

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA



AUTOREFERÁT DIZERTAČNÍ PRÁCE

**Fotodynamická terapie
xenotransplantovaných lidských tumorů**

*Photodynamic Therapy of
Xenotransplanted Human Tumours*

MUDr. Karol SUTORIS

Praha, 2015

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze
a
Akademie věd České republiky

Obor: **Experimentální chirurgie**

Předseda oborové rady: **prof. MUDr. Jaroslav ŽIVNÝ, DrSc.**

Školící pracoviště: **Chirurgická klinika 3. LF UK a FNKV, Praha**

Autor: **MUDr. Karol SUTORIS**

Školitel: **prof. MUDr. Robert GÜRLICH, CSc.**

Oponenti: **prof. MUDr. Jaromír MYSLIVEČEK, Ph.D.**
doc. MUDr. Jaromír ŠIMŠA, Ph.D.

S dizertační prací je možno se seznámit na Děkanátě 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze, Oddělení administrativy vědy a výzkumu, 2. patro, místnost č. 230, Ruská 2411/87, 100 00 Praha 10 – Vinohrady (tel.: +420 26710 2230).

OBSAH

1	SOUHRN	1
2	SUMMARY	2
3	ÚVOD.....	3
4	PŘEHLED PROBLEMATIKY	4
5	HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE	6
6	MATERIÁL A METODIKA.....	7
6.1	ZVÍŘECÍ MODEL.....	7
6.2	TKÁŇOVÉ LINIE – XENOTRANSPLANTÁTY LIDSKÝCH TUMORŮ.....	7
6.3	EXPERIMENTÁLNÍ FOTOLENITIZÉRY	7
6.4	SVĚTELNÝ ZDROJ POUŽITÝ V EXPERIMENTU	9
6.5	EXPERIMENTÁLNÍ SKUPINY – USPOŘÁDÁNÍ POKUSU	9
6.6	PDT V EXPERIMENTU.....	9
6.7	HISTOLOGICKÉ ZPRACOVÁNÍ	11
7	STATISTICKÁ ANALÝZA DAT.....	11
8	VÝSLEDKY	12
9	DISKUZE.....	17
10	ZÁVĚR.....	18
11	SEZNAM VYBRANÉ LITERATURY	19
12	PUBLIKAČNÍ ČINNOST	19

1 SOUHRN

V současné době jsou onkologické indikace fotodynamické terapie (photodynamic therapy – PDT) omezeny především na paliaci a jako doplněk konvenčních, zejména onkochirurgických postupů s cílem zlepšení kvality života a prodloužení přežívání nemocných.

V naší studii jsme *in vivo* na nu/nu myších prokázali efektivitu PDT na xenotransplantované lidské linii karcinomu prsu (MDA-MB-231) a dvou biologicky odlišných liniích karcinomu prostaty (LNCaP, PC-3). Klíčovým aspektem v našem experimentu je použití nově vyvinutého fotosenzitizéru – ftalocyaninu hydroxyhlinitého (AlOH-Pc) ve formě lipozomálního gelu určenému k lokotopické aplikaci. Výsledkem je kompletní remise tumorů u 90 % myší se xenoštěpy karcinomu prsu a u 100 % myší s oběma typy karcinomu prostaty. Nový preparát na rozdíl od starších použitých preparátů disponuje minimálním drug-light intervalem, nezpůsobuje fotosenzitivitu a není ani orgánově toxický.

V kontrastu se všemi současnými možnostmi onkologické terapie je PDT schopná selektivní destrukce tumoru se šetrností k ostatním zdravým tkáním. Zdá se být velmi slibným terapeutickým nástrojem pro řešení menších primárních nebo recidivujících a metastazujících karcinomů prsu i prostaty. Vhodnou indikací by pro vynikající anatomickou přístupnost a schopnost zužitkování všech kladů lokotopické aplikace fotosenzitizérů jistě představovaly jejich kožní metastázy.

Klíčová slova:

karcinom prsu, karcinom prostaty, kožní metastáza, fotodynamická terapie, nu/nu myš, xenotransplantace, ftalocyanin, lipozomální fotosenzitizér

2 SUMMARY

In today's clinical practice oncological indications of photodynamic therapy (PDT) are limited primarily to palliative treatment and are used as an adjunct to conventional oncosurgical routines with the aim of improving the quality of life and prolonging patient survival.

The efficacy of experimental PDT on xenotransplanted human tumours has been proven in our *in vivo* study on nu/nu mice. One particular cell line of mammary carcinoma (MDA-MB-231) and two biologically different cell lines of prostate carcinoma (LNCaP, PC-3) were tested. The key aspect of our experiment was the application of newly developed photosensitizer – hydroxy-aluminum phthalocyanine (AlOH-Pc) in the form of liposomal gel designed for locotopical application. Therapy achieved complete remission in 90% of mice with mammary carcinoma xenografts and in 100% of those with prostate carcinoma xenografts. The new photosensitizer, unlike the older ones, has minimal drug-light interval and does not cause photosensitivity or organ toxicity.

In contrast to all contemporary oncological modalities, PDT is fully capable of selective tumour destruction being thrifty and safe to surrounding healthy tissues. Photodynamic therapy seems to be a very promising therapeutic tool especially for the treatment of smaller primary or recurrent and metastatic breast and prostate cancer. Excellent anatomical accessibility of their cutaneous metastases makes it an ideal indication for the application of PDT with locotopical photosensitizer.

Key Words:

breast cancer, prostate cancer, cutaneous metastasis, photodynamic therapy, nu/nu mouse, xenotransplantation, phthalocyanine, liposomal photosensitizer

3 ÚVOD

Terapie malignit se v současné době opírá o čtyři hlavní metody – o terapii chirurgickou, radioterapii, chemoterapii a imunoterapii (Poučková, 2000). Společným cílem onkologické terapie je dosažení zničení nádorových buněk při současném zachování fyziologických funkcí buněk nenádorových, což je zejména v případě chemoterapie a radioterapie velmi problematické (nedostatečná selektivita často nutí k redukci terapeutických dávek) a v případě onkochirurgie při nutnosti zachování radikality operačního výkonu často nemožné. Vedle těchto konvenčních metod onkologické terapie je fotodynamická terapie (PDT) jednou z dalších perspektivních možností protinádorové léčby. Je to druh fotochemoterapie, který kromě zdroje světla a aplikované fotodynamicky aktivní látky – fotosenzitizéru, vyžaduje také přítomnost tkáňového kyslíku (Moriwaki a spol., 2001). Spolupůsobení těchto tří klíčových komponent, jež samy o sobě toxické nejsou a v základním stavu neprojevují žádné biologické efekty, podmiňuje mechanismus účinku PDT.

