaduje přímou interakci excitovaného PS v tripletovém stavu s molekulárním kyslíkem (Josefsen & Boyle, 2008).

PS se z excitovaného tripletového stavu uvolňuje zpět do základního stavu emisí fosforescenčního záření nebo přenosem energie na jinou molekulu nezářivým přechodem (Macdonald & Dougherty, 2001), kterou může být $^3\text{O}_2$. Ten je jedinečný v tom, že jeho základní stav je tripletový. Tento krok vede k vytvoření $^1\text{O}_2$ a proces se označuje jako fotoreakce Typu II.

V případě mechanismu Typu I reaguje PS přímo s organickou molekulou v buněčném mikroprostředí, kdy dochází k získání vodíkového atomu nebo elektronu za tvorby radikálu. Následná autooxidace redukováného PS produkuje $\cdot\text{O}_2^-$. Dismutace či jednoelektronová redukce $\cdot\text{O}_2^-$ poskytuje peroxid vodíku (H_2O_2), který hned poté může podstoupit další redukci jednoho elektronu na silný oxidační $\cdot\text{OH}$ (Agostinis et al., 2011). Společně jsou tyto reakce klasifikovány jako fotoreakce Typu I a jsou charakterizovány závislostí na koncentraci cílového substrátu. Oproti tomu fotoreakce Typu II jsou charakterizovány závislostí na koncentraci kyslíku. I když jsou fotoreakce Typu II obvykle spojovány s produkcí $^1\text{O}_2$, některé další sloučeniny mají také tripletový základní stav a můžou být zapojeny do fotoreakcí Typu II. Mezi ně patří například oxid dusnatý a vitamin A. Ačkoliv reakce Typu II se považují za dominantní v průběhu PDT, má se za to, že reakce Typu I se mohou stát hlavní cestou tvorby cytotoxických působků, pokud jsou PS vysoce koncentrované, ale zejména za hypoxických podmínek (Macdonald & Dougherty, 2001).

ROS (především $^1\text{O}_2$) produkované prostřednictvím fotoreakcí působí blízko jejich místa vzniku (Josefsen & Boyle, 2008), což je přibližně 10 – 55 nm. Životnost $^1\text{O}_2$ v biologickém systému je extrémně krátká (10 – 320 ns). Díky tomu se fotodynamické poškození projeví jen velmi blízko intracelulární lokalizaci PS (Agostinis et al., 2011).



Obř. 1 Fotofyzikální procesy zobrazené pomocí modifikovaného Jablonského diagramu. Vystavení molekuly PS světlu způsobí přechod ze základního singletového stavu (S_0) na excitovaný singletový stav (S_1). Molekula v S_1 může podstoupit mezisystémový přechod do excitovaného tripletového stavu (T_1). Poté buď tvoří radikály přes reakce Typu I nebo mnohem pravděpodobněji přenáší svoji energii na molekulární kyslík (3O_2) a vytváří singletový kyslík (1O_2), který je hlavním cytotoxickým agens ve fotodynamické terapii (Agostinis et al., 2011).

6.4 OXIDAČNÍ STRES

Za fyziologických podmínek jsou ROS udržovány na správné hladině rovnováhou mezi jejich tvorbou a eliminací. Rovnovážný stav ROS se snadno změní, pokud by došlo k narušení kteréhokoliv kroku v produkci či odstraňování ROS. Zvýšení produkce ROS, snížení antioxidační kapacity nebo obojí následně vede k oxidačnímu stresu.

Na základě tohoto principu byly vytvořeny experimentální modely oxidačního stresu porušením specifického procesu v redoxní rovnováze. Například, několik *in vitro* a *in vivo* modelů ukazuje, že onkogenní signály jako třeba Ras a Bcr-Abl podporují tvorbu ROS, což přispívá k oxidačnímu stresu v nádorových buňkách (Lu, Ogasawara, & Huang, 2008).

Významný oxidační stres způsobuje vážná poškození lipidů, proteinů, cukrů a bází nukleových kyselin, které tak ohrožují životaschopnost a funkci buněk. Některé buňky reagují na různé vnější stimuly a toxické látky rozvinutím oxidačního vzplanutí. Například, oxidační vzplanutí vyvolané granulocyty v odpovědi na infekční agens je efektivní nespécifický mechanismus pro odstranění patogenů. Současně oxidační stres

ničí patogeny a poškozuje okolní zdravé tkáně. Za běžných normoxických podmínek jsou ROS udržovány v úzkých mezích pomocí antioxidačních a reparačních mechanismů. Ty působí směrem k omezení nežádoucích oxidativních změn ve zdravé tkáni. Nekontrolované oxidační poškození jakékoliv buněčné složky může teoreticky přispět k rozvoji onemocnění. Oxidační stres je spojován přímo s primárními, nebo sekundárními patofyziologickými mechanismy různých akutních a chronických lidských onemocnění. Rakovinné buňky vyvolávají zvýšený oxidační stres, který podporuje nádorový růst a chrání tyto buňky proti proapoptotickým signálům, čímž podněcuje k progresi nádoru (Manda, Nechifor, & Neagu, 2009).

Oxidační stres se stává hlavním faktorem, který indukuje adaptivní expresi antioxidačních enzymů, jako jsou superoxid dismutáza (SOD), kataláza a glutation-S-transferáza. Z toho důvodu zvýšený ROS stres v rakovinných buňkách pravděpodobně způsobuje zvýšenou expresi SOD a dalších antioxidačních enzymů. Snížení aktivity SOD narušuje buněčnou schopnost eliminovat $\cdot\text{O}_2^-$ a způsobuje akumulaci ROS v buňkách.

Stupeň oxidačního stresu v buňce je závislý na dynamické rovnováze mezi tvorbou ROS a eliminací. Za fyziologických podmínek, udržování vhodné úrovně intracelulárních ROS je důležité pro zachování redoxní rovnováhy a signalizaci buněčné proliferace. Trvalá tvorba ROS, jako jsou superoxid, H_2O_2 a hydroxylové radikály, je nevyhnutelným důsledkem mitochondriální respirace u aerobních organismů.

Předpokládá se, že několik potencionálních mechanismů přispívá ke zvýšení ROS v nádorových buňkách. Mezi ně řadíme například onkogenní signály a poruchu mitochondriálního dýchacího řetězce, u nichž bylo prokázáno, že způsobují zvýšenou tvorbu ROS. Je také známo, že mitochondriální DNA (mtDNA) je náchylnější k oxidačnímu poškození oproti jaderné, a mutace mtDNA jsou často detekovány v nádorových buňkách. V současné době je známo, že vysoká tvorba volných radikálů je důležitým mechanismem, který podporuje progresi chronického zánětu k maligní transformaci (Pelicano, Carney, & Huang, 2004).

6.5 REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU

Celkově jsou ROS vnímány jako toxické látky vyvolávající různé škodlivé účinky – například narušení činnosti buňky, její smrt nebo maligní transformaci. Aerobní organismy se proto adaptovaly na život v oxidačním prostředí rozvinutím silných antioxidačních mechanismů. Ovšem na druhou stranu se ROS účastní také nespecifické imunitní obrany proti patogenům, transdukce buněčných signálů a buněčného metabolismu (Manda et al., 2009).

ROS jsou obecně definovány jako chemické látky odvozené od kyslíku s reaktivními chemickými vlastnostmi. Nepárové elektrony molekulárního kyslíku reagují za vzniku částečně redukovaných, vysoce reaktivních forem, které jsou klasifikovány jako ROS. Tyto formy představují radikálové a neradikálové molekuly. Patří sem např. $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$ a $^1\text{O}_2$. V biologických systémech jsou ROS neustále generovány prostřednictvím různých cest. Při tzv. oxidačním (respirační) vzplanutí fagocytů jsou ROS tvořeny enzymatickými a neenzymatickými reakcemi pevně řízeným tokem, který začíná tvorbou $\cdot\text{O}_2^-$ NADPH oxidázou (Manda et al., 2009)(Pelicano et al., 2004).

