

UNIVERZITA KARLOVA
FAKULTA FARMACEUTICKÁ
Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Tamara Záborková

FOTOTOXIKOLOGIE A DOPADY NA ZDRAVÍ ČLOVĚKA
/diplomová práce/

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Jitka Vytlačilová

1	ÚVOD	4
1.1	UV záření	4
1.2	Absorpce elektromagnetického záření	6
1.3	Optické vlastnosti kůže	6
1.4	Fotochemie biologických molekul	6
1.4.1	Nukleové kyseliny	6
1.4.2	Bílkoviny	8
1.4.3	Steroidy	8
1.4.4	Melanin	9
2	FOTOCHEMIE SIGLETOVÉHO KYSLÍKU	12
2.1	Fotosenzitizované reakce kyslíku	13
2.2	Singletový kyslík	13
2.3	Praktické aplikace singletového kyslíku	14
2.3.1	Organická syntéza	14
2.3.2	Fotomedicína	14
2.3.3	Desinfekce	15
2.3.4	Úprava a čištění vody	16
2.3.5	Pesticidy	16
2.3.6	Chemický kyslíko-jodový laser	16
3	NEGATIVNÍ ÚČINKY UV ZÁŘENÍ NA ORGANISMUS	18
3.1	Negativní účinky UV záření na kůži	18
3.1.1	Radiačně podmíněný zánět	19
3.1.2	Imunologické změny	20
3.1.3	Stárnutí kůže (photoageing)	21
3.1.4	Fotokarcinogeneze	22
3.1.5	Indukce virů	23
3.1.6	Poškození vlasů	24
3.2	Fotodermatózy	24
3.2.1	Idiopatické fotodermatózy	25
3.2.2	Sekundární fotodermatózy	27
3.2.3	Porfýrie	44
3.2.4	Genofotodermatózy	47
3.3	Vliv UV na červené krvinky	49
3.4	Vliv UV na oči	50
4	POZITIVNÍ ÚČINKY UV ZÁŘENÍ NA ORGANISMUS	52

4.1	Syntéza vitamínu D	52
5	VYUŽITÍ UV ZÁŘENÍ V MEDICÍNĚ	53
5.1	Fotodynamická terapie (PDT)	53
5.1.1	Léčba nádorů PDT	55
5.1.2	Neonkologické využití PDT	61
5.1.3	Antibakteriální PDT	64
5.1.4	Fotosenzitizéry	69
5.1.5	Aplikace světla	80
5.2	Fotochemoterapie	81
5.3	Fototerapie	83
6	FOTOPROTEKCE	86
6.1	Exogenní ochrana před sluncem	86
6.1.1	Chemická ochrana	87
6.1.2	Fyzikální ochrana	88
6.1.3	Stanovení ochranného faktoru	89
6.1.4	Nesnášenlivost slunečních ochranných prostředků	90
6.2	Endogenní ochrana proti slunci	94
7	ZÁVĚR	99
8	POUŽITÁ LITERATURA	100
	ABSTRAKT	106
	ABSTRACT	106
	VYSVĚTLIVKY	107

1 Úvod

Sluneční záření, které dopadá na zemský povrch, je druhem elektromagnetické radiace. Jako takové může být absorbováno, rozptýlováno, odraženo nebo lámáno.

Skládá se přibližně z 5 % ultrafialového záření (100-400 nm), 50 % viditelného záření (400-700 nm) a z 45 % infračerveného záření [1].

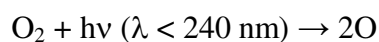
1.1 UV záření

Podle účinků na biologické systémy se konvenčně dělí na pásma:

- dlouhovlnné UVA záření..... 315 - 400 nm, penetruje nejhluběji, kdy z dopadajícího záření dosáhne coria až 35 - 50 %. Působí převážně nepřímo prostřednictvím fotosenzitizovaných reakcí, kdy zdrojem $^1\text{O}_2$ mohou být také endogenní senzitivátory. Singletový kyslík může být produkován kationtovými senzitivátory, které se interkalují mezi páry bází nebo vážou do žlábků DNA.
- středněvlnné UVB záření..... 280 - 315 nm, část je podstatně absorbována ve stratum corneum a epidermis a jen maximálně 10 - 15% tohoto záření pronikne do pars papilaris dermis. Může přímo excitovat jednotlivé báze v DNA, a tím iniciovat další reakce jako jsou tvorba dimerů a fotoadice [2].
- krátkovlnné UVC záření..... 100 - 280 nm, (z umělých zdrojů) je selektivně absorbováno v DNA a proteinech, a tedy proniká nejpovrchověji
- vakuové záření (UVD)..... 10 - 100 nm

Ozón absorbuje všechno UVC a velkou část UVB záření, takže ultrafialové spektrum na Zemi je tvořeno především UVA (90 - 99 %) a malou částí UVB záření (1-10 %).

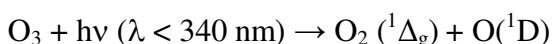
Za normálních okolností reaguje s UV zářením molekulární kyslík. V důsledku toho se molekuly kyslíku štěpí a většina vznikajících kyslíkových atomů se kombinuje s dalšími molekulami O_2 za vzniku molekuly ozónu (O_3) [1].



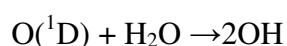
(M může být jakákoli molekula)

Fotolýza ozónu UV zářením, probíhající hlavně ve vysokých vrstvách atmosféry, je hlavním zdrojem $^1\text{O}_2$ v atmosféře. Z hlediska vlivu na životní prostředí může mít význam výskyt singletového kyslíku i v nižších a zejména přízemních vrstvách atmosféry.

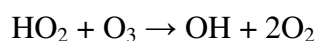
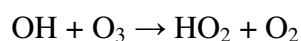
Fotolýza ozonu na $^1\text{O}_2$ je spinově dovolenou reakcí:



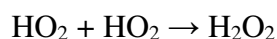
Dalším produktem fotolýzy je vysoce reaktivní atomární kyslík v excitovaném singletovém stavu, který s atmosférickou vodou reaguje na radikál OH



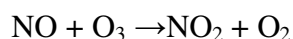
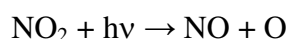
následuje



stejně jako produkce atmosférických peroxidů, např.



Singletový kyslík může vznikat v atmosféře rovněž fotosenzitizovanou reakcí. Možným senzitivátorem je NO_x = oxid dusičitý (NO_2) + oxid dusnatý (NO) (excitace při $\lambda \sim 398 \text{ nm}$), který generuje oba excitované stavy kyslíku, tj. $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ a $\text{O}_2(^1\Sigma_g)$.



Singletový kyslík iniciuje chemické reakce převážně ve styku s kapalnou fází – v kapkách vody, mracích a mlhách. Reaguje s nenasycenými organickými sloučeninami na peroxyacyl radikály, které jednak oxidují NO na NO_2 , jednak dále reagují s NO_2 na dráždivý peroxyacyl-nitrát RC(O)-O-O-NO_2 . „Přízemní“ $^1\text{O}_2$ vznikající ve znečištěné atmosféře je faktorem ohrožujícím životní prostředí a může hrát roli v patologii člověka, zvířat i rostlin [2, 3].

1.2 Absorpce elektromagnetického záření

K jakékoliv fotochemické reakci může dojít pouze tehdy, jestliže je dopadající záření absorbováno molekulami jemu vystavené látky. Takovou látku nazýváme chromoforem. To jsou v praxi molekuly DNA, RNA, bílkovin, porfyrinů a dalších sloučenin. Přitom se mění elektromagnetická energie v energii chemickou. Absorpce fotonů vyzdvihuje molekulu ozářené sloučeniny na vyšší energetickou hladinu, například v excitovaný singletový stav. Molekuly zůstávají ve svém excitovaném stavu do doby, než se sloučenina chemicky změní ve fotoprodukt, který přenesou energii na další molekulu, nebo ji vyžáří jako energii světelnou či tepelnou.

Přenosu energie může být podmíněn vznik morfologické reakce s navozením různých biochemických pochodů, například indukce nebo inaktivace enzymů, opravy enzymů, vzniku iontových stavů, replikace DNA a řady jiných. Ty posléze ústí v buněčné změny, ať již povahy proliferační, mutagenní, toxické nebo jiné.

Molekuly se též mohou transformovat z excitovaného singletového v tripletový stav. Doba trvání excitovaných stavů je velice krátká – singletový stav trvá v podmínkách normální teploty méně než 100 ns, tripletový nejvýše 1 ms.

1.3 Optické vlastnosti kůže

Při šíření světelného záření v kůži může docházet k jeho lomení vyvolanému přechodem mezi dvěma prostředími s různým indexem lomu. Při velmi plochém úhlu dopadu může nastat totální reflexe, kdy záření nevchází do kožní tkáně vůbec.

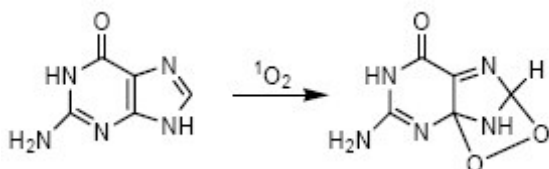
Pokud záření prochází kůží, pak je hloubka penetrace přímo úměrná jeho vlnové délce. Středněvlnné UVB záření prochází epidermis maximálně do dermálních papil, UVA radiace se dostává po rozhraní kůže a podkoží. Viditelné záření prochází až do podkoží. Krátkovlnné UV záření se vedle toho může po vstupu do kůže rozptylovat vlivem interakcí s různě nabitými částicemi [1].

1.4 Fotochemie biologických molekul

1.4.1 Nukleové kyseliny

Singletový kyslík reagující s nukleovými kyselinami vzniká převážně reakcemi senzitizerů interkalovaných mezi páry bazí nebo vázaných do žlábků šroubovice. Vzhledem k negativnímu náboji fosfosacharidové kostry interagují s nukleovými kyselinami senzitizerové s kladně nabitými periferními substituenty. Aniontové

senzitivizátory rozptýlené v okolí nukleové kyseliny způsobují méně významné, tzv. nespecifické oxidace. Singletový kyslík reaguje hlavně s jednou ze čtyř nukleobází, a to s guaninem. Reakce s guaninem nebo guanosinem byly studovány v souvislosti s oxidačním štěpením DNA. Prvním krokem reakce je [4+2] cykloadice $^1\text{O}_2$ na C-4 a C-8 purinového kruhu a vznik nestálého endoperoxidu (obr. 1).



Obr. 1. Reakce guaninu s $^1\text{O}_2$ [4]

Oxidace singletovým kyslíkem je jednou z příčin poškození nukleových kyselin. V důsledku oxidačních procesů dochází ke štěpení DNA - vzniku zlomů na jednom nebo méně často obou vláknech DNA.

Absorpční maximum pro DNA se nachází při vlnové délce 260 nm, přičemž maxima purinových a pyrimidinových kruhů jejich bází jsou mezi 245 a 280 nm. Působením této radiace se nejčastěji tvoří kovalentní vazby mezi sousedními thyminovými bazemi na šroubovici DNA (cyklobutanové thyminové dimery) [1]. Další fotoprodukty jsou thyminové a cytosinové hydráty, pyrimidin-pyrimidon (6-4) fotoprodukty [5], Dewarovy izomery 6-4 fotoproduktů, oxidované báze, vazby mezi proteiny a DNA a zlomy obou nebo jednoho řetězce.

Tato poškození jsou způsobena buď přímo absorpcí energie po expozici UVB nebo nepřímo kyslíkovými radikály tvořenými UVA zářením. Pyrimidinové dimery jsou hlavní DNA fotoprodukty. Pokud nejsou opraveny interferují s transkripcí a replikací. Přítomnost pyrimidinových dimerů může způsobit mutace, pokud je DNA replikována po poškození. Tyto genetické alterace mohou přispět k spuštění karcinogeneze [6].

Citlivost DNA ke zlomům je v korelaci s hustotou aktivních genů, udávaná jako hustota vyjádřené sekvence tagů (expressed sequence tags). Data ukazují inverzní vztah mezi genovou hustotou a UVA senzitivitou, protože genově chudé chromozomy se zdají být více poškozené než genově bohaté.

Je známo, že genově chudé genomické oblasti mají nižší aktivitu opravných enzymů. To může být možné vysvětlení pro nestejnou distribuci měřených zlomů DNA. Hypotéza Rapp *et al.* je, že vyšší aktivita opravných enzymů lokalizovaných v aktivních

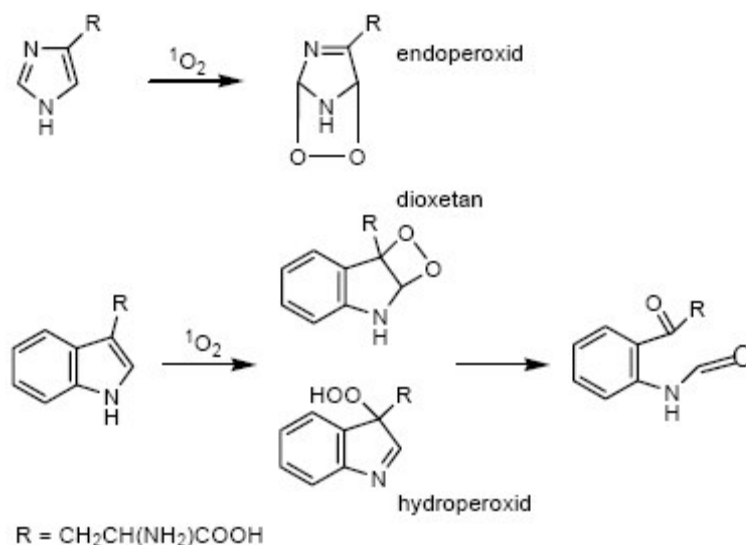
místech genů je schopná opravit DNA poškození indukované UVA, tak rychle, že tyto oblasti vykazují celkově redukované poškození [7].

1.4.2 Bílkoviny

Proteiny jsou, vzhledem ke svému zastoupení v buňkách, hlavním cílem oxidace singletovým kyslíkem. Zdrojem $^1\text{O}_2$ atakujícího protein jsou především senzitivátory vázané kovalentní vazbou nebo nekovalentní interakcí na protein [4].

Z esenciálních aminokyselin se nejnadhěji oxidují cystein, methionin, tryptofan, tyrosin a histidin a jsou tedy primárním cílem oxidačního ataku. Vznikající peroxidy a peroxyradikály jsou nositeli dalšího oxidativního ataku, způsobujícího fragmentaci proteinu, síťování a agregaci. Tyto změny jsou ireverzibilní, negativně postihují funkce proteinů a zdá se, že nepřímo poškozují i DNA [2].

Ostatní aminokyseliny reagují s $^1\text{O}_2$ podstatně pomaleji. Cílem oxidačního ataku bývají především postranní řetězce, nikoliv hlavní řetěz proteinu. Reakce s $^1\text{O}_2$ a peroxidovými produkty způsobují většinou nevratné poškození proteinu [4].



Obr. 2. Reakce histidinu a tryptofanu s $^1\text{O}_2$ [4]

Absorpční maximum se nachází většinou při 280 nm.

1.4.3 Steroidy

Cholesterol může být při fotosenzibilizačních pochodech oxidován. Tak může docházet k neopravitelnému poškození buněčných membrán [1].

Fotooxidace cholesterolu a ostatních lipidů buněčných membrán na povrchu tkání může zřejmě hrát roli v různých kožních fototoxicitách, předčasném stárnutí a

fotokarcinogenezi. Cholesterol může také být důležitý lipidový cíl v mnoha terapeutických aplikacích fotosenzitizace, např. eradikace neoplastických buněk nebo patogenních virů při fotodynamické terapii.

V buňkách mohou lipidové hydroperoxydy podstoupit jednoelektronové redukční reakce, které zhoršují potenciálně letální peroxidativní poškození, nebo dvouelektronové redukční reakce, které zabraňují nebo přinejmenším minimalizují peroxidativní poškození. V jednoelektronové dráze redukční agens, jako O_2^- nebo askorbát, typicky řídí redukci vznikajících lipidových hydroperoxidů katalyzovanou kovem na lipidoxyradikály, které buď přímo nebo nepřímo iniciují okruhy peroxidace volných radikálů odstraněním vodíku. Usnadněná tvorba produktů volných radikálů nebo karbonylových vedlejších produktů může mít za následek cytotoxicitu. Alternativně lipidové hydroperoxydy mohou podstoupit dvouelektronový redukční metabolismus zprostředkovaný glutathion dependentní peroxidázou transferáz. Oxidační stres nastane, když toxická jednoelektronová redukce fotoperoxidů oddálí dvouelektronovou detoxikaci, což má za následek zvýšené buněčné poškození.

Fotoperoxidace cholesterolu a ostatních lipidů může být zamezena nebo přinejmenším minimalizována různými enzymatickými a neenzymatickými obrannými systémy. Významné mezi enzymatickými systémy jsou superoxid dismutáza a kataláza, které zhasí O_2^- a H_2O_2 , glutathion dependentní selen peroxidázy, které redukují a detoxikují H_2O_2 a různé organoperoxydy, jako jsou druhy lipidových derivátů, a neseleno-glutathion-S-transferázy, které mohou také redukovat organoperoxydy [8].

1.4.4 Melanin

Melanin je heteropolymerní pigment produkovaný melanozomy v epidermálních melanocytech. Z nich se cytokrinním procesem dostává do keratinocytů. Jeho množství v kůži podmiňuje různý stupeň pigmentace u jednotlivých lidských ras.

Míra syntézy melaninu v melanocyty závisí na aktivitě enzymu tyrozinázy. Ta katalyzuje přeměnu tyrosinu v 3,4-dihydroxyfenylalanin (DOPA) a jeho konverzi na dopachinon.

Na tomto stupni se proces biosyntézy dělí; postupně je cyklizací syntetizován leukodopachrom, jeho oxidací pak dopachrom. Dekarboxylace vede dále k vzniku 5,6-dihydroxyindolu. Výsledný 5,6-indolchinon se následně vytváří jako polymerát při opakované kondenzaci v pozicích 3 a 7. Konečným produktem je komplex tyroxin-melanin, tmavší eumelanin.

Druhá cesta vede přes 5-S-cysteinyldopu k světlejšímu (žlutému) feomelaninu.

Při ozáření melaninu UV zářením dochází k fotooxidaci a tvorbě nestabilních volných radikálů semichinonového typu (především vlivem UVA zářením v oblasti 315-340 nm) – okamžitá reakce.

Pozdní reakce je stimulována především UVB zářením v oblasti 280 - 315 nm, méně vlnovými délkami v oblasti 315 - 500 nm. Zahrnuje syntézu nových melanosomů a proliferaci melanocytů. Reakce probíhá i v kůži neozářené, což se vysvětluje uvolňováním a cirkulací dosud neidentifikovaného mitogenního faktoru pro melanocyty.

K melanogenezi vedou i další fyzikální a chemické činitele přirozeného i arteficiálního původu. Různé léky i řada onemocnění, zejména zánětlivých a endokrinních, se projevuje hyperpigmentací kůže.

Fotoprotektivní působení melaninu spočívá ve fyzikálním krytí buněk stratum basale a cév horního koria a dále v rozptylu paprsků ultrafialového záření. Melanin také parciální absorpcí UV záření brání vzniku cytotoxických chemických substancí a při reakci s dalšími molekulami zachycuje volné radikály vyvolávající jinak dekompozici buněčných organel nebo membrán [1].

Eumelanin převládající v kůži jedinců s černými nebo hnědými vlasy, působí jako filtr UV záření a také má schopnost zhášet volné radikály. Feomelanin převládá u jedinců se světlou pletí a zrzavými nebo světlými vlasy, byl prokázán jako fotosenzitizér, protože zvyšuje tvorbu kyslíkových radikálů po UV ozáření.

Sarna ale tvrdí, že melaninové radikály jsou relativně nereaktivní a nebyl představen jasný důkaz interakce mezi melaninovými radikály a exogenními molekulami. Superoxidový aniont, na druhou stranu, reaguje rychle s melaninovými funkčními skupinami nebo sám se sebou aby se vytvořil H_2O_2 nebo O_2 .

Je spíše nepravděpodobné, že melanin v očích chrání buňky zhášením reaktivních molekul, které mohou být náhodně tvořeny v okolí buňky. Pokud hydroxylové radikály, singletový kyslík a nebo superoxidový aniont nebyly vytvořeny v melaninových granulech nebo v jejich těsné blízkosti, je enormně vysoká pravděpodobnost, že tyto reaktivní druhy budou zhášeny nějakou jinou buněčnou složkou a ne melaninem. Toto nastává z důvodu vysoké chemické reaktivity těchto radikálů s mnoha molekulami jako jsou komponenty cytoplazmy, membrány a subcelulární organely. Jen pokud jsou tvořeny v melanosomu, mohou být zhášeny melaninem [9].

Zda je eumelanin fotoprotektivní nebo není, závisí na čistém účinku absorpce záření (jeho screeningové schopnosti jsou určeny optickou hustotou); jeho tendencí poskytnout elektron kyslíku (autooxidace) produkcí superoxidového radikálu; a jeho schopností reagovat s oxidujícími radikály (působit jako zhášec radikálů).

Je možné, že melanin existuje v nerozpustné formě v neživých keratinocytech, které tvoří stratum corneum, a optický screening ve stratum corneum, široce zasažený množstvím eumelaninového pigmentu, je významný faktor ve fotoprotekci. Výsledky Haywood *et al.* ukázaly, že toto může být dosaženo nad 1 mg/ml koncentrace eumelaninu [10].

Data studie Maresca *et al.* ukazují, že feomelanin po UVA expozici indukuje epidermální modifikace náboje katalázy zprostředkované singletovým kyslíkem. Tato změna by mohla být považována jako časný a specifický marker pro akutní oxidativní poškození zprostředkované UVA ovlivňující světlou pokožku [11].

2 Fotochemie sigletového kyslíku

Singletový kyslík $^1\text{O}_2$, energeticky bohatší a vysoce reaktivní forma molekulárního kyslíku, hraje významnou roli v mnoha chemických a biologicky relevantních procesech. Zvláštní význam pro vznik $^1\text{O}_2$ mají fotosenzitizované reakce – světlem iniciované reakce sloučenin obsahujících chromofory, po jejich excitaci se přenáší absorbovaná energie na kyslík za vzniku $^1\text{O}_2$. Senzitizátory jsou účinné již při velmi nízkých koncentracích, protože jedna molekula senzitizeru může opakovaným přenosem energie produkovat mnoho molekul $^1\text{O}_2$ [2].

