

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

FOTOTERMÁLNÍ TERAPIE V LÉČBĚ NÁDORŮ

Bakalářská práce

Vedoucí: RNDr. Miloslav Macháček, Ph.D.

Hradec Králové 2019

Adéla Slámová

Chtěla bych poděkovat vedoucímu své bakalářské práce RNDr. Miloslavu Macháčkovi, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a cenné připomínky při zpracování této práce. Díky patří také mé rodině a přátelům za pomoc a podporu v průběhu celého studia.

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

V Hradci Králové dne

Obsah

1	ÚVOD.....	5
2	SEZNAM ZKRATEK.....	6
3	TEORETICKÁ ČÁST.....	7
3.1	ZÁKLADNÍ PRINCIP A POPIS FOTOTERMÁLNÍ TERAPIE.....	8
3.2	MECHANISMUS ÚČINKU PTT A BUNĚČNÉ SMRTI INDUKOVANÉ PTT.....	9
3.3	LASEROVÉ ZÁŘENÍ	11
3.4	NANOTECHNOLOGIE V MEDICÍNĚ, NANOČÁSTICE PRO PTT 12	
3.4.1	Nanoterapeutika.....	12
3.4.2	Zlaté nanočástice	15
3.4.3	Další nanomateriály pro PTT (kromě zlatých nanočástic)	16
3.4.4	Porfyrinové nanostruktury	16
3.5	PŘÍSTUPY A POUŽITÍ PTT V KOMBINACI S DALŠÍ TERAPIÍ ...	18
3.5.1	Metastatické nádory.....	18
3.5.2	PTT konjugovaná s chemoterapií.....	18
3.5.3	PTT kombinovaná s imunoterapií	19
3.5.4	PTT a regulace genů	20
3.5.5	PTT řízená zobrazováním	21
4	ZÁVĚR.....	22
5	LITERATURA.....	23

1 ÚVOD

„Fototermální terapie v léčbě nádorů“ jsem si jako téma bakalářské práce vybrala, protože mě zaujala možnost nových přístupů v léčbě nádorových onemocnění. Po celém světě je snaha vytvářet inovativní léčebné, ale i diagnostické metody. Jedním z nich je i fototermální terapie (PTT). Její výhodou je nízká invazivita, výrazné cílení na maligní tkáň, a tak i snížení vedlejších účinků. Využívá schopnosti fotosensitizeru (PS) přeměnit absorbované světlo na teplo, které ničí buňky nádorové tkáně.

Ve své práci představuji princip PTT, jednotlivé součásti, užívané PS a také přístupy a použití PPT v jednotlivých léčebných postupech. Zmiňuji také výhodné použití nanočástic nejen jako PS, ale i jejich další aplikaci v medicíně jako možný prostředek terapie i diagnostiky.

PTT je stále zkoumána dál, jsou vyvíjeny nové modifikované nanomateriály pro PTT a diskutovány také konkrétní možnosti kombinování této terapie se standardními léčebnými postupy. V preklinických testech prokazovala dobré výsledky a jeví se tak velice slibnou.

2 SEZNAM ZKRATEK

CAR-T	terapie založená na T-lymfocytech upravených chimerními antigenními receptory (CAR)
CTL	cytotoxický T-lymfocyt
CTLA4	cytotoxický T-lymfocytární antigen
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
DC	dendritická buňka
FDA	<i>U. S. Food and Drug Administration</i>
ICG	indokyanová zeleň
IL-10	interleukin 10
MDR	rezistence na více léků (<i>multi-drug resistance</i>)
MMP-2/9	metaloproteinasa 2/9
MRTI	magnetická rezonance teplotního zobrazování
NIR	blízké infračervené záření (<i>near-infrared</i>)
NK	nukleové kyseliny
PA	fotoakustické zobrazování
PDT	fotodynamická terapie
PEG	polyethylenglykol
PLGA	poly(laktid-co-glykolid)
PS	fotosenzitizér
PTT	fototermální terapie
R837	agonista Toll-like-receptoru-7
siRNA	malá interferující RNA (<i>small interfering RNA</i>)
TGF- β (1)	transformující růstový faktor β (<i>transforming growth factor beta</i>)
Treg	T regulační buňka
VEGF	růstový faktor cévního endotelu (<i>vascular endothelial growth factor</i>)

3 TEORETICKÁ ČÁST

Již v 19. století se objevují první počátky terapie nádorů teplem („hypertermie“), kdy u pacientů s horečkou rakovina částečně ustoupila. Postupný vývoj v této oblasti se zaměřil na rozvoj snahy o zahřívání kontrolované a cílené. Spolu s lepším pochopením mechanismu buněčné smrti způsobené nadměrným teplem došlo k dalšímu intenzivnímu vývoji a hledání možných přístupů (Chen a Cai 2015).

Nově vyvíjené léčebné postupy by měly splňovat cíle, mezi které patří: ničení primárního nádoru s vysokou specifitou a nízkou toxicitou vůči zdravé tkáni, schopnost ablace metastází a předcházení recidivě choroby. Současné standardní terapeutické postupy, jako jsou chirurgické odstranění, radioterapie či chemoterapie, zcela nesplňují výše zmíněné cíle, nicméně nově objevená a stále se rozvíjející PTT se v tomto jeví jako velice slibná (Chen a kol. 2016).

3.1 ZÁKLADNÍ PRINCIP A POPIS FOTOTERMÁLNÍ TERAPIE

Základním principem PTT je působení laserového záření (v blízké infračervené oblasti; NIR) na PS, neboli fotoabsorbent, tj. látku schopnou absorbovat světlo o vhodné vlnové délce (zde právě v NIR oblasti).

Tento základní princip je společný i s terapií fotodynamickou (PDT), která se vedle PTT řadí mezi fototerapie. Obě terapie se však zásadně odlišují v mechanismu usmrcení buněk. Při PDT nedochází k produkci tepla, specifické pro PTT, ale jsou při ní vytvářeny vysoce reaktivní kyslíkové radikály působící toxicky na buňky a ničící tkáň, na kterou se v terapii cílí. Účinek PDT je ale limitován v léčbě hypoxických nádorů. Tato terapie je totiž závislá na množství kyslíku v tkáni, který je nezbytný pro její správný účinek. PTT závislost na množství kyslíku v nádorech a sníženou účinnost při jeho nedostatku nevykazuje, a je tedy v těchto případech vhodnou alternativou (Zoul a kol. 2016, Jin a kol. 2013).