PDT byla po svém objevu považována za velmi nadějnou metodu, od které byla očekávána revoluce v chirurgii. Od počátku se doufalo, že tato metoda vytlačí klasické chirurgické postupy zejména proto, že představuje „na míru šitou“ onkologickou terapii. Je vysoce specifická a selektivní – umožňuje nejen přesně zasáhnout maligní struktury, ale i diagnostikovat hranice mezi zdravou a patologickou tkání pomocí fluorescenční diagnostiky. Na poli onkologie je PDT vnímána nadále jako metoda poněkud experimentální s řadou nedořešených problémů. Identifikace optimálního fotosenzitizéru je jedním z nich. Požadavky na takovou látku jsou selektivní vylučování nádorovými buňkami, spontánní netoxicity na straně jedné a dostatečný toxický efekt po ozáření světlem na straně druhé. K těmto zásadním požadavkům přistupují i další, mezi které v neposlední

řadě patří i snadná příprava, finanční dostupnost a možnost opakované aplikace v relativně rychlém sledu, nejlépe v ambulantním režimu.

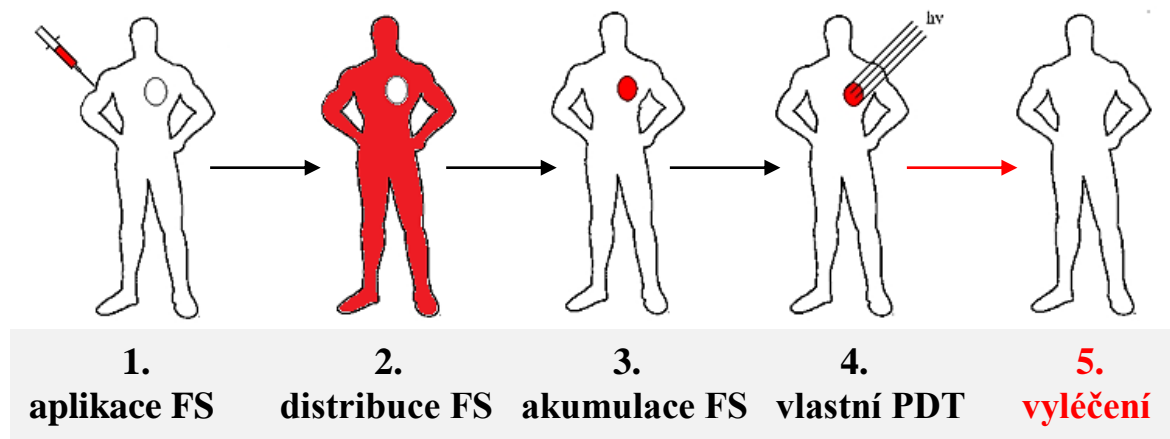
4 PŘEHLED PROBLEMATIKY

Fototerapie využívá světlo k léčbě nemocí. Její podskupinou je fotochemoterapie, která je podmíněna i paralelní aplikací léku. PDT je druh fotochemoterapie, který kromě terapeutické aplikace světla a léku – fotosenzitizéru – vyžaduje také přítomnost kyslíku v cílové tkáni. PDT, jakožto příbuzná laseroterapie, byla zpočátku některými autory označovaná jako terapie fotoradiační (Dougherty a spol., 1978).

PDT je dvoustupňový proces, který je založen na principu fotosenzibilizace či fotoaktivace, tj. na principu selektivní akumulace fotosenzitizéru v tumoru a jeho následném ozáření světelnou energií vhodné vlnové délky (λ): 600–900 nm (Marcus a McIntyre, 2002, Pervaiz a Olivo, 2006). Vlivem absorpce světla o specifické λ dochází ve fotosenzitizéru ke vzniku excitovaných stavů, které v zásadě podléhají dvěma typům deaktivčních reakcí. Buď excitovaná forma fotosenzitizéru reaguje přímo se substrátem za vzniku volných radikálů substrátu (mechanismus účinku I. typu), nebo dochází k transferu energie z fotosenzitizéru na kyslík za vzniku vysoce reaktivní singletové formy kyslíku (mechanismus účinku II. typu, tj. vlastní fotodynamický efekt) (Poučková, 2000). Cytotoxické působení singletového kyslíku a volných radikálů, zvláště pak radikálů lipidických složek buněčných membrán, je příčinou destrukce tumoru (Dolmans a spol., 2003). Oba tyto mechanismy mohou při PDT probíhat paralelně, avšak jejich výsledný relativní terapeutický podíl je závislý od typu a koncentrace fotosenzitizéru, na intratumorózní koncentraci kyslíku a na afinitě fotosenzitizéru

k substrátu (Kolářová, 2005). PDT účinkuje na atomové, molekulární, buněčné a konečně i tkáňové úrovni. Schematicky je princip PDT zobrazen na **Obrázku 1**.

Obrázek 1. Zjednodušené schéma fungování PDT (pozn.: FS – fotosenzitizér)



Destrukční účinek PDT na většinu populace nádorových buněk není závislý na typu tumoru (Stern a spol., 1993). Protinádorový efekt PDT je výsledkem tří vzájemně působících procesů: přímé smrti nádorové buňky (cestou nekrózy, apoptózy a autofagocytózy), poškození cévního zásobení tumoru (Gozuacik a Kimchi, 2004; Yoo a Ha, 2012) a aktivace nespecifických protinádorových imunitních procesů (Mroz a spol., 2011). Role jednotlivých komponent ve výsledné ablacii tumoru jsou proměnlivé – dají se modifikovat podanou dávkou fotosenzitizéru, λ a energií použitého světelného zdroje.

Práce je zaměřena na možnosti PDT dvou nejčastějších hormonálně dependentních malignit vůbec – karcinomu prsu a karcinomu prostaty. Nedávné pokroky v patofyziologii těchto karcinomů prokázaly jejich pozoruhodnou imunofenotypovou podobnost (Risbridger a spol., 2010). Karcinom prsu představuje globálně nejčastější příčinu úmrtí na nádorové onemocnění bez rozdílu pohlaví. Mortalita na karcinom prostaty má dlouhodobě stagnační charakter a na tuto malignitu umírá každý pátý onkologický pacient. Nepříznivost situace nutně vede k analýzám indikací doposud používaných terapeutických modalit a testování modalit nových.