Termínem singletový kyslík $^1\text{O}_2$ je označována molekula kyslíku v elektronicky excitovaném stavu, v němž jsou všechny elektrony spárovány, takže multiplicita spinu je 1 (singlet).

V základním, energeticky nejnižším stavu má molekula kyslíku v nejvyšším antivazebném orbitalu dva nepárové elektrony s paralelními spiny a tedy multiplicitu spinu 3 (triplet). Naprostá většina látek, např. organické sloučeniny, anorganické anionty, obecné plyny, sloučeniny hlavních podskupin a nepřechodné kovy mají v základním stavu všechny elektrony spárovány. Jsou tedy v singletovém stavu a pro jejich reakce s tripletovou molekulou kyslíku na singletové produkty platí, podle pravidla zachování spinu, spinový zákaz. Důsledkem je, že všechny reakce kyslíku v základním stavu se singletovými molekulami mají velmi vysokou aktivační energii a probíhají měřitelnou rychlostí pouze tehdy, podaří-li se vytvořit podmínky pro obejití spinového zákazu.

Podstatou vysoké reaktivity $^1\text{O}_2$ je skutečnost, že jeho reakce s většinou chemických látek jsou spinově dovolené. Singletový kyslík vzniká řadou fyzikálních, chemických, fotochemických nebo biologických reakcí. Příkladem vzniku $^1\text{O}_2$ fyzikálním procesem je mikrovlnný výboj v kyslíkové atmosféře. Chemickou cestou je např. klasická reakce chlornanu s peroxidem vodíku, tepelný rozklad endoperoxidů, reakce ozonu a ozonidů s různými látkami a rozklad peroxochromanu nebo peroxomolybdenanu, případně dosud diskutovaná dismutace superoxidu na kyslík a peroxid vodíku. V biologických systémech produkují $^1\text{O}_2$ některé peroxidasy. K přímým fotochemickým reakcím patří fotolýza ozonu, probíhající zejména ve vyšších vrstvách atmosféry, fotolýza komplexů s přenosem náboje kyslík-organická molekula (CT přechody) a fotoexcitace molekulárního kyslíku [4].

2.1 Fotosenzitizované reakce kyslíku

Podle Grotthusova-Draperova teorému vyvolává chemickou změnu pouze světelné kvantum absorbované molekulou. Jelikož molekula kyslíku nemá v běžně přístupné oblasti UV-Vis záření výraznější absorpci, nejčastěji se excituje nepřímo prostřednictvím senzitizeru.

Senzitizer se absorpcí světelného kvanta dostává do excitovaného singletového stavu, který rychlou relaxací přechází na nejnižší excitovaný singletový stav S_1 . Stav S_1 se spontánně deaktivuje vnitřní konverzí, vyzářením přebytečné energie ve formě fluorescence nebo mezisystémovým přechodem do tripletového stavu. Deaktivace tripletového stavu mezisystémovým přechodem nebo fosforescencí jsou zakázané přechody, a proto mají tripletové stavy senzitizerů poměrně dlouhou dobu života a mohou se zúčastňovat řady bimolekulárních interakcí. Jejich zhášení rozpuštěným kyslíkem probíhá přenosem energie z excitovaného senzitizeru na kyslík a vede ke vzniku 1O_2 ve dvou singletových stavech označovaných jako $O_2(^1\Delta_g)$ a $O_2(^1\Sigma_g)$. Zhášení senzitizeru kyslíkem může rovněž probíhat přenosem elektronu za vzniku superoxidového anionradikálu O_2^- . Přenos energie nebo elektronu na kyslík jsou kompetitivní reakční cesty a záleží na fyzikálně-chemických a fotofyzikálních vlastnostech senzitizeru, která z nich převáží.

Deaktivace excitovaných stavů je fyzikální monomolekulární proces, kdežto zhášení kyslíkem případně jinou molekulou je bimolekulární reakce.

Účinnost fotochemické reakce charakterizuje kvantový výtěžek, který je definován zlomkem (počet přeměněných molekul)/(počet absorbovaných světelných kvant). Z definice je zřejmé, že jeho hodnoty jsou ≤ 1 . Může však nabývat i hodnot > 1 v případech, kdy je počet přeměněných molekul zvyšován následnými reakcemi, např. řetězovou nebo fotokatalytickou reakcí [4].

2.2 Singletový kyslík

Ve většině literatury pojednávající o 1O_2 v roztoku, zejména v kontextu s fotodynamickým efektem, je termínem singletový kyslík označována stabilnější forma singletového kyslíku $O_2(^1\Delta_g)$. V posledních letech významně vzrostl zájem o generaci a reakce energeticky bohatší, ale méně stabilní formy $O_2(^1\Sigma_g)$ v roztoku i v plynné fázi.

Zhášení tripletových stavů senzitizerů v některých organických rozpouštědlech produkuje v primárním kroku přenosu energie jak $O_2(^1\Delta_g)$ tak i $O_2(^1\Sigma_g)$. Poměr mezi

produkcí obou forem singletového kyslíku $^1\Sigma/^1\Delta$ závisí na povaze senzitizeru i rozpouštědla. Experimentální doba života $O_2(^1\Delta_g)$, $\tau\Delta$, je významně závislá na rozpouštědle a nabývá hodnot od přibližně 4 μ s ve vodě až po 100 ms v některých slabě interagujících halogenovaných uhlovodících.

Singletový kyslík v roztoku zaniká třemi cestami: fosforescencí, srážkami s molekulami rozpouštědla nebo zhášením. Zhášení znamená interakci s okolními molekulami a nemusí vždy vést k chemické změně. Může nastávat přenosem energie na molekulu zhášeče, která ji následně rozptyluje do okolního rozpouštědla. Tento mechanismus se označuje jako fyzikální zhášení a takto působí např. β -karoten či některé komplexy přechodných kovů. Zhášení může probíhat také chemickou reakcí - oxidací reaktantu (chemické zhášení). Vzhledem k vysoké reaktivitě 1O_2 existuje množství jeho oxidačních reakcí, které však mají jisté selektivní rysy. Typickou reakcí je adice na dvojnou vazbu C=C, izolované nebo konjugované, jako jsou oxidace olefinů (en-reakce, [2+2] cykloadice), 1,3-dienů ([4+2] cykloadice), aromatických sloučenin a heterocyklů. Meziprodukty, případně produkty, jsou dioxetany, endoperoxidy a peroxosloučeniny. Reakce nenasycených lipidů jsou typicky en-reakce [4].

2.3 Praktické aplikace singletového kyslíku

2.3.1 Organická syntéza

Singletový kyslík je používán v organické syntéze jako silné a přitom selektivně působící oxidační činidlo. Základními reakcemi jsou adice na vazbu C=C a to en-reakce, 2+2 cykloadice, 4+2 cykloadice, a dále oxidace sulfidů.

Typickým příkladem je fotooxygenace 4-methylpent-3-en-2-olu na β -hydroperoxyalkohol, který po konverzi poskytuje 1,2,4-trioxan vykazující antimalarickou aktivitu. Průmyslově provozovaná fotooxidace (-)-citronellolu senzitizedá bengálskou červení poskytuje za redukčních podmínek odpovídající allylalkohol, následně po konverzi v kyselém prostředí cyklický terpenoid, který je významnou komponentou používanou při výrobě parfémů.

2.3.2 Fotomedicína

Fotodynamická terapie (photodynamic therapy, PDT) je neinvazivní metodou léčby nejrůznějších typů rakoviny kombinovaným užitím viditelného či blízkého infračerveného světla a senzitizeru. Senzitizer je zaveden do krevního řečiště a postupně

se akumuluje v neoplastických tkáních. Tumorová tkáň s akumulovaným senzitizerem je ozářena světlem s vlnovou délkou 600–900 nm (oblast tzv. terapeutického okna), které prochází tkání do větší hloubky a excituje senzitizer.

PDT se používá při léčbě kožních melanomů, rakoviny plic, mozku, ústní dutiny, jícnu, peritoneální dutiny, žaludku, střev, jater, močového měchýře, prostaty a děložního čípku. Fotodynamická metoda našla také využití při léčbě degenerativních změn na sítnici (Visudyne, Purlytin), nemoci koronárních cév, chronického zánětu dásní a mikrobiálních infekcí.

Podrobnější informace v kapitole o fotodynamické terapii.

2.3.3 Desinfekce

Fotodynamická inaktivace bakterií, virů, kvasinek a prvoků (photodynamic antimicrobial chemotherapy, PACT) je založena na stejném principu jako PDT. Vlastnost senzitizerů způsobujících fotoinaktivaci *in vitro* i *in vivo* se souhrnně označuje jako fototoxicita nebo fotocytotoxicita.

Celkový fototoxický efekt je zpravidla způsoben $^1\text{O}_2$, ale mohou k němu přispívat superoxidový anion-radikál $\text{O}_2^{\bullet-}$, hydroxylové radikály OH^\bullet , případně další radikály senzitizeru nebo jiných přítomných molekul. Zatímco při PDT se používají téměř výhradně porfyrinoidní senzitizery, pro fotodynamickou dezinfekci se používají i fenothiazinová barviva (methylenová modř), aminoakridinová barviva a xanthenová barviva (bengálská červeň).

Perspektivní využití $^1\text{O}_2$ se objevuje v oblasti dezinfekce krve a krevních derivátů pro transfuze. Při současné potřebě transfuzí a nebezpečí infekce musí dezinfekční proces splňovat náročné standardy. Především je třeba, aby byly cíleně zasaženy patogeny různé povahy - viry (HIV), bakterie, kvasinky, prvoci (*Plasmodium malariae*) a přitom nebyly ohroženy krevní komponenty jako např. červené krvinky. Fotodynamická metoda je založena na skutečnosti, že krevní plasma a červené krvinky neobsahují nukleové kyseliny, kdežto bílé krvinky a infikující mikroorganismy nukleové kyseliny obsahují. Lze proto použít selektivně působící kationtové senzitizery s planární strukturou, které se interkalují do DNA mezi páry bází. Dalším požadavkem je, aby senzitizery absorbovaly záření v oblasti mimo absorpci hemových pigmentů, tedy vlnové délky větší než 600 nm. Tomu vyhovují modrá barviva jako jsou kationtové ftalocyaniny Zn nebo Si a fenothiazinová barviva.

2.3.4 Úprava a čištění vody

Použití $^1\text{O}_2$ k úpravě a čištění odpadních vod umožňuje odstranění mikrobiálního znečištění i oxidativní degradaci organických polutantů např. barviv nebo fenolických látek. Optimálního výsledku při inaktivaci Gram-pozitivních i Gram-negativních bakterií bylo dosaženo při použití kationtových porfyrinů nebo kationtových ftalocyaninů. K odstraňování koliformních bakterií z fekálních vod určených k recyklaci byla použita kombinace kationtového porfyriu, bengálské červeni a methylenové modři. Pro velké objemy čištěné vody jsou z důvodu snadnější regenerace výhodnější imobilizované senzitivátory zakotvené na tuhém nosiči. K detoxifikaci (také od chemických pesticidů) a k dezinfekci vody byly použity porfyrinové senzitivátory zakotvené na poly(methylmetakrylátu).

2.3.5 Pesticidy

Narozdíl od konvenčních chemických pesticidů, jejichž vedlejším účinkem je kontaminace půdy a povrchových vod, jsou fotodynamické pesticidy netoxické a nezatěžují životní prostředí, protože jsou účinné v mnohonásobně nižší koncentraci a vlivem slunečního záření se rozkládají většinou během několika hodin. Jako fotodynamické pesticidy se používají xanthenová barviva (floxin B, bengálská červeň, uranin), furokumariny (psoraleny) a porfyriny, zejména endogenní, akumulované v tkáni v důsledku vysokých dávek ALA. Tyto pesticidy mohou zároveň působit jako detoxifikační činidla při odstraňování zamoření chemickými pesticidy. Fotoinsekticidní aktivitu vykazují xanthenová, fenothiazinová, akridinová barviva, furokumariny, porfyriny a některé další látky. Použití porfyrinů jako fotodynamických insekticidů je výhodné pro jejich příbuznost s biologicky aktivními látkami, pro kterou jsou dobře přijímány organismy, vysoké kvantové výtěžky $^1\text{O}_2$ a absorpci světla v širokém pásmu blízkého UV a VIS záření, tedy v pásmu slunečního záření.

2.3.6 Chemický kyslíko-jodový laser

Kyslíko-jodový laser je chemickým laserem (chemical oxygen-iodine laser, COIL), který převádí energii chemické reakce na fotony. Je založen na elektronickém přechodu mezi prvním elektronovým a základním stavem atomárního jodu $\text{I}(^2\text{P}_{1/2}) \rightarrow \text{I}(^2\text{P}_{3/2})$ a protože kontinuální laserová oscilace probíhá v blízké infračervené oblasti na vlnové délce 1,315 μm , je COIL chemickým laserem s nejkratší vlnovou délkou. Díky vhodné vlnové délce pro vláknovou optiku, dostupnosti základních chemikálií a možnosti získat

vysokoenergetické svazky byla vývoji technologie COIL věnována velká pozornost. Uvádí se, že COIL je vhodný pro průmyslové aplikace jako je vysokorychlostní řezání nebo vrtání [2].

3 Negativní účinky UV záření na organismus

3.1 Negativní účinky UV záření na kůži

UV záření hraje hlavní roli v patogeneze spálení sluncem, rakoviny kůže a solární elastózy (photoageing) lidské kůže a kůže experimentálních zvířat [12].

UV transformuje buňky v kůži, které jsou obvykle eliminovány imunitním dozorem, ale UV záření způsobuje také imunosupresi, která dovoluje rakovinným buňkám uniknout a vyvíjet se. Poškození DNA v kůži může hrát důležitou roli při vytváření imunosuprese, protože tyto mechanismy, které experimentálně usnadňují odstranění cyklobutanových pyrimidinových dimerů indukovaných UV, začínají kaskádou dějů vedoucí k uvolnění cytokinů. UV záření indukuje produkci mnoha rozpustných faktorů epidermálních buněk a některé byly ukázány jako imunosupresivní (schéma 1) [13].

UVB záření je známo tím, že vyvolává erytém, karcinom a změny ve stárnutí kůže jako důsledek přímé absorpce fotonu DNA v kůži savců. Naproti tomu buněčné poškození způsobené UVA zářením, zahrnující zčervenání kůže a pigmentaci, je silně závislá na přítomnosti kyslíku, indukující nepřímou senzitivizační reakci (tak zvaný typ II nebo fotodynamická reakce). Ta zahrnuje tvorbu reaktivních druhů kyslíku jako je singletový kyslík ($^1\text{O}_2$), superoxidový anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$) nebo hydroxylový radikál ($\bullet\text{OH}$) [12].

UV indukovaný zánět a erytém, produkované aktivními kyslíkovými radikály, urychlují nádorové bujení. Také hyperplazie znamená zvýšení mitotické aktivity a toto samotné je děj urychlující vznik nádoru [13].

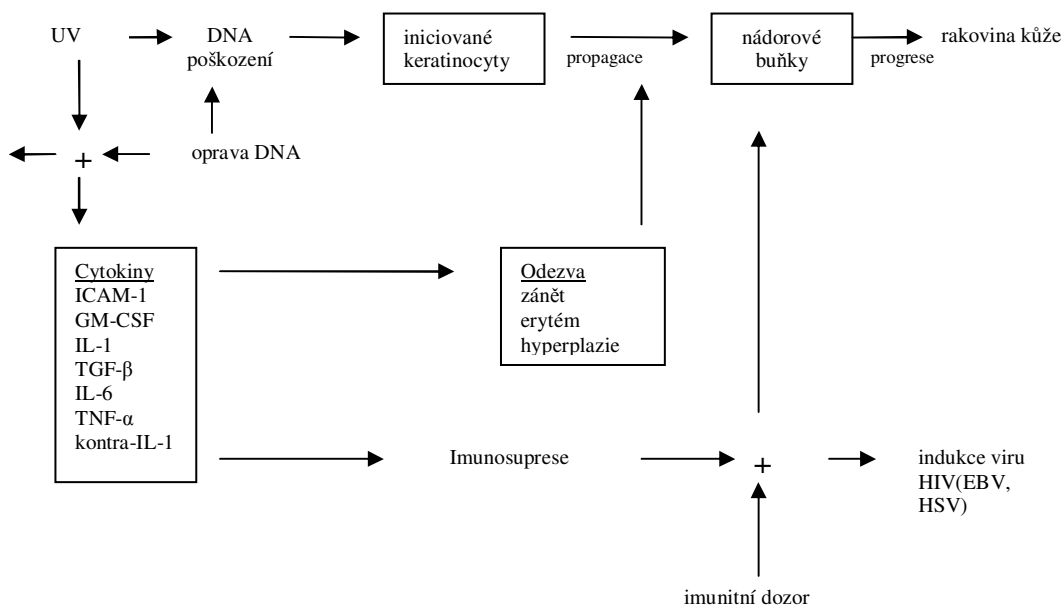


Schéma 1. Působení UV záření na buňku [13].

UV záření vyvolává na kůži dvojí typ účinků, a to časné a pozdní spojené s opakovanou expozicí slunci a vedoucí k aktinickým změnám. K prvním lze řadit radiačně podmíněný zánět a imunologické změny. K druhým se počítá stárnutí kůže, solární keratóza a fotokancerogeneze [12].

3.1.1 Radiačně podmíněný zánět

Absorpce ultrafialového záření bílkovinami a DNA kůže má za následek vznik molekulárního buněčného poškození, spojeného s poruchou tkáňových funkcí a zánětem. Příznaky zánětu nastávají spolu s poruchami funkce v průběhu několika hodin, nejvýš dnů. V histologickém obraze se projevuje spongiózou epidermis, vazodilatací v dermis, edémem, neutrofilní a mononukleární infiltrací, později tvorbou zvláštního typu aktinicky poškozených buněk, tzv. „sunburn cells“. Souběžně s vývinem zánětlivé reakce lze pozorovat uvolnění mediátorů typu prostaglandinů a cytokinů. Jde-li o reakci na UVB ozáření (erytemogenní je převážně UVB záření o vlnové délce 300 nm), pak dochází k zvýšení koncentrace interleukinu 1 a TNF (tumor necrosis factor). K tomu se přidává i zvýšená exprese intercelulárních adhezivních molekul 1 (ICAM-1) [1].

3.1.2 Imunologické změny

Všechna tři pásma UV záření vyvolávají na kůži i při nízkých dávkách radiace poškození Langerhansových buněk a ovlivnění jejich funkce.

Histologickým vyšetřením lze prokázat morfologické změny a snížení počtu epidermálních Langerhansových buněk v ozářeném místě. Toto zjištění podpořilo hypotézu, že UVB záření ovlivňuje funkce buněk prezentujících antigen, a tak mění typ vzniklé imunitní odpovědi.

Existují i poznatky o tom, že též buňky infiltrátu, které se dostaly do kůže v rámci zánětlivé odpovědi na UV ozáření, se mohou chovat jako buňky prezentující antigen, a mohou tak přispívat k změnám imunitní odpovědi.

Poškození DNA navozené UVB zářením spouští kaskádu procesů, vedoucích ve svém důsledku k antigen-specifické, systémové, T-lymfocyty podmíněné imunosupresi [1]. Přitom hraje hlavní roli uvolnění inhibičních mediátorů (IL-10, TNF α , IL-1 α , cis-urokanová kyselina, α -melanocyty stimulující hormon) z epidermis exponované UV. Tyto mediátory mohou působit nejen lokálně v kůži, nýbrž, pokud se dostanou do krevního oběhu, také modulovat systémové funkce antigen prezentujících buněk a také T-buněk. Důležitý funkční model pro hodnocení lokální a systémové imunosuprese vyvolané indukované UV je reakce kontaktním ekzémem [14].

UV záření musí být v rámci imunitních dějů nejprve absorbováno příslušným fotoreceptorem, v tomto případě buňkou kůže, a jeho fyzikální energie transformována v biochemický stav. UV záření může pak přímo aktivovat geny s vyvoláním strukturálních změn DNA, nebo poškozovat DNA nepřímo prostřednictvím působení kyslíkových radikálů. UV záření je schopno působit lipidickou peroxidací buněčných membrán a tak aktivovat geny pomocí intracelulárních signálních procesů. Může konečně izomerizovat molekuly urokanové kyseliny nacházející se ve stratum corneum a mající imunosupresivní vlastnosti. Ty spočívají v supresi kontaktně alergické i pozdní přecitlivělosti organismu, s ovlivňováním Th1 lymfocytů, systém cytokinů, Langerhansových buněk a některých neuropeptidů [1].

UV zářením indukované poškození DNA a uvolnění cytokinů z kůže, neopravené poškození DNA u lidských genetických nemocí může vést k chronické nadprodukci cytokinů. Vysoké hladiny cytokinů, které reagují s elementy imunitního i nervového systému mohou zhoršit funkci přílišnou stimulací cílových buněk nebo provokovat autoimunitní odpovědi [13].

3.1.3 Stárnutí kůže (photoageing)

Stárnutí je multifaktoriální komplexní proces, ale existují významné důkazy, že akumulace oxidativního poškození DNA a změny v genové regulaci jsou dva základní rysy tohoto fenoménu [15].

Photoageing představuje souhrn morfologických, biochemických a funkčních změn, které jsou manifestovány v kůži obvykle vystavené slunci.

Po vzhledové stránce se jedná o výskyt vrásek, zdrsnění a ochabnutí tonu kůže, skvrnitě hyperpigmentace, lentig, aktinických keratóz, hrubého ztlustění, vzniku fibrotické depigmentace, suchého olupování, zažloutnutí, atrofie a teleangiektazií.

V histologickém obraze je nápadné ztlustění epidermis, zejména její rohové vrstvy, s akantózou provázenou přítomností buněčných atypií, ztrátou polaritu a význačnou variabilitou velikosti buněk a jejich funkčních vlastností. Změny postihují i cévy, z nichž mnohé jsou obliterované, zbylé v různé míře dilatované či vinuté. Také dochází k degradaci horizontálního plexu [1].