PTT využívá schopnosti fotoabsorbentu efektivně převést absorbovanou světelnou energii na energii tepelnou (Zoul a kol. 2016). Tímto způsobem zahřeje tkáň na 50 – 55°C, což je teplota, která iniciuje buněčnou smrt (Jin a kol. 2013). Výsledná teplota, stejně jako i samotná účinnost celé terapie, závisí na velikosti a tvaru fotoabsorbentů (nanočástic), na materiálových vlastnostech i na výkonu laseru (Groses a Barchiesi 2018). Jako fotoabsorbenty jsou v PTT užívané především nanomateriály, předně pak zlaté nanočástice. Díky dodání fotoabsorbentu přímo do postižené tkáně a cílené produkci tepla působí tento zničující efekt především na nádorové buňky (v místě terapie) a nepostihuje buňky okolní zdravé tkáně. Je tedy terapií značně cílenou (Chen a Cai 2015).

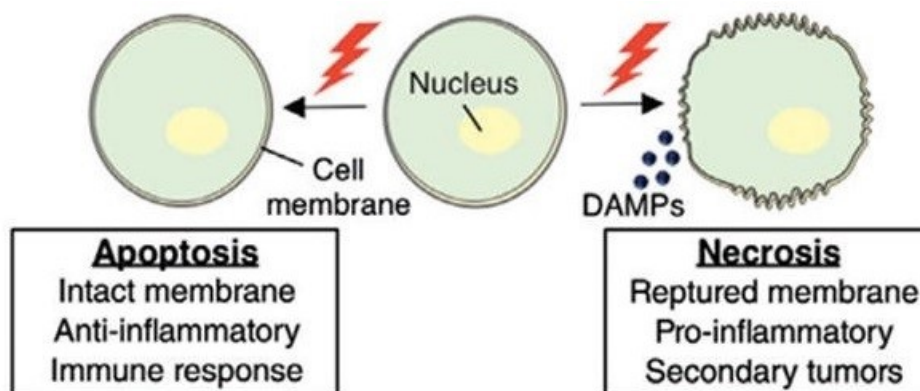
3.2 MECHANISMUS ÚČINKU PTT A BUNĚČNÉ SMRTI INDUKOVANÉ PTT

PTT jako fototermální technika má za cíl co nejvíce využít selektivní fototermolýzu nádorových buněk obsahujících nanočástici. Ta je do buněk dodávána přímou injekcí, difúzí nebo může být využito protilátek pro selektivní zacílení (Zharov a kol. 2004). Po jejich intravenózním podání však hrozí, že se rychle potáhnou sérovými proteiny a budou rozpoznány fagocytujícím retikuloendoteliálním systémem a odstraněny z krve. Tomuto lze zabránit tím, že je na jejich povrch vedle činidel a dalších terapeutických molekul navázáno pasivační činidlo, především polyethylenglykol (PEG). Vrstva tohoto činidla prodlužuje cirkulaci nanočástic a stávají se zároveň biokompatibilní.

Buňky s nanočásticí uvnitř jsou ozařovány laserovými pulsy záření. Elektrony fotoabsorbentů (nanočástic) projdou synchronizovanou oscilací (Riley a Day 2017). Část poskytnutého elektromagnetického záření úspěšně absorbují a následně převedou a vyloučí ve formě tepla (Chen a Cai 2015).

Mezi omezení PTT patří schopnost zachování okolních zdravých buněk. Jedním ze sledovaných parametrů, které je tedy třeba zohlednit, je charakteristická délka termální ablace. Ukazuje míru prostorového rozšíření zahřátí kolem nanočástice uložené v buňkách. Odpovídá vzdálenosti k částici, u které byla přesáhnutá prahová hodnota pro ablaci. Tento parametr je ovlivňován velikostí nanočástic a výkonu použitého laseru. Větší agregáty nanočástic mají větší účinek, potenciálně však představují větší riziko pro okolní tkáň. U PTT by měla být velikost částic a parametry laseru takové, aby byla tepelná ablace nádorových buněk účinná, zatímco buňky v okolí budou ušetřeny termální reakcí a zůstane v nich zachována původní teplota (Grosgees a Barchiesi 2018).

Účinky nadměrného tepla uvnitř buňky ústí v poškození DNA nebo denuraci proteinů. Buněčná smrt nádorových buněk apoptózou či nekrotózou aktivuje mnohé další signální cesty v buňce. Apoptóza a nekrotóza se odlišují v mnoha znacích, které jsou naznačeny a shrnuty na Obr. 1 (Riley a Day 2017). Patrnými ukazateli nevratného tepelného poškození identifikovanými histologií jsou zmenšování buněk, koagulace a ztráta jaderného zbarvení (Hirsch a kol. 2003).



Obr. 1: Schéma účinků fototermální terapie a reakce způsobené mechanismy buněčné smrti (apoptózou a nekrózou), převzato z: Riley a Day (2017)

Klasická PTT využívá vysokoenergetické záření a zvýšení teploty způsobuje nekrózu buněk. Tento mechanismus usmrcení buněk je účinný, ale může vyvolat nežádoucí účinky. Uvolňované DAMPs (Damage-associated molecular patterns) iniciují a udržují neinfekční zánětlivou reakci. Rizikem nekrózou ničených buněk je vytvoření zánětu, který může vést i ke zvýšenému růstu sekundárních nádorů.

Oproti tomu nízkonoenergetická PTT vede spíše k buněčné smrti apoptózou, podporuje prospěšnou imunogenní odpověď, a na rozdíl od nekrózy nezpůsobuje rozvoj zánětu. Přirozená ochrana před rozvojem zánětlivé reakce je podpořena produkcí protizánětlivých látek, například TGF- β . Tyto látky začnou uvolňovat fagocyty po pohlcení ničených nádorových buněk (Riley a Day 2017).

Míra poškození a to, proběhne-li nekróza či apoptóza, závisí nejen na podmínkách ozáření (počtu použitých laserových pulsů a energii laseru), ale také na velikosti, koncentraci nanočástic v maligní tkáni a jejich fototermální vlastnosti (Zharov a kol. 2004, Riley a Day 2017).