5 HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

Experimentální *in vivo* model do podkoží nu/nu myši xenotransplantovaných lidských tumorů představuje v klinickém pojetí pozdní stadium s kožními metastázami karcinomu prsu i prostaty nebo naopak stadium časně. Formulace vědeckého předpokladu experimentu je následná:

Nulová hypotéza H_0 : **Terapeutická účinnost PDT jako monoterapie xenotransplantovaného lidského karcinomu prsu a karcinomu prostaty u nu/nu myši je < 50 %.**

Alternativní hypotéza H_1 : **Terapeutická účinnost PDT jako monoterapie xenotransplantovaného lidského karcinomu prsu a karcinomu prostaty na modelu nu/nu myši je ≥ 50 %.**

Kromě testování dvou centrálních hypotéz tak z práce vyplynuly další základní otázky a vedlejší problémy, na které bylo nezbytné se zaměřit:

- Bude nově vyvinutý lipozomální gelový preparát s hydrofobním ftalocyaninem hydroxyhlinitým (AlOH-Pc) účinný u PDT karcinomu prsu a karcinomu prostaty? V jakých koncentracích?
- Bude AlOH-Pc dostatečně účinný již po jedné aplikaci?
- Jak se bude lišit efekt PDT od aplikační cesty fotosenzitizéru? Bude efekt podání lokotopického srovnatelný s podáním systémovým?
- Budou ftalocyaniny v porovnání s Metvixem a Photofrinem účinnější?
- Bude 10minutový interval k dosažení účinné hladiny AlOH-Pc v tumoru dostatečný?
- Nebude AlOH-Pc vykazovat známky fotosenzitivity? Nebudou známky poškození zdravých tkání AlOH-Pc?
- Nedojde k regresi nebo úplné remisi tumorů v kontrolních skupinách?
- Mohla by PDT být použita v terapii karcinomu prsu či prostaty u lidí?

6 MATERIÁL A METODIKA

6.1 ZVÍŘECÍ MODEL

Za vhodný experimentální model byly zvoleny samice athymických nu/nu myši věku 6–8 týdnů (18–22 g). Zvířata byla chována izolátorovým systémem ve sterilním laminárním flow boxu při konstantní chovné teplotě 28 °C. Myši byly podestýlány radiačně sterilizovanou jedlovo-smrkovou podestýlkou, krmeny radiačně sterilizovanou dietou a napájeny byly autoklávovanou vodou *ad libitum*.

6.2 TKÁŇOVÉ LINIE – XENOTRANSPLANTÁTY LIDSKÝCH TUMORŮ

Ke xenotransplantaci lidských tumorů na nu/nu myši byly použity 3 tkáňové linie kavkazské rasy. Tkáňová linie MDA-MB-231 představovala v experimentu lidský adenokarcinom prsu; lidský adenokarcinom prostaty zastupovaly tkáňové linie LNCaP – klon FGC a linie PC-3. Linie LNCaP má na rozdíl od PC-3 metastatický potenciál velmi malý. Po kultivaci, namnožení a dosažení počtu 10^6 nádorových buněk (cca 1 mg tkáňové kultury) byly společně s Matrigelem subkutánně implantovány na pravý bok athymické myši. Objem tumoru byl pravidelně měřen a vlastní experiment s PDT začal poté, co došlo k nárůstu tumoru do velikosti 6 mm v průměru, tj. do objemu cca 0,2–0,4 cm³ a plochy cca 2 cm².

6.3 EXPERIMENTÁLNÍ FOTOSENZITIZÉRY

Ve studii účinku PDT na karcinom prsu byl ke srovnání s novým AlOH-Pc v lipozomální gelové formě k lokotopické aplikaci použit komerčně běžně dostupný krém 16% hydrochloridu metylaminolevulátu (Metvix, absorpční maximum: 630 nm). K systémové aplikaci se podával roztok disulfonovaného ftalocyaninu hydroxyhlinitého (Al(OH)S₂-Pc, 675 nm). Dalším preparátem k parenterálnímu podání byl porfimer sodný (Photofrin, 632 nm). Ve studii

s karcinomem prostaty byl použit jenom lipozomální gel AlOH-Pc určen k lokotopické aplikaci. Nově vyrobený a testovaný lipozomální gel s účinnou látkou 85% ftalocyaninu hydroxyhlinitého (AlOH-Pc, 672 nm) byl v experimentu aplikován v různých koncentracích (**Tabulka 1**). Vlastní výroba gelu s lipozomy zfúzovanými s hydrofobními mikročásticemi AlOH-Pc je patentována (Ježek a spol., 2008) a připravuje se procesem fluidizace sterilního izotonického roztoku lecitinu. Konečná průměrná velikost mikrovezikul je 200–300 nm.

Tabulka 1. Experimentální skupiny – uspořádání pokusu

Skupina	Typ	n	Linie	Fotosenzitizér	Koncentrace	Aplikace	Drug-light interval	Foto- protektce Xe	iradiace	
A (2)	pokusná	10	MDA-MB-231	AlOH-Pc	2 mg/ml	loc.	10 min	-	+	
A (3)		10		AlOH-Pc	3 mg/ml	loc.	10 min	-	+	
A		10		AlOH-Pc	4 mg/ml	loc.	10 min	-	+	
B		10		Metvix	0,16 mg/mg	loc.	3 h	+	+	
C		10		Al(OH)S2-Pc	2,5 mg/ml	i. v.	10 min	-	+	
D		10		Photofrin	2,5 mg/ml	i. v.	48 h	+	+	
E		kontrolní		10	AlOH-Pc	4 mg/ml	loc.	-	-	-
F	10		Metvix	0,16 mg/mg	loc.	-	-	-		
G	10		-	-	-	-	-	-		
H	pokusná	8	LNCaP	AlOH-Pc	4,5 mg/ml	loc.	10 min	-	+	
I		8		AlOH-Pc	9 mg/ml	loc.	10 min	-	+	
J		8		AlOH-Pc	18 mg/ml	loc.	10 min	-	+	
K		kontrolní		8	-	-	-	-	-	-
L				8	-	-	-	-	-	+
M	8		AlOH-Pc	18 mg/ml	loc.	-	-	-		
N	pokusná	8	PC-3	AlOH-Pc	2 mg/ml	loc.	10 min	-	+	
O		8		AlOH-Pc	4 mg/ml	loc.	10 min	-	+	
P		8		AlOH-Pc	6 mg/ml	loc.	10 min	-	+	
R		kontrolní		8	-	-	-	-	-	-
S				8	-	-	-	-	-	+
T	8		AlOH-Pc	6 mg/ml	loc.	-	-	-		

6.4 SVĚTELNÝ ZDROJ POUŽITÝ V EXPERIMENTU

Jako zdroj silného světla o velkém světelném toku (0,97 W) byla použita xenonová lampa onkolight 051 (ONL 051), která pracuje v tzv. daleko-červeném spektru 600–700 nm s max. kolem 635 nm a intenzitou záření 200 mW/cm². Celková energie záření představovala 100 J/cm².

6.5 EXPERIMENTÁLNÍ SKUPINY – USPOŘÁDÁNÍ POKUSU

Celkový soubor použitý v našem experimentu tvořilo 186 nu/nu myší (n = 186). Přehledné uspořádání experimentu včetně všech pokusných a kontrolních skupin zvířat je shrnuto v předešlé **Tabulce 1**.