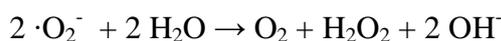
V průběhu oxidativní fosforylace v mitochondriích jsou elektrony dodávány skrze dýchací řetězec. Protonový gradient je ustanoven přes vnitřní mitochondriální membránu jako zdroj energie pro syntézu ATP. Jedním z důležitých biochemických pochodů spojovaným s tímto metabolickým procesem je produkce $\cdot\text{O}_2^-$. Některé elektrony se mohou uvolnit z mitochondriálního elektronového transportního řetězce a reagovat tak s $^3\text{O}_2$ za tvorby $\cdot\text{O}_2^-$, který je následně převeden na H_2O_2 . Vzhledem k tomu, že $\cdot\text{O}_2^-$ je během respirace neustále vytvářen a může být převeden na H_2O_2 a jiné reaktivní druhy kyslíku, jsou mitochondrie považovány za hlavní zdroj buněčných ROS. Vedle toho mohou být ROS produkovány také rodinou membránově vázaných enzymů jako např. NAD(P)H oxidázy, které, jak se zdá, ovlivňují buněčnou proliferaci a apoptózu (Pelicano et al., 2004).

ROS jsou vysoce reaktivní a snadno způsobují oxidační změny biomolekul. Díky jejich krátkému poločasu a omezené difuzní vzdálenosti způsobuje většina ROS poškození lokálně, blízko místa jejich vzniku. Nicméně, H_2O_2 má relativně dlouhý poločas a může překonávat dlouhé vzdálenosti, což umožňuje této molekule fungovat

jako druhý posel v signálních drahách a způsobit poškození i ve vzdálených místech, včetně jaderné DNA (Lu et al., 2008).

6.5.1 Superoxid anion radikál

$\cdot\text{O}_2^-$ vzniká jedoelektronovou redukcí molekulárního kyslíku (Manda et al., 2009). V biologických systémech není příliš reaktivní a nezpůsobuje výrazné oxidační poškození. Může ovšem reagovat sám se sebou za vzniku peroxidu vodíku a kyslíku. Tato reakce se označuje jako dismutace a může být katalyzována enzymem superoxid dismutázou (SOD) (A. P. Castano, Demidova, & Hamblin, 2004):

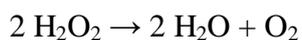


Z tohoto důvodu je SOD silným antioxidantem, jelikož detoxikuje první ROS vznikající při oxidativním vzplanutí. Vzhledem k jeho poměrně nízké reaktivitě může difundovat relativně daleko z místa jeho tvorby a tak vyvolávat oxidační stres v celé buňce (Manda et al., 2009).

$\cdot\text{O}_2^-$ je také důležitý při produkci vysoce reaktivního $\cdot\text{OH}$. V tomto procesu $\cdot\text{O}_2^-$ ve skutečnosti působí jako redukční činidlo, ne jako oxidační. Což je dáno tím, že $\cdot\text{O}_2^-$ je zde donorem jednoho elektronu na redukcí kovových iontů, které působí jako katalyzátory pro přeměnu H_2O_2 na $\cdot\text{OH}$. Tato reakce se nazývá Fentonova reakce. Je velmi významná v biologických systémech, protože většina buněk v organismu má určitou úroveň železa, mědi nebo jiných kovů, které mohou katalyzovat tuto reakci. Redukované kovy poté katalyzují rozrušení vazby kyslík-kyslík v H_2O_2 za vzniku $\cdot\text{OH}$ a hydroxylového iontu (HO^-). $\cdot\text{O}_2^-$ může reagovat s $\cdot\text{OH}$ za tvorby $^1\text{O}_2$, nebo s oxidem dusnatým (NO) za vzniku peroxynitritu (ONOO^-), což je další vysoce reaktivní oxidační molekula (A. P. Castano et al., 2004).

6.5.2 Peroxid vodíku

Dvouelektronovou redukcí molekulárního kyslíku vzniká H_2O_2 . Je tvořen kontrolovanou dismutací $\cdot\text{O}_2^-$ katalyzovanou SOD. Peroxid vodíku je rychle přeměňován na vodu a kyslík za účasti katalázy (enzym koncentrovaný v peroxizomech v buňkách):



H_2O_2 je potřebný pro tvorbu více toxických ROS, jako jsou $\cdot\text{OH}$ (vznikající Fentonovou a Haber-Weissovou reakcí) a kyselina chlorná (vznikající při reakci katalyzované myeloperoxidázou). Interaguje s lipidy, proteiny a nukleovými kyselinami. Je rozpustný v tucích a díky jeho strukturální podobnosti s vodou a poměrně nízké reaktivitě může volně difundovat dovnitř i ven z buněk a skrze tkáň. Tím je schopen interferovat s buněčnými cíli, které jsou vzdáleny od svého místa vzniku (Manda et al., 2009).

6.5.3 Hydroxylový radikál

$\cdot\text{OH}$ vzniká Fentonovou reakcí za přítomnosti železnatých iontů (Fe^{2+}) nebo Haber-Weissovou reakcí za účasti $\cdot\text{O}_2^-$:



$\cdot\text{OH}$ je extrémně reaktivní a napadá většinu buněčných komponent (sacharidy, nukleové kyseliny, lipidy a proteiny). Jediným způsobem, jak chránit buněčné struktury proti poškození $\cdot\text{OH}$, jsou efektivní reparační systémy (Manda et al., 2009).

Stejně jako H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$ snadno prochází přes membrány a nemůže být uchovávan mimo buňky. Tento vysoce reaktivní radikál se může připojit k organickému substrátu (např. mastná kyselina) a vytvořit tak hydroxylovaný produkt, který je sám radikálem. $\cdot\text{OH}$ je také schopný oxidovat organický substrát odebráním jednoho elektronu. Výsledný oxidovaný substrát se opět stává sám radikálem a může reagovat s dalšími molekulami v řetězové reakci. Příkladem může být reakce s kyslíkem v základním stavu za produkce peroxylového radikálu ($\text{ROO}\cdot$). $\text{ROO}\cdot$ je znovu vysoce reaktivní a může reagovat s ostatními organickými substráty v řetězové reakci. Tento typ řetězové reakce je běžný u oxidativního poškození mastných kyselin a dalších lipidů. To je důvodem toho, proč radikály, jako je $\cdot\text{OH}$, mohou způsobovat mnohem větší škody, než by se dalo očekávat (A. P. Castano et al., 2004).

6.5.4 Singletový kyslík

$^1\text{O}_2$ je excitovaný stav molekulárního kyslíku s vyšší energií než jeho základní tripletový stav (Manda et al., 2009). Patří mezi převládající cytotoxické agents produkované v průběhu PDT. Jedná se o vysoce reaktivní formu kyslíku, která je tvořena převrácením spinu jednoho ze svých nejvzdálenějších elektronů (Macdonald & Dougherty, 2001). Z ROS, $^1\text{O}_2$ je nejvíce agresivní a je tvořen procesem známým jako fotoreakce Typu II (Agostinis et al., 2011)

Reaguje s buněčnými proteiny a lipidy. Poločas rozpadu singletového kyslíku v biologických systémech je < 40 ns, a proto je poloměr jeho působení v řádu 20 nm (A. P. Castano et al., 2004).