Lopez *et al.* zjistili, že vysoká expozice ($\geq 2,8$ minimální erytémové dávky, MED) způsobila 10-30% zvýšení v síle vrstvy dermis-epidermis. Odezva nebyla vždy přímo úměrná dávce UV záření a maximální zesílení nastalo 48 h po ozáření. V některých případech se vyskytlo rozšíření zesílení do okolní oblasti vzdálené až 4 cm od ozářeného místa [16].

Expozice kůže UV záření indukuje aktivitu metaloproteináz, z čehož vyplývá pomalá degradace kolagenu a dalších složek extracelulární matrix. Ten je rozpouštěn enzymy produkovanými zánětlivými buňkami, takže se ve významně poškozených oblastech kůže vůbec nevyskytuje. Na jeho místě se nachází elastická vlákna a glykosaminoglykany.

Carbonare a Pathak věří, že patogeneza dermatoheliozy (photoageing) je spojena s přímým účinkem fotonů na buněčnou DNA a nepřímým účinkem volných radikálů a reaktivních druhů kyslíku ($^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$), které jsou tvořeny při UVB a UVA záření. Endogenní chromofory jako riboflavin, některé chinony (ubichinon), NADPH, porfyrity a další molekuly (např. keton, acetoacetát) s karbonylovými skupinami přispívají k tvorbě reaktivních druhů kyslíku mechanismem fotosenzitizace II typu, který zahrnuje přenos energie z chromoforu na molekulu kyslíku. Tyto volné radikály a reaktivní druhy kyslíku indukují tvorbu příčných vazeb mezi řetězci proteinu.

Kolagen s takovými vazbami v řetězci je vždy málo rozpustný, rezistentní k působení pepsinu a ztrácí své kontraktilní vlastnosti. S opakovanými expozicemi vysokým dávkám UVA záření roste množství příčných vazeb mezi řetězci, což vede k zvýšení nerozpustnosti kolagenu a jeho denaturaci a časem k stárnutí kůže [1].

Hazane *et al* zjistili, že MMP3 a MMP1 se zvýšily s věkem v základním stavu a po ozáření. MMP3, také známý jako stromelysin 1, degraduje fibronektin, laminin, kolageny III, IV (základní komponenty bazální membrány) IX a X. MMP1, také nazývaný intersticiální kolagenóza je zapojena v rozkladu kolagenu I, II a III. Bylo demonstrováno, že mRNA kódující MMP1 byla zvýšena během stárnutí. MMP1 byla zvýšena také v kůži exponované slunci, po ozáření 1 MED a v kůži kuřáků. To znamená, že je pozorován stejný trend u vnitřního stárnutí a fotoageingu.

Buněčné odezvy následující po oxidačním stresu se pravděpodobně mění s věkem. Opravdu bylo navrženo, že stárnutí by mohlo vyplývat z dlouhodobé buněčné redoxní nerovnováhy.

Hazane *et al* také ukázali, že geny TXN, GSS a APEX, což jsou důležité geny přispívající k regulaci redoxního stavu buňky, jsou indukovány v menší míře u starších jedinců a po oxidačním stresu vyvolaném UVA [15].

Během stárnutí se také kumulují mutace mitochondriální DNA. Nejčastější mutace je vypuštění 4,977 páru bází, také zvané společná delece (common deletion), které je zvýšeno v kůži zestárlé vlivem světla.

Kyslíkové radikály mohou poškodit mtDNA a poškození peroxidem vodíku je rozsáhlejší v mtDNA než v nukleární DNA. Navíc bylo ukázáno, že zvýšení oxidačního stresu je spojeno s pozměněnou funkcí mitochondrie *in vivo*.

Berneburg *et al.* demonstrovali, že oxidativní stres je opravdu zodpovědný za tvorbu široké škály delecí mitochondriální DNA v lidských buňkách vystavených UVA záření, které indukuje stárnutí tkání za normálních podmínek [17].

3.1.4 Fotokarcinogeneze

Buňky poškozené UV zářením funkčně postrádají reparační systémy, které jinak zabezpečují jejich integritu. Z toho vyplývá vznik mutací DNA v oblasti onkogenních a tumor-supresivních genů a tvorba maligních buněčných klonů. Geny podílející se na maligní transformaci UV zářením poškozených epidermálních buněk jsou např. ras-onkogeny inaktivující tumorsupresorový gen p53, který za normálních podmínek navozuje v buňkách poškozených UV zářením apoptotické změny. Jestliže je vlivem

mutace funkce takového genu vyřazena, vznikají mutované buňky a nastává nádorový růst. Kromě mutace genu p53 může mutace postihovat i další tumor suprimující gen, a to tak zvaný *patched* (PTCH) gen, zúčastňující se např. při vzniku bazaliomů.

K poruše apoptotických pochodů dochází však také na p53 nezávislým procesem, a to radiační poruchou integrinů, které za normálních okolností odstraňují transformované buňky adhezivními mechanismy řízené buněčné smrti.

Na vzniku karcinomů spolupůsobí také imunosuprese navozená UV zářením.

Za tyto pozdní následky solární expozice je převážně zodpovědná UVB oblast [1].

Množství studií demonstrovalo přílišnou expresi cyklooxygenázy 2 (COX-2) v kůži chronicky ozářené UVB, stejně jako v premaligních poškozeních a skvamózních buněčných karcinomech indukovaných UVB. Jeden z produktů COX-2, prostaglandin E₂ (PGE₂), byl ukázán jako kritický hráč zprostředkující přispívání dráhy COX-2 k vývoji rakoviny. PGE₂ hraje klíčovou roli v normální kožní homeostáze, ale může také působit jako promotor nádoru, kontrolující mnoho reakcí typických pro nádorové buňky. PGE₂ může stimulovat zvýšenou proliferaci, změněnou adhezi, zvýšenou migraci a zvýšenou invazivnost nádorových buněk.

Účinek PGE₂ na různé typy buněk závisí na repertoáru E prostanoidních (EP) buněčných receptorů. Nové zprávy ukazují zvýšené hladiny EP₁ v myších nádorových kožních buňkách a demonstrují, že tento receptor je kritický pro mitogenní účinek PGE₂ na tyto buňky in vitro.

Tober *et al.* shledali, že blokování EP₁ receptoru topickou aplikací specifického antagonisty EP₁, ONO-8713, úspěšně snížilo infiltraci neutrofilů do kůže v odezvě na akutní UVB expozici. Také demonstrovali, že blokování signalizace EP₁ receptoru použitím ONO-8713 významně redukovalo vývoj nádoru indukovaný UVB.

Ovšem kombinace inhibitoru COX-2 a specifického blokátoru EP₁ nebyla účinnější než samostatné podání těchto látek. To poukazuje na to, že také ostatní EP receptory se mohou podílet na procesu kožní karcinogeneze [18].

3.1.5 Indukce virů

Několik lidských virů, obzvláště HIV-1, herpes simplex virus (HSV-1) a virus Epstein-Barrové (EBV), latentně hostují v těle, dokud extracelulární stimulace neindukuje plnou genovou expresi viru. V případě HIV-1, je jeho DNA i RNA nacházena v pokožce pacientů a UV je silný stimulant pro indukci HIV v infikovaných

buňkách v kultuře a v kůži transgenních myší. Indukce je započata poškozením DNA, protože exprese z promotéru HIV je indukována při nižších dávkách UV záření v XP buňkách s defektní opravou DNA než v buňkách s dokonalou opravou. Exprese z HIV promotéru navozená UV je zprostředkována rozpustnými faktory (schéma 1) a nepřekvapivě mnoha stejnými cytokiny, které vyvolávají transkripci z HIV promotéru a jsou také imunosupresivními faktory indukovanými UV [13].

3.1.6 Poškození vlasů

Je dobře známo, že expozice UV záření poškozuje vlasové vlákno. Suchost, redukováná síla, hrubá struktura povrchu, ztráta barvy, snížení lesku, tvrdost a křehkost vlasů jsou způsobeny sluneční expozicí. Fotochemická degradace vlasů je důsledek ataku na proteiny a melaniny vlasů. Degradace vlasových proteinů je indukována vlnovými délkami 254-400 nm. Chemicky jsou tyto změny zřejmě způsobeny UV zářením vyvolanou oxidací molekul obsahujících síru ve střední části vlasu. Také se vyskytuje oxidace amidového uhlíku polypeptidového řetězce.

Ve většině případů jsou pozměněny aminokyseliny v kutikule ve více než v kortexu, protože vnější vrstva vlákna přijímá v vyšší intenzity záření. Tato expozice může způsobit rupturu a oddělení externích vrstev vyplývající v třepení konečků.

Santos Nogueira a Joeques tvrdí, že viditelné záření je většinou zodpovědné za změny barvy vlasů, a uvádějí, že jen blond vlasy jsou zesvětlené UVA zářením, tmavé vlasy jsou zasaženy jen viditelným světlem. Také podotýkají, že poškození aminokyselin kutikuly je podobné u obou typů vlasů z důvodu absence pigmentu v této oblasti.

Ve své studii Santos Nogueira a Joeques ukázali, že UVB záření je hlavně zodpovědné za ztrátu proteinů ve vlasech a že barevné změny jsou způsobeny převážně UVA zářením [19].

3.2 Fotodermatózy

Jsou to nemoci vyvolané zvýšenou citlivostí na světlo. Lze je klasifikovat do pěti skupin:

- idiopatické (primární)
- sekundární vyvolané zevním činitelem (fototoxické a fotoalergické),
- sekundární vyvolané vnitřním činitelem (nejčastěji porfyrie)

- fotoexacerbované dermatózy (autoimunitní, infekční nemoci, poruchy výživy, a primárně nefotosensitivní choroby)
- genodermatózy [20]

3.2.1 Idiopatické fotodermatózy

3.2.1.1 Chronická polymorfní fotodermatóza

Je nejčastější z těchto fotodermatóz, s tím, že se její prevalence v obyvatelstvu odhaduje na 10-20% podle geografické oblasti. Je autozomálně dominantně dědičná s penetrací ve 3% u nezatížených a až 50% u geneticky ohrožených osob.

Významným faktorem je u této choroby vliv životního prostředí z hlediska radiační intenzity – lidé žijící v oblastech s intenzivním slunečním zářením onemocní méně často, i když jsou světlé pleti.

Klinický obraz se může u jednotlivých osob i významně lišit. Kožní výsev nastane často již po několika hodinách, jindy však i dnech po expozici slunci. Expozicí přitom může být jak první jarní oslunění, tak i příležitostná vydatná insolace v průběhu sezóny, zejména v tropických oblastech nebo horách. Objektivně lze pozorovat formy papulózní, papulovezikulární, vezikulózní až bulózní, ekzematózní, ložiskově infiltrativní, výjimečně i purpurózní nebo charakteru erythema exsudativum multiforme.

Léze, které svědí, se lokalizují s výjimkou čisté pruriginózní formy na slunci vystavených místech kožního povrchu, a to nejčastěji ve výstřihu a na extenzorových plochách paží. Kožní změny se spontánně hojí přibližně za 24 hodin až týden, pokud mezitím nedojde k dalšímu oslunění.

UV spektrum vyvolávající změny na kůži se nalézá asi u dvou třetin nemocných v UVA oblasti, pouze jedna čtvrtina reaguje pozitivně na ozáření kombinací UVA+UVB radiace. Jen vzácně se popisují pozitivní reakce po provokaci samotným UVB zářením [1].

3.2.1.2 Hydroa vacciniforme

Nemoc je vzácná a projevuje se vznikem hluboko uložených puchýřků různé velikosti na slunci exponovaných místech kožního povrchu, převážně na obličeji, ušních boltcích, dorzech rukou a na předloktích. Tyto eflorescence, provázené při svém vzniku intenzivním svěděním, jsou zpravidla přítomny na povrchu větších edematózních makulopapulózních ložisek. Obsah puchýřů, které mohou být i multilokulární, je

zkalený. Léze se pomalu hojí a postupně se mění v odlučující se impetiginizované krusty a pak v trvalé jizvičky, připomínající změny po proběhlém onemocnění planými neštovicemi nebo po vakcinaci.

Výsevy nastávají po pobytu na slunci v jarním a letním období, vzácně i po zimním slunění. U většiny nemocných se po dovršení věku 20 let výsevy spontánně zastaví, zcela mimořádně přetrvávají i později.

Výjimečně dochází souběžně i k vzniku očních změn, a to ponejvíce keratokonjunktivitid, méně často vesikulárních erupcí na spojivce a rohovce, infiltrací rohovky s vaskularizací a keratouveitid.

Histologicky lze nalézt ložiskovou epidermální nekrózu se vznikem intraepidermálních vehikul či bul, obsahujících polymorfonukleární infiltrát a zbytky nekrotické tkáně. V přilehlém koriu se nachází nevýrazná lymfocytární a polymorfonukleární infiltrace, uložená zčásti perivaskulárně [21].

Modeste et al. zjistili, že 3 omega polynenasycené mastné kyseliny obsažené v rybím tuku redukují lokální zánět vyvolaný expozicí slunečnímu záření tím, že zvyšuje hladinu 3-omega nenasycených mastných kyselin v epidermis a snižuje hladinu prostaglandinů v kůži [22].

3.2.1.3 Urticaria solaris

Může jít o primární (idiopatický) typ nebo sekundární typ, kdy se jedná o následek fotosenzibilizace různými zevními prostředky, nejobvykleji léky.

Klinický projev je následkem alergické reakce časného typu na přítomnost fotoalergenu nacházejícího se buď v kůži, nebo cirkulujícího v krevním oběhu. Na akčním spektru záření vyvolávajícím výsev závisí molekulová hmotnost tohoto alergenu. Pokud jde o nespecifické cirkulující protilátky, patří podle dosavadních zjištění do třídy IgE imunoglobulinů. Specifické protilátky se vyskytují jen u idiopatických forem nemoci. Předpokládá se současně, že erupce u sekundární solární urtikarie jsou neimunologického původu, akční spektrum odpovídá struktuře fotosenzibilizátoru a alergen může být přítomen u kterékoliv osoby.

Vlastní mechanismus fotoreakce spočívá v uvolnění mediátor, zejména histaminu, a degranulaci žírných buněk, za účasti eozinofilních leukocytů a neutrofilních, chemotakticky působících faktorů. Významnou tu má být i úloha bazických proteinů, původem z eozinofilních leukocytů

Tkáňové změny jsou krátkodobé a spočívají ve vzniku edému v korigu s roztačením kolagenních svazků, degranulací žírných buněk, eozinofilní a neutrofilní perivaskulární infiltrací.

Výsevy nastávají na slunci vystavených plochách kůže po expozici trvající několik málo minut. Erupce obvykle ustoupí do hodiny či dvou. Spočívá ve vzniku jednotlivých nebo navzájem splývajících mnohotných kopřivkových ostře ohraničených pupenů porcelánovitě růžové barvy, subjektivně svědících či pálicích. Tyto místní změny jsou nezhřídka provázeny celkovými příznaky – bolestmi hlavy, nauzeou, bronchospasmy i mdlobou.

Sekundární, značně častěji pozorovaný typ solární urtikarie bývá diagnostikován po senzibilizaci některými zevně aplikovanými sločeninami, nejobvykleji používanými terapeuticky, jako jsou například dehet, anilinová barviva, z léčiv pro vnitřní použití pak ponejvíce po nesteroidních antirevmaticích [1].

3.2.1.4 Chronická aktinická dermatitida

Je to imunitně zprostředkovaná fotodermatóza, sestávající z perzistentní reaktivity na světlo, aktinického retikuloidu, fotosenzitivního ekzému a fotosenzitivní dermatitidy.

Klinicky se projevuje chronickými pruriginózními ekzematózními změnami s lichenizací, lokalizujícími se s převahou na slunci exponovaných místech kožního povrchu, které u větší části pacientů postupně přejdou v erythrodermii.

Může ale dojít k výskytu postižení i na stíněných částech těla, např. oční víčka, což může mít příčinu v asociované alergické kontaktní dermatitidě.

Při epikutánních testech se u některých pacientů zjišťuje pozitivita na rostlinné antigeny, zejména druhu Compositae.

Histologicky se v postižené kůži nachází epidermální spongióza a akantóza, někdy s hyperplazií. Charakteristickým nálezem jsou husté, převážně perivaskulární lymfocytární infiltráty v horním korigu a epidermis, s predominancí CD8+ lymfocytů nad CD4+ buňkami, zejména v epidermis [23].

3.2.2 Sekundární fotodermatózy

Velká skupina zcela nepříbuzných kožních onemocnění má vlastnost měnit vlivem slunečního záření různých vlnových délek svůj klinický vzhled nebo laboratorní charakteristiky. U jiných chorob je možno pozorovat provokační vliv této radiace na

klinickou manifestaci onemocnění, například účastí ve vzniku protilátek nebo uvolňování cytokinů.

Přehled sekundárních fotodermatóz:

- Psoriáza – kromě podráždění navozeného zářením a zhoršení akutního výsevového stadia může být tato choroba vyvolávána přímo UV zářením.
- Atopická dermatitida – jde nejčastěji o vznik pruriginózních uzlíků nebo ložisek typu ekzematózní formy chronické polymorfni fotodermatózy
- Seborrhoická dermatitida
- Lichen planus – klinicky se manifestuje modrohnědými okrouhlými skvrnami s ostrým ohraničením, nichž se postupně vyzdvihují blednoucí okraje a zbývá zanořené hnědavé centrum. Vyskytuje se nejčastěji již v mladším věku, převážně u žen s tmavší kůží v oblastech zvýšené UV-radiační aktivity.
- Kožní T-buněčný lymfom – je často přítomen v slunci exponovaných oblastech kůže, zejména na obličeji, kde může výt solitární nebo existovat mnohotně jako miliární typ nemoci. V řadě sdělení byl konstatován její společný vznik s některou ryzí fotodermatózou, poněvorce se solární urtikarií, PMLE, či aktinickým retikuloidem.
- Karcinoidní syndrom
- Lymfocytární infiltrace Jessnera-Kanofové – přichází častěji u mužů jako solitární nebo vícečetná erytematoinfiltrativní ložiska. Histologicky se jedná o perivaskulární a perifolikulární lymfocytární infiltrace v dermis preferenčně ve fotosenzitivních lokalizacích na obličeji, méně často na krku a vzácně na trupu.
- Diseminovaná povrchní aktinická porokeratóza – jde o hereditární onemocnění s autozomálně dominantní dědičností s nízkou penetrací genu. Klinické změny tu mají být následkem expozici mutovaných klonů epidermálních buněk slunci. U postižených může docházet i k maligní transformaci kožních změn.
- Erythema exsudativum multiforme
- Pelagra – dnes již řídká nemoc způsobená deficitem niacinu nebo jeho prekurzoru tryptofanu. Kromě nedostatku v dietě může být vyvolána některými léky (izonikotinyhydrazin), karcinoidními nádory, případně podmíněnou poruchou metabolismu aminokyselin s aminoacidurií. Projevuje se erytémovými, deskvamativními dermatitickými a pigmentačními změnami, někdy puchýři na slunci exponovaných místech obličeje, krku, horních a dolních končetin.

- Herpes simplex
- Erythematodes akutní a chronický – vznik klasického motýlovitého erytému na obličeji s palmárním erytémem, lézemi ústní sliznice, cheilitidou a urtikarií u systémového erythematodu (SLE); papuloskvamózních lézí s erytémem a infiltrací, přecházejících v pigmentovaná jizvící ložiska u chronického diskoidního erythematodu (DLE). Důvod zvýšené fotosenzitivity se shledává buď v reakci na uvolňování cytokinů, navozené UV zářením, nebo vůči translokaci vyvolané UV zářením sekvestrovaných antigenů v epidermis a koriu, či konečně ve změněném specifickém imunologickém efektorovém mechanismu.
- Dermatomyozitida – zvláštní forma myozitidy, u níž se pracidelně nachází růžovofialové erytematózní kožní změny v obličeji.
- Pemphigus vulgaris
- Pemphigus foliaceus
- Pemphigus erathematosus
- Familiární chronický pemfigus Hailey-Hailey
- Bulózní pemfigoid
- Transientní akantolytická dermatóza (Groverova choroba)
- Pityriasis rubra pilaris
- Darierova choroba
- Acne vulgaris
- Rosacea [1]
- Aktinické prurigo – chronická patologie kůže způsobená abnormální reakcí na sluneční světlo, při kterém je UV světlo součástí neznámého mechanismu, pro který byl navržen hereditární model. Omezení lidských leukocytárních antigenů (HLA) u aktinického pruriga naznačuje selektivní prezentaci patogenních peptidů imunitnímu systému zasažených jedinců, což indukuje buněčnou odpověď, která zhoršuje patologii [24].
- Syndrom retikulární erytematózní mucinózy (REM) – představuje retikulární erytém na trupu, mucinózu a kulatobuněčný infiltrát v dermis. Histologický obraz zahrnuje perivaskulární, někdy periadnexální hustý kulatobuněčný infiltrát v papilách a horním koriu, který není tvořen T-lymfocyty. Patrné jsou tu též regresivní změny kolagenních a elastických vláken. Histochemicky lze prokázat zmnožení mucinu, odpovídajícího hyaluronové kyselině, v dermis [1].

3.2.2.1 Lékově vyvolaná fotosenzitivita

Fotosenzibilizační reakce jsou vesměs závislé na kyslíku. Fotosenzitizérem může být chemická sloučenina různého složení, která absorbuje elektrony ve formě specifických fotonů.

Fotosenzibilizační reakce mohou být i na kyslíku nezávislé, přičemž jde většinou o vznik kovalentních vazeb senzibilizéru a DNA, vyvolaný UVA zářením.

Pásma vlnových délek uplatňujících se fotosenzibilizačně se nacházejí v UV a viditelné oblasti. UVB záření vyvolává erytémové fototoxické reakce, zatímco UVA vesměs pozdní fotoalergické reakce.

Lékově vyvolané fotosenzitivní reakce mohou být kategorizovány jako buď fotoiritační, fotogenotoxické nebo fotoalergické a některá léčiva mohou způsobit všechny tři typy reakcí [25].