3.3 LASEROVÉ ZÁŘENÍ

Laser užívaný při PTT poskytuje NIR záření v oblasti vlnových délek zpravidla 650-900 nm (Chen a Cai 2015). Někdy je použito světlo až z tzv. druhého NIR okna tkáně, které zahrnuje záření o vlnových délkách 950-1350 nm (Riley a Day 2017). Vlnové délky patřící do druhého okna jsou s výhodou využívány především k zobrazení nádorů. Díky sníženému rozptylu a autofluorescenci tkáně poskytují lepší prostorové rozlišení a vysokou hloubku penetrace tkání. Správné zobrazení a využití zobrazovacích metod umožňuje lepší cílení terapie a má velký význam pro zvolení správně řízené léčby (Sun a kol. 2018). Oblast infračerveného záření lze rozdělit na blízké (NIR), střední a vzdálené infračervené záření. NIR zářením je označována část hned za spektrem viditelným (NASA Science, 2010).

Dodávka světla může být invazivní nebo neinvazivní, s ohledem na omezenou hloubku penetrace (maximálně několik cm) NIR záření a rozdílnou lokalizaci nádorů v těle (Chen a Cai 2015). Právě NIR záření je schopné v porovnání se zbývajícími pásmy pronikat do hlubších vrstev tkání přímo, a proto je využíváno pro PTT. Ta je hodnocena často jako výhodná právě díky své nízké invazivitě, kdy zpravidla nevyžaduje chirurgický zákrok (Násirová 2011).

3.4 NANOTECHNOLOGIE V MEDICÍNĚ, NANOČÁSTICE PRO PTT

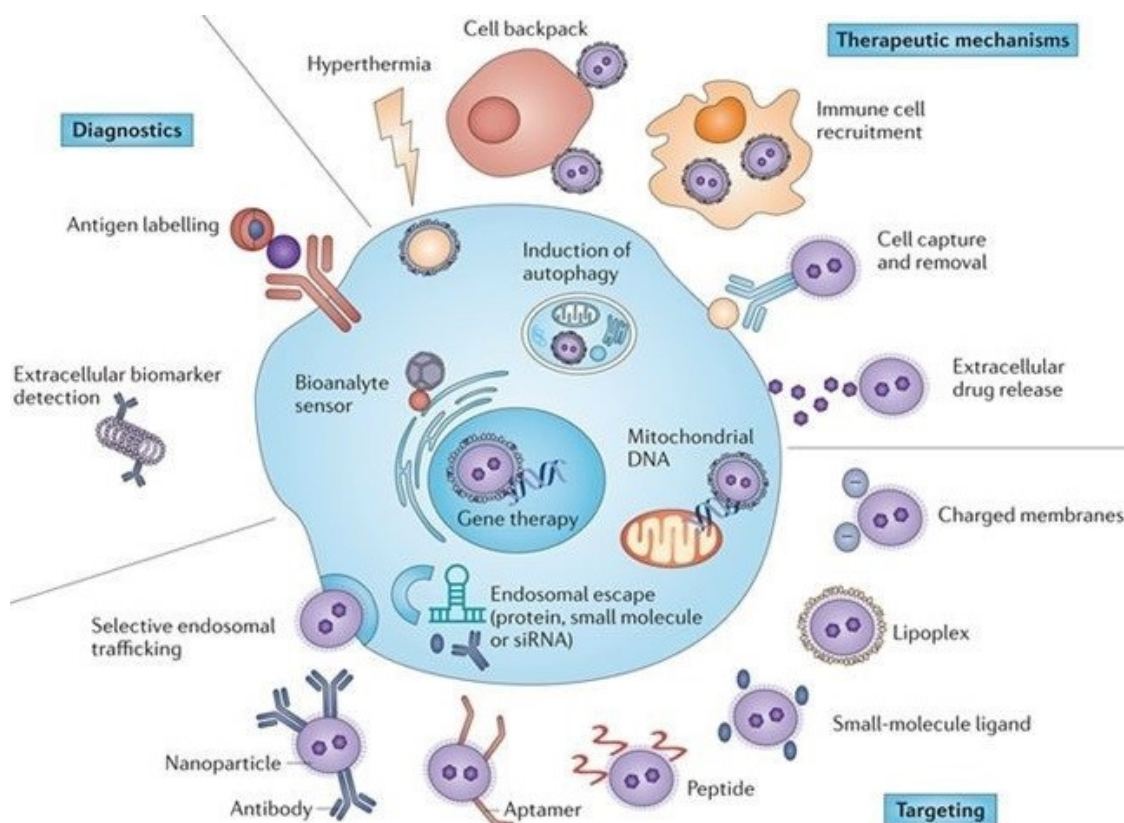
Samotný objev nanomateriálů a vývoj nanotechnologie vedl postupně přirozeně ke snaze zapojit je (vedle bohaté aplikace v průmyslu, energetice, kosmetice, ochraně životního prostředí a dalších oblastí) také do medicíny jako možný prostředek terapie nebo diagnostiky. Zajímavými pro aplikaci je činí mimo dalších vlastností především velmi malá velikost, čímž jsou podobné běžným biomolekulám a umožňují pronikání až do subcelulárních struktur.

3.4.1 NANOTERAPEUTIKA

Nanočásticová terapeutika zahrnují nosiče léčiv nebo biomolekul, zobrazovací činidla i fototermální činidla pro PTT. Přístup nanočástic k buňce názorně ukazuje Obr. 2 (Schroeder a kol. 2012).

Terapeutická činidla a nosiče léčiv na bázi nanotechnologií jsou také často označovány souhrnným názvem jako nanobiofarmaceutika (Scheng a Huang 2011). Umožňují léčivo nebo biomolekuly pro transport zapouzdřit. To je výhodnější než druhý způsob, tzn. navázání těchto molekul na jejich vnější povrch, protože nehrozí, že by mohly být rozpoznány a degradovány působením imunitního systému (Riley a Day 2017). Jsou biologického, organického nebo anorganického původu různých tvarů a velikostí a umožňují tak obsáhnout celou škálu biologických mechanismů a cílení (Schroeder a kol. 2012). Jednotlivé příklady použití jsou uvedeny v Tab. 1.

Zapojení nanočástic do podávání léčiva nabízí komplexnější schopnosti. Kromě cíleného dodání léčiva do tkáně jsou schopné dosáhnout i mnohých kompartmentů uvnitř buněk. Umožňují specifické uvolnění léčiva, zvýšení poločasu rozpadu léčiva v nemocné tkáni, snížení nutné dávky léčiva apod. Může-li být dávka jednotlivých protinádorových terapeutik snižována, terapie způsobí menší množství efektů mimo cílovou tkáň a potlačí tak nežádoucí účinky. Lokální uvolnění léčiva může být způsobeno vnějšími podněty – ultrazvukem, ozářením (světlem) nebo radiofrekvenčním elektromagnetickým polem. Některé nanočástice jsou schopné zaznamenat určitý podnět, např. změnu iontové koncentrace nebo vazbu molekuly, a uvolnit přenášený obsah, zničit ho, pokud je třeba, nebo i chemicky léčivo *in vivo* modifikovat (Schroeder a kol. 2012, Riley a Day 2017).