6.6 DŮSLEDKY ZVÝŠENÍ ROS V NÁDOROVÝCH BUŇKÁCH

Nadměrná produkce ROS vede k poškození různých buněčných komponent zahrnujících DNA, proteiny a lipidové membrány. Zvýšený oxidační stres je schopen vyvolat různé biologické odpovědi, a to v rozsahu od přechodného zastavení růstu a adaptace, zvýšení buněčné proliferace, trvalého zastavení růstu nebo stárnutí, apoptózy až nekrózy. Skutečné výsledky jsou závislé pravděpodobně na buněčném genetickém pozadí, typu účastněných specifických ROS a na stupni a trvání ROS stresu.

Při mírné expozici ROS jsou buňky schopné regulovat různé adaptační mechanismy ve snaze vyrovnat se s oxidačním stresem. Tyto buněčné obranné mechanismy proti ROS zahrnují redoxní pufrovací systémy (glutathion, tioredoxin) a různé antioxidační enzymy (SOD, kataláza, peroxidáza). Nicméně takové adaptační procesy mají v nádorových buňkách omezenou kapacitu a za trvalých stresových podmínek může být ROS-pufrovací kapacita vyčerpána. To může postupně vést přes zvyšování oxidačního stresu až k vyvolání buněčné smrti (Pelicano et al., 2004).

6.6.1 Oxidace DNA

Oxidace DNA poškozuje jaderné i mitochondriální genomy. Důsledkem toho je tvorba nejrůznějších modifikovaných produktů (DNA zlomy, modifikované báze apod.). Jestliže oxidační poškození DNA není správně a účinně opraveno, může to mít

za následek buněčnou smrt, mutace, replikační chyby a genomickou nestabilitu (Jarrett & Boulton, 2012). ROS-zprostředkované poškození mtDNA může způsobit poruchu funkce dýchacího řetězce a také zesílení tvorby ROS (Pelicano et al., 2004).

6.6.2 Oxidace proteinů

Oxidace proteinů může vyvolat přímou reakci s aminokyselinami (AK), štěpení polypeptidového řetězce a přeměnu proteinů na deriváty, které jsou vysoce citlivé k proteolytické degradaci. Oxidace proteinů dokáže zničit redoxní rovnováhu, která je potřebná pro správnou funkci mnoha enzymů obsahujících kovy (cytochrom c, cytochrom c oxidáza, glutation, peroxidáza, katalázy). Inhibice antioxidantních enzymů dále snižuje schopnost buňky eliminovat ROS, a oxidační stres se tak dále stupňuje (Jarrett & Boulton, 2012)(Pelicano et al., 2004).

6.6.3 Peroxidace lipidů

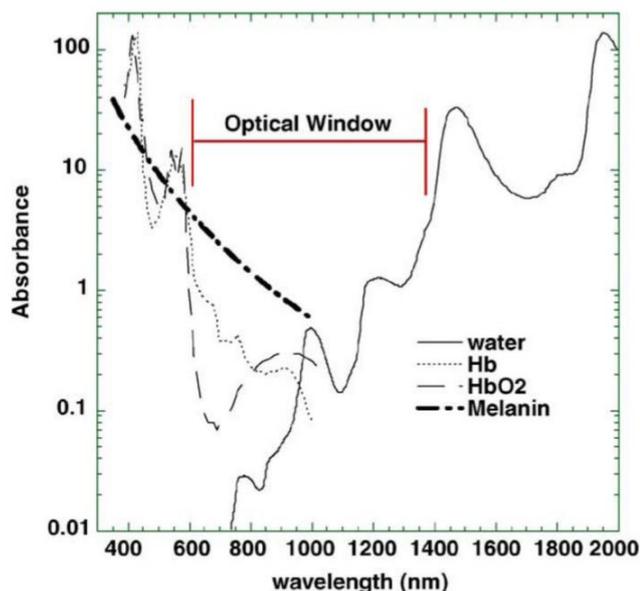
Při peroxidaci lipidů dochází ke komplexní řetězové reakci využívající interakci ROS s polynenasycenými mastnými kyselinami, která vede k tvorbě vysoce reaktivních elektrofilních aldehydů a volných radikálů. Tento proces je extrémně škodlivý pro buněčné funkce – narušuje integritu biologických membrán, jejich fluiditu a funkci (Jarrett & Boulton, 2012). Peroxidací lipidů dochází ke snížení fluidity membrán a zvýšení jejich permeability.

Dále je známo, že nadměrná produkce ROS také indukuje programovanou buněčnou smrt. Nicméně, masivní buněčná oxidace vysokými hladinami ROS může vést spíše k nekróze buňky namísto apoptózy. Pokles potenciálu vnitřní mitochondriální membrány, narušení mitochondriálního dýchacího řetězce a vyčerpání ATP jsou charakteristickými následky oxidačního stresu (Pelicano et al., 2004).

6.7 SVĚTLO

Ve PDT je důležité, abychom byli schopni předpovídat prostorovou distribuci světla v cílové tkáni. Světlo je po jeho vstupu do tkáně buď rozptýleno a absorbováno. Rozsah obou těchto procesů závisí na typu tkáně a na vlnové délce světla. K absorpci dochází převážně díky mnoha přirozeně se vyskytujícím endogenním tkáňovým chromoforům, jako jsou například hemoglobin, myoglobin a cytochromy. Rozptyl je obvykle nejdůležitějším faktorem při omezování průniku světla do většiny tkání (A. P. Castano et al., 2004)(Allison & Sibata, 2010).

Kombinace absorpce světla o nízké vlnové délce důležitými tkáňovými chromofory (oxyhemoglobin, deoxyhemoglobin a melanin) společně se sníženým rozptylem světla při delších vlnových délkách a výskyt absorpce vody při vlnových délkách nad 1300 nm vedla k vytvoření představy tzv. tkáňového optického okna (A. P. Castano et al., 2004). Toto optické okno se nachází v oblasti mezi 600 a 1200 nm. Nicméně pouze světlo přibližně do 800 nm může efektivně tvořit $^1\text{O}_2$, jelikož delší vlnové délky už nemají dostatečnou energii pro zahájení fotodynamické reakce (Agostinis et al., 2011).



Obr. 2 Optické okno tkáně. Absorpční spektra důležitých tkáňových chromoforů – voda, oxyhemoglobin, deoxyhemoglobin a melanin (A. P. Castano et al., 2004).

Nejméně efektivně proniká skrze tkáň modré světlo, zatímco červené a infračervené světlo pronikne hlouběji. Žádný světelný zdroj není nikdy ideální pro všechny indikace v PDT, a to dokonce i pokud se jedná o stejný PS. Z toho důvodu by měl být výběr světelného zdroje založen na absorpčním spektru PS, na charakteru onemocnění (lokalizace, velikost lézí, dostupnost a vlastnosti tkáně), ale také na ceně a velikosti daného zařízení. Klinická účinnost PDT je dále závislá na celkové dávce světla, době osvitů a způsobu dodání světla (jednotně či frakcionovaně). Výběr optimálních kombinací PS, světelných zdrojů a léčebných parametrů je naprosto zásadní pro úspěšnou PDT (Agostinis et al., 2011).

Světelný zdroj, o vhodné vlnové délce a intenzitě pro konkrétní použitý PS, je směřován do oblasti léčby buď přímo, nebo častěji prostřednictvím optických vláken. (Allison & Sibata, 2010).