6.6 PDT V EXPERIMENTU

Po dosažení stanovené velikosti xenotransplantovaného tumoru (cca 6 mm v průměru) a rozdělení myší do výše uvedených skupin začal experiment se samotnou PDT. K vyloučení vystresování a pohybu zvířat při cílené aplikaci PDT byly na začátku experimentu všechny myši uvedeny do neuroleptanalgezie. Myším se současně intraperitoneálně aplikoval ketamin a xylazin.

PDT karcinomu prsu

Ke stanovení nejvhodnější terapeutické koncentrace lipozomálního gelu AIOH-Pc pro karcinom prsu se testovaly gely o různé koncentraci: 2, 3 a 4 mg/ml. Každý gel byl lokálně aplikován zevně na tumor v dávce 0,2 ml/tumor a doba jeho působení pod částečně okluzivním ovazem byla 10 min (tzv. drug-light interval). Konečně byl tumor ze vzdálenosti 1 cm ozářen Xe lampou s výše uvedenými parametry. Kolem tumoru byl ozářen i cca 5mm lem zdravé tkáně, zbylá část těla zvířete ozářena nebyla. Délka iradiace trvala přesně 8 min. Efektivita 4 mg/ml AIOH-Pc gelu se srovnávala s krémem Metvix, který byl aplikován dle instrukcí výrobce – 0,4 mg bylo nanášeno lokálně na tumor ve

vrstvě tlusté cca 1 mm. Ozáření světelným zdrojem probíhalo za stejných podmínek, ale až po 3 h od aplikace. Léčeným skupinám se systémovou aplikací se fotosenzitizéry podávaly ve formě izotonických 0,9% roztoků bolusově i. v. do laterální ocasní žíly. Al(OH)S₂-Pc byl podán v dávkovacím schématu 2,5 mg/kg tělesné hmotnosti, doba působení před ozářením činila opět 10 min. Dávka Photofrinu byla 2 mg/kg tělesné hmotnosti a jeho doba působení až 48 h. Způsob světelné iradiace byl identický. Skupiny myši léčené Photofrinem i Metvixem byly v době působení fotosenzitizérů (48 h nebo 3 h) chráněny před přímým slunečním světlem kvůli riziku fotosenzitivity. Skupiny s ftalocyaninovými preparáty byly přímému slunečnímu světlu volně vystaveny. Všechny skupiny byly pravidelně sledovány. Po dobu následujících 30 dnů se mikrometrem zaznamenávala plocha nekrotického tumoru a dopočítával se objem tumoru.

Kontrolní skupiny nu/nu myši v pokusu PDT karcinomu prsu byly tři. Dvě skupiny obdržely pouze lokálně podaný fotosenzitizér – lipozomální gel AlOH-Pc v účinné koncentraci 4 mg/ml nebo Metvix bez iradiace světlem. Třetí kontrolní skupina představovala tzv. čistou kontrolu – myši se xenoštěpy tumoru nebyly nijak terapeuticky intervenovány, hodnotil se růst karcinomu na živém zvířecím modelu. Poslední (30.) den pokusu byla všechny experimentální zvířata usmrceny metodou cervikální dislokace.

PDT karcinomu prostaty

Stejná metodika se použila i v PDT obou buněčných podtypů karcinomu prostaty. K určení optimální terapeutické koncentrace lipozomálního gelu AlOH-Pc pro karcinom prostaty a porovnání účinnosti na jeho jednotlivé tkáňové linie se zkoumaly gely o různé koncentraci: 4,5, 9 a 18 mg/ml u linie LNCaP a 2, 4, 6 mg/ml u linie PC-3. Dávkování aplikovaných lipozomálních gelů s ftalocyaninem na povrch každého tumoru se od pokusu s karcinomem prsu

nelišilo, stejně jako způsob aplikace světelné iradiace, nulová fotoprotekce, délka trvání experimentu s harmonogramem výstupných měření objemů tumorů.

Charakteristika kontrolních skupin byla v pokusu PDT karcinomu prostaty mírně odlišná. Kromě dvou skupin čistých kontrol (každá pro danou linii) dostaly další dvě skupiny bez světelného terapeutického působení jen lokálně aplikovaný lipozomální gel AlOH-Pc v koncentraci 18 mg/ml u LNCaP a 6 mg/ml PC-3. Zbylé 2 kontroly se xenoštěpy linie LNCaP i PC-3 podstoupily jen ozáření Xe lampou, ale nedostaly žádný fotosenzitizér.

6.7 HISTOLOGICKÉ ZPRACOVÁNÍ

Nekropsie jizevnaté tkáně u myší s úspěšnou PDT a oblasti tumoru u myší s neúspěšnou PDT a kontrolních posloužila k objektivizaci efektivity terapie. Po standardním zpracování vzorků bylo použito barvení hematoxylin-eosinem (HE) v Gillově modifikaci. Histopatologické vyšetření jater, ledvin, srdce, tenkého střeva, plic a kosterní svaloviny zas sloužilo k vyloučení případného poškození vnitřních orgánů celým procesem PDT, chemickou sloučeninou testovaného fotosenzitizéru nebo pouhým světelným ozářením.

7 STATISTICKÁ ANALÝZA DAT

Provedený laboratorní experiment je typově preklinická metodologicko-intervenční analytická studie s kvantitativním výzkumem. Byla stanovena nulová hypotéza H_0 a alternativní hypotéza H_1 a tyto hypotézy byly statisticky testovány. Statistická signifikance, tj. p-hodnota $< 0,001$ byla interpretována jako statisticky významný výsledek, zamítající nulovou hypotézu H_0 na hladině významnosti $\alpha = 0,01$. 1% pravděpodobnost falešné positivity byla i přes relativně malý rozsah rozptylů plně vyhovující. Metody popisné statistiky (aritmetický průměr, standardní – směrodatná odchylka, medián, rozpětí a

relativní četnosti) byly použity pro charakteristiky souborů při statistickém zpracování výsledků.

Před vlastní analýzou dat byla otestována homogenita výchozích podmínek metodou jednofaktorové analýzy rozptylu (analysis of variance – ANOVA). Metodou ANOVA se testovaly i konečné stavy všech kontrolních skupin. Smyslem tohoto parametrického testu bylo vyloučit případ, kdy v jedné ze skupin budou výchozí podmínky charakterizované jako objem tumoru výrazně odlišné od ostatních skupin.

Na konci pokusu byl vypočten rozsah celkového zpomalení nádorového růstu (total growth inhibition – *TGI*) podle vzorce: $\% TGI = 1 - (V_E / V_K) \times 100$. V_E představuje průměrný objem tumoru v léčené pokusné skupině a V_K průměrný objem tumoru v kontrolní – neléčené skupině. Tyto výsledky jsme zhodnotily nepárovým oboustranným Studentovým t-testem. Parciální odpověď na protinádorovou terapii je u experimentálních zvířat definována jako $TGI > 50 \%$ (ale $< 100 \%$) počátečního objemu tumoru (v 0. den). Kompletní odpověď znamená $TGI = 100 \%$, kdy je objem tumoru již neměřitelný (v kterýkoliv den experimentu). Pro pokusy s monoterapií je hraniční účinnost stanovena jako kontinuální $TGI \geq 50 \%$ po dobu nejméně 1 doubling time tumoru kdykoliv po zahájení terapie. Softwarem použitým v práci byl statistický program IBM SPSS Statistics a programovací jazyk R Development Core Team.