Třída	Léčivo	Fototoxická reakce	Fotoalergická reakce
Antibiotika	Fluorochinolony (ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin)	+	-
	Sulfonamidy	+	-
	Tetracykliny (doxycyklin, tetracyklin)	+	-
Antihistaminika	Promethazin	+	+
	Cyproheptadin	+	+
	Difenhydramin	+	+
	Hydroxyzin	+	-
Antifungální látky	Itrakonazol	+	+
	Vorikonazol	+	-
Antiarytmika	Amiodaron	+	-
	Diltiazem	+	-
	Chinidin	+	+
Diuretika	Furosemid	+	-
	Hydrochlorothiazid	+	+
Hypoglykemika	Der. sulfonylurey (glipizid, glyburid)	-	+
Neuroleptika	Fenothiaziny (chlorpromazin, flufenazin, perazin, perfenazin, thioridazin)	+	+
	Thioxanteny (chlorprotixen)	+	-
NSAID	Celecoxib	-	+
	Ibuprofen	+	-
	Ketoprofen	+	+
	Naproxen	+	-
Retinoidy	Acitretin	+	-

	Izotretinoin	+	-
Opalovací krémy a jejich účinné látky	Benzofenony	-	+
	Cinamáty	-	+
	PABA	+	+
	Salicyláty	-	+
Vonné esence	Ambra	-	+
	6-methylkumarin	-	+

Tabulka 1. Fotosenzitizující léčiva [20]

3.2.2.1.1 Fototoxické reakce

Je to nejobvyklejší reakce. Může být navozena u kteréhokoliv jedince za předpokladu, že kůže je exponována dostatečné dávce fotosenzibilizujícího xenobiotika a dostatečné dávce záření příslušné vlnové délky. Jde o akutní reakci, která se objevuje již při první expozici [20, 26]. Je pro ni typické, že se omezuje pouze na oblasti přímo záření exponované jako je obličej, oblast výstřihu, oblast šíje, hřbety rukou, předloktí a přední část lýtky. Připomíná přehnané oslunění v podobě erytému, edému, olupování kůže a tvorbou puchýřů ve vážných případech. Pacienti mohou popisovat bolest, citlivost na dotek, pálení nebo píchání. Přítomny mohou být až změny vezikulózní či bulózní.

Byly rozlišeny tři typy fototoxických odpovědí:

- Silně opožděný erytém a edém s prudkým začátkem 8-24 h po sluneční expozici a přetrvávající 2-4 dny typicky způsobená psoraleny.
- Rychlejší, přechodný erytém s okamžitým nástupem (30 minut), přetrvávající 1-2 dny. Zde není edém, ale pálení a svědění je evidentní. Tento typ odpovědi je spojen s demeklocyklinem a deriváty kamenouhelného dehtu.
- Rychlé, přechodné podlitiny a zarudnutí s pocitem pálení. Tento typ ustupuje rychleji a je charakteristicky způsobený porfyriny.

Akutní fototoxicita je charakterizována nekrotickými keratinocyty, epidermální spongiózou, edémem, vazodilatací a infiltrátem sestávajícím z neutrofilů, lymfocytů a makrofágů. Fototoxické reakce vytvářené topickými fotosenzitizéry jsou obvykle závažnější než ty vyvolané systémovými látkami.

Hyperpigmentace je častý následek, který může přetrvávat po několik měsíců poté, co akutní reakce vymizela. Hyperpigmentace může vzniknout z indukce proliferace melanocytů a jejich migrace nebo z depozice látky nebo jejích fotoproduktů

v kůži. Mezi další méně časté projevy fototoxicity, které byly popsány, patří břidlicově šedá pigmentace, lichenoidní vyrážka, fotoonycholýza a pseudoporfyrie [27].

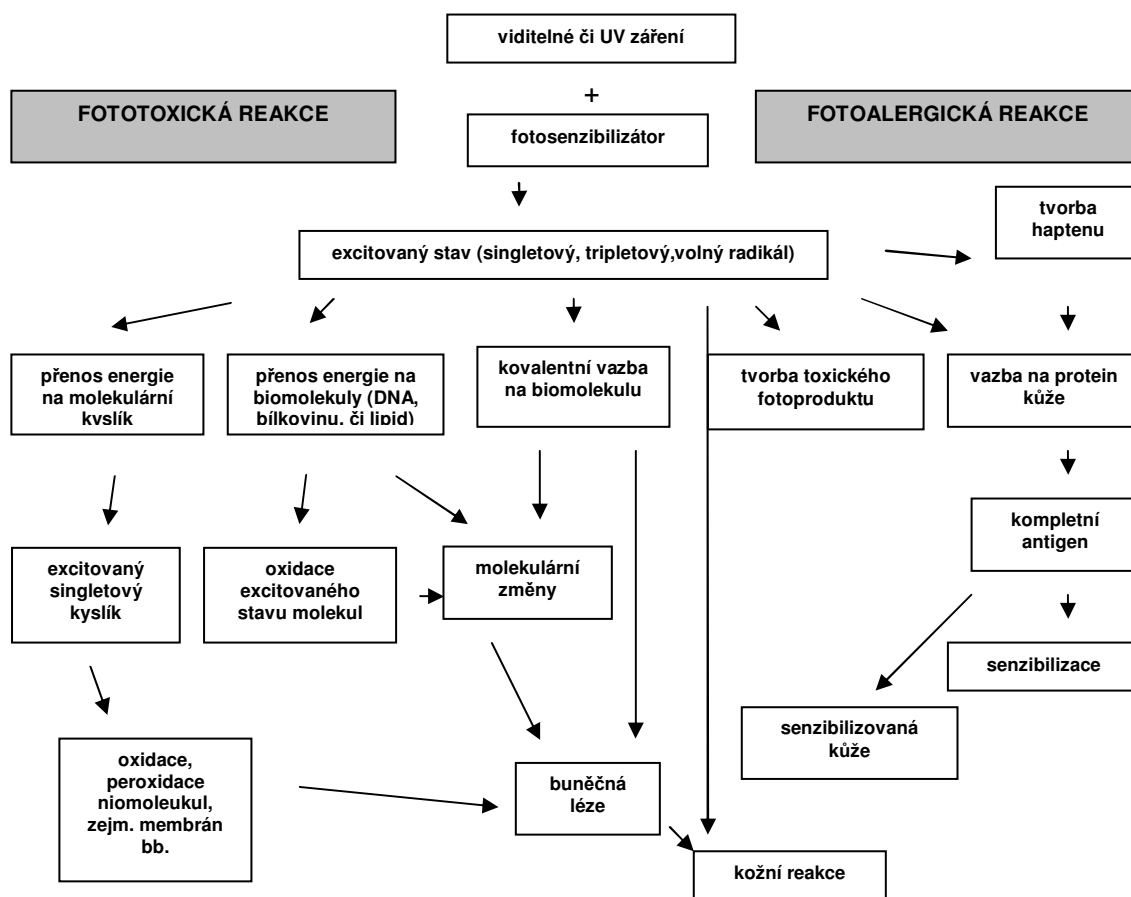
Fotoonycholýza, obvykle zahrnující dolní třetinu nehtu a doprovázená citlivostí na dotek, byla pozorována u tetracyklinu, fluorochinolonů, benoxaprofenu, orálních kontraceptiv, chlorazepátu draselného a chininu. Fotoonycholýza obvykle nastává po více než 2 týdnech po zasažení léčivem, často po typické kožní fototoxické reakci.

Bylo nabídnuto několik vysvětlení pro zapojení nehtů do fototoxicity. Za první nehty působí jako konvexní čočka pro zaměření UV záření. Za druhé je zde málo melaninu a proto malá ochrana nehtového lůžka před světlem. Za třetí oblast neobsahuje žádné potní žlázy a proto žádné lipidy, které mohou redukovat UV transmissi. Nakonec je možné, že UV penetruje normální nehty snadněji než kůži.

Pseudoporfyrie. Lékově indukovaná porfyrie se podobá pozdní kožní porfyrii (porphyria cutanea tarda) klinicky a histologicky. Pseudoporfyrie se liší od dědičné formy porfyrie, ve které vyvolávající agens není spojeno se zvýšenými hladinami nebo abnormalitami v porfyrinovém metabolismu. Léčba spojená s tímto procesem zahrnuje naproxen, kyselinu nalidixovou, tetracykliny, sulfonylmočoviny, furosemid, bumetanid, dapson, pyridoxin, benosaprofen, tiaprofenová kyselina a amiodaron.

Nemoc je charakterizována světlem indukovanými puchýři, zvýšenou fragilitou kůže a snadným poraněním následovaným tvorbou jizev a milií. Histologické zkoušení ukazuje tvorbu subepidermálních puchýřů a rozptýleným zánětlivým infiltrátem velkou měrou složeným z lymfocytů. IgM, IgG a periodický kyselina-Schiff-pozitivní diastaza rezistentní materiál byl zaznamenán na základu membrány a okolo cév v některých případech. Tyto podmínky obvykle vyřeší zastavením fototoxinu, ale plné vymizení může trvat týdny až měsíce [28].

Mechanismus fototoxicity spočívá ve schopnosti fotoaktivních látek selektivně absorbovat určité vlnové délky, nejčastěji dlouhovlnné ultrafialové záření UVA (320 – 400 nm), vzácněji viditelné světlo nebo UVB (280 – 320 nm) [20].



Obr. 3. Mechanismus fototoxicity a fotoalergie [1]

Buď dochází k přenosu elektronu, nebo vodíku za vzniku volného radikálu (reakce typu I), nebo k přenosu energie na molekulu kyslíku za vzniku excitovaného singletového kyslíku (reakce typu II). V jakém poměru budou obě reakce zastoupeny závisí na chemické povaze fotosenzibilizující látky i substrátu a dále na podmínkách, za kterých reakce probíhá (např. koncentrace látky, substrátu a kyslíku, charakter rozpouštědla, pH). O tom, zda bude převažovat reakce typu volných radikálů nebo singletového kyslíku trvale, rozhoduje soupeření mezi substrátem a kyslíkem o tripletový fotosenzibilizátor.

Biologickým cílem fotosenzitizovaných reakcí je plazmatická membrána, cytoplazmatické organely a jádro, v závislosti na lokalizaci fotosenzibilizátoru v buňce v čase fotoaktivace.

Cílovými buňkami fototoxické reakce jsou především poškození keratinocytů, zatímco látky podané celkově navozují přednostně poškození mastocytů a endotelií.

Následné uvolnění solubilních mediátorů, zejména eikosanoidů, proteáz a histaminu, vede k rozvoji zánětlivé kožní reakce [26].

Buněčný cíl fototoxinů závisí na jeho biodistribuci. Topicky aplikované látky jsou pravděpodobněji poškození keratinocytů, protože se koncentrují ve větší míře v této oblasti. Orálně a parenterálně podané komponenty jsou škodlivější pro žírné nebo endoteliální buňky kůže. Subcelulární cíle fotosenzitizujících látek závisí na jejich fyzikálně chemických vlastnostech obzvláště na rozpustnosti v tucích. Hydrofilní látky poškozují buněčnou membránu, zatímco hydrofobní difundují do buněk a poškozují cytoplazmatické nebo jaderné komponenty.

Fototoxické reakce vyžadují relativně vysokou dávku léčiva ve srovnání s fotoalergickými reakcemi a vznikají, pokud je nejprve dodáno léčivo nebo chemikálie.

Aby mohla proběhnout jakákoli fotochemická reakce, musí být radiční energie absorbována molekulou. Molekuly, které absorbují světlo, se nazývají chromofory a v kůži mohou být přítomné endogenní (např. DNA a melanin) nebo exogenní (např. fotosenzitizující léčiva nebo chemikálie). Absorpční spektrum pro určitý chromofor se vztahuje k vlnové délce, kterou absorbuje. Absorpční spektrum je charakteristické pro jednotlivé molekuly a je určováno uspořádáním atomů.

Absorpční spektrum se liší od akčního spektra. Akční spektrum molekuly se skládá ze schopnosti dodané vlnové délky záření vyvolat biologickou odezvu. V mnoha případech je absorpční a akční spektrum stejné. Nicméně neplatí to v každém případě. Na příklad DNA, která je předpokládána jako chromofor způsobující erytém v lidské kůži, má absorpční maximum při 260 nm a akční spektrum má maximum při 250 a 295 nm. To je způsobeno epidermálními proteiny, které odfiltrovávají vlnové délky okolo 280 nm.

Vlnové délky, které způsobují aktivaci nejvíce fotoalergenů, leží v oblasti UVA. UVA může být zodpovědné za tyto účinky, protože penetruje hlouběji do kůže než UVB, což umožňuje jeho interakci s léčivy a chemikáliemi, jejichž biodistribuce je v hlubších vrstvách kožních tkání. Nicméně akční spektrum pro některé fotoalergeny (např. halogenované salicylanilidy) se rozšiřuje do UVB oblasti.

Hostitelské a okolní faktory vysvětlují, proč se fototoxické reakce nevyskytují u 100% lidí. Na příklad množství léčiva přítomného v kůži závisí na cestě podání a na individuálních rozdílech v gastrointestinální absorpci, distribuci léčiva a metabolismu. Kvantum záření, které dosáhne pokožky bude různé podle pigmentu, vlasů a síly stratum corneum. Navíc poškození zářením zvyšuje okolní vlhkost, teplota a síla větru.

Přenesená energie způsobuje poškození buněčných makromolekul a organel a stejně tak i tvorbu zánětlivých mediátorů. Nefotodynamické chemikálie způsobují poškození bez požadavku kyslíku. Příklad tohoto je fotoadice 8-methoxypsoralenu na pyrimidinové báze v DNA.

Kožní fotosenzitivita může být inhibována různými inhibitory, které blokuje tvorbu kyslíkových radikálů. Například alopurinol i verapamil jsou farmakologické látky známé tím, že zabraňují tvorbě superoxidového anionu prostřednictvím dráhy xantinoxidázy, jsou účinné při inhibici fotosenzitivní odezvy u zvířat [28].

3.2.2.1.2 Fotoalergické reakce

Jsou poměrně vzácné, mají však těžší průběh a jsou závažnější. Na rozdíl od fototoxických reakcí, kde dochází k přímé fototraumatizaci kůže, fotoalergie zahrnuje imunitní mechanismus, většinou pozdní typ, zprostředkovaný T-lymfocyty a cytokiny. Fotochemická reakce vzniklá po absorpci záření fotosenzibilizérem vede k produkci kompletního fotoantigenu vazbou na proteiny, pravděpodobně na HLA-DR molekulu [26].

Jednou vytvořený kompletní antigen je vychytán, degradován a znovu vyjádřen na povrchu Langerhansových buněk. Langerhansovy buňky potom migrují do regionálních lymfatických uzlíků, kde aktivují T-lymfocyty, které potom proliferují, diferencují se a opět recirkulují do kůže, kde jsou fotosenzitizující komponenty vystaveny světlu [27]. V této oblasti tvoří zánětlivou odezvu konstruovanou, aby se eradikovaly buňky konjugované s fotohapténem [28].

Jedná se o období alergické kontaktní dermatitidy, takže odpověď se objevuje pouze u geneticky predisponované části populace a vyžaduje určitou dobu senzibilizace, po níž nastupuje během 24-48 hodin [26]. Na rozdíl od fototoxických reakcí fotoalergické reakce nejsou závislé na koncentraci fotoagens nebo trvání expozice [27].

Fotoalergie se mohou vyskytnout u pacientů jakéhokoli věku, ale muži se zdají být postiženi častěji než ženy, možná proto, že nabízí větší expozici chemickým látkám. Převažující klinický obraz je ekzematózní alergická reakce. Tato reakce je obvykle omezena na exponovaná místa, ale po opakovaných poškozeních fotoalergickou reakcí se mohou vyvíjet celkovější kožní komplikace i v oblastech mimo expozici. Při akutní reakci jsou poškození erytematózní a vezikulární. Pokračující expozice nicméně může mít za následek subakutní nebo chronickou fázi, při které převažuje erytém, olupování a lichenizace. Ačkoli většina případů se znormalizuje po odstranění škodlivého agens

nebo světla, může se vyvinout chronická fotodermatitida (přetrvávající reakce na světlo, PLR), při které přetrvává fotosenzitivita, i když bylo agens staženo [28].

Histopatologické změny při fotoalergii jsou identické těm u kontaktní dermatitidy s epidermální spongiózou spojenou s intenzivní perivaskulární infiltrací mononukleárních buněk v kůži [27].

Ekzémové reakce jsou zaznamenávány často v souvislosti s užíváním halogenovaných salicylanilidů jako dezinfekčních přísad do kosmetiky, mýdel, šamponů, apod. Nověji se uplatňují ingredience parfémů, zejména éterické oleje a chemické sluneční filtry v kosmetických přípravcích aplikovaných na kůži [26].

Diagnóza. Procedura fototestování zahrnuje epikutánní testy (photopatch testing) stejně jako určení minimální erytematózní dávky (MED) pro UVA a UVB. Epikutánní testování je hodnotnější, pokud je podezření na fotoalergii, a stanovení MED je použitelnější test pro diagnózu fototoxických reakcí. Nicméně je doporučeno provádět oba testy pro komplexní hodnocení fotosenzitivních pacientů.

Fototestování systémové fototoxicity zahrnuje ozáření kůže nevystavené slunci, obvykle na zádech, aby se postupně zvyšovalo množství UVB (5-100 mJ/cm²) a UVA (1-15 J/cm²) záření pro určení MED pro stejná vlnová pásma. Erytematózní odezva při nižší než předpokládané dávce pro určitou vlnovou délku je důkaz fototoxicity. Testování by mělo být opakováno dva týdny nebo více po odstranění poškozující látky, a tehdy by měla být MED normalizovaná [27].

3.2.2.1.3 Identifikace fotosenzibilizujících látek

Již od devadesátých let minulého století formulovala veřejnost prostřednictvím nevládních organizací požadavek omezit až zastavit pokusy na zvířatech nejen při zkoušení kosmetických prostředků a nahradit je alternativními metodami bez použití pokusných zvířat [29].

Několik studií navrhlo množství screeningových metod pro rozpoznání fotosenzitizujících léčiv: měření UV absorpce, fotohemolytický model, měření spotřeby kyslíku *Bacillus subtilis*, model kožní fototoxické reakce používající lidskou rekonstituovanou epidermis Episkin a test fototoxicity 3T3 vychytávání neutrální červeně (3T3 NRU). Ačkoli fototoxické odezvy byly velmi komplikované, většina fototoxicitních in vitro testů spočívá na jednoduchém parametru cytotoxicity (obvykle NRU nebo MTT testy). Především 3T3 NRU fototoxicitní test byl akceptován EU/COLIPA validačním programem pro „fototoxicity in vitro“. Nicméně tyto buněčné

testy na monovrstvě mají následující hlavní omezení: nízká produktivita způsobená screeningovým systémem a test není vhodný pro rozlišení fotoalergenů a fotoiritantů. Jako alternativní metoda k 3T3 NRU testu fototoxicity bylo někdy zkoumáno absorpční spektrum komponentu, protože fotochemické reakce se nemohou vyskytnout, dokud není absorbováno elektromagnetické záření.

Pro předpovídání potenciálu fototoxických odpovědí a fotochemických reakcí byla vyvinuta efektivní metodologie k hodnocení fotochemických/biologických vlastností s cílem nahradit metody prováděné na zvířatech nebo lidech.

Ovšem některé fotosenzitivní/fototoxické komponenty vykazují nízkou absorpci UVA/UVB, zatímco podle klinických zpráv byly identifikovány jako fototoxické. UVA/UVB absorpce chemikálií nemůže vždy přímo korelovat s jejich fototoxickým potenciálem. Některé komponenty by byly chybně pokládány za fototoxické nebo nefototoxické jenom na základě spektrální UV analýzy. Proto by měla být aplikována doplňková screeningová metoda pro hodnocení fotoreaktivity.

Nověji byla použita jako test fotooxidačních schopností fotooxidace histidinu. Protože histidin reaguje se singletovým kyslíkem, test indikuje schopnost ozářených komponentů vytvářet singletový kyslík. Některé fotosenzitizéry jako chlorpromazin, indometacin, sulfamethoxazol, tamoxifen a omeprazol neprodukovaly detekovatelné množství singletového kyslíku, nicméně byla pozorována významná tvorba superoxidu u těchto komponentů [25].

Pro usměrnění vývoje a pro validaci alternativních metod byl zřízen specifický institut, a to Evropské centrum pro validaci alternativních metod (ECVAM) jako součást Společného výzkumného střediska Evropského společenství se sídlem Ispra, Itálie. Členy jeho vědeckého výboru jsou experti nominovaní pro oblast alternativních metod členskými státy ES.

3.2.2.1.3.1 Test cytotoxicity 3T3 NRU

Výchozí metodou pro stanovení lokální tolerance je screeningový test v kultuře fibroblastů. Tato metoda je všeobecně používána i k hodnocení bezpečnosti zdravotnických prostředků. Buňky 3T3 Balb/c se nasadí do mikrotitračních destiček s 96 jamkami, prekulturní se 24 hodin a poté se kulturační médium nahradí sérií ředění testovaného materiálu. Buněčná kultura se poté inkubuje 24 hodin, obarví se neutrální červení a fluorimetricky se stanoví inkorporace tohoto vitálního barviva v živých

buňkách. Porovnáním s hodnotami kontrolními, kultivovanými pouze v médiu, se stanoví životnost kultury vyjádřená v procentech kontroly.

Testem cytotoxicity se stanoví u chemických látek EC_{50} neboli hraniční koncentrace, při níž dochází ke snížení životnosti buněčné kultury na 50%.

Testy in vitro využívající linii 3T3 fibroblastů jsou pro svou spolehlivost v současné době preferovány v řadě oblastí experimentální toxikologie. Jsou základem pro mezinárodní standardní metodiky zkoušení chemických látek, metody OECD nebo ISO.

3.2.2.1.3.2 Trojrozměrné modely lidské kůže

Nová a progresivní metoda testování lokální tolerance je založena na trojrozměrných modelech lidské kůže. Nahrazuje testy na zvířatech při zkouškách leptavých účinků na kůži, kožní dráždivosti a fototoxicity.

Model lidské kůže EpiDerm™ je založen na normálních lidských keratinocytech pocházejících z tkáně předkožky od jednoho dárce. Skládá se z bazálních, spinózních a granulózních buněčných vrstev a 10-15 vrstev buněk stratum corneum, které do jisté míry simulují funkci kožní bariéry. Po hodinové preinkubaci v čerstvém médiu, která umožní odstranění toxických metabolitů vznikajících vlivem stresu při transportu, lze aplikovat vzorky pevné i rozpuštěné ve vodě či v oleji. Po ukončení aplikace jsou vzorky opláchnuty a tkáň dále inkubována. Na závěr pokusu se přenesou do média obsahujícího MTT a žluté barvivo MTT je redukováno působením mitochondrií na modré krystaly formazanu. Formazan se extrahuje isopropanolem a výsledná intenzita, odpovídající životnosti tkáně, se měří spektrofotometicky při 540 nm [29].