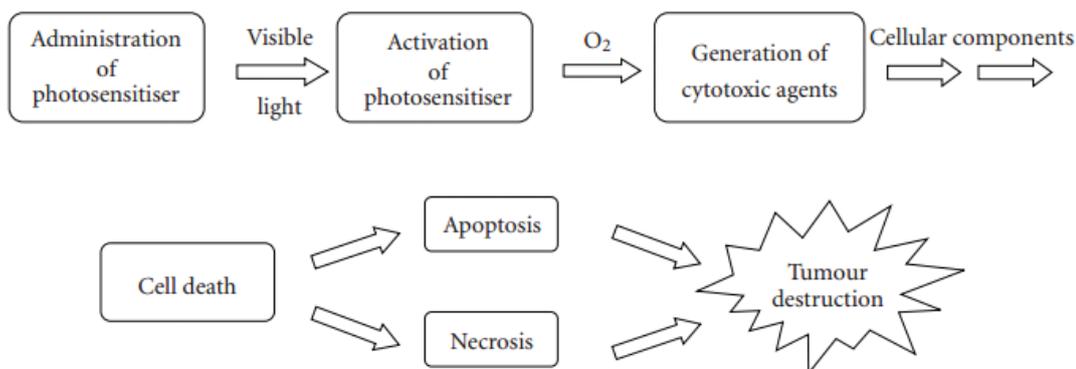
6.7.1 Zdroje světla

Světlo potřebné k aktivaci PS je generováno nejčastěji lasery nebo v některých případech nekoherentními zdroji světla (obloukové lampy, fluorescenční zdroje světla). Lasery jsou používány mnohem častěji, protože dokáží produkovat vysoce koherentní monochromatické světlo. Takto generované světlo může být snadno dodáváno pomocí optických vláken na požadované místo léčby v nepřístupných částech těla, často pomocí endoskopu (např. močový měchýř, jícn).

Volba světelného zdroje závisí především na hloubce průniku, kterého musí být světlem dosaženo (Mitton & Ackroyd, 2008)(Macdonald & Dougherty, 2001). Průnik světla do tkáně se zvyšuje s jeho vlnovou délkou (Agostinis et al., 2011). Zvolená vlnová délka se musí shodovat s absorpčním spektrem vybraného PS. Optimální vlnová délka by měla poskytovat maximální výtěžek $^1\text{O}_2$ v maximální hloubce. Nelaserové zdroje světla jsou používány především v dermatologii (Mitton & Ackroyd, 2008).

6.8 FOTOSENZITIZÉRY

PS jsou molekuly, které po jejich excitaci světelným zářením, dokáží využít energii k zahájení fotochemické reakce a k následné produkci letálních toxických agents. V buněčném prostředí mají tyto produkty (ROS a radikály) za následek buněčnou smrt a destrukci tkání. PS jsou absorbovány do buněk celého těla a jako samotné jsou neškodné. Znamená to, že v nepřítomnosti světla a obvykle i kyslíku nemají žádný vliv na zdravé či abnormální tkáň. V ideálním případě by měly být zadržovány nemocnou tkání, zejména nádorovou, po delší dobu ve srovnání se zdravou tkání. Z toho důvodu je velmi důležité pečlivě načasovat světelnou expozici a zajistit, aby došlo k aktivaci PS pouze, pokud je poměr PS v nemocné tkáni větší než ve zdravé tkáni. Tím se minimalizuje nežádoucí poškození okolních nenádorových buněk (Josefsen & Boyle, 2008).



Obr. 3 Fotosenzitizérem iniciovaná buněčná smrt (Josefsen & Boyle, 2008)

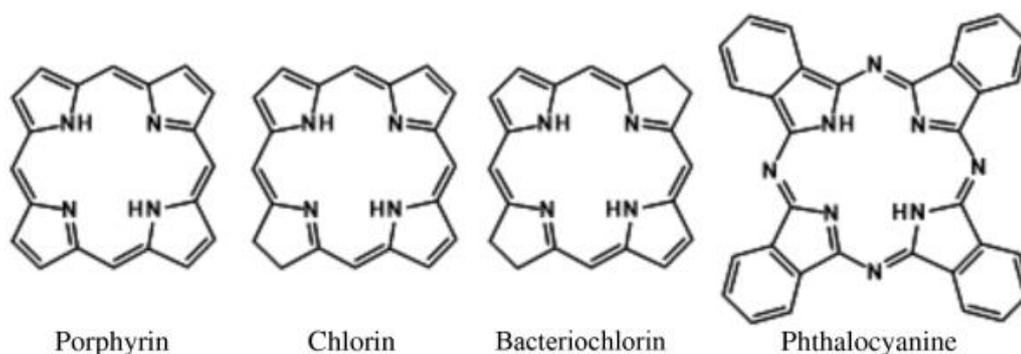
Hlavní PS, které obdržely schválení pro PDT nádorů, jsou Photofrin[®] (porfimer sodný), kyselina 5-aminolevulová (ALA), Verteporfin[®] (BPD, benzoporfyriinový derivát) a Foscan[®] (temoporfin, meta-tetrahydroxyphenyl chlorin). Verteporfin[®] je schválený v USA a některých dalších zemích pro terapii AMD (Hopper, 2000)(Agostinis et al., 2011).

6.8.1 Struktura fotosenzitizérů

Většina PS je odvozena od tetrapyrolového aromatického jádra, které se nachází v mnoha přirozeně se vyskytujících pigmentech jako hem, chlorofyl a bakteriochlorofyl (A. P. Castano et al., 2004). Obecně se jedná o planární aromatické molekuly, které jsou složeny ze čtyř symetricky uspořádaných pyrolových jednotek spojených methinovými můstky. Ačkoliv texafyriny mají pouze tři pyrolové jednotky a ftalocyaniny jsou spojeny azonovými můstky, tak jsou obě molekuly planární a aromatické a mají podobné fotofyzikální vlastnosti jako porfyriny, chloriny a bakteriochloriny.

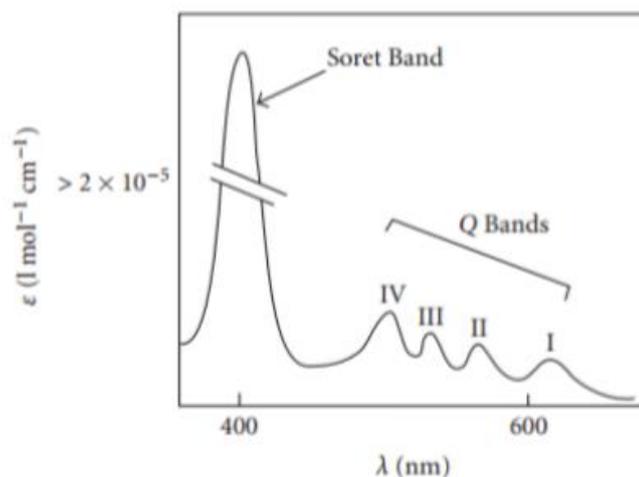
Porfyriny, chloriny a bakteriochloriny patří mezi nejužitečnější PS pro *in vivo* PDT. Nicméně ostatní třídy porfyrinoidů, jako ftalocyaniny a texafyriny, jsou také používány. Jejich absorpční maximum se nachází v červené oblasti elektromagnetického spektra, což jim umožňuje aktivovat průnik světla hlouběji do tkáně, a také jsou účinnými generátory $^1\text{O}_2$ (Macdonald & Dougherty, 2001).

Přirozeně se vyskytující porfyriny jsou plně konjugované (neredukované) tetrapyroly, které se liší v počtu a typu vedlejších skupin (zejména skupiny karboxylových kyselin). Porfyriny mají nejdelší vlnovou délku absorpčního pásu v oblasti 630 nm, ta má tendenci se zmenšovat. Chloriny jsou tetrapyroly s redukovanou dvojnou vazbou v jednom pyrolovém kruhu. Následkem toho dochází k posunu vlnové délky absorpčního pásu až do oblasti 650 – 690 nm. Bakteriochloriny mají dva pyrolové kruhy s redukovanými dvojnými vazbami, což vede k posunu absorpčního pásu ještě dále do červené oblasti spektra (A. P. Castano et al., 2004).