Obr. 2: Přístup nanočástice k buňce – pro diagnostiku, cílení a terapii, převzato z: Schroeder a kol (2012)

Nanotechnologie navíc umí dostat do tkáně i léčivo primárně nestabilní, s nízkou biologickou dostupností bez selektivity k danému cíli, léčivo extrémně toxické nebo atomy radioaktivních prvků. Zabudování takového léčiva do nanočástice umožní jeho využití bez negativního působení na buňky mimo cílenou oblast. Brání také rozvoji rezistence na léčiva (Pillai 2014).

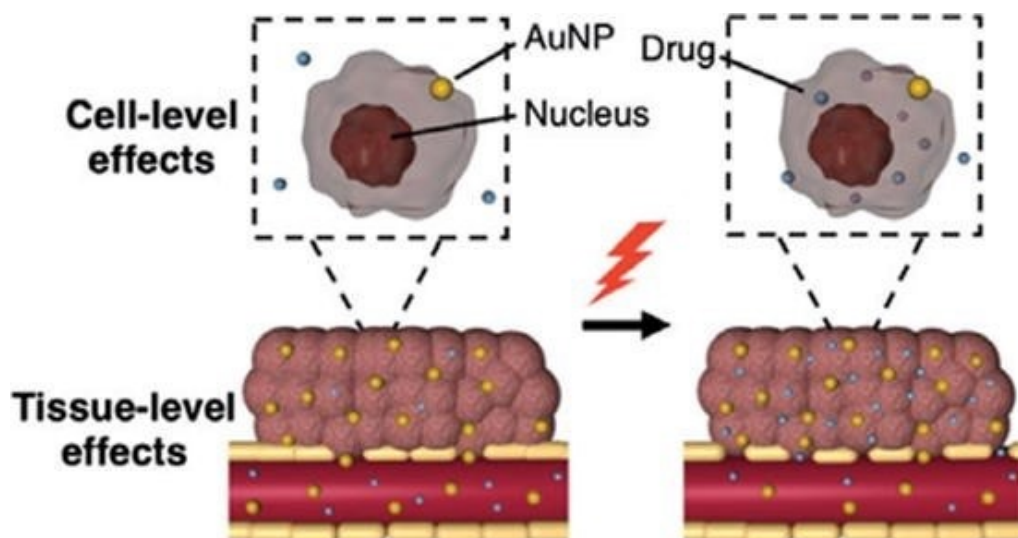
Tento velký potenciál nanočástic byl využit také významně při terapii nádorových onemocnění léčivy. K léčbě rakoviny mohou být obecně použity všechny možné substance: peptidy, proteiny, DNA, RNA i malé molekuly. Zpravidla ale prokází svůj účinek pouze, jsou-li spojeny s vhodným nosičem. Nanočástice prokázaly díky svým vlastnostem ideální předpoklady takovému nosičem být (Sheng a Huang 2011). I díky schopnosti vstupovat do jednotlivých buněk a možnosti cílení selektivně na nádorové buňky bez poškození tkáně zdravé by mohly úspěšně překonat limity tradiční nádorové chemoterapie. Kumulací v nádorech zvyšují cytotoxický účinek protinádorových činidel (Pillai 2014). Tato pasivní kumulace je přirozeně podpořena abnormálními cévami

nádoru. Netěsnící a neorganizované nádorové cévy, zvýšená produkce řady mediátorů permeability apod. jsou jedinečné patofyziologické vlastnosti nádorů, které nejsou ve zdravých tkáních a orgánech pozorovány (Maeda a kol. 2000). Díky efektu zvýšené permeability cév nádoru i cytoplasmy buněk a vyšší retenci dochází k snadnějšímu vyvázání nanočástic z cévního řečiště a jejich účinnějšímu dodání do buněk nádoru (Rilley a Day 2017). Schematicky je to zobrazeno na Obr. 3.

Tab. 1: Stavební bloky nanočástic a jejich užití, převzato z: Schroeder a kol. (2012)

Stavební složka	Částice	Použití
Polymery	Nanočásticové jaderné skořepiny, nanogely a polymerní micely	Dobře charakterizované, biokompatibilní a modulární transportéry léčiv.
Lipidy	liposomy, lipoplexy, micely a filomicely	Dodávají ve vodě rozpustné i nerozpustné léky.
Kovy	Zlaté nanotyčky, zlaté nanočástice, nanočástice tvořené oxidy železa a kvantové tečky	Zobrazovací činidla pro diagnostiku. Termoablativní terapie.
Uhlík	Uhlíkové nanotrubičky, nanodiamanty a grafen	Emise NIR záření umožňující transparentní zobrazování tkání pro diagnostiku a sledování. Terapie k potenciálnímu ústupu MDR (rezistence na více léků) u některých leukemií.
Biologické složky	Viry, nanočástice nukleových kyselin, DNA origami a proteinové nanočástice	Viry dodávají nekovalentně vázané užitečné zatížení bez ztráty z pasivní difúze.

Do dnešní doby bylo vyvinuto množství nanoterapeutik. První generací FDA schválených terapií na bázi nanočástic tvoří systémy složené z lipidů (liposomy nebo nanomicely) (Jelveh a Chithrani 2011). Mnohé jsou v klinice běžně používány, např. doxorubicin zapouzdřený v liposomech (Doxil[®]), proteinové částice s paklitaxelem (Abraxane[®]) k léčbě metastatického karcinomu prsu, nanočástice oxidu železitého (ferumoxytol) schváleny k léčbě anémie z nedostatku železa a mající účinnost k časným metastázím lymfatických uzlin u karcinomu prostaty a varlat (Schroeder a kol. 2012). Mnohem větší pozornost se v posledních letech obrací k anorganickým nanočásticím, tedy především ke zlatým nanočásticím. Díky jejich jednoznačným výhodám byla PTT jimi zprostředkovaná důkladně zkoumána na ablaci nádorů u zvířecích modelů a byla zařazena již do mnohých klinických studií (Rilley a Day 2017).