3.2.2.1.3.3 Test fototoxicity

Informace získané ze zkoušky fototoxicity 3T3 in vitro slouží k identifikaci fototoxického potenciálu zkoušené látky, tj. existence nebo neexistence možného nebezpečí, které může plynout ze zkoušené látky ve spojení s expozicí UV záření nebo viditelnému světlu.

Zkouška fototoxicity 3T3 NRU in vitro byla vyvinuta a validována v rámci spojeného projektu EU/COLIPA v letech 1992-1997 s cílem vytvořit platnou alternativu in vitro k různým používaným zkouškám in vivo.

Výsledky ze zkoušek fototoxicity 3T3 NRU in vitro byly porovnány s akutními fototoxickými nebo fotoiritačními účinky in vivo u zvířat a u člověka a zkouška se

ukázala pro předpověď těchto účinků jako vynikající. Zkouška není určena pro předpověď jiných nepříznivých účinků, které mohou plynout z kombinovaného působení chemické látky a světla, např. fotogenotoxicity, fotoalergie a fotokarcinogenity, třebaže mnoho chemických látek, které vykazují tyto specifické vlastnosti, bude ve zkoušce fototoxicity 3T3 NRU in vitro pozitivně reagovat. Zkouška dále není vyvinuta k tomu, aby umožnila hodnocení stupně fototoxicity.

Fototoxické účinky byly zaznamenány u mnoha typů chemických látek. Jejich jediným společným rysem je schopnost absorbovat světelnou energii v oblasti slunečního světla. Podle prvního zákona fotochemie (Gronnhuis-Draperův zákon) vyžaduje fotoreakce dostatečnou absorpci světelných kvant. Před zvážením biologického zkoušení podle předložené metodiky by tedy mělo být stanoveno UV/VIS absorpční spektrum zkoušené chemické látky. Je-li molární absorpční koeficient menší než $10 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, chemická látka nemá fotoreaktivní potenciál a nemusí být zkoušena zkouškou fototoxicity 3T3 NRU in vitro nebo jakoukoli jinou biologickou zkouškou na nepříznivé fotochemické účinky.

Zkouška fototoxicity 3T3 NRU in vitro je založena na srovnání cytotoxicity chemické látky při zkoušení s expozicí necytotoxické dávce UVA/VIS světla a bez této expozice. Cytotoxicita je při této zkoušce vyjádřena jako koncentračně závislé snížení příjmu vitálního barviva neutrální červeně 24 hodin po působení zkoušené chemické látky a ozáření.

Buňky Balb/c 3T3 se 24 hodin kultivují, aby vytvořily monovrstvu. Dvě 96jamkové destičky na jednu zkoušenou chemickou látku se poté 1 hodinu preinkubují osmi různými koncentracemi chemických látek. Poté je jedna ze dvou destiček exponována necytotoxickou dávkou UVA/VIS světla 5 J/cm^2 UVA (+UV experiment), zatímco druhá destička se udržuje v temnu (-UV experiment). U obou destiček se poté aplikační médium nahradí kultivačním médiem a po dalších 24 hodinách inkubace je buněčná životaschopnost stanovena 3hodinovým příjmem neutrální červeně (NRU). Relativní buněčná životaschopnost vyjádřená v procentech vzhledem k neexponované negativní kontrole se vypočte pro každou z osmi zkušebních koncentrací. Pro předpověď fototoxického potenciálu se porovnájí koncentračně závislé odezvy získané při ozáření (+UV) a bez ozáření (-UV), obvykle při hodnotě EC_{50} .

3.2.2.1.3.3.1 Kritéria jakosti

Citlivost buněk na UVA: citlivost buněk na UVA by měla být pravidelně kontrolována. Buňky se nasadí při intenzitě použité při zkoušce, příští den se ozáří dávkou UVA záření $1-9 \text{ J/cm}^2$ a buněčná životaschopnost se stanoví o den později zkouškou NRU. Buňky splňují kritérium jakosti, není-li jejich životaschopnost po ozáření 5 J/cm^2 menší než 80% životaschopnosti kontroly udržované v temnu. Tato kontrola by měla být opakována vždy po deseti pasážích buněk.

Citlivost buněk negativní kontroly na UVA při samotné zkoušce: zkouška splňuje kritéria jakosti, jestliže negativní kontroly (buňky v EBSS (Earlův fyziologický roztok) s 1% dimethylsulfoxidem (DMSO) nebo 1% ethanolem) nebo bez nich vykazují při +UVA experimentu životaschopnost alespoň 80% vzhledem k životaschopnosti neozářených buněk v tomtéž rozpouštědle při souběžném experimentu v temnu (-UVA).

Životaschopnost negativní kontroly: absolutní absorbance měřená v extraktu neutrální červeně negativních kontrol naznačí, zda 1×10^4 buněk nasazených na jednu jamku zachovalo při růstu během dvou dnů zkoušky obvyklou dobu zdvojnásobení (doubling time). Zkouška splňuje kritérium přijatelnosti, jestliže střední hodnota absolutní absorbance neexponovaných kontrol je $\geq 0,2$.

Pozitivní kontrola: při každé zkoušce fototoxicity 3T3 NRU in vitro musí být souběžně zkoušena známá fototoxická chemická látka. Při validační studii EU/COLIPA byl použit jako pozitivní kontrola chlorpromazin, a je tedy doporučen.

Namísto chlorpromazinu mohou být použity jako souběžné pozitivní kontroly jiné známé fototoxické chemické látky vhodné z hlediska typu nebo rozpustnosti hodnocené zkoušené chemické látky. V takovém případě by měly být na základě dosavadních údajů jako kritéria přijatelnosti zkoušky přiměřeným způsobem definovány rozsahy hodnot EC_{50} a PIF nebo MPE.

Ověření jasně pozitivního výsledku opakovaným experimentem se nepožaduje. Negativní výsledky nemusí být dále ověřovány, jestliže byla zkoušená chemická látka zkoušena za dostatečně vysokých koncentrací. V takových případech stačí jeden hlavní experiment podpořený jedním nebo více předběžnými experimenty pro zjištění rozmezí koncentrací.

Zkoušky s výsledky blízko hraničních hodnot předpovědního modelu by měly být pro kontrolu opakovány.

Je-li to možné, stanoví se koncentrace zkoušené chemické látky odpovídající 50% inhibici buněčného příjmu neutrální červeně (EC₅₀).

3.2.2.1.3.3.2 Předpovědní model – fotoiritační faktor

Jestliže jsou v obou případech jak při ozáření, tak bez ozáření získány úplné křivky závislosti odezvy na koncentraci, lze vypočítat fotoiritační faktor podle tohoto vzorce:

$$PIF = \frac{EC_{50}(-UV)}{EC_{50}(+UV)}$$

Hodnota PIF <5 předpovídá neexistenci fototoxického potenciálu, zatímco hodnota PIF ≥ 5 předpovídá existenci fototoxického potenciálu.

Jestliže je chemická látka cytotoxická pouze při +UVA a není cytotoxická při zkoušce -UVA, nelze hodnotu PIF vypočítat, třebaže jde o výsledek, který svědčí o fototoxickém potenciálu. V takových případech lze vypočítat hodnotu „> PIF“, jestliže se provede -UV zkouška až po nejvyšší zkušební koncentraci (C_{max}) a tato hodnota se použije pro výpočet:

$$> PIF = \frac{C_{max}(-UV)}{EC_{50}(+UV)}$$

Existenci fototoxického potenciálu předpovídá hodnota >PIF >1.

Jestliže nelze v důsledku toho, že chemická látka nevykazuje až do nejvyšší zkušební koncentrace žádnou fototoxicitu, vypočítat ani hodnotu EC₅₀ (-UV), ani hodnotu EC₅₀ (+UV), svědčí to o neexistenci fototoxického potenciálu. V takových případech se pro charakterizaci výsledku používá hodnota „PIF = *1“:

$$PIF = *1 = \frac{C_{max}(-UV)}{C_{max}(+UV)}$$

3.2.2.1.3.3.3 Předpovědní model – střední světelný účinek (MPE)

Alternativně lze použít novou verzi modelu pro předpovídání fototoxického potenciálu, který byl vyvinut s použitím údajů z validační studie EU/COLIPA a byl testován naslepo v následné studii fototoxicity in vitro u chemických látek, které se chovají jako UV filtry. Tento model nemá omezení jako model PIF v případech, kdy nelze získat hodnotu EC₅₀. Tento model využívá střední světelný účinek, veličinu, která je založena na srovnání celých křivek závislosti odezvy na koncentraci. Pro použití

modelu byl na Humboldtově univerzitě vyvinut speciální počítačový software, který je volně k dispozici.

Pozitivní výsledek zkoušky fototoxicity 3T3 NRU in vitro ($PIF \geq 5$ nebo $MPE \geq 0,1$) znamená, že látka má fototoxický potenciál. Jestliže bylo výsledku dosaženo při koncentracích pod 10 $\mu\text{g/ml}$, je také pravděpodobné, že látka bude působit za různých expozičních jako fototoxin in vivo. Je-li pozitivního výsledku dosaženo pouze při nejvyšší zkušební koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$, mohou být pro posouzení nebezpečnosti nebo intenzity fototoxicity nezbytné další úvahy. Ty se mohou týkat údajů o penetraci, absorpci a možné akumulaci chemické látky v kůži nebo zkoušení chemické látky alternativní potvrzující zkouškou, např. za použití modelu lidské kůže in vitro.

Negativní výsledek znamená, že látka nebyla pro savčí buňky za použitých podmínek fototoxická.

Není-li naproti tomu toxicita prokázána (+UV a-UV) a jsou-li koncentrace omezeny rozpustností ve vodě na hodnoty menší než 100 $\mu\text{g/ml}$, není patrně zkouška pro zkoušenou látku vhodná a měla by být zvažena potvrzující zkouška (např. za použití modelu lidské kůže in vitro nebo zkouškou in vivo) [30].

Zkouška fototoxicity na modelech kůže by se mohla po řádné validaci stát užitečným doplňkem testu fototoxicity na buňkách 3T Balb/c, protože lépe simuluje reakci kůže složené z řady vrstev buněk a chráněné stratum corneum než monovrstva vysoce citlivých fibroblastů a identifikuje tak falešně pozitivní výsledky testu na buněčné kultuře. V neposlední řadě je výhodou testu na modelech kůže i možnost testování pevných nebo ve vodě nerozpustných látek, které nelze na buněčné kultuře testovat [29].

3.2.2.2 Fytofotodermatitidy

Jsou to fototoxické reakce, které vznikají, když kůže přijde do styku s fotosenzitizérem a je následně vystavena záření. Fytofotodermatitidy se často vyskytují u lidí manipulujících s výrobky obsahujícími furokumariny jako jsou zemědělci, barmani, floristi a zahradníci a také u plážoví běžci, atleti a děti. Nejčastěji jsou zasažena ústa a ruce, což je způsobeno manipulací nebo jedením poškozujících agens obsahujících furokumariny.

Častým fotosenzitizérem byl pigment furokumarin, 8-methoxypsoralen rozpustný v tucích. Tento pigment se nachází v různých rostlinách a zelenině jako je celer (*Apium graveolens*), limetky a citrony (*Citrus limon*), fíky (*Ficus carica*),

citrusové plody, petržel (*Petroselinum crispum*), pelyněk (*Artemisia absinthium*), zlatobýl (*Solidago virgaurea*), chryzantéma (*Chrysanthemum* spp.), ambrozie (*Ambrosia artemisiifolia*) a řepeň trnitá (*Xanthium strumarium*) [31].

Nejdůležitější skupina rostlinných fotosenzitizérů jsou psoraleny, furokumariny s různou substitucí. K nejčastějším příčinám psoraleny způsobených fototoxických dermatitid patří zástupci z čeledi Apiaceae jako *Heracleum* spp., *Angelica archangelica*, *Pastinaca sativa* a *Ammi majus*. Psoraleny jsou ale také v čeledi Rutaceae široce rozšířené. Vedle citrusů v užším smyslu mohou vyvolávat fototoxické reakce také rostliny používané jako koření, *Ruta graveolens* a *Dictamnus albus*. Rutaceae obsahují jako zvláštnost vedle psoralenů rovněž fototoxicky působící furochinolinové alkaloidy obsahující dusík.

Další důležitá skupina fotosenzibilizujících rostlinných obsahových látek jsou naftodiantrony, ke kterým patří fagopyrin pýru (*Fagopyrum esculentum*) a hypericin třezalky tečkované (*Hypericum perforatum*) [32].

Pigment musí být přítomen v dostatečném množství a vlnová délka následného ozáření musí být ve spektru působení fotosenzitizující látky, typicky v UVA oblasti 320-400 nm.

V akutní fázi se fytofotodermatitidy projevují pálením, edémem a puchýři během 24 hodin po kontaktu a projevy závisejí na stupni expozice. Může následovat pozánětlivá hyperpigmentace, obzvláště po opakovaných expozicích, ale obvykle vybledne po 2-3 měsících. Systémová manifestace je vzácná. Nicméně jeden případ byl spojen s hemolytickou anémií a retinální hemoragií [31].

Fototoxické kontaktní dermatitidy vyvolané rostlinami se vyvíjejí po přímém kontaktu nebo po systémovém podání fototoxické substance a následném ozáření dlouhovlnným UV světlem popřípadě slunečním zářením. Předurčující faktory jsou světlý typ kůže, vlhká kůže a sluneční ozáření.

Klinické formy fototoxických dermatitid vyvolaných psoraleny jsou berloque dermatitida, dermatitida lučních trav a bulózní fototoxická dermatitida. Fototoxické dermatitidy nemusí být způsobeny jen přímým kontaktem s rostlinami, nýbrž také produkty, které obsahují rostliny, např. éterické oleje (bergamotový olej) [32].

Placzek *et al* také zjistili, že tabákový kouř je fototoxický. Testován byl kondenzát cigaretového kouře fotohemolytickým testem. Kondenzát cigaretového kouře způsobil fotohemolýzu závislou na koncentraci a aplikované dávce UV. Tabákový kouř

obsahuje více než 1000 různých komponentů, hlavně aromatických sloučenin, z nichž některé jsou známé jako fototoxické.

Vzhledem k známé korelaci mezi různými fototoxickými účinky a fotokarcinogenezí bychom měli vzít u úvahy možnost, že fototoxický efekt kondenzátu cigaretového kouře může také usnadňovat fotokarcinogenezi [33].

3.2.3 Porfyrie

Porfyrie představují skupinu onemocnění vznikajících z důvodu poruchy syntézy hemu na různých úrovních metabolismu. Jsou charakterizovány hromaděním porfyrinů nebo jejich prekursorů v některých tkáních, zvýšenou hladinou v plasmě či v erytrocytech a zvýšeným vylučováním porfyrinů nebo jejich prekursorů stolicí nebo močí.

Jedná se o onemocnění způsobená převážně vrozenou, vzácněji získanou poruchou (pouze sporadická forma porphyria cutanea tarda, PCT). Akutní porfyrie jsou všechny jaterní a jsou přenášeny autosomálně dominantně. Chronické porfyrie jsou typické fotodermatózy a nelze u nich navodit akutní porfyrickou ataku. Přestože jsou akutní porfyrie řazeny k raritním onemocněním, nositelů mutovaného genu může být v populaci více než klinicky nemocných. Klinická manifestace záleží na řadě faktorů, jejichž přesný výčet není zdaleka úplný. Jsou to především určité léky (nejčastěji barbituráty a sulfonamidy, seznam léků se stále doplňuje a upřesňuje), stres, hormonální vlivy a další. U chronických porfyrií nejsou restriktce určitých léků jako u porfyrií akutních. Nicméně u PCT alkohol může vést k manifestaci onemocnění [34].

Tři nejčastější porfyrie jsou porphyria cutanea tarda, akutní intermitentní porfyrie a erythropoetická protoporfyrie. Méně časté formy (zahrnující deficit dehydratázy delta-aminolevulinové kyseliny) jsou kongenitální erythropoetická porfyrie, hepatoerythropoetická porfyrie, hereditární koproporfyrie a porphyria variegata.

Porfyrie mohou být klasifikovány několika způsoby. Klasifikace podle deficitu specifického enzymu je nejpřesnější. Jiný klasifikační systém rozlišuje porfyrie, které způsobují neurologické symptomy (akutní porfyrie) od těch způsobujících fotosenzitivitu (kožní porfyrie). Třetí klasifikační systém je založen na tom, zda nadbytek prekursorů vzniká především v játrech (hepatické porfyrie) nebo v kostní dřeni (erythropoetické porfyrie). Některé porfyrie jsou zařazeny ve více než jedné z těchto kategorií.

3.2.3.1 Akutní intermitentní porfyrie

Akutní intermitentní porfyrie je způsobena deficitem enzymu porfobilinogen deaminázy (také známého jako hydroxymethylbilansyntáza), který vede ke kumulaci hemových prekurzorů delta-aminolevulinové kyseliny a porfobilinogenu nejprve v játrech. Onemocnění je dědičné, autosomálně dominantní, způsobené abnormálním genem od jednoho rodiče.

U většiny lidí s deficitem porfobilinogenu deaminázy se nikdy neobjeví symptomy. Nicméně u některých pacientů mohou určité faktory, jako léčiva (barbituráty, antikonvulziva, sulfonamidová antibiotika), hormony (progesteron a odvozené hormony) nebo dieta (nízkokalorická, nízkosacharidová dieta, velké množství alkoholu, kouření) urychlit nástup onemocnění.

Nejčastější symptom je bolest břicha, gastrointestinální symptomy jako nauzea, vomitus, zácpa nebo průjem a nadmutí břicha. Vysoká tepová frekvence, vysoký krevní tlak, pocení a neklid jsou také časté během ataky [35].

Při akutní atace může postihnout neurologická dysfunkce jakoukoli část nervového systému. Také se mohou objevit dysfunkce centrálního nervového systému jako halucinace, záchvaty, koma, hypotalamická dysfunkce nebo postižení cerebelárního a bazálního ganglionu [36].

3.2.3.2 Erythropoetická protoporfyrie

U erythropoetické protoporfyrie vede deficit enzymu ferrochelatázy ke kumulaci prekurzoru hemu - protoporfyrinu v kostní dřeni, červených krvinkách, plazmě, kůži a játrech. Enzymový deficit je obvykle dědičný. Kumulace protoporfyrinu v játrech může způsobit jaterní poškození. Protoporfyrin ve žluči může vést ke žlučovým kamenům.

Symptomy obvykle začínají již v dětství. Bolest a pálení se objevují brzy po sluneční expozici. Vyskytují se puchýře a málokdy jizvy.

3.2.3.3 Porphyrin cutanea tarda

Je to nejčastější porfyrie. Vzniká jako následek nižší aktivity enzymu uroporfyrinogen dekarboxylázy, což vede ke kumulaci porfyrinů v játrech. Nastává poškození kůže, protože porfyriny produkované v játrech jsou transportovány do plazmy v kůži.

S PCT jsou spojeny některé známé urychlující faktory: nadbytek železa v tkáních, mírné nebo silné užívání alkoholu, používání estrogenů, infekce virem

hepatitidy C a možná kouření. Uvažuje se, že tyto faktory interagují s železem a kyslíkem v játrech a tím inhibují nebo poškozují uroporfyrinogen dekarboxylázu.

Pacienti s PCT prodělávají chronické, recidivující puchýře různé velikosti na oblastech vystavených slunci jako jsou paže, obličej a obzvláště hřbety rukou. Po puchýřích se vyvíjejí strupy a zjizvení a hojení trvá dlouho. Kůže, obzvláště na rukou, je citlivá na drobná poranění [35].

U pacientů s neléčenou chorobou se po delší dobu může vyvinout cirhóza a hepatocelulární rakovina.

3.2.3.4 Kongenitální erythropoetická porfyrie (Güntherova choroba)

Fotosenzitivita u této velmi vzácné autosomálně recesivní choroby může začít už v dětství. Klinická manifestace představuje kožní poškození jako puchýře na kůži exponované světlu, které po čase ulcerace a eroze způsobí jizvy. Zjizvení může způsobit závažné deformity částí obličeje a prstů. Další komplikace jsou hypertrichóza, alopecie, konjunktivitida, keratitida a změny pigmentace.

Diagnóza je stanovena díky tmavé moči (barva jako portské víno), erytrodoncii a hemolytické anémii. Porucha je následkem deficitní aktivity uroporfyrinogen III kosyntázy, zvýšený uroporfyrin je patrný v moči.

3.2.3.5 Hepatoerythropoetická porfyrie

Tato forma je docela vzácná a je způsobena deficitem uroporfyrinogen dekarboxylázy. Převážně kožní manifestace je patrná v prvním roce života a podobá se PCT. Eventuálně jsou pacienti vážně poškozeni hirsutismem, zjizvením, sklerodermoidními změnami a akrosklerózou. Abnormality v porfyrinovém metabolismu jsou stejné jako u PCT navíc se zvýšenou hladinou Zn-protoporfyrinu v erytrocytech.

3.2.3.6 Koproporfyrie

Je to autosomálně dominantní choroba, která má stejné urychlující faktory jako akutní intermitentní porfyrie. Při akutním ataku se vyskytují neurologické i kožní manifestace.

Nemoc je způsobena sníženou aktivitou koproporfyrinogen oxidázy, která způsobuje zvýšenou exkreci fekálního koproporfyrinu.

3.2.3.7 Porphyria variegata

Je to autosomálně dominantní choroba, která se může projevovat kožní nebo neurologickou manifestací nebo jejich kombinací. V oblastech vystavených slunci dochází ke zvýšené fragilitě kůže s tvorbou puchýřů, erozí a jizev. Také se může vyskytnout ztlustění kůže a hypertrichóza v obličeji. Akutní ataka představuje stejné neurologické dysfunkce jaké byly popsány u AIP [36].

3.2.4 Genofotodermatózy

Genofotodermatózy mohou vyplývat z defektu v syntéze melaninu, defektu v opravě DNA nebo z kongenitální fotosenzibility.