Obr. 4 Základní struktury porfyrinových fotosenzitizérů (Deda & Araki, 2015)

Všechny, porfyrinu podobné sloučeniny, mají silné absorpční pásmo okolo 400 nm (Soret band). Tento pás ovšem není vhodný pro PDT, jelikož modré světlo nedokáže proniknout příliš hluboko do tkáně. Proto se pro terapii používají slabší absorpční pásy (Q-bands) mezi 600 až 800 nm (Macdonald & Dougherty, 2001).



Obr. 5 Typické absorpční spektrum porfyrinu (Josefsen & Boyle, 2008)

Druhou široce studovanou strukturní skupinou PS jsou ftalocyaniny (Pc) a v menší míře také jejich příbuzné naftalocyaniny. Opět je v jejich absorpčním pásmu vlnová délka maxima > 650 nm. Nicméně tyto PS mají značné problémy s rozpustností a agregací, které jsou způsobené přítomností čtyř fenylových nebo naftylových skupin (A. P. Castano et al., 2004).

6.8.2 Rozdělení fotosenzitizérů do generací

PS jsou obecně klasifikovány do tří generací. První generace PS je založena na porfyrinu a zahrnuje hematoporfyrin a jeho deriváty, především Photofrin[®]. Následně pro překonání nevýhod PS první generace byla rozvíjena druhá generace PS. Tato skupina obsahuje různé struktury zahrnující porfyriny, rozšířené porfyriny, deriváty chlorofylu a barviva. Třetí generace PS je složena z první a druhé generace PS konjugovaných s různými modifikátory, jako jsou cholesterol, protilátky, nanočástice a liposomy pro selektivní akumulaci a cílení na nádorovou tkáň (Yoon, Li, & Shim, 2013)(Allison & Sibata, 2010).

6.8.3 Vlastnosti ideálního fotosenzitizéru

Hlavní charakteristikou každého fotodynamického senzitivizéru je jeho schopnost se přednostně hromadit v nemocné tkáni a prostřednictvím tvorby cytotoxických produktů vyvolat požadovaný biologický účinek. Dobrý PS by měl splňovat následující kritéria (Josefsen & Boyle, 2008):

- Mít silnou absorpci v červené oblasti elektromagnetického světla při vlnových délkách 600 – 850 nm umožňující hlubší penetraci světla tkáni.
- Být účinným generátorem $^1\text{O}_2$ a dalších ROS.
- Mít zanedbatelnou minimální cytotoxicitu v nepřítomnosti světla.
- Vykazovat vyšší retenci v nemocné (cílové) tkáni než ve zdravé tkáni.
- Farmakokinetická eliminace z těla pacienta by měla být rychlá s vyvoláním pouze nízké systémové toxicity.
- Být jednoduchá, chemicky čistá, dobře charakterizovaná sloučenina se známým a konstantním složením dovolující kvalitní kontrolní analýzy s nízkými výrobními náklady a dobrou stabilitou během skladování.
- Mít krátkou a vysoce výnosnou syntézu.
- Být rozpustný ve vodě nebo ve směsi vodných rozpouštědel, rozpustný v biologických prostředích dovolující tak přímé i.v. podání a transport do plánovaného cíle. Neměl by se příliš agregovat v biologickém prostředí, protože se tím snižuje jeho fotochemická účinnost.
- Mít vysokou fotochemickou reaktivitu s vysokými výtěžky a dlouhou životností tripletových stavů (Josefsen & Boyle, 2008)(Sharman et al., 1999)(Agostinis et al., 2011)(A. P. Castano et al., 2004).

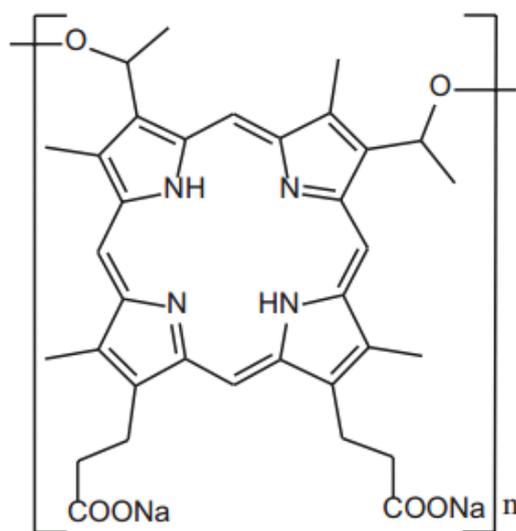
I když žádný z PS není považován za ideální pro všechny možné aplikace, množství PS druhé generace bylo vyvinuto k překonání nedostatků Photofrinu[®] a využití jejich dalších ideálnějších vlastností (Sharman et al., 1999).

6.8.4 První generace fotosenzitizérů

Porfimer sodný - Photofrin[®]

Prvním PS klinicky používaným pro terapii nádorů byla ve vodě rozpustná směs porfyrinů nazývaná HpD a jeho purifikovaná forma - porfimer sodný, který se stal později známý jako Photofrin[®]. Ačkoliv porfimer sodný je stále nejrozšířenějším používaným PS, tak tento produkt má řadu nevýhod a významné vedlejší účinky. Jedná se zejména o dlouho trvající kožní fotosenzitivitu a relativně nízkou absorbanci při 630 nm. Proto bylo hlavní úsilí investováno do vývoje nových PS (Agostinis et al., 2011)(Ackroyd et al., 2001).

Photofrin[®] byl první do detailů studovaný PS (A. P. Castano et al., 2004). Photofrin[®] je v podstatě směsí monomerů, dimerů a oligomerů odvozených chemickou manipulací od Hp, ve které jsou porfyrinové jednotky spojeny etherovými, esterovými a C-C vazbami (Yano et al., 2011)(Allison et al., 2004).



Obr. 6 Struktura Photofrinu[®] (Deda & Araki, 2015)

Typické používání Photofrinu[®] v PDT je jeho podání pomocí i.v. injekce (dávka 2 – 5 mg/kg) následované ozářením světlem o vlnové délce 630 nm v čase 24 – 48 h po

podání injekce. Pro úplné odstranění z těla Photofrin[®] vyžaduje dlouhý čas 4 – 8 týdnů po injekci, aby se zabránilo kožní fotosenzitivitě (Yano et al., 2011).

Photofrin[®] byl schválený pro klinické použití proti časnému a pozdnímu stádiu rakoviny plic, rakovině jícnu, močového měchýře, žaludku a malignímu, nemalignímu a časnému stádiu rakoviny děložního čípku po celém světě (Yano et al., 2011)(Hopper, 2000).

6.8.5 Druhá generace fotosenzitizérů

PS druhé generace jsou definované chemické sloučeniny se silnější absorpcí při delších vlnových délkách, s krátce trvající kožní fotosenzitivitou a nízkou toxicitou v nepřítomnosti světla (Zimcik et al., 2010). Bylo vyvinuto mnoho nových PS druhé generace a několik z nich je již v klinické praxi zkoušeno (Yano et al., 2011). Většina z nich jsou cyklické tetrapyroly, zahrnující substituované deriváty porfyrinu, chlorinu a bakteriochlorinu (Yoon et al., 2013).