8 VÝSLEDKY

Nu/nu myši reagovaly na PDT poměrně rychle. V intervenčních experimentálních skupinách byly u zvířat první známky nekrózy zaznamenány již 24 h po ozáření. 7. den experimentu byla u léčených skupin patrná téměř kompletní regrese objemů tumorů s makroskopickou demarkací nekróz.

V případě úspěšné PDT byla makroskopickým výsledkem jemná oploštěná jizva krytá epitelem (**Obrázek 2**). V mikroskopickém nálezu dominovalo výrazné zmnožení plazmocytů s příměsí mastocytů v řídkém prosáknutém kolagenním vazivu; nádorové změny a přítomnost maligních buněk pozorovány nebyly. Rozdíl v histologickém obrazu čerstvé jizevnaté tkáně mezi skupinami léčených různým typem fotosenzitizéru pozorován také nebyl.

Obrázek 2. Makroskopický výsledek úspěšné (vlevo) a neúspěšné PDT (vpravo)

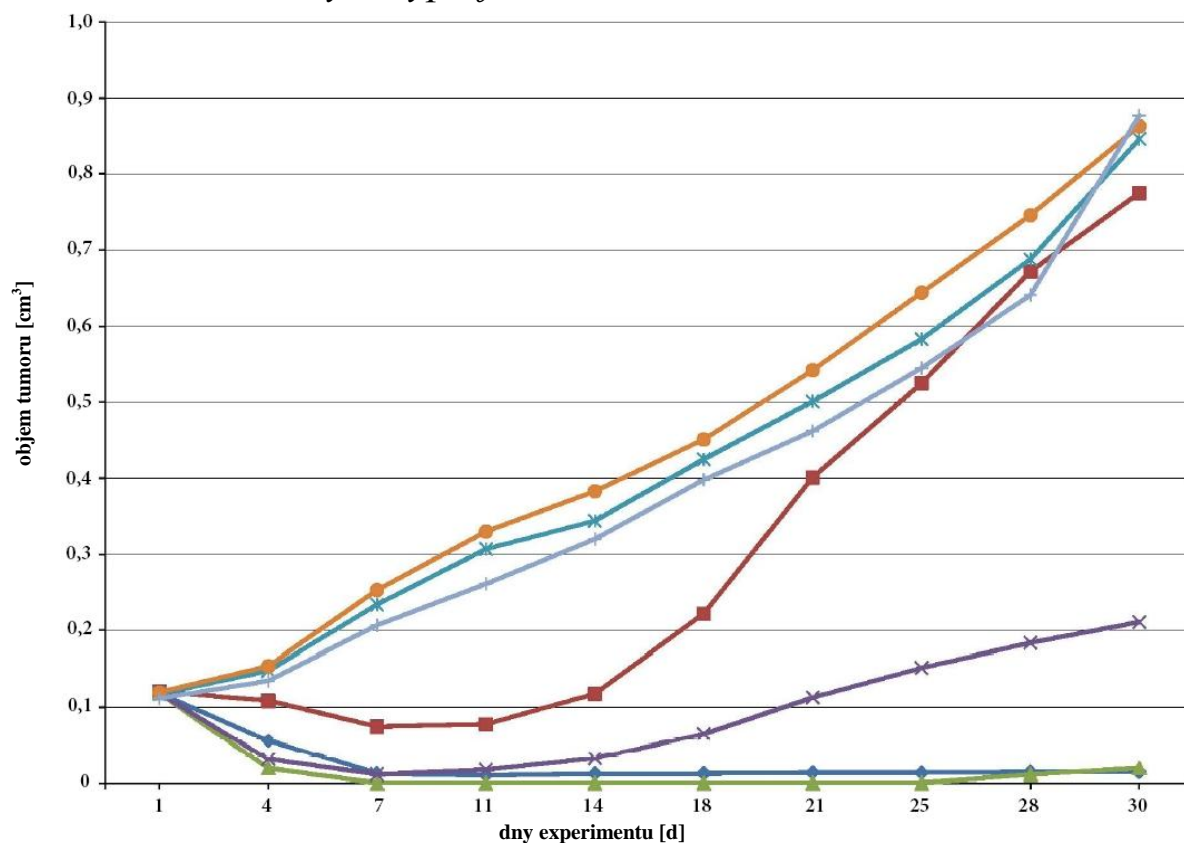


Ve všech kontrolních skupinách tumor naopak vždy rostl a mikroskopicky byly nádorové buňky posléze prokázány. Stejný nálezn byl i u myši s relapsem po neúspěšné PDT, kde u léčených skupin navíc vlivem terapie docházelo k centrální nekróze a exulceraci implantovaných tumorů – bez ohledu na jejich histologický původ (**Obrázek 2**). Mikroskopický obraz po HE barvení byl u myši všech kontrol a u případů selhané PDT stejný. Tumory byly jen lehce regresivně změněné, uchovávali si solidní uspořádání a rostly infiltrativně. Lymfangioinvaze a perineurální propagace byly vyjádřené víc u tkáňové linie LNCaP. U myši čistých kontrol byla centrální nekrotizace tumoru patrná víc a byla doprovázena rozsáhlou reaktivní kulatobuněčnou celulizací (lymfocyty a plazmocyty). Vitální nádorová tkáň se nacházela převážně v okrajových částech léze a hrubě orientačně zajímala cca 30–70 % celé tumorozní masy.

Vzhledem k faktu, že se jednalo o tumory uložené subkutánně, tak s nimi myši dobře přežívaly i při konečné téměř 9násobné velikosti tumorů původně xenotransplantovaných. Celý experiment se obešel bez předčasného úhynu myší.

Systémově podaný ftalocyanin (Al(OH)S2-Pc) oproti lokotopicky podanému AlOH-Pc v pokusu na karcinomu prsu sice vykazoval rychlejší nástup účinku, ale od 28. dne byla jejich efektivita identická – zcela kurabilní. Malá účinnost komerčně dostupného Metvixu i Photofrinu oproti testovaným ftalocyaninovým preparátům u PDT karcinomu prsu je zobrazena na **Grafu 1**.