Obr. 3: Schéma účinků PTT a zvýšení propustnosti vaskulatury nádoru a membrány buňky, AuNP – zlatá nanočástice. Převzato z: Riley a Day (2017)

3.4.2 ZLATÉ NANOČÁSTICE

Zlaté nanočástice mají obrovský potenciál především v diagnostickém zobrazování a terapii nádorů. Zahrnují částice tvořené ze zlata zcela nebo i částečně. Snadná biologická vazba zlato-thiolová skupina umožňuje snadné povrchové napojení terapeutik, cílových ligandů apod. a jejich průnik do nádorové tkáně po systémovém podání. Ten je podpořen i malými rozměry částic. Díky schopnosti silné absorpce světla a rozptylu elektromagnetického záření se ukazují jako velmi užitečné v cílení nádorových buněk. Reagují na NIR světlo a jsou schopny absorbovanou světelnou energii přeměnit na teplo, které lokálně vytvoří hypertermii a tím způsobuje smrt buněk. Tímto splňují základní podmínku a mohou být použité pro PTT jako činidlo fototermální ablace nádoru (Kang a kol. 2017, Riley a Day 2017).

Zvýšená absorpce blízkého infračerveného světla (obecně elektromagnetického záření, tedy i světla viditelného) vzniká na základě povrchové plasmonové rezonance (Huang a kol. 2008). Tato vlastnost je společná pro nanočástice ušlechtilých kovů z důvodu silných povrchových magnetických polí. Často jsou proto nazývány „plasmově-

rezonantní částice“. Generují signál o vysoké intenzitě. Jsou odolné proti vyhasínání světla vnitřními chromofory v původní tkáni (Huang a kol. 2006).

Za nejúspěšnější fototermální činidla považujeme zlaté nanotyčky a sférické zlaté nanočástice, popř. zlaté nanoslupky. PTT jimi samotnými je však zpravidla nedostatečná. Mají ale vlastnost snadné modifikovatelnosti (úpravy povrchu), a proto bývají s výhodou konjugovány s dalšími látkami za účelem zvýšení jejich specifčnosti cílení. I další typy zlatých nanočástic mohou být využity podobně.

Velmi významné a nadějně jsou pak také tyto komplexy nanočástic při léčbě nádorů rezistentních na léčiva. Konjugované nanočástice např. s protilátkou či virovým vektorem umožňuje specifické použití PTT (Kang a spol 2017).

3.4.3 DALŠÍ NANOMATERIÁLY PRO PTT (KROMĚ ZLATÝCH NANOČÁSTIC)

Dodnes bylo vyvinuto mnoho dalších nanomateriálů pro možné použití jako činidel v PTT. Většinu tvoří vedle anorganických nanomateriálů s obsahem zlaté nanočástice také nanostruktury na bázi uhlíku (jednovrstevné nebo vícevrstevné uhlíkaté nanotrubic), grafeny, nanokrystaly na bázi mědi nebo porfyrinové nanostruktury (porfysomy, nanoporfyrin) (Chen a Cai 2015).

V roce 1980 byly látky obsahující chromofor objeveny jako PTT činidla. V porovnání se zlatými nanočásticemi mají však poměrně nízkou absorpci světla (Jin a kol. 2013). Uhlíkové nanotrubicе objevil roku 1991 Sumio Iijima. Mají v podstatě strukturu grafitu a název získaly díky své svinuté trubicovité struktuře. Mají průměr v rozmezí několika nanometrů a dosahují délky několika mikrometrů (International Balzan Prize Foundation 2007). Na bázi uhlíku jsou založeny i grafeny (dvojměrný uhlíkový krystal) a fullereny svinuté do uzavřeného tvaru (Chen a Cai 2015).

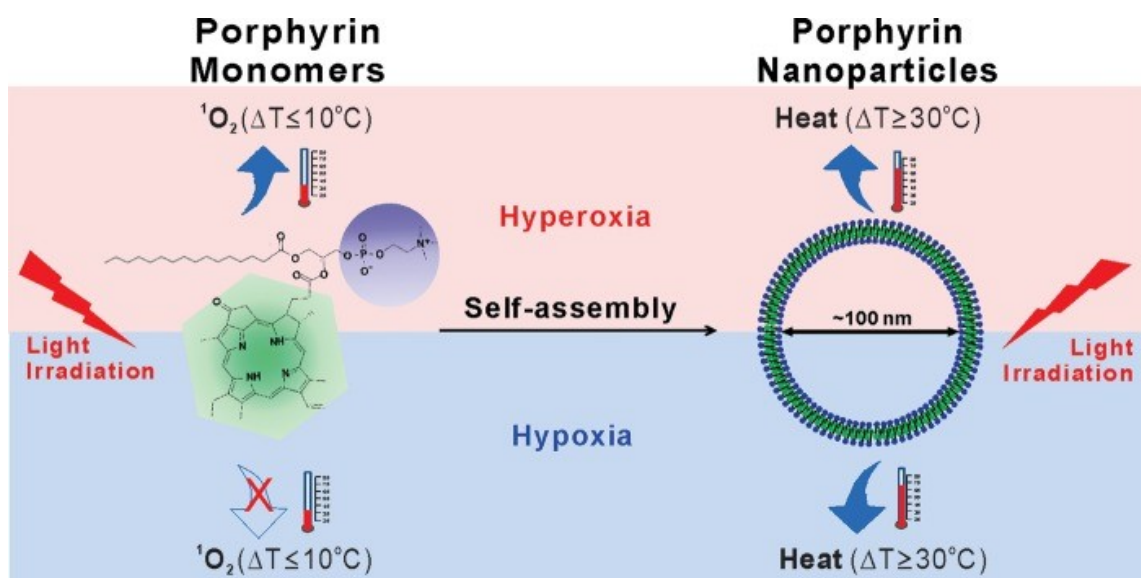
3.4.4 PORFYRINOVÉ NANOSTRUKTURY

Poměrně nedávným objevem a vůbec prvním organickým PTT činidlem jsou porfyrinové nanostruktury – „porfysomy“ – což jsou samostatně složené konjugáty porfyrinu zpravidla se zlatou nanočásticí nebo uhlíkovou nanotubicí. Monomerní porfyrinový lipid se skládá do nanočástice liposomálního typu (dvojměrný) a vytváří

porfýsom (Obr. 4). Výhodnými vlastnostmi oproti činidlům anorganickým jsou nejen zlepšení přeměny světelné energie, ale také biokompatibilita a biologická degradabilita.