3.2.4.1 Xeroderma pigmentosum

Je to dědičné, autosomálně recesivní onemocnění charakterizované patologickou senzitivitou na UV záření, spojenou s defektem enzymatického systému pro opravu DNA. Základní biochemický mechanismus je absence opravy mutací typu CC → TT. Tyto mutace, vyskytující se náhodně, se mohou dotknout genového klíče buněčných operací v oblasti protoonkogenů, ale také genových supresorů nádoru jako je protein p53. Nicméně anomálie v opravném systému nejsou pravděpodobně jediným mechanismem způsobujícím karcinogenezi, protože u Cockayne syndromu a trichodystrofie nejsou doprovázeny nádory kůže. Proto zřejmě existují další faktory v oblasti imunizace spojené s funkcí NK (natural killer) lymfocytů nebo se změnami detoxikace genotoxických kyslíkových radikálů snížením aktivity superoxid dismutázy.

Nemoc se objevuje v prvních letech života a projevuje se vesikulo-bulózními lézemi v oblastech vystavených slunci, zanechávající místa s opakovanou expozicí ve stavu poikilodermie. Mnohočetná lentiga a keratózy se objevují v prvních letech života. Poté se objevují první bazo- a spinocelulární karcinomy a četnost se zvyšuje. Také se mohou vyskytnout melanomy.

Interní patologické demonstrace se dotýkají především centrálního nervového systému a projevují se křečemi a mentální retardací u syndromu Sanctis-Cacchione. Vnitřní neoplazie jsou mnohem vzácnější a zasahují CNS a hematopoeitické tkáně.

Klinický obraz může mít různé varianty podle skupin komplementace xeroderma pigmentosum. Fotosenzitivita je nejzávažnější u skupin A a B, zatímco neoplazie jsou obzvláště agresivní a časně u skupiny A.

3.2.4.2 Cockayneho syndrom

Jedná se o kongenitální poikilodermii s autosomálně recesivním přenosem. Klinické znaky se objevují nejčastěji do 6 měsíců věku a jsou charakterizovány kožními, očními, neurologickými a skeletálními anomáliemi spojenými se staturo-ponderální a psycho-intelektuální retardací. Kožní znaky představuje fotosenzitivita pravidelně nevedoucí k tvorbě kožních nádorů. Připojuje se progresivní degenerace pigmentu v retině, eventuálně spojená s kataraktou, hluchotou a spasticitou s ataxií.

Syndrom vyplývá z defektu opravy DNA, která se volitelně přenáší do aktivně transkribovaných genů. Tento syndrom je heterogenní na genetické úrovni a byly definovány tři skupiny komplementace. Skupina A závisí na anomáliích genu SCA lokalizovaného na chromozomu 5 a kódujícího protein obsahující oblast opakování motivu WD (tryptofan-arginin), která interaguje s ERCC-2,3 a 6 v transkripčním komplexu TFIIH. Skupina B závisí na mutaci genu ERCC-6 lokalizovaném v 10q11-21. Skupina C je způsobena mutacemi stejného genu obsaženého ve skupině B xeroderma pigmentosum (ERCC-3), ale s mutačním profilem patrně odlišným, týkajícím se jiné oblasti genu.

3.2.4.3 Trichothiodystrofie

Označení trichothiodystrofie spojuje klinicky a biologicky heterogenní choroby s přenosem autosomálně recesivním, které jsou spojeny s anomáliemi neuro-ektodermálních struktur, především vlasů. Společná charakteristika všech těchto nemocí je papilární dystrofie s lámavými vlasy, které s věkem řídnou. Obsah aminokyselin se sírou je značně snížený v porostu na povrchu těla, hlavně ve vlasech. Někdy jsou přítomné další různé anomálie převážně fotosenzitivita, ichtyosiformní vzhled, intelektuální a psychomotorická retardace, snížená fertilita a staturo-ponderální zaostalost.

U pacientů trpících abnormální fotosenzitivitou se vyskytují anomálie v opravě poškození DNA indukovaného UV.

3.2.4.4 Bloomův syndrom

Bloomův syndrom je vzácná kongenitální poikilodermie s autosomálně recesivním přenosem, spojená s opožděním počátku intrauterinního růstu, časnou fotosenzitivitou a závažným poškozením obličeje, které je erytemato-strupovité, postupně teleangiektasické, a imunitním deficitem počínajícím opakovanými respiračními

infekcemi. Kožní poškození se zmírňuje s věkem. Nicméně téměř u 20% pacientů se objeví maligní nádory, zejména hemopatie a nádory GIT.

Bloomův syndrom vykazuje mutace genu BLM, který kóduje skupinu helikáz RecQ. To je charakterizováno nestabilitou a křehkostí chromozomových protějšků účinkem velkého počtu genotoxických agens, pravděpodobně v důsledku nedostatku opravy DNA a vysokou rychlostí výměny sesterských chromatid v době meiózy.

3.2.4.5 Syndrom Rothmund-Thomson

Tento syndrom je jednou z kongenitálních poikilodermií, která se projevuje velmi časným výskytem teleangiektazického erytému s atrofií tváří a obličeje. Projevy se potom rozšiřují z tváře na krk, horní končetiny, stehna a hýždě. Obvyklá je fotosenzitivita. Solární expozice může způsobit vznik puchýřů a podporuje rozšíření dermatózy. Další anomálie zahrnují kataraktu, onychodystrofie, opožděný růst a anomálie kostí. Onemocnění se s věkem zmírňuje a ponechává dobrou životní prognózu [37].

3.3 Vliv UV na červené krvinky

UVB záření je pozorováno jako škodlivé pro červené krvinky a modifikace v jejich buněčné membráně mohou být indukovány malým zvýšením UVB záření způsobeným nedostatkem stratosférického ozonu.

Pozorování R.B. Misra *et al.* také ukázalo, že hemoglobin uvolněný při expozici UVB záření, je konvertován na methemoglobin v závislosti na dávce záření.

Navíc byla u červených krvinek popsána spontánní generace superoxidových, peroxidových a hydroxylových radikálů. Toto sdělení indikuje inhibici enzymů navázaných na membránu, jako ATPáza a acetylcholinesteráza, indukovanou UVB. Nově bylo pozorováno významné snížení těchto aktivit v membráně červených krvinek singletovým kyslíkem, produkovaným ozářeným riboflavinem. Erytrocytární ATPáza je popsána jako potenciálně náchylná k oxidativní modifikaci, což je možná způsobeno její těsnou blízkostí u membránových lipidů.

Také bylo pozorováno významné zvýšení lipidových peroxidů v membráně červených krvinek při UVB záření.

Normální struktura a funkce membrány byla poškozena UVB pravděpodobně inhibicí ATPázy navázané na membráně, acetylcholinesterázy a glukóza-6-fosfát

dehydrogenázy, posměněním obsahu redukovaného glutathionu a usnadněním lipidové peroxidace [38].

Na druhou stranu X.Q. Mi *et al.* během své studie zjistili, že při ozáření laserem absorbuje hemoglobin vázaný na membráně (Hbm) erytrocytu náhodné fotony, zvýší se jeho vibrační energie a slabá vazebná interakce může být přerušena. Tím by se mohla zlepšit malá deformovatelnost erytrocytů, protože čím více Hbm erytrocyt obsahuje, tím je jeho deformovatelnost horší [39].

3.4 Vliv UV na oči

Zatímco kožní melanin je neustále syntetizován epidermálními melanocyty, přenášen do keratinocytů, rozkládán lysozomy a vylučován z těla olupováním mrtvých keratinocytů na úrovni stratum corneum, melanin v retinálním pigmentovaném epitelu (RPE) a pravděpodobně v dalších pigmentovaných očních tkáních, vykazuje velmi malou, obměnu. Proto biologický význam jakékoli strukturální modifikace, která se může vyskytnout v očním melaninu jako následek okolních poškození nebo jednoduše stárnutím, jsou potenciálně mnohem závažnější než modifikace melaninu v kůži.

Existuje hypotéza, že oxidativní poškození RPE melaninu by se mohlo stát prooxidantem a tím potenciálně cytotoxickým.

RPE a choroidální melanin vykazují trend sníženého obsahu s věkem. Nejvyšší koncentrace rozpustného melaninu byla v RPE na vzdáleném okraji a klesala s věkem, zatímco nejnižší byla v makule a nevykazovala změny spojené s věkem.

Poškození korneálního epitelu a endoteliálních buněk může vést ke keratitidě. Nicméně díky velmi účinnému opravnému mechanismu v buňkách je poškození vzácně permanentní. Bylo předpokládáno, že tvorba katarakty může být indukována chronickou expozicí UV záření. Solární retinopatie je pravděpodobně jedna z nejčastějších poškozujících reakcí, vyvolaných světlem, v lidském oku s tím, že poškození bývá největší ve středu retiny nebo v jeho blízkosti.

Bylo pozorováno, že během akutní fáze fototoxického poranění se objevila porucha bariéry mezi krví a retinou, což je časný a senzitivní indikátor poškození RPE a retiny.

Oční choroby, které mohou mít fototoxický komponent, představují makulární degeneraci spojenou s věkem, uveální melanomy a předčasná retinopatie.

Expozice slunečnímu záření byla také zkoumána jako potenciální vnější faktor pro melanomy uveálního traktu. Tyto vzácné maligní nádory jsou charakteristické vysokou pravděpodobností metastáz.

Retinální poškození produkované světlem je nejzávažnější v určité oblasti, která nejrychleji upadá v makulární degeneraci spojenou s věkem (ARMD). Může být předpokládáno, že dlouhodobé změny vyplývají ze světelných poškození, která mohou být indukována fotochemickými a fotooxidativními procesy.

Zdá se však, že individuální expozice očí UV záření má malý efekt na zvýšení rizika ARMD, což může být vysvětleno, pokud jsou vzaty v úvahu poškozující účinek světla i transmisní křivka očního média. Je známo, že u normálních dospělých jedinců kornea a čočka filtrují nejvíce světlo pod 400 nm. Proto výsledné akční spektrum poškození retiny není způsobeno normálním akčním spektrem poškozujícím tkáň.

Byla ukázána inverzní souvislost mezi stupněm oční pigmentace a ARMD, což je také shodné s klinickým dojmem oftalmologů, že u pigmentovanější rasy je méně pravděpodobný vývoj ARMD než u bílé. Protektivní efekt očního melaninu před ARMD může být vysvětlen jeho schopností chránit před poškozením slunečním zářením snížením ozáření retiny [9].

4 Pozitivní účinky UV záření na organismus

4.1 Syntéza vitamínu D

UVB fotony, které zasáhnou epidermis mohou být také absorbovány 7-dehydrocholesterolem (pro-vitaminem D₃), a vytvořit pre-vitamin D₃, který je dále termoizomerizován na vitamin D₃. Ten pak vyžaduje dvě následující hydroxylace, aby se vytvořil 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25-(OH)₂D₃), aktivní metabolit, který vykazuje efekt při navázání na receptor pro vitamin D (VDR). Klasické účinky 1,25-(OH)₂D₃ představují regulaci kalcia a homeostázy kostí. 1,25-(OH)₂D₃ však také vykazuje pleiotropní efekt na tkáň a buňky, které se nepodílejí na metabolismu vápníku. V epidermálních keratinocytech indukuje 1,25-(OH)₂D₃ zastavení růstu a stimuluje diferenciaci. Tyto vlastnosti vedly k úspěšnému využití aktivních složek vitamínu D v léčbě hyperproliferativní kožní poruchy – psoriázy.

Při pohledu na úzkou souhru mezi expozicí UVB záření a produkcí vit. D v kůži, můžeme vytušit vzájemný vliv. Bylo skutečně popsáno, že UVB potlačuje genovou expresi VDR a naopak, že 1,25-(OH)₂D₃ a jeho analogy inhibují apoptózu indukovanou UVB zářením a produkci interleukinu-6 v keratinocytech. Pozdější data evokovala možnost, že aktivní složky vit. D mohou chránit keratinocyty před poškozením způsobeným UVB zářením. Tento předpoklad byl potvrzen ve studii De Haes et al., kde prokázali, že 1,25-(OH)₂D₃ a dva jeho analogy s nízkým vlivem na kalcémii významně redukuje poškození DNA v primárních lidských keratinocytech vyvolané UVB zářením. Kromě toho poskytli argumenty ukazující, že antiproliferativní efekt 1,25-(OH)₂D₃ podporuje ochranný efekt 1,25-(OH)₂D₃ proti poškozením DNA indukovaným UVB. To činí aktivní složky vit.D velmi atraktivními kandidáty pro chemoprevenci rakoviny kůže indukované UVB [40].

5 Využití UV záření v medicíně

Fototerapie obsahuje postupy, kdy fotochemický jev indukovaný světlem je využit k léčbě nemoci. Fotochemoterapie je forma fototerapie, ve které je použita chemická látka a navíc ještě světlo. Ve fotodynamické terapii je použita kombinace O_2 , světla a fotosenzitizující látky.

5.1 Fotodynamická terapie (PDT)

Fotodynamická terapie je relativně nová metoda léčby maligních nádorů, při které se používá senzitizer, světlo a kyslík k vyvolání fotochemické smrti buněk. Fotosenzitizer se koncentruje především v nádorové tkáni, ale také v orgánech retikuloendoteliárního systému, aterosklerotických placích, v zánětlivých oblastech a v kůži. Po aktivaci světlem o vlnové délce odpovídající absorpci skupin fotosenzitizeru se tvoří volné radikály a singletový kyslík. To vede k poškození nádoru. Protože 1O_2 difunduje během své doby života intracelulárně jen asi 20 nm, jsou zničeny především buněčné struktury obsahující vysokou koncentraci senzitizeru [41]. Světlo, které je normálně používáno v PDT neprostupuje hluboko do tkáně, ale je rozptýleno a absorbováno endogenními chromofory, proto může být PDT použita k léčení nádorů, které jsou nejvíce 2 cm silné, přesná tloušťka závisí na použitém fotosenzitizeru. Nádor je selektivně odstraněn bez poškození okolní tkáně [42].

V sérii preklinických studií používajících nádory rostoucí ortotopicky v mozku králíka nebo potkana, bylo shledáno, že PDT Photofrinem je schopná zničit velký objem intrakraniálního nádoru hemoragickou nekrózou. Navzdory velmi malému objemu vychytaného léčiva je normální mozková tkáň silně citlivá na PDT Photofrinem, pravděpodobně z důvodu poškození vaskulárního endotelu v intaktní hematoencefalické bariéře [41].

Nejčastěji se takto léčí kožní nádory a časná stadia různých dalších nádorů. PDT nemůže být použita, pokud by destrukce nádoru vedla k závažné léčebné krizi, jako když nádor tvoří část hrudní stěny. PDT může být kombinována s operací; nádor může být odstraněn do velikosti léčitelné PDT nebo PDT může být aplikována k odstranění možných mikroskopických pozůstatků po operaci. Může být také kombinována s chemoterapií, ozařováním nebo hypertermií. Může být použita jako paliativní léčba tam, kde je cíl redukovat velikost nádoru a tím zmírnit symptomy a prodloužit život

pacienta. Vhodnost PDT jako léčby je většinou závislá na tom, jestli může dostatek světla dosáhnout do oblasti nádoru. Protože většina tetrapyrolových fotosenzitizérů jsou fluorofory, mohou být také použity k detekci nádoru a ke stanovení velikosti nádoru před PDT [42].

Jedna z výhod této terapie je fakt, že při ní nebyly pozorovány vážné vedlejší účinky. Jediný klinicky významný nežádoucí účinek je kožní fotosenzitivita. Pacienti se proto musí vyvarovat přímého silného světla několik týdnů po terapii [41].

A. Misra *et al.* popsali pozdní erytém, který se objevil tři dny po PDT tváře. Nevyskytovaly se žádné další symptomy a byla vyloučena možná interakce léčiv i fotosenzitivita. Erytém byl zřejmě způsoben nepřímými účinky PDT, které mají pomalejší nástup. Jeden takový účinek je vazokonstrikce arteriol v postiženém místě, které způsobuje hypoxii a zlepšuje účinek fotodynamické terapie. Další nepřímé účinky způsobují zpomalení rychlosti toku erytrocytů, což vede k městnání krve a shromažďování v dermálním plexu. Ačkoli mechanismus není jasný, uvažuje se, že roli zde hraje vazokonstrikce, tvorba destičkového trombu a embolizace v mikrocirkulaci [43].

Bylo zjištěno, že PDT je méně účinná, když je světlo dodávané s velkou rychlostí osvitů, protože tkáňový kyslík je kompletně využit a nemůže být mikrocirkulací dodáván dost rychle, aby se udržel krok s fotochemickou spotřebou. PDT s nízkou rychlostí osvitů při vysoké energii světla na jednotku plochy zachovává rovnováhu mezi potřebou a dostupností kyslíku a výsledkem je 70-80% odstranění nádoru, zatímco stejná energie světla na jednotku plochy při vysoké rychlosti osvitů odstranila jen 10-15% nádorů. Vysoká energie světla při nízké rychlosti osvitů vedla k ablacii cév. Byla pozorována vysoká hladina zánětlivých cytokinů a infiltrovaných neutrofilů, pokud byla použita nízká energie světla při nízké rychlosti osvitů. Optimální léčebný režim PDT (vysoká energie při nízké rychlosti osvitů) produkuje minimální zánětlivou reakci [41].

Hlavní faktory, které mají největší vliv na terapeutickou účinnost PDT jsou intracelulární akumulace senzitivizéru, energie světla a okysličení nádoru. Znalost intracelulární koncentrace fotosenzitivizéru v nádoru nebo tkáni může být považovaný za prognostický faktor určení terapeutických výsledků. Navíc dávka senzitivizéru je nezbytná pro zhodnocení optimální doby léčby, proto aby se maximalizoval terapeutický účinek PDT a minimalizovala toxicita [44].

Další faktor ovlivňující výsledek PDT je časový interval mezi podáním fotosenzitizéru a expozicí světla neboli drug-light interval DLI.

Zatímco PDT s jednotlivou nízkou dávkovou frakcí neočekává dobrý léčebný výsledek, může být opakovaním zvýšena na cílenou dávku. Při tomto alternativním přístupu multifrakční PDT může být tumor vystaven mnohonásobným nízkým dávkám PDT frakcí, aby se dosáhlo kompletní odpovědi nádoru [45].

5.1.1 Léčba nádorů PDT

Maligní nádory jsou během PDT odstraňovány několika cestami – přímá destrukce buněk, poškození mikrocirkulace a imunitní mechanismy.

Při přímém ničení nádorových buněk se využívá toho, že tyto buňky akumulují mnohem více fotosenzitizéru než buňky v normální tkáni. Krátce po podání je fotosenzitizér přítomen téměř ve všech tkáních, ale později je zadržován především v nádoru, RES a kůži. Konečná lokalizace fotosenzitizéru závisí na jeho chemických vlastnostech, způsobu podání, čase uplynulém po injikování a typu nádoru [46].

Buňka vystavená singletovému kyslíku vykazuje nestejněměnější buněčnou stěnu, bublinkovatení a zvýšení cytoplasmatické granule, které patrně ukazuje zvýšení vakuolizace. Na chromozomové úrovni dochází k subjektivnímu zvýšení aberací chromátid a určité zvýšení endoreduplikace, což má efekt na dělicí vřeténko [47].

Po ozáření jsou endoteliální buňky zničeny, tok krve stagnuje, mikrocirkulace je pozměněna, neutrofilů a trombocytů adheze k subendoteliální matrix a uvolňují obsah svých granul. Tromboxany uvolněné z destiček způsobují vasokonstrikci a agregaci destiček a aktivují kaskádu hemokoagulace. To nakonec vede k ischemické nekróze nádoru. Hemolýza erytrocytů může podpořit ischemický efekt PDT [46].

Terapie cílené proti cévnímu zásobení nádoru nabízí efektivní strategii pro kontrolu růstu nádoru. V kombinaci s léčbou zaměřenou na přímé zabíjení buňky zajišťují větší příležitosti zdokonalit klinický výsledek. Během PDT dochází k uvolnění vazoaktivních molekul, zlepšení průniku a agregaci destiček následované okluzí.

Seshadri *et al.* popsali, že protinádorové léčivo kyselina 5,6-dimethylxanthenon-4-octová (DMXAA) zlepšuje aktivitu PDT fotosenzitizovanou Photofrinem proti experimentálním RIF-1 nádorům bez zvýšení systémové toxicity nebo lokální fototoxicity.

O látkách zaměřených na cévy jako DMXAA se předpokládá, že jsou efektivnější proti cévám uvnitř nádoru a jsou asociovány s okrajem buněk v periférii

nádoru, který přežije léčbu. Fotodynamické účinky v hlubších oblastech nádoru mohou být omezeny neefektivní penetrací světla a/nebo neadekvátním okysličením. Toto může být vysvětleno zlepšením protinádorové aktivity kombinací PDT s DMXAA. Kombinace terapií navíc vykazuje zlepšení antitumorové aktivity také zlepšením selektivity odpovědi ve srovnání se samotnou PDT [48].

Krammer *et al* popsali, že fotodynamická léčba působí na transmembránový transportní systém ve fibroblastu, ovlivňuje lipidovou dvouvrstvu membrány, pozměňuje membránový potenciál v renálních buňkách a způsobuje depolarizaci myších myelomových buněk.

Jejich studie odhalila převážné zbarvení centra jaderného obalu, které může indikovat, že matrix mezi jadernou membránou je primární cíl pro barvivo. Redistribuce molekul porfyrinu z plazmatické membrány do jaderné membrány, popsaná v některých dřívějších studiích, nebyla zpozorována. V kontrastu s plazmatickou a jadernou membránou byla jaderná matrix slabě zbarvena různými deriváty hematoporfyrinu a jen po prolongované inkubaci.

Protiklad mezi rychlým vychytáváním senzitizeru a zřejmou fyziologickou stabilitou jaderného obalu může být vysvětlen nedostatečností iontového transportního systému. Proto nemůže fotodynamická léčba způsobit velké změny v potenciálu jaderné membrány. Nicméně existence potenciálu jaderné membrány ukazuje rozdíly v iontové distribuci mezi cytoplazmou a jádrem. Iontový transportní systém v jaderné membráně proto nemůže být hlavní cíl senzitizerujícího barviva [49].

Nádorové buňky zničené při PDT zůstávají v těle pacienta. Mohou se stát zdrojem nemaskovaných nádorových antigenů, které mohou stimulovat imunitní odpověď proti nádoru.