Graf 1. Účinnost různých typů fotosenzitizérů v PDT linie MDA-MB-231



Pokusné skupiny:

- ◆ AlOH-Pc 4 mg/ml gel loc. + Xe iradiace
- Metvix 0,16 mg/mg crm. loc. + Xe iradiace
- ▲ Al(OH)S2-Pc plv. sol. i. v. + Xe iradiace
- × Photofrin 2,5 mg/ml plv. sol. i. v. + Xe iradiace

Kontrolní skupiny:

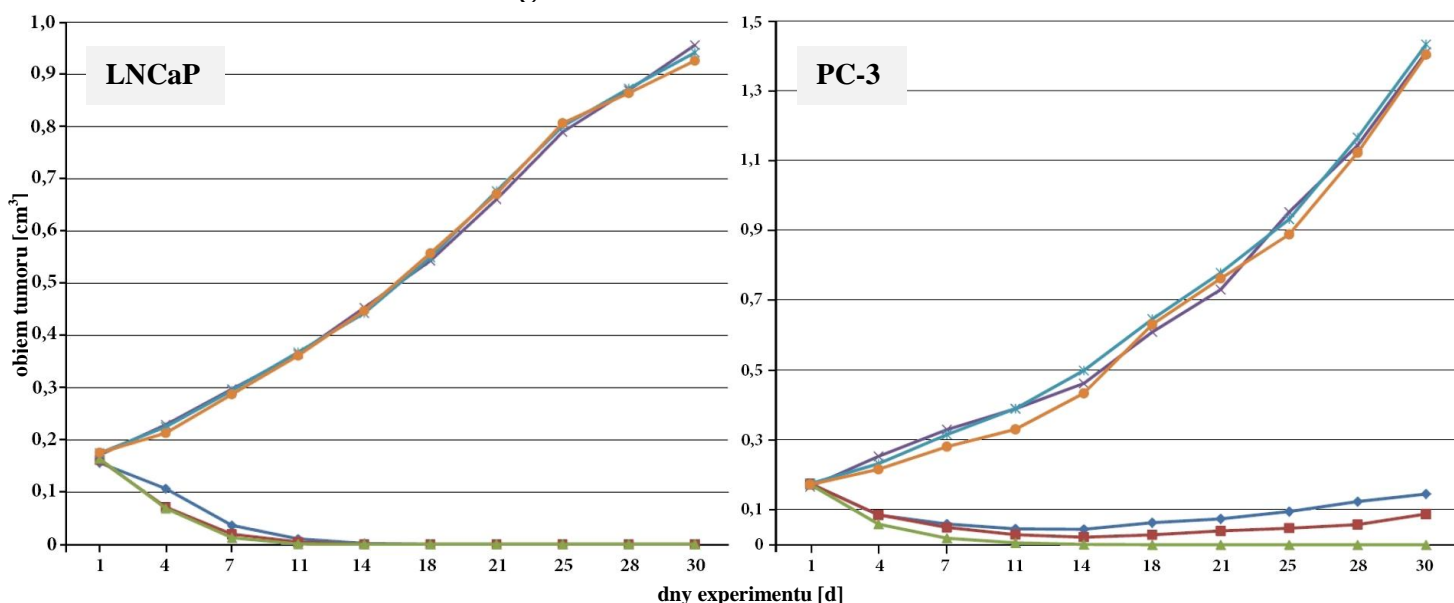
- ✱ AlOH-Pc 4 mg/ml gel loc. bez iradiace
- Metvix 0,16 mg/mg crm. loc. bez iradiace
- + bez fotosenzitizéru, bez iradiace

V pokusech se tak plně osvědčil potenciál nově vyvinutého fotosenzitizéru z pomezí II. a III. generace – AlOH-Pc podávaného lokotopicky ve formě

lipozomálního gelu. Jedinečnost nově zkoumaného preparátu v porovnání s jinými, již certifikovanými a hromadně vyráběnými, léčivými přípravky dále spočívá v extrémně krátké době nutného preradiačního působení (drug-light interval: 10 min) za zachování výtečných protinádorových účinků, rychlé eliminaci a bezproblémové snášenlivosti zvířecím modelem – bez náznaků fotosenzitivity a bez známek subakutní orgánové toxicity nebo kancerogenity.

Terapeutického efektu bylo dosaženo již jedním cyklem terapie, tj. pouze jednou aplikací fotosenzitizéru. Pro PDT xenotransplantovaného lidského karcinomu prsu linie MDA-MB-231 byla neúčinnější dávka 4 mg/ml AIOH-Pc, která způsobila celkové zpomalení nádorového růstu v 98,4 % a vyléčila tak 90 % myší. Lipozomální gel AIOH-Pc prokázal slibnou účinnost i proti dvěma liniím xenotransplantovaného lidského karcinomu prostaty (**Graf 2**).

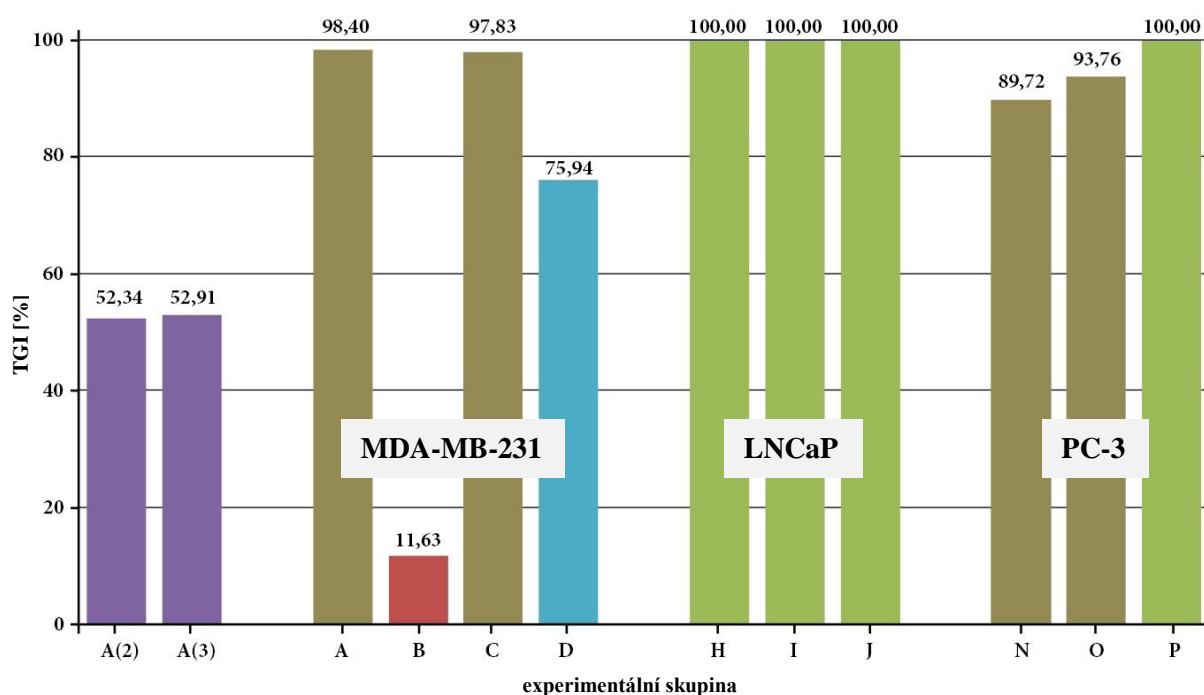
Graf 2. Účinnost AIOH-Pc gelu v PDT linie LNCaP a PC-3