Samotný porfyrin má při léčbě nádorových onemocnění (ale také v diagnostice) široké využití. Mimo funkce PS tak působí i jako výborná kontrastní látka. Má vnitřní světelnou kapacitu, a díky tomu umožňuje NIR fluorescenční zobrazování. Tyto komplexy zlatých nanočástic s porfyrinem se přednostně hromadí v nádorech, zesilují v nich signál a díky tomu se pak snadno detekují. Signál porfyrinu v buňkách pak jasně odráží úspěšnost vazby komplexu a umožňuje nádor přesně lokalizovat i v případě malých nádorových ložisek díky pozorování fluorescenční hustoty porfyrinů (Kang a kol. 2017).

Vysokou účinnost absorpce světla jsou schopné dosáhnout díky obrovskému množství porfyrinů na jednu částici. Vysoké hustoty porfyrinu a zároveň větší stability je dosaženo díky samo-složení těchto konjugátů. Fluorescence a tvorba singletového kyslíku, která se uplatňuje u molekuly Photofrinu® (směs porfyrinových monomerů, dimerů a oligomerů) v PDT, jsou utlumeny a absorbovaná světelná energie se přednostně mění na teplo. Tím je podpořena fototermální reakce, a tudíž i účinnější PTT, které je možné dosáhnout díky struktuře nanočástice i za hypoxických podmínek (nádorová hypoxie), kdy v nádorových buňkách není dostatek kyslíku (Jin a kol 2013). Názorně je tento závěr zobrazen na Obr. 4.



Obr. 4: Porfyrinová nanočástice, výhodné samosložení (angl.. self-assembly), převzato z: Jin a kol. (2013)

3.5 PŘÍSTUPY A POUŽITÍ PTT V KOMBINACI S DALŠÍ TERAPIÍ

PTT může působit samostatně, ale velmi často je kombinovaná s jinými léčebnými postupy jako je chemoterapie, genová terapie a imunoterapie. PTT zprostředkovaná nanočásticemi umožňuje senzitivizaci nádorových buněk k dalším způsobům terapie a významně tak zlepšuje účinek terapie nádorů. Díky kombinaci výhodných funkcí jednotlivých terapií se jejich účinky synergizují, pokrývají vzájemně své limity a ve výsledku znamenají výraznější projev léčby a zlepšení stavu. PTT zprostředkovaná (zlatými) nanočásticemi v kombinaci se sekundárními terapeutickými přístupy také překonává omezení samostatné PTT a dalších standardních metod v léčbě rakoviny s metastázemi (Riley a Day, 2017).

3.5.1 METASTATICKÉ NÁDORY

Běžné terapeutické metody léčby nádorů, tzn. chemoterapie, chirurgický zákrok či radioterapie, jsou při použití na nádorové metastázy nepříliš úspěšné a doba přežití se u pacientů s metastatickým nádorem prodlouží někdy jen o několik měsíců. Naopak použití PTT kombinované s dosud dostupnými metodami měla v preklinických testech na zvířatech značně slibnější výsledky – konkrétně pak například při léčbě metastází rakoviny prsu.

PTT jako taková je totiž schopná, díky inhibici a vyhlazení i nádorových kmenových buněk a buněk vyvolávajících nádory, potlačit tvorbu metastáz ve vzdálených orgánech. Napomáhá tomu i fakt, že hypertermie působí inhibičně na expresi několika látek podílejících se na tvorbě a rozvoji metastatických ložisek. Mezi tyto látky patří například matricová metaloproteinasa 2/9 (MMP-2/9), vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) a transformující růstový faktor β 1 (TGF- β 1) (Zoul a kol. 2016).

3.5.2 PTT KONJUGOVANÁ S CHEMOTERAPIÍ

Nanočástice (zlata) představují inovativní přístup s lepším cílením a řízeným uvolňováním léčiv s vysokým toxickým účinkem užívaných v chemoterapii a snižují tím negativní vedlejší účinky (Jelveh a Chithrani 2011). To je umožněno díky jejich schopnosti zapouzdření léku uvnitř nebo jeho navázání na povrch a následné uvolnění po ozaření NIR zářením. PTT tak může pomoci s úspěšností následné chemoterapie a

překonat její limity v případě léčby nádorů rezistentních na léčivo. Prvním prokázaným spojením těchto dvou metod byl experiment Hahna *et al.* na ošetření buněk doxorubicinem (adriamycinem) a teplem (43°C) (Riley a Day, 2017). V experimentu bylo prokázáno mírné zvýšení citlivosti buněk k antibiotikům bleomycinu nebo adriamycinu, užívaných pro chemoterapii, při vzrůstu teploty nad sledovaných 37°C *in vitro* i *in vivo* (Hahn a kol. 1975).

3.5.3 PTT KOMBINOVANÁ S IMUNOTERAPIÍ

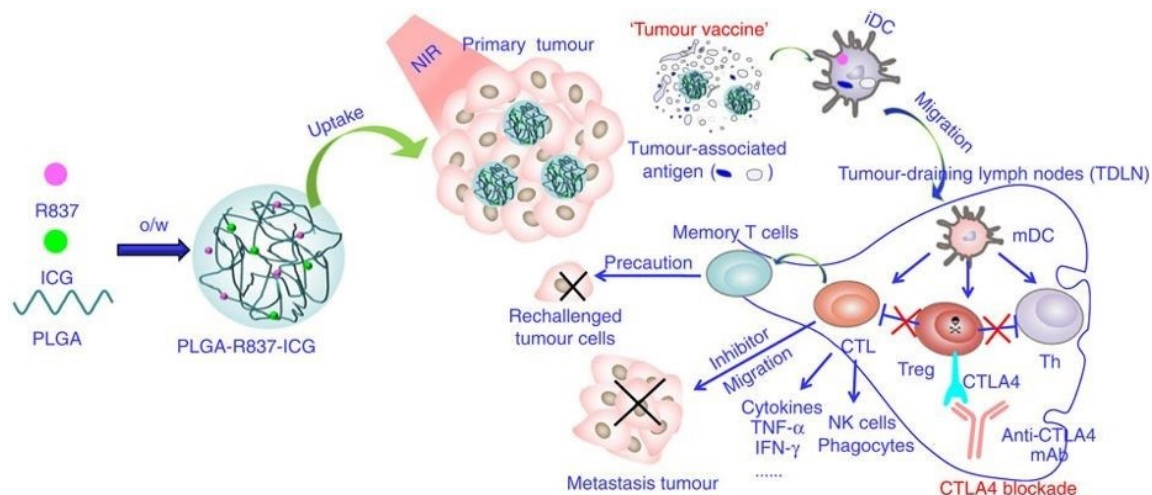
PTT zprostředkované nanočásticemi kombinované s imunoterapií představují léčebnou metodu, jejímž cílem je odstranit primární nádor, potlačit rozvoj metastáz, a především předcházet relapsu nádorového onemocnění prodloužením protinádorového účinku (Chen a kol. 2016).