Buněčná populace lidských solidních nádorů obvykle obsahuje 20-50% makrofágů. Makrofágy akumulují fotosenzitizer při fagocytóze porfyrinových agregátů nebo v souvislosti s plasmatickými lipoproteiny prostřednictvím apoB/E LDL receptorů nebo makrofágových receptorů. Aktivace makrofágů je nepřímá, zprostředkovaná působením PDT na T a B lymfocyty. PDT pravděpodobně způsobí peroxidaci nenasycených mastných kyselin v membránách lymfocytů a to zvýší fluiditu membránových lipidů. Lymfocyty jsou aktivované tímto procesem a stimulují makrofágy. Ty jsou kromě toho stimulovány pravděpodobně také lipidovými fragmenty vznikajícími během PDT z membrán nádorových buněk [46].

Lymfocyty jsou obvykle snadno zabíjeny PDT a aktivované lymfocyty jsou obzvláště citlivé. Tento nález vedl k tomu, aby byla PDT navržena jako léčba odvržení štěpu příjemcem, některých forem autoimunitních onemocnění a kožního T-buněčného lymfomu.

PDT způsobuje akutní zánětlivou odpověď, která je vysílána do normální tkáně nebo nádorové. Zvýšení hladiny IL1 β , IL6, IL8 a IL10 bylo detekováno u pacientů po operaci a PDT mesoteliomu. Zdroj těchto zánětlivých mediátorů může být mnoho různých typů buněk, které jsou přítomné v nádorech. Na příklad maligní buňky, endoteliální buňky nádoru a leukocyty infiltrované v nádoru, ale ne fibroblasty, byly ukázány jako producenti zánětlivých mediátorů – prostaglandinů. Uvolňování tromboxanu z endoteliálních buněk po PDT je částečně odpovědné za přerušení cév.

Podobný přístup, který využívá imunostimulačního efektu PDT je příprava vakcín proti rakovině použitím PDT *in vitro* na buněčných kulturách. Vakcíny generované PDT jsou nádorově specifické, indukované cytotoxickou odpovědí T-buněk a, na rozdíl od ostatních metod, nepotřebují současné podání pomocné látky, aby byly efektivní. Lyzáty generované PDT byly schopné vyvolat fenotypické dozrávání dendritických buněk a expresi IL12 [41].

PDT celého močového měchýře zeleným světlem a nízkými dávkami léčiva i světla zůstává atraktivní volbou léčby rakoviny *in situ*. Může při ní být dosaženo dobré odpovědi povrchového nádoru bez transmurálních zranění nebo morbidit spojené s léčbou.

Nejnověji byla pro léčbu recidivy povrchové rakoviny močového měchýře použita ALA. ALA PDT jako samostatná léčba nebo v kombinaci s mitomycinem C má ve výsledku míru kompletní odpovědi 40-52% za 18-24 měsíců bez přetrvávající redukce kapacity močového měchýře.

Rakovina kůže je ideálně vhodná pro PDT. Mnoho studií potvrdilo, že PDT dosahuje míry odpovědi pro povrchovou rakovinu kůže, která je ekvivalentní těm dosaženým konvenčními metodami (kryoterapie, chirurgické odstranění), ale s menším zjizvením.

Pro léčbu jen několika lokalizovaných poškození je nejvhodnější použití topické aplikace ALA nebo jejího methylesteru (Metvix®). ALA PDT může být také použita k úspěšnému léčení Bowenovy choroby, kde je míra celkové odpovědi nádoru významně vyšší (75-88%) než u léčby 5-fluorouracilem (50%) nebo kryoterapií (48%), pokud je ozáření pronikajícím červeným světlem. Jedna nevýhoda ALA PDT je, že

prvních pár minut ozařování může být velmi bolestivé. Tento problém může být zmírňován lokální anestezií nebo studeným vzduchem.

PDT systémovým fotosenzitizérem (porfimer sodný nebo mTHPC) je vhodnější pro léčbu mnohočetných poškození, zejména velkých povrchů s mnohočetnými malými poškozeními.

Časné stavy rakoviny v oblasti hlavy a krku jsou obvykle léčeny chirurgicky a/nebo radioterapií, zatímco pokročilá choroba je standardně léčena chemoradiací. Míra vyléčení je dobrá obzvláště v raných stádiích, ale může být spojena s vysokou morbiditou. Radioterapie je spojena s rizikem xerostomie, trismu a dokonce osteonekrózy. PDT je stejně efektivní jako léčebná chirurgie nebo radioterapie pro malé povrchové nádory, ale má výhodu, že je šetrná k tkáni v okolí nádoru a poskytuje výborné dlouhodobé funkční a kosmetické výsledky.

PDT také může být efektivní jako záchranná léčba recidivující rakoviny hlavy a krku pacientů, u kterých selhala konvenční terapie.

Standardní léčba rakoviny jícnu je chirurgické odstranění, ale vysoká morbidita a mortalita spojená s touto procedurou vedla k vyvinutí méně invazivních metod jako je endoskopická resekce mukózy, koagulace a PDT. Záření je dodáváno použitím flexibilního cylindrického difuzéru, který je umístěn pomocí endoskopu do blízkosti nádoru. Nejčastěji je kolem difuzéru nafouknutý balónek, který je částečným stínítkem pro ochranu okolní normální tkáně a usnadňuje stejnoměrné ozáření.

Při použití mTHPC jako fotosenzitizéru a zeleného světla nedochází k jinak častým nežádoucím účinkům jako je píštěl a perforace.

PDT je také obzvláště vhodná k léčbě premaligních stavů Baretova jícnu.

Pro PDT léčbu Baretova jícnu, stejně jako pro rakovinu jícnu je nejdůležitějším omezením toxicita spojená s léčbou, popsána v 10-50% případů léčby systémovým fotosenzitizérem a červeným světlem. Protože mukóza není o mnoho hlouběji než u normálního jícnu, použití ALA PDT potenciálně nabízí efektivní a méně toxickou alternativu [50].

Transdermální PDT využívá fotosenzitizér druhé generace Verteporfin, který má maximum absorpce při 690 nm a biodistribuční vlastnosti, které dovolí aktivaci léčiva v kapilárách kůže bez způsobení kožní fotosenzitivity.

Imunosuprese při transdermální PDT byla použita pro léčbu experimentálních autoimunitních chorob, u kterých jsou aktivované lymfocyty zodpovědné za základní

patologii. Studie ukázaly potenciální působení fotosenzitizérů na tlumení imunity, takže by mohly být aplikovány v klinické léčbě autoimunitních chorob [46].

PDT se také může kombinovat s dalšími imunostimulačními látkami nebo strategiemi, které mohou být rozděleny do tří skupin.

PDT a mikrobiální pomocná látka. Látky odvozené od mikrobiálního stimulatoru vlastní imunity mohou být injikovány do nádoru nebo okolní tkáně před, během nebo po PDT. Jejich role je aktivovat Toll-like receptory (iniciují signalizaci, která přitahuje a aktivuje imunitní buňky, TLR) nebo podobné molekuly k rozpoznávání antigenů, které jsou přítomné na makrofázích a dendritických buňkách. Bylo identifikováno 13 členů rodiny TLR na monocytech a makrofázích, dendritických buňkách, žírných buňkách a některých epiteliálních buňkách. Princip jejich funkce je uvažován jako detektory nebezpečných signálů; varovný systém hrozící infekce. Aktivaci drah TLR může indukovat NF κ B a následně expresi některých genů zapojených do aktivace imunitního systému, které jsou také důležité pro imunitní odpověď proti nádoru. Tyto nálezy dali vzniknout hypotéze, že kombinace terapií, které spojují podání pomocné látky stimulující imunitu (často potenciální ligandy TLR) a různé režimy PDT se mohou projevit jako efektivní.

PDT a terapie cytokiny. Jiná skupina kombinovaných terapií se týká podání cytokinů jako je TNF α , aby potencovaly PDT prováděnou s Fotofrinem. Léčba lokalizovaného nádoru léčeného GCSF (granulocyte colony-stimulating factor) v kombinaci s PDT prováděnou Fotofrinem měla za následek významnou redukci růstu nádoru a prodloužení délky přežívání u BALB/c myši nesoucích dva typy nádorů: nádor colonu 26 a Lewisův nádor plic. Více než 33% myši s nádorem colonu 26 bylo zcela vyléčeno kombinovanou terapií a vyvinula se u nich specifická a dlouhodobá imunita.

Terapie regulačními T buňkami a adoptivními buňkami. Třetí skupina kombinačních terapií PDT obsahuje zásahy, které jsou navrženy, aby pozměnily nebo rozšířily buněčnou výzbroj o imunitní odpověď proti nádoru. Je zde rostoucí poznání, že CD4⁺CD25⁺ T-regulační buňky mají důležitou roli v potlačení imunitní odpovědi proti rozmanitým cílům, a tyto buňky jsou vyčerpané při nízké dávce cyklofosfamidu, čímž je potencována imunita, stejně jako vysoká dávka cyklofosfamidu je imunosupresivní. Nízká dávka cyklofosfamidu kombinovaná s PDT prováděnou BPD využívá krátký interval mezi podáním léčiva a použitím světla, který nejdříve míří do nádorových krevních cév. To vede k významnému počtu dlouhodobě vyléčení retikulárních buněk

J774 sarkomu a odolnost proti novému nádorovému bujení, stejně jako vzájemná léčba samotná vede k 100% smrti progresivních nádorů nebo metastáz [41].

5.1.1.1 Metronomická PDT

Termín „metronomická“ byl nově zavedený k popsání kontinuálního podávání nízkých dávek chemoterapeutické látky po objevení, že nízkodávková chemoterapie je podstatně více antiangiogenní než konvenční vysokodávkové režimy a má minimální vedlejší účinky. Metronomická chemoterapie je ve vývoji jako metoda k minimalizaci toxicity a zamezení relapsu. Hlavní princip metronomické PDT (*mPDT*) je zdokonalit nádorově specifickou odpověď.

My definujeme *mPDT* jako léčbu, při které jsou podávány fotosenzitizér a světlo během prodloužené periody, buď kontinuálně při nízké rychlosti nebo v mnoha malých vysokofrekvenčních frakcích. Kritické faktory v tomto přístupu jsou: frakce zbývajícího nádoru zabitého v každém časovém přírůstku musí být dostatečná, aby překonala rychlost dorůstání nádoru a obzvláště u nádoru mozku, smrt nádorových buněk je selektivní a především apoptózou, aby se zabránilo fotodynamickému poškození a sekundární zánětlivé odpovědi na nekrózu. Proto předpokládáme, že *mPDT* by mohla být bezpečnější a selektivnější než akutní vysokodávková PDT.

V sérii preklinických studií používajících nádory rostoucí ortotopicky v mozku králíka nebo potkana, bylo shledáno, že PDT Photofrinem je schopná zničit velký objem intrakraniálního nádoru hemoragickou nekrotizací. Navzdory velmi malému objemu vyčtyaného léčiva, je normální mozková tkáň silně citlivá na PDT s Photofrinem, pravděpodobně z důvodu poškození vaskulárního endotelu v intaktní hematoencefalické bariéře. Akutní vysokodávková PDT prováděná Photofrinem nebo 5-aminolevulinovou kyselinou (ALA) indukuje apoptózu v intrakraniálním nádoru i v normální mozkové tkáni. Nízkodávková Photofrin-PDT pod prahem nekrotizace může také způsobovat apoptózu v nádoru i normální mozkové tkáni. Aktuální studie však ukázaly, že podprahová nízkodávková ALA-PDT může indukovat selektivní apoptózu intrakraniálních nádorových buněk, bez detekovatelného poškození (apoptotického nebo nekrotického) v normálním mozku. Toto poskytuje možnost léčit pacienty nízkodávkovou ALA-PDT po resekci nádoru jako způsob dosažení selektivní redukce residuálního makroskopického nádoru stejně dobře jako mikroskopických zárodků nádorových buněk, které jsou odpovědné za vysokou míru recidiv po standardní léčbě.

ALA je malá ve vodě rozpustná molekula, která může být rychle absorbována přes hematoencefalickou bariéru analogickým mechanismem jako aminokyseliny - pH dependentní iontovou pumpou. Dále je působení protoporfyrinu IX (PpIX) zprostředkované ALA převážně buněčné, proto redukuje potenciál pro PDT poškození hematoencefalické bariéry.

Uvažuje se, že v selektivě ALA zprostředkované PpIX-PDT se odráží zvýšený metabolismus rychlého dělení nádorových buněk oproti poměrně zestárlým neuronálním buňkám normálního mozku. To má za následek vysokou hladinu syntézy PpIX v nádorových buňkách při podávání ALA. Terapeutický profit v jednotkách přežití nebo kvality života by měl být s *m*PDT dostupný, poskytnutý vhodným dávkováním, aby mohla být dosažena trvalá hladina zabitých nádorových buněk a překonána rychlost zdvojení nádorových buněk a v důsledku toho předcházen nebo zpždován růst nádoru.

Zdá se nepravděpodobné, že by jednotlivá dávka ALA-PDT poskytla odpovídající úroveň selektivní apoptózy nádoru, aby zajistila kontrolu nad nádorem. Proto je vyžadována mnohonásobná léčba [51].

5.1.2 Neonkologické využití PDT

Ačkoli byla zavedena jako léčba rakoviny, nejúspěšnější aplikace PDT byla v oftalmologii, jako léčba věkově závislé makulární degenerace [52].

Věkově závislá makulární degenerace (ARMD), stav způsobený neovaskularizací cévnatky (CNV), je nejčastější příčina slepoty v rozvinutých zemích. Nedávno bylo předvedeno v široce randomizované kontrolované studii, že PDT Visudyne, liposomální formulací verteporfinu, předchází těžké ztrátě zraku a byla schválena ke klinickému používání. Z důvodu zatvrzelosti ARMD, většina pacientů potřebuje opakovat léčbu každé tři měsíce, což snižuje kvalitu jejich života. Mělo by také být poznamenáno, že zároveň s opakováním léčby většina pacientů skončí se ztrátou zraku z důvodu obnovení neovaskularizace cévnatky, a to podněcuje k hledání alternativního fotosenzitizéru s větší efektivností. Pro efektivní PDT proti ARMD je nezbytné selektivní dodávání fotosenzitizéru do místa poškození neovaskularizací v cévnatce a efektivní fotochemická reakce. Jako nosiče fotosenzitizéru jsou používány lipoproteiny o nízké hustotě (LDL) a protilátky proti markerům endoteliálních buněk; nicméně se fotosenzitizér v určitém rozsahu distribuuje také do normálních cév, protože také obsahují takové markery

Ideta *et al.* nedávno popsali dendrimerický fotosenzitizér, dendrimer porfyrin (DP), kde je ve středu umístěn porfyrin obklopený poly(benzyl ether)dendrony třetí generace. Na rozdíl od konvenčních fotosenzitizérů DP zajišťuje účinnost produkcí singletového kyslíku v extrémně vysoké koncentraci, protože dendritický obal DP dokáže předcházet agregaci centrálního porfyrinu.

V pokusu podat fotosenzitizér do oblasti neovaskularizace byly zkoušeny volné DP i DP uložený v PIC micel. Výsledky pokusu ukázaly selektivní a efektivní akumulaci micel v CNV poškozeních, což dokládá, že CNV poškození mají charakteristické rysy podobné vaskulatuře solidního nádoru, jako je hyperpermeabilita a snížená lymfatická drenáž.

Při podání DP uložených v micelách, byla pozorována akumulace DP do CNV poškození asi za 15 min po injikování, vrcholu dosáhla za 4 hodiny a byla stále evidentní 24 hodin po injikování. Imunohistochemická analýza demonstrovala, že DP bylo přítomno v endoteliálních buňkách s pozitivním faktorem VIII. Naopak po injikování volného DP se DP koncentroval v poškození CNV až po 4 hodinách, ale zmizel za 24 hodin. Imunochemická analýza ukázala, že DP byl přítomen nejen v buňkách s pozitivním faktorem VIII, ale také mimo tyto buňky. Bylo pozorováno, že volný DP vykazuje nižší vychytávání buňkami, protože má negativní náboj na periferii.

Zlepšení akumulace DP enkapsulovaného v micelách do CNV poškození vyplynulo v prokazatelně zřetelný fotodynamický efekt, který byl stanoven použitím fluoresceinové angiografie.

Choroidální neovaskularizace endoteliálních buněk byla zničena při PDT laserem ve srovnání s neléčeným kontrolním poškozením. Transmisní elektronová mikroskopie odhalila, že cévy v CNV poškození ustoupily kolagenovým vláknům bez endoteliálních buněk nebo byly uzavřeny erytrocyty. Endoteliální buňky ležící v normálních cévách v retině a cévnatce v léčené oblasti nebyly zničeny po stejné aplikaci DP uloženého v micelách a laseru při maximální energii pravděpodobně proto, že ani PIC micely, ani volný DP nebyl vychytáván do endoteliálních buněk v normálních cévách. Navíc nebyla makroskopicky pozorována fototoxicita kůže, když byli potkani vystaveni širokopásmovému viditelnému světlu. V kontrastu k supresivnímu účinku po podání DP v micelách, téměř všechna CNV poškození vykazovala silnou hyperfluorescenci a CNV endoteliálních buněk se jevíly normální, když byl aplikován volný DP za stejných podmínek. Protože o DP v micelách se

předpokládá, že postupně disociuje na DP a kopolymer v těle při rozpouštění, vyhne se dlouhodobé fototoxicitě po PDT při použití této micely.

DP v micelle dosáhl vysoce selektivní akumulace v CNV poškození a nižší energie světla byla dostačující k uzavření CNV poškození. To může být prisuzováno jedinečné charakteristice DP; agregace porfyrinového jádra je stericky zamezena i v pozoruhodně vysokých koncentracích [53].

Topická PDT selektivně ničí cílové buňky, zatímco zachovává zdravé struktury. Topický prekurzor fotosenzitizující látky (aminolevulinová kyselina nebo krém s methylaminolevulinátem) je metabolizována na protoporfyrin IX, který se akumuluje především v cílových buňkách. Následná aktivace protoporfyrinu IX ozářením viditelným světlem má za následek tvorbu singletového kyslíku a kyslíkových radikálů, které mají škodlivé účinky na lipidovou membránu buněk a struktury mitochondrií, což bezpodmínečně končí apoptotickou nebo nekrotickou smrtí buněk.

Topická PDT byla popsána jako léčba tukové hyperplazie imunokompetentních individuů. Potenciální mechanismus pro použití topické PDT u tukové hyperplazie a acne vulgaris může záviset na preferenčním vychytávání fotosenzitivního porfyrinu mazovými žlázami a jejich následné destrukci [54].

Další neonkologická aplikace PDT zahrnuje léčbu méně vyvinutých stavů psoriázy, artritidy, aterosklerózy a restenózy artérií a vén [52], benigní hyperplazie prostaty, akné a hirsutismu [42].

Manjunath *et al* identifikovali některé endogenní fluorofory ve tkáních a změny koncentrací těchto fluoroforů navrhli pro rozlišení normálních a maligních tkání. Některé z dobře známých tkáňových fluoroforů jsou proteiny (tryptofan), NAD(P)H, kolagen, elastin, flaviny, lipopigmenty a porfyriny. V nynějším výzkumu byly použity rozdílné excitační vlnové délky zaměřující různé druhy molekul. Byly to: 275 nm pro proteiny; 325 nm pro kolagen, elastin, NAD(P)H, flaviny, lipopigmenty; 375 nm pro NAD(P)H, flaviny, lipopigmenty; 425 nm pro porfyriny, flaviny a lipopigmenty. V této studii byla prozkoumána excitace, která má za výsledek maximální rozdíl mezi normální a maligní tkání. Zdá se, že 325 nm vytváří lepší spektrální rozdíl pro normální a maligní tkáň.

Kolagen a NAD(P)H se ukázaly jako markery cervikální malignity. Také byly prozkoumány jako rozlišovací parametr poměry intenzity vázaného a volného NAD(P)H. Intenzita vázaného NAD(P)H je větší v maligní tkáni ve srovnání s volným. To může být způsobeno zvýšenou expresí proteinů v malignitě a zvýšeným kvantovým

výtěžkem fluorescence NAD(P)H vázaného na proteiny. Zvýšení koncentrace NAD(P)H v maligní tkáni je přisuzovaný posunu metabolismu z aerobního na anaerobní a snížení metabolismu mitochondrií [55].

5.1.3 Antibakteriální PDT

Vývoj rezistence na antibiotika mezi patogenními bakteriemi vede k většímu úsilí, aby se našly alternativní antibakteriální terapeutika, ke kterým by nebyl snadný vývoj rezistence. Příklad těchto relativně nových terapií jsou bakteriofágy, přírodně získávané nebo syntetické antimikrobiální peptidy a PDT.

Dodávání světla je téměř lokalizovaný proces, je vhodné aplikovat PDT především na lokalizované infekce. V kontrastu k PDT rakoviny, kde je fotosenzitizér obvykle injikován do krevního oběhu a akumulován v nádoru, je PDT lokalizovaných infekcí prováděna lokálním podáním fotosenzitizéru do infikované oblasti topickou aplikací, nakapáním, intersticiální injekcí nebo podáním v aerosolu. Je potřebná efektivní selektivita fotosenzitizéru k mikrobu, aby se vyvarovalo neakceptovatelnému stupni poškození velkého množství tkáně v oblasti infekce a zabránilo se obnovení růstu patogenů z buněk, které by přežily léčbu [52].

Obzvláště nástup kationtových fotosenzitizérů (fenothiaziny-methylenová modř a toluidinová modř, *meso*-substituované porfyriny, chloriny vázané na polylyzin), které především interagují s vnější membránou na povrchu některých typů bakterií a kvasinek, zvyšuje jejich permabilitu a umožňuje akumulovat významné množství fotosenzitizéru na úrovni cytoplazmatické membrány.

Fotoinaktivace Gram+ a Gram- bakterií je založena na konceptu, že určitý fotosenzitizér se může akumulovat v nebo na cytoplazmatické membráně, rozhodujícím cíli pro indukci ireverzibilního poškození bakterie. Zdá se, že kladný náboj fotosenzitizéru podporuje pevné elektrostatické interakce s negativně nabitými stěnami na vnějším povrchu bakteriální buňky [56].