Pokusné skupiny: LNCaP		PC-3	
◆	AIOH-Pc 4,5 mg/ml gel loc. + Xe iradiace	■	AIOH-Pc 2 mg/ml gel loc. + Xe iradiace
■	AIOH-Pc 9 mg/ml gel loc. + Xe iradiace	▲	AIOH-Pc 4 mg/ml gel loc. + Xe iradiace
▲	AIOH-Pc 18 mg/ml gel loc. + Xe iradiace	●	AIOH-Pc 6 mg/ml gel loc. + Xe iradiace
Kontrolní skupiny: LNCaP		PC-3	
×	bez fotosenzitizéru, bez iradiace	×	bez fotosenzitizéru, bez iradiace
✕	bez fotosenzitizéru, se Xe iradiací	✕	bez fotosenzitizéru, se Xe iradiací
●	AIOH-Pc 18 mg/ml gel loc., bez iradiace	●	AIOH-Pc 6 mg/ml gel loc., bez iradiace

V případě experimentální PDT biologicky méně agresivní linie LNCaP se osvědčilo dávkování 4,5 mg/ml se 100% nádorovou inhibicí i stejným zastoupení remisí. U agresivnější formy karcinomu prostaty – tkáňové linie PC-3 – byla dostačující kurativní koncentrace zmiňovaného fotosenzitizéru 6 mg/ml, díky které se celkový růst tumorů zpomalil také 100%, a všechny myši byly na konci experimentu úspěšně vyléčeny. Jen samotné podání fotosenzitizéru bez ozáření nebo samotné ozáření světlem vhodné charakteristiky bez použití fotosenzitizéru nemá žádný terapeutický efekt – fotodynamická terapie je efektivní výhradně v kombinaci těchto kroků.

Graf 3. Celkové zpomalení nádorového růstu po PDT v experimentu



Graf 3 sumarizuje výsledky našeho experimentu – zamítá nulovou hypotézu H_0 a akceptuje alternativní hypotézu H_1 . **PDT se v experimentu prokázala jako účinná metoda monoterapie xenotransplantovaných lidských tumorů, konkrétně karcinomu prsu a karcinomu prostaty u nu/nu myši, ve více než 50 %.** Vyjádřením terapeutické účinnosti je procentuální celkové zpomalení nádorového růstu (% TGI) po experimentální PDT, jež při dodržení optimálního aplikačního schématu pro lokotopické použití

ftalocyaninového gelu dosahuje 98,4% TGI u karcinomu prsu a 100% TGI u obou tkáňových linií karcinomu prostaty.

9 DISKUZE

Náš experiment byl částečně limitován použitím světelného zdroje s relativně rozptýleným spektrem. Domníváme se, že použití zdroje s nastavitelnou operační λ , tj. vždy pro daný typ fotosenzitizéru jinou, „na míru šitou“ vlnovou délkou by efektivitu PDT možná zlepšilo. Úplně ideálním by pro tento účel byl diodový laser s jednou vlnovou délkou nebo draží, ale univerzálnější diodový laser laditelný.

I když otázka účinnosti metody po jedné aplikaci bývá většinou sporná, nic na situaci nemění, že při potenciálním klinickém využití našich poznatků by nemocní těžili z biologicky bezpečné, aplikačně nenáročné a časově komfortní terapie s možností bezproblémového opakování PDT cyklu. Drug-light interval pouhých 10 min s kompletní odpovědí na terapii u zvířecích modelů se v současné literatuře zatím jeví v porovnání s komerčně dostupnými přípravky jako snadno nepřekonatelný (Nekvasil a spol., 2007). Dobu 4–6 h mezi aplikací fotosenzitizéru a ozářením (např. při metvixové PDT keratózy a bazaliomů) už pacienti označili za nevyhovující. Při úvaze o jednorázovém podání fotosenzitizéru je za dobu 3 h teoreticky možno provést až 18 cyklů PDT (18 rozličných pacientů nebo variace mnoha opakování PDT u několika pacientů) s AIOH-Pc, kdežto např. s Metvixem pouze cyklus jeden (1 pacient). Pozitivní časový faktor doby minimálního působení fotosenzitizéru před ozářením světlem je velkou výhodou pro nemocné – za stejnou dobu může být vedení terapie mnohem agresivnější. Pokles časové náročnosti terapie společně se snížením periterapeutické morbiditity tak v konečném důsledku znamenají levnější a

efektivnější variantu pro pacienta i celkově pro zdravotní systém. Takto aranžovaná PDT by mohla být metodou volby k odstranění tumorů s rychlou progresí. Karcinom prsu i karcinom prostaty tuhle charakteristiku splňují.

10 ZÁVĚR

V experimentu byla prokázána vysoká efektivita jednoho cyklu PDT za použití lipozomálního ftalocyaninového gelu v terapii xenotransplantovaných lidských karcinomů prsu a prostaty u athymických myší. Při dodržení optimálního dávkování vedla tato terapie k remisi ve většině případů (90–100 %), a to bez ohledu na typ malignity. Při zvažování využití takto aranžované PDT v klinické praxi by její velkou výhodou představoval prakticky zanedbatelný drug-light interval. Další výhodou přípravků ftalocyaninové řady je jasně definovaná chemická struktura, což se obecně o hematoporfyrinových derivátech, kde často preparáty sestávají až ze 40 různých substancí, říct nedá.

Oproti klasickým onkologickým modalitám má PDT mnoho výhod: zanedbatelné vedlejší účinky, nízká úroveň periterapeutických komplikací, vyšší kvalitu života pacienta bez nutnosti hospitalizace, možnost opakování terapie, eventualita spojení fluorescenční diagnostiky a samotné terapie do jednoho kroku – to vše za nižších finančních nákladů v porovnání s chemo- a radioterapií. Z vlastní charakteristiky PDT dále plyne široké spektrum jejího použití, miniinvazivita spojená s dobrým hojením, minimální pooperační bolestivostí a výborným estetickým efektem, nízká systémová toxicita, zaručený a vědecky ověřený komplexní účinek na molekulární, buněčné i tkáňové úrovni. Prospěšnost metody je ještě podložena žádnou nebo minimální krevní ztrátou, bez potřeby celkové anestezie (max. lokální anestezie/analgosedace) a konečně tím nejdůležitějším – rychlým efektem terapie.