6.8.5.1 Porfyriny

Kyselina 5-aminolevulová

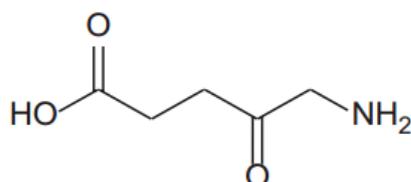
ALA je proléčivo bez fototoxické aktivity (Yano et al., 2011) používané v klinické praxi k léčbě a zobrazování řady povrchových rakovin a nádorů. ALA sama o sobě není PS, ale je klíčovým prekurzorem v biosyntéze přirozeně se vyskytujícího porfyrinu – hemu. Bezprostředním prekurzorem hemu je protoporfyrin IX (PPIX) – účinný fotosenzitizér (Josefsen & Boyle, 2008) tvořený endogenní syntézou z ALA.

Teprve až po podání ALA dochází k syntéze tohoto PS *in situ* v tumorové nebo jiné cílové tkáni. Následně po absorpci viditelného světla (400 – 600 nm) může PPIX generovat ¹O₂ a další ROS, což ve výsledku vede ke smrti buněk. Důvody, proč nádorové buňky mají tendenci syntetizovat PPIX více než normální zdravé buňky, byly intenzivně zkoumány (A. P. Castano et al., 2004)(Yano et al., 2011).

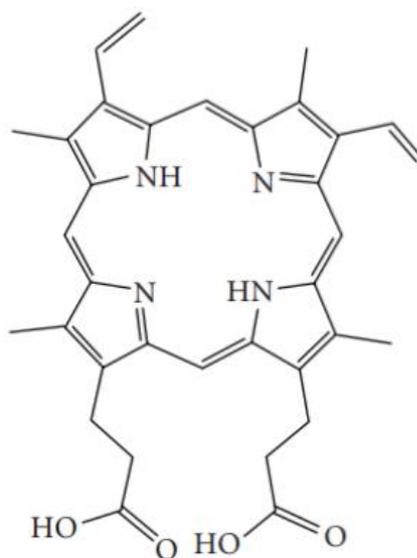
Celá řada studií se zaměřila na mechanismus ALA-indukované selektivní akumulace PPIX v tumorové tkáni. Jedna hypotéza se zaměřuje na cílové proteiny (PBR, p53, FHIT, LDL) zvýšené v nádorových buňkách, které mohou mít vliv na

hladinu PPIX. Jiné studie ukázaly, že PEPT1 a ABCG2 mají klíčovou úlohu v regulaci intracelulárních hladin PPIX. Bylo potvrzeno, že PEPT1 a ABCG2 zásadním způsobem přispívají k regulaci tumorově specifické akumulace PPIX. Nicméně některé z výše uvedených studií jsou rozporuplné, a proto mechanismus ALA-indukované selektivní akumulace PPIX v tumorových lézích je nejasný a zůstává dále předmětem výzkumu (Fan et al., 2016)(Hagiya et al., 2013).

ALA (pod obchodním názvem Levulan[®]) se svou velkou bezpečností a snadným podáním stala široce akceptovanou a populární procedurou, zejména pro léčbu kožních malignit. Ukázala také slibné výsledky v PDT nemaligních dermatologických stavů (psoriáza, Bowenova nemoc, hirsutismus) (Yano et al., 2011)(Josefsen & Boyle, 2008).



Obr. 7 Struktura kyseliny 5-aminolevulové (Deda & Araki, 2015)



Obr. 8 Struktura PPIX (Josefsen & Boyle, 2008)

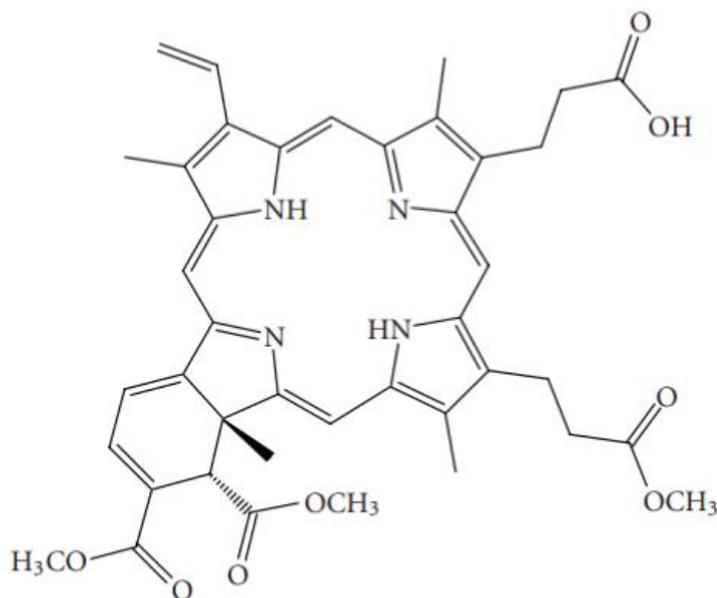
Ve snaze překonat špatnou biologickou dostupnost při aplikaci ALA lokálně byly zkoumány esterifikované ALA deriváty se zlepšenými farmakologickými vlastnostmi, které činí molekulu více lipofilní. Methylester ALA (Metvix[®]) je používán

jako PS pro bazální buněčný karcinom a jiné kožní léze. Benzylester (Benvix[®]) a hexylester (Hexvix[®]) deriváty jsou registrovány pro léčbu nádorů gastrointestinálního traktu a k diagnostice rakoviny močového měchýře (Josefsen & Boyle, 2008)(A. P. Castano et al., 2004).

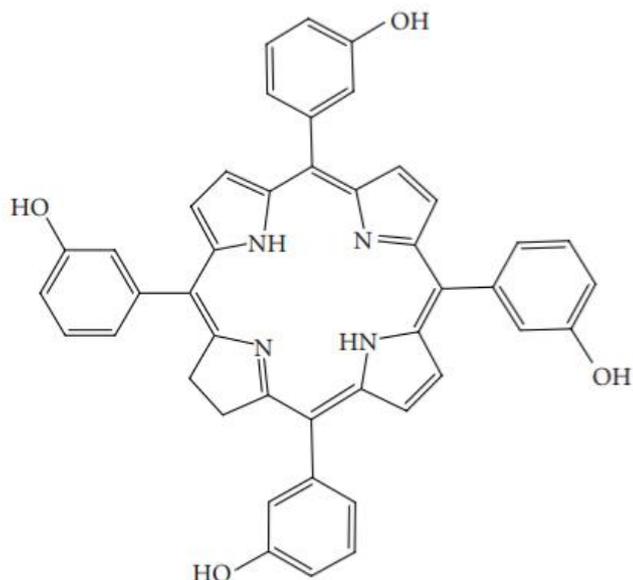
6.8.5.2 Chloriny

Do této skupiny chlorinových PS zahrnujeme benzoporphyrinový derivát (BPD, Verteporfin, Visudyne[®]), meta-tetra(hydroxyfenyl)chlorin (m-THPC, Foscan[®], Temoporfin), cínový ethyl etiopurpurin (SnET2, Rostaporfin, Purlytin[™]) a N-aspartyl chlorin e6 (NPe6, Talaporfin, LS11) odvozený od chlorofylu a (Ormond & Freeman, 2013)(Josefsen & Boyle, 2012).

Chloriny obecně podávají vynikající výtěžky ¹O₂ a jsou vysoce účinnými PS (Allison & Sibata, 2010). Struktura se oproti porfyrinům liší o další dva vodíky v jednom pyrolovém kruhu, což vede k posunu absorpčního pásu na 640 – 700 nm (Ormond & Freeman, 2013).