Podstatou imunoterapie je stimulovat imunitní systém hostitele, aby byl schopný rozpoznávat a usmrcovat i ty z nádorových buněk, které se postupně adaptovaly a vyvinuly si mechanismy, kterými se brání rozpoznání a zničení imunitním systémem. Příkladem takového mechanismu je uvolňování cytokinů. Např. cytokin IL-10 potlačuje zrání dendritických buněk, které jako buňky prezentující antigen fyziologicky zachytí nádorové antigeny a prezentují je T-lymfocytům pro aktivaci imunitní reakce proti nádorovým buňkám. Podobně může způsobit snížení stimulace T-lymfocytů produkce faktorů TRAIL a FasL, které indukují apoptózu T-lymfocytů (Riley a Day 2017).

Možné metody imunoterapie nádorových onemocnění jako jsou cytokinová terapie, terapie blokády kontrolních bodů, antigenová terapie T-lymfocytů (CAR-T), protinádorová vakcína aj. prokázaly svůj klinický účinek, jsou však výrazně limitovány. Omezují je vysoké náklady na provedení, variabilita v terapeutických odpovědích, imunotoxicita a podobně (Chen a kol. 2016).

V tomto spojení je možné se opírat o fakt, že po fototermální ablacii nádoru PTT se *in situ* uvolňují vytvořené antigeny asociované s nádorem a proteiny tepelného šoku. Jako antigeny jsou zachyceny buňkami prezentujícími antigen a aktivují imunitní reakci. Je-li tomu přítomná imunizovaná nanočástice, ukazuje se funkce podobná vakcíně. V kombinaci s imunoterapií (např. blokádou kontrolních bodů) vyvolají silnou protinádorovou odpověď a terapie je účinná. Na Obr. 5 je příklad kombinované PTT s imunoterapií. Indokyanová zeleň (ICG, fototermální činidlo) a imichimod (R837, agonista Toll-like-receptoru-7, pro aktivaci imunitních odpovědí) jsou společně

zapouzdřeny kopolymerem kyseliny mléčné a kyseliny glykolové (PLGA) a vytváří komplex PLGA-ICG-R837. Jednotlivé složky jsou klinicky schváleny FDA (U. S. Food and Drug Administration) a díky tomu se předpokládá, že i samotný komplex bude mít dobrou šanci pro budoucí klinickou interpretaci (Chen a kol. 2016).



Obr. 5: Mechanismus protizánětlivé imunitní odpovědi vyvolané PTT zprostředkovanou PLGA-ICG-R837 v kombinaci s blokádou kontrolních bodů (CTLA4). CTL – cytotoxický T-lymfocyt, DC – dendritická buňka, ICG – indokyanová zeleň, PLGA – poly(laktid-*co*-glykolid), R837 – imichimod, Treg – T regulační buňka. Převzato z: Chen a kol. (2016).

3.5.3.1 Protinádorové vakcíny

Protinádorové vakcíny navrhnuté jako imunoterapie mohou být zaměřeny jako vakcíny proti celé nádorové buňce ve formě buněčného lyzátu, tj. částičky izolované z lyzovaných nádorových buněk. Jsou získávané z nádorových tkání odebraných pacientovi. Kombinovaný přístup s PTT však nemusí řešit žádné etické znepokojení, jelikož antigeny pro funkční vakcínu jsou tvořeny přímo *in situ*. Umí zajistit dlouhodobou imunitní paměť a působit jako prevence proti recidivě (Chen a kol. 2016).

3.5.4 PTT A REGULACE GENŮ

Možným přístupem léčby rakoviny je regulace genů, tedy léčba pomocí nukleových kyselin (NK), které potlačí expresi genů ovlivňujících růst nádoru. Tato léčba může nahradit použití terapeutických malých molekul, pro které ale není přítomno

vazebné místo a nemohou se navázat a působit. Produkci proteinů asociovaných s nádorem svým působením brání malá interferující RNA (siRNA). Její konjugáty s nanočásticemi pro PTT se endocytózou dostávají dovnitř buňky a tam uvolňují NK do cytosolu. Tyto již „prázdné“ nanočástice nejsou stabilní a mohou živému organismu škodit, proto se od této metody spíše upouští (Riley a Day 2017).

3.5.5 PTT ŘÍZENÁ ZOBRAZOVÁNÍM

Nanočástice mají mimo jiné takové fotonické vlastnosti, že jsou vhodné pro použití jako kontrastní činidla. Díky tomu může být PTT prováděna s multimodálním zobrazením, které umožňuje její řízení a hodnocení v reálném čase. Může být použita pro lepší terapeutické plánování i možnost přizpůsobení k dosažení správně vedené terapie i v průběhu terapie samotné. Poskytuje podstatné informace o dostatečném nahromadění částic v nádoru, dosažení požadované teploty tkáně, přesné lokalizaci nádoru a odhadu rozsahu šíření nemoci. Všechny jsou zásadní v rozhodování o vhodné léčbě, možnosti použití řízené radioterapie a pro zajištění úspěšné PTT samostatně nebo v kombinaci se sekundárními léčebnými metodami (Riley a Day 2017, Zou a kol. 2016, Schroeder a kol. 2012).

Sledovanými možnostmi zobrazování a vedení PTT jsou optická koherentní tomografie nebo fotoakustické zobrazování (PA). Pro PPT řízenou zobrazováním může být použita i magnetická rezonance teplotního zobrazování (MRTI). PA zaznamenává akustické vlny. Ty se šíří díky tlaku vyvolanému tepelným šířením z tkáně ozářené laserem. Vložené nanočástice zvyšují signál PA. Výsledkem tohoto zobrazování jsou díky ultrazvukovému převodníku tradiční ultrazvukové snímky. Výstupem MRTI jsou teplotní mapy v reálném čase během ozařování. Používá se již v klinice pro mapování teploty při ultrazvukových nebo radiofrekvenčních ablacích. MRTI umožňuje v reálném čase také monitorovat nádory ošetřené NIR-absorbujícími nanočásticemi, které zprostředkovaly nevratnou termální ablací a snížily objem nádoru. Odhady poškození tkáně podle MRTI potvrdilo i histologické vyšetření. Tím se prokázalo jeho potenciální využití při určování poškození tkáně během terapie. Zobrazovací metody přispívají k vedení PTT pro možnost kontroly mechanismu ničení buněk a snížení množství negativních vlivů na okolní zdravou tkáň. Díky nim mohou být v budoucích studiích přizpůsobené léčebné režimy tak, aby byla zajištěna úplná termální destrukce nádoru (Hirsch a kol 2003, Riley a Day 2017).