11 SEZNAM VYBRANÉ LITERATURY

1. Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK. *Photodynamic therapy for cancer*. Nat Rev Cancer. **2003**; 3:380-387.
2. Dougherty TJ, Kaufman JE, Goldfarb A, Weishaupt KR, Boyle D, Mittleman A. *Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors*. Cancer Res. **1978**; 38(8):2628-2635.
3. Gozuacik D, Kimchi A. *Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism*. Oncogene. **2004**; 23(16):2891-2906.
4. Ježek P, Nekvasil M, Poučková P. *Liposomální gelový ftalocyaninový preparát pro fotodynamickou terapii nádorových onemocnění a způsob jeho přípravy*. Česká republika. Patentový spis CZ 298978 B6. 26. 3. **2008**.
5. Kolářová H. *Fotodynamická terapie*. In: Kuna P, Navrátil L. *Klinická radiobiologie*. Praha: Manus, **2005**; 171-175. ISBN 978-80-86571-09-02.
6. Marcus SL, McIntyre WR. *Photodynamic therapy systems and applications*. Expert Opin Emerg Drugs. **2002**; 7(2):321-334.
7. Moriwaki SI, Misawa J, Yoshinari Y, Yamada I, Takigawa M, Tokura Y. *Analysis of photosensitivity in Japanese cancer-bearing patients receiving photodynamic therapy with porfimer sodium (Photofrin)*. Photodermatol Photoimmunol Photomed. **2001**; 17(5):241-243.
8. Mroz P, Hashmi JT, Huang YY, Lange N, Hamblin MR. *Stimulation of antitumor immunity by photodynamic therapy*. Expert Rev Clin Immunol. **2011**; 7:75-91.
9. Nekvasil M, Zadinová M, Tahotná L, Žáčková M, Poučková P, Ježek P. *Optimum modality for photodynamic therapy of tumors: gels containing liposomes with hydrophobic photosensitizers*. Drug Dev Res. **2007**; 68(5):235-252.
10. Pervaiz S, Olivo M. *Art and science of photodynamic therapy*. Clin Exp Pharmacol Physiol. **2006**; 33(5-6):551-556.
11. Poučková P. *Fotodynamická terapie maligních nádorů*. In: Navrátil L. *Moderní fototerapie a laseroterapie*. Praha: Manus, **2000**; 176-182. ISBN 978-80-902318-3-7.
12. Risbridger GP, Davis ID, Birrell SN, Tilley WD. *Breast and prostate cancer: more similar than different*. Nat Rev Cancer. **2010**; 10(3):205-212.
13. Stern SJ, Craig J, Flock S, Montague D, Waner M, Jacques S. *Tumor specific response to photodynamic therapy*. Lasers Surg Med. **1993**; 13(4):434-439.
14. Yoo JO, Ha KS. *New insights into the mechanisms for photodynamic therapy – induced cancer cell death*. Int Rev Cell Mol Biol. **2012**; 295:139-174.

12 PUBLIKAČNÍ ČINNOST

Publikace – články se vztahem k dizertaci – s IF

1. **Sutoris K**, Větvička D, Horák L, Beneš J, Nekvasil M, Ježek P, Zadinová M, Poučková P. *Evaluation of topical photodynamic therapy of mammary carcinoma with experimental gel containing liposomal hydroxyl-aluminium phthalocyanine*. Anticancer Res. **2012**; 32(9):3769-3774. **IF 1,713**
2. **Sutoris K**, Rakušan J, Karásková M, Mattová J, Beneš J, Nekvasil M, Ježek P, Zadinová M, Poučková P, Větvička D. *Novel topical photodynamic therapy of prostate carcinoma using hydroxy-aluminum phthalocyanine entrapped in liposomes*. Anticancer Res. **2013**; 33(4):1563-1568. **IF 1,872**

Publikace – články se vztahem k dizertaci – bez IF

3. **Sutoris K.** *Photodynamic therapy of a human breast carcinoma cell line – new experience.* Folia Medica Cassoviensia. **2009**; 64(1):438.
4. **Sutoris K.** *A new liposomal product containing phthalocyanine for topical application of malignant tumour.* Čes-slov Derm. **2009**; 84(4):221.

Publikace – články bez vztahu k dizertaci – bez IF

5. **Sutoris K,** Mráček M, Rohan Z, Bergmann P, Šimša J. *Ileocékalna aktinomykóza – kazuistika.* Rozhl Chir. **2013**; 92(7):395-399.
6. Levý M, Herdegen P, **Sutoris K,** Šimša J. *Divertikulární choroba tračníku – chirurgická léčba (Postgraduální vzdělávání).* Rozhl Chir. **2013**; 92(7):408-413.

Publikace – kapitoly v knize

1. **Sutoris K.** *Onemocnění sleziny.* In: Šimša J. Lexikon operačních výkonů. Praha: Maxdorf, **2015**; titul v přípravě.

Přednášky

1. **Sutoris K.** *Photodynamic therapy of a human breast carcinoma cell line – new experience.* 1st International Student Medical Congress in Košice, Košice, Slovensko, 23. 6. **2009**.
2. **Sutoris K,** Herdegen P. *Perforovaná divertikulitida sigmatu – současné možnosti léčby.* Pracovní den Koloproktologické sekce ČCHS ČLS JEP, Praha, 7. 2. **2013**.
3. **Sutoris K.** *Fotodynamická terapia versus karcinóm prsníka – naše preklinické skúsenosti.* Oddelenský seminár s diskusiou – Chirurgické oddelenie NÚTPCHaHCH vo Vyšných Hágoch, Vysoké Tatry, Slovensko, 10. 8. **2009**.
4. **Sutoris K,** Šmejkal P. *Cholecystektomie – co nového?* Odborný nemocniční seminář pro lékaře – Nemocnice Říčany, Říčany, 18. 3. **2013**.
5. Šmejkal P, **Sutoris K.** *Benigní onemocnění jícnu.* Odborný nemocniční seminář pro lékaře – Nemocnice Říčany, Říčany, 18. 3. **2013**.
6. **Sutoris K.** *Mimicking the tumor of the small intestine.* Open Medical Institute Seminar – Trauma & Emergency Surgery, Salzburg, Rakousko, 13. 1. **2015**.

Postery

1. **Sutoris K,** Horák L, Zadinová M, Ježek P, Nekvasil M, Rakušan J, Karásková M, Hloušková D, Bennett RJ, Poučková P. *A new liposomal product containing phthalocyanine for topical application of malignant tumour PDT.* 10th International Congress of Dermatology in Prague, Praha, 20.–24. 5. **2009**.
2. **Sutoris K,** Prochoda V, Rosová B, Levý M, Šimša J. *Solitary fibrous tumor of the greater omentum – a rare experience.* 24th World Congress of the International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists in Vienna, Vídeň, Rakousko, 5.–7 . 12. **2014**.