Obr. 9 Verteporfin (Josefsen & Boyle, 2008)

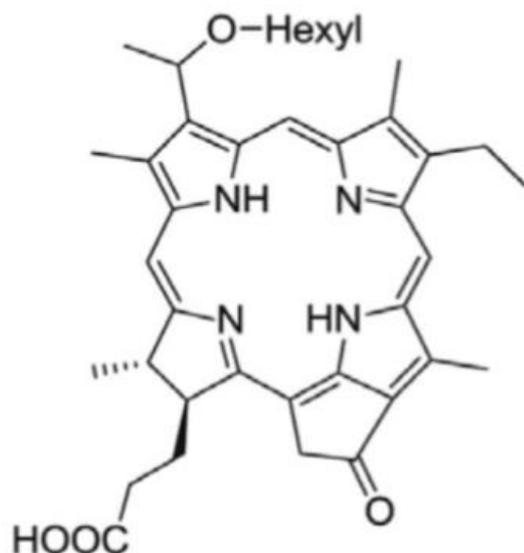


Obr. 10 Temoporfin (Josefsen & Boyle, 2008)

Verteporfin byl schválen pro používání k léčbě AMD a prokázal také svou účinnost v terapii nemelanomových nádorů kůže. BPD i NPe6 způsobují minimální kožní fotosenzitivitu. Temoporfin je používán v PDT rakoviny krku a hlavy, žaludku, slinivky břišní, prostaty a prsu. Jeho nevýhodou je ovšem vysoká kožní fotosenzitivita u některých pacientů (Ormond & Freeman, 2013).

6.8.5.3 Feoforbidy

Feoforbidy jsou chlorinové deriváty, které mají také redukovanou dvojnou vazbu v jednom pyrolovém kruhu a můžou být odvozeny od chlorofylu. Nejslibnějším z více než 400 testovaných PS se zdál být 2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinyl pyropheorbid (HPPH, Photochlor®), vysoce lipofilní PS absorbující při 665 nm (Ormond & Freeman, 2013)(Allison & Sibata, 2010)(Yano et al., 2011).



Obr. 11 Photochlor® (Yoon et al., 2013)

HPPH je hodnocen v klinických studiích pro léčbu rakoviny jícnu, plic, dutiny ústní, hlavy a krku, hltanu, bazálního buněčného karcinomu a Barretova jícnu (Ormond & Freeman, 2013).

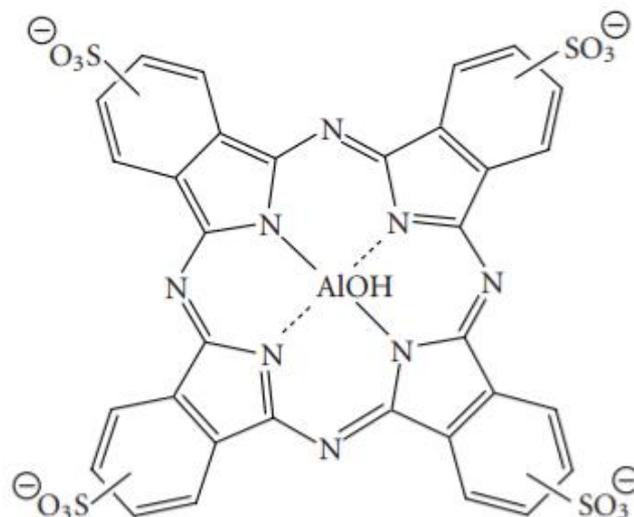
6.8.5.4 Ftalocyaniny

Pc patří mezi nejslibnější skupinu nových PS dostávající zvýšenou pozornost v posledních několika letech. Silně absorbují při delších vlnových délkách kolem 670 - 700 nm a vyznačují se vysokým kvantovým výtěžkem $^1\text{O}_2$ (Zimcik et al., 2010)(Ormond & Freeman, 2013).

Jejich struktura je založena na porfyrinu, benzenové kruhy kondenzované ke každé ze čtyř pyrolových podjednotek, a obvykle obsahuje centrální atom kovu (nejčastěji zinek, křemík nebo hliník), který zvyšuje produkci $^1\text{O}_2$. Tvorbou koordinačních komplexů s celou řadou kovů vznikají intenzivně zbarvené modro-zelené sloučeniny (Josefsen & Boyle, 2012) (Allison & Sibata, 2010).

Pc prokázaly silnější absorpci červeného světla (v porovnání s Photofrinem®), což umožňuje účinnější penetraci světla tumorovými tkáněmi, a proto se ukázaly jako velmi slibné PS druhé generace (Josefsen & Boyle, 2012).

Jedním ze specifických Pc derivátů je hlinitý ftalocyanin tetrasulfonát (AlPcS₄, Photosens[®]), který byl použit v Rusku pro léčbu rakoviny žaludku, kůže, rtů, dutiny ústní a prsu. Jeho nevýhodou ovšem je, že způsobuje kožní fotosenzitivitu po několik týdnů (Ormond & Freeman, 2013). Mezi další Pc patří například křemičitý ftalocyanin (Pc4) a disulfonovaný zinkový ftalocyanin, které jsou ve fázi klinických studií (Allison & Sibata, 2010).



Obr. 12 Photosens[®] (Josefsen & Boyle, 2008)

V poslední době jsou Pc používány jako fotoproduktivní materiály v laserových tiskárnách a CD discích. Dále se také využívají jako fluorescenční sondy *in vitro* a *in vivo*, optické materiály, průmyslové katalyzátory a samozřejmě jako fotosenzitizéry v PDT (Josefsen & Boyle, 2012).

6.8.6 Třetí generace fotosenzitizérů

Špatná rozpustnost mnoha PS ve vodném prostředí (zejména při fyziologickém pH) zabraňuje jejich i.v. podání přímo do krevního řečiště (Josefsen & Boyle, 2008). Ve snaze zvýšit účinnost a selektivitu PS, byla proto vyvinuta řada PS druhé generace konjugovaných s nosnými molekulami, které specificky dodávají PS do tumorové tkáně. Tyto nosné molekuly zahrnují monosacharidy, peptidy, LDL, protilátky, polymerní nanočástice (NPs) a polymery (Yoon et al., 2013).

Budoucí trendy a dlouhotrvající cíle v oblasti terapie rakoviny je schopnost léčit podkožní nádory neinvazivně. Vazba sacharidů na PS je schopná zlepšit jejich rozpustnost a snížit toxicitu. Tumory spotřebovávají vyšší hladiny glukózy než normální buňky, proto používání nových glykokonjugovaných PS umožňuje poskytnout vynikající zlepšení léků pro PDT. PS třetí generace jsou stále ve fázi výzkumu (Yano et al., 2011).

Bylo vyvinuto mnoho různých druhů PS proti celé řadě klinických aplikací (Josefsen & Boyle, 2008). Nejpoužívanější a nejslibnější PS pro PDT jsou shrnuty v následující tabulce.