4 ZÁVĚR

Z teoretické části vyplývá, že nanočástice (především zlaté) mají obrovský potenciál v medicíně. Jejich uplatnění při PTT přináší velké výhody a přispívají k úspěšnému ničení nádorů za použití NIR laserového záření. To je vhodně zvoleno pro možnost hlubšího pronikání do tkáně. Díky specifické produkci tepla a výraznému cílení na buňky maligní tkáně překonává PTT limity klasických přístupů a znamená potenciálně účinnou alternativní terapii v léčbě metastáz, hypoxických nádorů i nádorů rezistentních na léčiva.

Díky schopnosti nanočástic jako zobrazovacích činidel jsou využity v diagnostice a přispívají tak díky možnosti časného zachytu onemocnění k lepší prognóze onemocnění. Jedná se o metodu rozvíjející se v posledních desetiletích, určitě ale může znamenat a přinést pokrokový přístup. Zásadní pro úspěšnou termální ablací nádoru PTT je správné zvolení PS i parametrů laserového záření. Pro budoucí studie je nutné tyto parametry sledovat a uvažovat i možnou toxicitu nanočástic na organismus.

5 LITERATURA

CHEN F, CAI W. Nanomedicine for targeted photothermal cancer therapy: Where Are We Now?. *Nanomedicine*. 2015; 10(1): 1-3.

CHEN Q, XU L, LIANG C, WANG C, PENG R, LIU Z. Photothermal therapy with immune-adjuvant nanoparticles together with checkpoint blockade for effective cancer immunotherapy. *Nature Communications*. 2016; 7(1).

CHEN WR, LIU H, RITCHEY JW, BARTELS KE, LUCROY MD, NORDQUIST RE. Effect of different components of laser immunotherapy in treatment of metastatic tumors in rats. *Cancer Research*. 2002; 62(15): 4295–4299.

GROSGES T, BARCHIESI D. Gold Nanoparticles as a Photothermal Agent in Cancer Therapy: the Thermal Ablation Characteristic Length. *Molecules*. 2018; 23(6): 1316.

HAHN GM, BRAUN J, HAR-KEDAR I. Thermochemotherapy: synergism between hyperthermia (42-43 degrees) and adriamycin (of bleomycin) in mammalian cell inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 1975; 72(3): 937-940.

HIRSCH LR, STAFFORD RJ, BANKSON JA, SERSHEN SR, RIVERA B, PRICE RE, HAZLE JD, HALAS NJ, WEST JL. Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 2003; 100(23): 13549–13554.

HUANG X, IH ES, QIAN W, MA ES. Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods. *Journal of American Chemical Society*. 2006; 128(6): 2115-2120.

HUANG X, JAIN PK, IH ES, MA ES. Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers in Med Science*. 2008; 23(3): 217-228.

JELVEH S, CHITHRANI DB. Gold Nanostructures as a Platform for Combinational Therapy in Future Cancer Therapeutics. *Cancers (Basel)*. 2011; 3(1): 1081-1110.

JIN CS, LOVELL JF, CHEN J, ZHENG G. Ablation of Hypoxic Tumors with Dose-Equivalent Photothermal, but Not Photodynamic, Therapy Using a Nanostructured Porphyrin Assembly. *ACS Nano*. 2013; 7(3): 2541–2550.

KANG X, GUO X, NIU X, AN W, LI S, LIU Z, YANG Y, WANG NA, JIANG Q, YAN C, WANG H, ZHANG Q. Photothermal therapeutic application of gold nanorods-porphyrin-trastuzumab complexes in HER2-positive breast cancer. *Scientific Reports*. 2017, 7(1): 42069.

MAEDA H, WU J, SAWA T, MATSUMURA Y, HORI K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of Control Release*. 2000; 65(1-2): 271-84.

MUDr. Michaela Násirová. Infračervené záření a jeho působení na lidský organismus. 2011. [cit. 04/2019]. Dostupné z: https://www.2es.cz/med/_layout/download/ir-med.pdf.

PILLAI G. Nanomedicines for cancer therapy: an update of FDA approved and those under various stages of development. *SOJ Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2014; 1(2): 13.

Reflected Near-Infrared Waves, Science Mission Directorate. NASA Science. 2010. National Aeronautics and Space Administration. [cit. 04/2019]. Dostupné z: http://science.nasa.gov/ems/08_nearinfraredwaves.

RILEY RS, DAY ES. Gold nanoparticle-mediated photothermal therapy: applications and opportunities for multimodal cancer treatment. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2017; 9(4).

SCHROEDER A, HELLER DA, WINSLOW MM, DAHLMAN JE, PRATT GW, LANGER R, JACKS T, ANDERSON DG. Treating metastatic cancer with nanotechnology. *Nature Reviews Cancer*. 2012; 12(1): 39-50.

SHENG, WY, HUANG L. Cancer immunotherapy and nanomedicine. *Pharmaceutical Research*. 2011; 28(2): 200–214.

SUN Y, ZENG X, XIAO Y, LIU C, ZHU H, ZHOU H, CHEN Z, XU F, WANG J, ZHU M, WU J, TIAN M, ZHANG H, DENG Z, CHENG Z, HONG X. Novel dual-function near-infrared II fluorescence and PET probe for tumor delineation and image-guided surgery. *Chemical Science*. 2018; 9(8): 2092–2097.

The Discovery of Carbon Nanotubes - Basle, 22.11.2007. International Balzan Prize Foundation. [cit. 12/05/2019]. Dostupné z: <https://www.balzan.org/en/prizewinners/sumio-ijjima/the-discovery-of-carbon-nanotubes-ijjima>.

ZHAROV VP, GALITOVSKAYA E, VIEGAS M. Photothermal guidance for selective photothermolysis with nanoparticles [online]. 2004. [cit. 05/2019]. Dostupné z: <https://www.spiedigitallibrary.org/conference-proceedings-of-spie/5319/0000/Photothermal-guidance-for-selective-photothermolysis-with-nanoparticles/10.1117/12.532011.short>.

ZOU L, WANG H, HE B, ZENG L, TAN T, CAO H, HE X, ZHANG Z, GUO S, LI Y. Current Approaches of Photothermal Therapy in Treating Cancer Metastasis with Nanotherapeutics. *Theranostics*. 2016; 6(6): 762–772.