Tab. 1 Klinicky aplikované fotosenzitizéry (Agostinis et al., 2011)

Fotosenzitizér	Struktura	Vlnová délka, nm	Schválený	Testování	Typy rakoviny
Porfimer sodný (Photofrin) (HpD)	Porfyrin	630	Celosvětově		Plíce, jícen, žlučovody, močový měchýř, mozek, vaječníky
ALA	Porfyrinový prekurzor	635	Celosvětově		Kůže, močový měchýř, mozek, jícen
ALA estery	Porfyrinový prekurzor	635	Evropa		Kůže, močový měchýř
Temoporfin (Foscan) (mTHPC)	Chlorin	652	Evropa	USA	Hlava a krk, plíce, mozek, kůže, žlučovody
Verteporfin	Chlorin	690	Celosvětově	Velká Británie	Oční, pankreas, kůže
HPPH	Chlorin	665		USA	Hlava a krk, jícen, plíce
SnEt2 (Purlytin)	Chlorin	660		USA	Kůže, prsa
Talaporfin (LS11, MACE, NPe6)	Chlorin	660		USA	Játra, tračník, mozek
Ce6-PVP (Fotolon), Ce6 deriváty (Radachlorin, Photodithazine)	Chlorin	660		Bělorusko, Rusko	Nosohltan, sarkom, mozek
Silikonový ftalocyanin (Pc4)	Ftalocyanin	675		USA	Kožní T-buněčný lymfom
Padoporfin (TOOKAD)	Bakteriochlorin	762		USA	Prostata
Motexafin lutetium (Lutex)	Texafyrin	732		USA	Prsa

7 ZÁVĚR

PDT je stále považována za novou, ale velmi slibnou a úspěšnou protinádorovou terapii. Neustálý vývoj nových PS a světelných zdrojů pro PDT se snaží především podstatně snížit fotosenzitivitu u pacienta, zkrátit dobu léčby a zároveň zvýšit dosahovanou hloubku působení. Jedná se o poměrně jednoduchou techniku léčby mnoha druhů rakoviny s velkou účinností a minimálními následky pro pacienta.

Na rozdíl od jiných běžně užívaných nádorových terapií (chirurgie, chemoterapie, radioterapie) má PDT značné výhody. Ty jsou zejména v tom, že dochází k selektivní akumulaci PS v nádoru nebo jiné nemocné tkáni, a na zaměřeném a prostorově omezeném dodání světla do cílové nemocné tkáně.

Za účelem překonání nežádoucích vedlejších účinků PDT byla rozvinuta řada PS druhé a třetí generace, které překonávají značné nevýhody prvních používaných PS. Bylo vyvinuto mnoho nových PS druhé generace a některé z nich jsou již klinicky testovány a používány. Budoucími, velmi slibnými PS jsou PS třetí generace, které jsou stále ve stádiu výzkumu. Současný vývoj a klinické studie nových PS se soustředí především na zvýšení terapeutické účinnosti a selektivitu pouze pro maligní tkáně.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Ackroyd, R., Kelty, C., Brown, N., & Reed, M. (2001). The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, *74*(5), 656–669. [http://doi.org/10.1562/0031-8655\(2001\)0740656THOPAP2.0.CO2](http://doi.org/10.1562/0031-8655(2001)0740656THOPAP2.0.CO2)
- Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. a, Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., ... Golab, J. (2011). Photodynamic Therapy of Cancer : An Update. *American Cancer Society*, *61*, 250–281. <http://doi.org/10.3322/caac.20114>. Available
- Allison, R. R., Downie, G. H., Cuenca, R., Hu, X. H., Childs, C. J. H., & Sibata, C. H. (2004). Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, *1*(1), 27–42. [http://doi.org/10.1016/S1572-1000\(04\)00007-9](http://doi.org/10.1016/S1572-1000(04)00007-9)
- Allison, R. R., & Sibata, C. H. (2010). Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, *7*(2), 61–75. <http://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2010.02.001>
- Castano, A., Mroz, P., & Hamblin, M. (2006). Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nature Reviews Cancer*, *6*(7), 535–545. <http://doi.org/10.1038/nrc1894>. Photodynamic
- Castano, A. P., Demidova, T. N., & Hamblin, M. R. (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: Part one - Photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. [http://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00007-4](http://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00007-4)
- Deda, D. K., & Araki, K. (2015). Nanotechnology, Light and Chemical Action: an Effective Combination to Kill Cancer Cells, *26*(12), 2448–2470.
- Dougherty, T. J., Gomer, C. J., Henderson, B. W., Jori, G., Kessel, D., Korbek, M., ... Peng, Q. (1998). Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, *90*(12), 889–905. <http://doi.org/10.1093/jnci/90.12.889>
- Fan, Z., Cui, X., Wei, D., Liu, W., Li, B., He, H., ... Wei, X. (2016). eEF1A1 binds and enriches protoporphyrin IX in cancer cells in 5-aminolevulinic acid based photodynamic therapy. *Scientific Reports*, *6*(April), 25353. <http://doi.org/10.1038/srep25353>

- Hagiya, Y., Fukuhara, H., Matsumoto, K., Endo, Y., Nakajima, M., Tanaka, T., ... Ogura, S. ichiro. (2013). Expression levels of PEPT1 and ABCG2 play key roles in 5-aminolevulinic acid (ALA)-induced tumor-specific protoporphyrin IX (PpIX) accumulation in bladder cancer. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, *10*(3), 288–295. <http://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2013.02.001>
- Hopper, C. (2000). Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer. *The Lancet Oncology*, *1*(4), 212–219. [http://doi.org/10.1016/S1470-2045\(00\)00166-2](http://doi.org/10.1016/S1470-2045(00)00166-2)
- Jarrett, S. G., & Boulton, M. E. (2012). Consequences of oxidative stress in age-related macular degeneration. *Molecular Aspects of Medicine*, *33*(4), 399–417. <http://doi.org/10.1016/j.mam.2012.03.009>
- Josefsen, L. B., & Boyle, R. W. (2008). Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. *Metal-Based Drugs*, *2008*. <http://doi.org/10.1155/2008/276109>
- Josefsen, L. B., & Boyle, R. W. (2012). Unique diagnostic and therapeutic roles of porphyrins and phthalocyanines in photodynamic therapy, imaging and theranostics. *Theranostics*, *2*(9), 916–966. <http://doi.org/10.7150/thno.4571>
- Lu, W., Ogasawara, M. A., & Huang, P. (2008). Models of reactive oxygen species in cancer. *Drug Discovery Today: Disease Models*, *4*(2), 67–73. <http://doi.org/10.1016/j.ddmod.2007.10.005>
- Macdonald, I. I. J., & Dougherty, T. J. (2001). Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and*, *5*(2), 105–129. <http://doi.org/10.1002/jpp.328>
- Manda, G., Nechifor, M. T., & Neagu, T.-M. (2009). Reactive Oxygen Species, Cancer and Anti-Cancer Therapies. *Current Chemical Biology*, *3*(1), 342–366. <http://doi.org/10.2174/187231309787158271>
- Mitton, D., & Ackroyd, R. (2008). A brief overview of photodynamic therapy in Europe. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, *5*(2), 103–111. <http://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2008.04.004>

- Ormond, A. B., & Freeman, H. S. (2013). Dye sensitizers for photodynamic therapy. *Materials*, 6(3), 817–840. <http://doi.org/10.3390/ma6030817>
- Pelicano, H., Carney, D., & Huang, P. (2004). ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resistance Updates*, 7(2), 97–110. <http://doi.org/10.1016/j.drug.2004.01.004>
- Sharman, W. M. W., Allen, C. C. M., van Lier JE, & van Lier, J. E. (1999). Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discovery Today*, 4(11), 507–517. [http://doi.org/10.1016/S1359-6446\(99\)01412-9](http://doi.org/10.1016/S1359-6446(99)01412-9)
- Yano, S., Hirohara, S., Obata, M., Hagiya, Y., Ogura, S. ichiro, Ikeda, A., ... Joh, T. (2011). Current states and future views in photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 12(1), 46–67. <http://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2011.06.001>
- Yoon, I., Li, J. Z., & Shim, Y. K. (2013). Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. *Clinical Endoscopy*, 46(1), 7–23. <http://doi.org/10.5946/ce.2013.46.1.7>
- Zimcik, P., Miletin, M., Radilova, H., Novakova, V., Kopecky, K., Svec, J., & Rudolf, E. (2010). Synthesis, properties and in vitro photodynamic activity of water-soluble azaphthalocyanines and azanaphthalocyanines. *Photochemistry and Photobiology*, 86(1), 168–175. <http://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2009.00647.x>