Studie vztahu mezi strukturou a aktivitou ukázala, že amfifilní deriváty (např. di- nebo tetrakationické porfyriny nebo ftalocyaniny) vykazují největší afinitu ke G+ bakteriím a kvasinkám, zatímco hydrofilnější látky jako oktasubstituovaný ftalocynin, mající rozdělovací koeficient n-oktanol/voda nižší než okolo 10, se vážou nejochotněji s Gram- bakteriemi. Stejně elektricky neutrální fotosenzitizéry jako chlorin e_6 mohou efektivně indukovat inaktivaci G- bakterií s podmínkou, že jsou kombinované s polykationtovými doplňky jako je polylysin [57].

Byl pozorován základní rozdíl mezi G+ a G- bakteriemi v citlivosti k PDT. Neutrální nebo aniontové molekuly fotosenzitizéru jsou účinně vázané k fotodynamicky aktivním G+ bakteriím, stejně tak jsou vázány ve větší či menší míře pouze k vnější membráně G- bakteriálních buněk, které nejsou inaktivovány po ozáření. Vysoká citlivost G+ druhů je vysvětlována jejich fyziologií, protože jejich cytoplasmatická membrána je obklopená relativně propustnou vrstvou peptidoglykanu a lipoteichoové kyseliny, která je prostupná pro fotosenzitizér. Buněčný obal G- bakterií sestává z vnitřní cytoplasmatické membrány a vnější membrány, která je oddělena periplasmou obsahující peptidoglykany. Vnější membrána vytváří fyzikální a funkční bariéru mezi buňkou a jejím okolím [52].

Fotosenzitivita Gram- bakterií může být zvýšena přidáním biologických nebo chemických molekul, např. nonapeptid polymixin nebo Tris-EDTA, které jsou známé tím, že pozměňují nativní konzistenci vnější membrány a tím zlepšují její permeabilitu a usnadňují penetraci fototoxických molekul do cytoplasmatické membrány.

Hlavně fotosenzitizéry s celkovým kladným nábojem stejně dobře jako *meso*-substituované kationické porfyriny a ve vodě rozpustné kationické ftalocyaniny se zinkem mohou efektivně zabíjet Gram- bakterie fotosenzitizací dokonce bez přítomnosti aditiv. Vysvětlení pro fotoinaktivaci Gram- bakterií porfyriny může být poškození buněčné funkce díky lokalizaci molekul z důvodu jejich pozitivního náboje, protože *meso*-substituované, ale negativně nabitě porfyriny nevykazovaly toxicitu proti G- bakteriím navzdory generaci singletového kyslíku oběma porfyriny.

V souladu s tím není dostatečné narušit jen strukturu vnější membrány, ale musí být porušena cytoplasmatická membrána jak pro zabití G- bakterií tak i G+ patogenů [56].

Hamblin a Hasan vytvořili hypotézu, že fotosenzitizér, který působí převážně reakcí typu I potřebuje penetrovat vnější membránou G- bakterie, zatímco ty, které působí především reakcí typu II nemusí, a proto může být PDI (fotodynamická inaktivace) účinnější.

Existují dva základní mechanismy vysvětlující letální poškození bakterií způsobené PDI - poškození DNA a poškození cytoplasmatické membrány, dovolující unikání buněčného obsahu nebo inaktivaci membránových transportních systémů a enzymů. Působení různými fotosenzitizéry a světlem na bakterie vede k poškození DNA. Zlomy v jedno- i dvouřetězcové DNA a úbytek plazmidové frakce byl detekován v G+ i G- bakteriích po PDI širokopásmovým typem fotosenzitizéru. Poškození však

může být opraveno různými reparačními systémy. Proto různí autoři uvedli, že i když dojde k poškození DNA, nemůže to být hlavní příčina smrti bakteriální buňky [52].

Během posledních deseti let byly učiněny zásadní kroky na poli antimikrobiální PDT, které jsou charakterizovány následujícími body:

- Celkově krátký čas antibakteriální PDT je díky velmi rychlému vychytávání fotosenzitizéru bakteriemi (několik minut) následované relativně nízkou intenzitou výtěžku významné redukce patogenů.
- Vhodnost širokého spektra fotosenzitizérů, např. fenothiazinů, ftalodyaninů nebo porfyrinů, které vykazují významnou antibakteriální aktivitu proti G+ stejně dobře jako G- bakteriím.
- Aplikovatelnost proti bakteriím rezistentním nezávisle na typu jejich rezistence na antibiotika. Tato vlastnost je důležitá s ohledem na opakovanou léčbu chronických a/nebo recidivujících infekcí.
- Absence indukce rezistence po opakované léčbě. Pokračující studie ukázaly, že nejméně u patnácti generací *S. aureus* a *E. coli* fotosenzitizovaných porfyceny se neobjevila žádná rezistence k PDT.
- Absence mutagenicity. Potenciální výhoda PDT před UVA léčbou, protože PDT nemůže být skutečně karcinogenní.
- Demonstrace, že PDT může také zničit virulentní faktory spojené s bakteriálními infekcemi.

Problém v antimikrobiální PDT je nalézt terapeutické okno in vivo, které může zabít bakterie bez cytotoxických účinků na okolní tkáň. MIC hodnoty vhodných fotoreaktivních barviv musí indukovat tři základní kroky redukce růstu in vivo, aby zabily bakterii ($\geq 99,9\%$) a musí být nižší než ty stanovené pro kožní typy buněk.

Když jsou splněné všechny body, antimikrobiální PDT bude poskytovat bezpečnou alternativu ke konvenční antimikrobiální léčbě in vivo [56].

Bylo prokázáno, že mohou být úspěšně inaktivovány jak kmeny citlivé k antibiotikům tak i rezistentní, a zatím opakovaná fotosenzitizace bakteriálních buněk neindukovala selekci rezistentních kmenů. Kromě toho má PDI výhodu dvojí selektivity, může být zaměřen fotosenzitizér i záření. Kombinace všech těchto kvalit činí PDI zajímavou alternativou antimikrobiální léčby infekcí povrchních ran, které jsou snadno dosažitelné světlem.

Svou roli v léčbě PDI má inhibiční efekt albuminu na PDI mikroorganismů, který ve své studii popsali Lambrechts *et al.* Albumin se váže na porfyrin a zhasí a

odstraňuje kyslíkové radikály a silně redukuje citlivost zejména *C. albicans* k PDI. Tato redukovaná senzitivita *C. albicans* k PDI v přítomnosti vysoké koncentrace albuminu výjimečně není omezením využití v možné budoucí léčbě orofaryngeální kandidózy PDI, protože obsah proteinu ve slinách je nízký, pohybuje se okolo 0,1-0,3% a PDI *C. albicans* suspendované v 1% HSA suspenzi nebyla významně odlišná od PDI v PBS [58].

Nejdříve byla antibakteriální fotodynamická terapie použita k desinfekci plné krve a krevních produktů. Zaznamenané výhody doporučují použití a-PDT pro lokalizovanou bakteriální nebo parazitickou infekcí, např. atopická dermatitida. Byla objevena nová technika jak zabít bakterie bez potenciálu nespecifického poškození normální tkáně zprostředkovanou kombinací specifických protilátek a fotodynamické aktivity fotosenzitizéru. Protilátkově zacílená fotolýza bakterií *in vivo* proti *P. aeruginosa* měla za výsledek více než 75% snížení počtu živých bakterií, zatímco po léčbě konjugátem byl detekován buď normální růst bakterií nebo žádné působení. Výhoda protilátkově zacílené fotolýzy bude specifita protilátek proti bakterii společně s nulovou toxicitou proti okolní tkáni. Nicméně vysoká molekulová hmotnost takových komplexů bude inhibovat penetraci do kůže [56].

PDI může být klinicky aplikována u dalších různých typů infekčních nemocí.

Papilomatosi, způsobená lidským papilomavirem (HPV), byla léčená systémovou a topickou PDT v několika anatomických lokalizacích. Konvenční terapie nemůže předejít mnohonásobným opakováním. Systémová PDT eterem dihematoporfyrinu byla testována na 48 pacientech, kteří byly ozářeny laserem (50 J při 630 nm) 48h po aplikaci léčiva. Došlo k výraznému zlepšení a podstatnému snížení růstu papilomu v porovnání s kontrolní skupinou pacientů. Léčba epidermodysplasia verruciformis PDT byla provedena za použití masti s 20% ALA aplikovaná na 6 hodin na poškození a ozářená světlem o 580-740 nm. Následující PDT způsobila na vyskytujícím se poškození puchýře a strupovitost, ale ty byly kompletně vyléčeny za 2-3 týdny bez jizev a kosmetický výsledek byl excelentní. Ačkoli trvalé vyléčení epidermodysplasia verruciformis nemůže být dosaženo, topická PDT může poskytnout lepší kontrolu poškození způsobených HPV.

Bakterie odpovědná za akné (*P. acnes*) byla dlouho známa jako akumulátor červěně fluoreskujícího porfyrinu, tato vlastnost byla použita následně k fluorescenční fototerapii obličeje a jako základní fototerapie k léčbě akné

Některé zprávy uváděly, že viry s lipidovým obalem jsou citlivější k PDT než neobalené variety. Mnoho klinických aplikací PDT u lokalizovaných infekcí byla spojena s poškozením virové etiologie.

Plasmodium falciparum způsobující malárii, bylo zabito PDT prováděnou derivátem N-(4-butanol)feoforbidu a ftalocyaninem s navázaným silikonem jako je Pc4. *Trypanosoma cruzi* byla zabita kombinací světla a fotosenzitizéru jako je hematoporfyrin a aluminium sulfonovaný ftalocyanin. Vajíčka helmintů v odpadních vodách byla inaktivována kationickým meso-substituovaným porfyritem a světlem.

Infekce chirurgických ran jsou způsobené v 25% nozokomiálními infekcemi a často vykazují určitý stupeň rezistence na antibiotika. Jsou to druhy jako *S. aureus*, *Enterococcus* spp. a G- střevní bakterie. Může být vhodné, pokud tyto infikované rány potřebují chirurgický zásah, aplikovat topickou PDT, obzvláště v případech lékové rezistence.

Akutní infekce měkkých tkání jsou relativně vzácné, ale mohou mít zničující důsledky pro pacienty. Při těchto infekcích jsou často nezbytné opakované resekce napadené tkáně a topická PDT může hrát roli v rychlé redukci množství bakterií a tím redukovat rozsah chirurgického zásahu.

Absces je častý důsledek infekce v měkké tkáni a mnoha vnitřních orgánech, jako jsou játra, plíce, mozek a peritoneum. Chirurgická drenáž je normální léčba abscesu a může být také výhodně doplněna topickou aplikací fotosenzitizéru a následným ozářením, aby se odstranila residuální infekce z podloží abscesu.

Chronická a akutní sinusitida může představovat významný klinický problém, protože zasahují dutinu infekcí, která někdy málo odpovídá na léčbu systémovými antibiotiky a operací.

Periodontitida zahrnuje několik zánětlivých procesů struktur upevňujících zuby a výsledkem je chronická infekce způsobená směsí Gram+ a G- bakterií rostoucích jako biofilm a produkujících takzvaný subgingivální plak. Kombinace účinku metaloproteáz uvolňovaných z neutrofilů ve tkáni a eventuálně enzymů produkovaných bakteriemi vede k destrukci periodontálních ligament a vypadnutí zubu. Zatímco současné léčebné postupy chronické periodontitidy zahrnují mechanické odstranění biofilmu pracnou a nepříjemnou procedurou, PDT byla navržena jako realizovatelná alternativní metoda. In vitro studie ukázaly, že několik patogenů, které převládají v subgingiválním periodontálním plaku (např. *P. gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Staphylococcus*

sp.) jsou efektivně eradikovány fotodynamickou léčbou jak ve vodné suspenzi, tak v biofilmu [57].

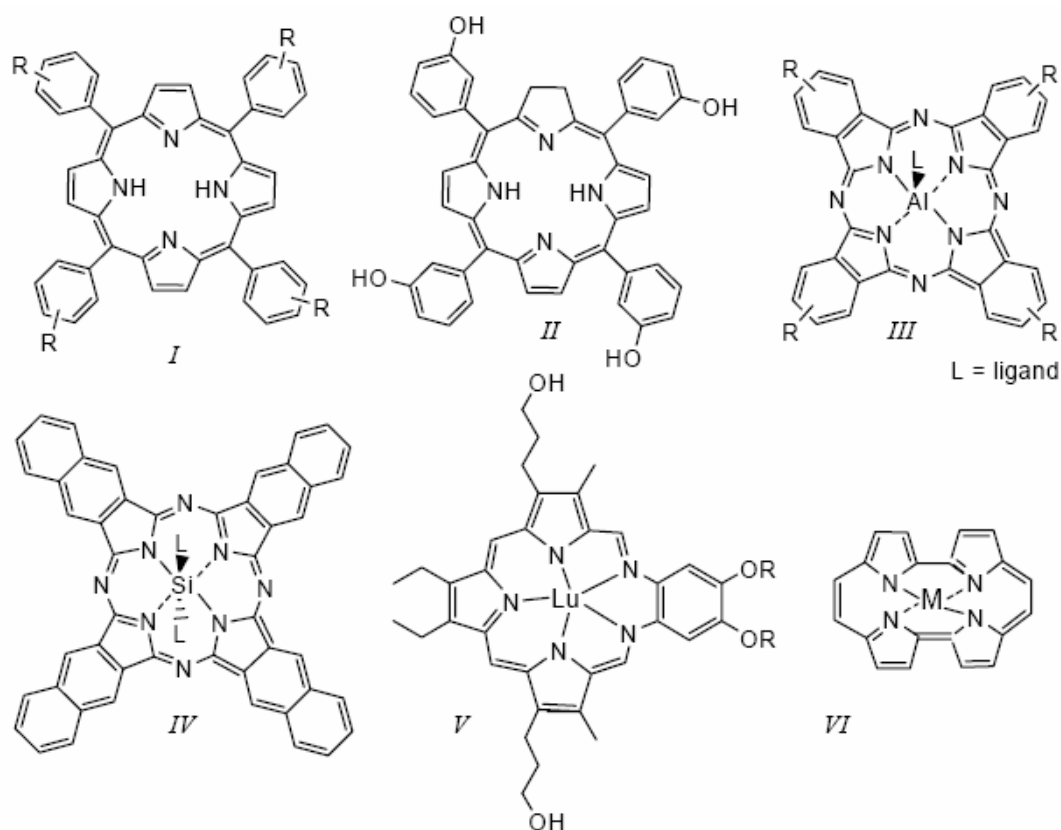
Dále může PDT pomoci při léčení popálenin, chronické a akutní sinusitidy, infekcí močových cest, infekcí *H. pylori* a korneálních infekcí jako je bakteriální keratitida a keratomykóza [52] a také psoriázy, impetiga, atopické dermatitidy [56] a orální kandidózy [57].

Momentálně je hlavní aplikace PDI ve sterilizaci krve a krevních produktů. Hlavně HIV je citlivý k inaktivaci PDI [42].

5.1.4 Fotosenzitizéry

K senzitizerům produkujícím $^1\text{O}_2$ patří velký počet barviv, aromatických a heterocyklických organických sloučenin a barevných kovových komplexů. Obecně platí, že senzitizery označované jako (n,π^*) , kde excitovaný elektron pochází z ne vazebného orbitalu, poskytují převážně O_2 . Typickým příkladem je antrachinon a jeho deriváty. Senzitizery typu (π,π^*) , kde excitovaný elektron pochází z π orbitalu, poskytují $^1\text{O}_2$. K tomuto typu náležejí např. barviva jako eosin, akridin, bengálská červeň, methylenová modř, anthracen, triarylmethanová barviva, dále porfyriny, ftalocyaniny, expandované porfyriny a jejich metalokomplexy.

Většina fotosenzitizérů používaných v PDT jsou cyklické tetrapyroly, zahrnující substituované deriváty porfyriu, chlorin a bakteriochlorin. Přirozeně působící chlorofyly a bakteriochlorofyly jsou substituované deriváty chlorinu a bakteriochlorinu. Hlavní typy porfyrinoidních senzitizerů s potenciálním využitím ve fotomedicině jsou znázorněny na obr.4.



Obr. 4. Některé porfyrinoidní senzitivizéry. *I* - substituované porfyriny, *II* – *m*-THPC, *III* – Al(III)-ftalocyanin, *IV* – Si(IV)-naftalocyanin, *V* – Lu(III)-texafyrin, *VI* – substituované porfyriceňy [4].

Senzitivizér vhodný pro aplikaci v PDT musí splňovat řadu kritérií. Nejdůležitější jsou:

- vhodná absorpce senzitivizátoru. Výhodou je vyšší absorpce v oblasti vlnových délek „terapeutického okna“ a naopak nízká absorpce v oblasti spektrálního maxima denního světla 400–600 nm z důvodu možné fotosenzitivizace kůže,
- dostatečně selektivní retence senzitivizátoru v neoplastických tkáních,
- nízká toxicita senzitivizátoru za nepřítomnosti záření označovaná jako „temná“ toxicita,
- fotostabilita senzitivizátoru po dobu ozařování tkáně,
- fluorescence senzitivizátoru, která umožňuje sledování jeho distribuce fluorescenční endoskopií,
- dostatečně vysoký kvantový výtěžek $^1\text{O}_2$,
- důležitou vlastností je rovněž polarita senzitivizátoru. Polární, hydrofilní senzitivizátory mohou být aplikovány intravenózně. Hydrofobní senzitivizátory

vyžadují aplikaci na nosičích a vykazují většinou vyšší retenci v tumorových tkáních [2].

Dobrý fotosenzitizér je především čistá látka s konstantním složením. Měla by být eliminována z těla dostatečně rychle, aby nedocházelo k celkové kožní fotosenzitizaci. Neměla by v těle příliš agregovat, protože agregace snižuje Φ_t (pravděpodobnost, že fotosenzitizér po absorpci kvanta světla přejde do excitovaného tripletového stavu T_1) a Φ_Δ (pravděpodobnost, že fotosenzitizér po absorpci kvanta světla přejde do stavu T_1 a přeneše přebytečnou energii na O_2). Měl by také absorbovat světlo o dostatečné vlnové délce (600-800 nm), tak aby terapeutický efekt PDT byl tak hluboký, jak je možné, a aby použité světlo nezpůsobilo fotosenzitizaci zdravé tkáně. Fotostabilita látky často klesá, když vlnová délka její absorpce stoupá. Především by fotosenzitizér neměl silně absorbovat v oblasti 400-600 nm, aby riziko celkové fotosenzitivity způsobené slunečním zářením bylo co nejmenší. Syntéza fotosenzitizéru by měla být poměrně jednoduchá a výchozí materiály dostupné.

Existují další charakteristiky fotosenzitizéru, které mohou ověřit jeho použitelnost v PDT. Silná absorpce světla fotosenzitizérem použitým při PDT snižuje jeho množství potřebné pro terapeutický účinek. Na druhou stranu silná absorpce fotosenzitizéru může bránit penetraci světla do tkáně a tím redukovat hloubku účinku. Fotosenzitizér by měl být dostatečně stálý vůči degradačním procesům, např. vyblednutí světlem (photobleaching). I když tendence k vyblednutí může být i přínosná, protože může zkrátit délku celkové fotosenzitivity po PDT a také zvýšit selektivitu léčby [42].

5.1.4.1 První generace fotosenzitizérů

První fotosenzitizér použitý v PDT byl hematoporfyrin (Hp) a jeho deriváty. Před érou PDT byla fotosenzibilizační schopnost Hp a jiných tetrapyrólů pozorována jako syndrom fotosenzitivity. Systémový výskyt porfyrinů v těle způsobí fototoxickou reakci v oblastech vystavených slunečnímu záření.

Hp byl izolován z hemoglobinu z vysušené krve za použití koncentrované kyseliny sírové. Hp může být také získán z protoheminu izolovaného z krve. Ačkoli je neupravený Hp dobrý fotosenzitizér, není vhodný pro PDT, protože jeho zasažení nádoru je velmi malé.

Schopnost derivátů Hp (HpD) působit jako fotosenzitizéry in vivo je většinou dána jejich oligomerními komponenty. Oligomerní a monomerní komponenty HpD mohou být částečně separovány HPLC. Frakce obohacená oligomerními komponenty je

nazývaná „frakce D“ a je používána v komerční verzi jako Photofrin, Photosan, Haematodrex a Photocarcinorin [42].

HpD v kombinaci s červeným světlem vykazuje dobrý tumoricidní účinek [50].

Existují závažné důvody, proč HpD nevyhovuje pro využití v PDT. HpD je komplikovaná směs a některé komponenty nejsou fotoaktivní. Přesné složení směsi není známé a mění se případ od případu. Komponenty HpD mohou být také modifikovány ve tkáních: esterové vazby mohou být hydrolyzovány a agregáty rozloženy. Díky chemické heterogenitě se těžko interpretují studie závislosti odpovědi na dávce. Fotodynamická charakteristika a distribuce v tkáních se liší přípravek od přípravku, což brání předvídání terapeutického účinku PDT.

Asi nejzávažnějším omezením HpD je jeho elektronové absorpční spektrum, které je méně než ideální, pokud se týká PDT. Absorpční spektrum HpD je podobné spektru Photofrinu. Je to takzvané etotypické spektrum obsahující silnou Soretovu skupinu při asi 400 nm typickou pro porfyriny a Q-skupinu o nižší intenzitě při 500, 540, 570 a 630 nm. Ačkoli absorpce HpD při 630 nm je nejslabší, je světlo o této vlnové délce používáno při PDT, protože penetruje nejloužeji do tkání [42].

Přečištěná frakce aktivního materiálu v HpD, porfimer sodný, je směs různých produktů hematoporfyrinu s několika absorpčními píky. Stal se prvním fotosenzitizérem, který byl schválený pro PDT k léčbě recidivující povrchní papilární rakoviny močového měchýře [50].

5.1.4.2 Druhá generace fotosenzitizérů.

Většina z těchto fotosenzitizérů absorbuje světlo delších vlnových délek a vykazuje silnou absorpci v oblasti červeného spektra. Fotosenzitizéry používané v klinických pokusech patří ke skupině porfyrinů, ftalocyaninů, texapyrinů, chlorinů a bakteriochlorinů. Tyto složky mají jistou charakteristiku, která je činí obzvláště vhodnými pro PDT. Jejich důležitou vlastností je dobrá schopnost tvořit $^1\text{O}_2$, který je indikovaný vysokou hodnotou Φ_{Δ} . Další charakteristiky fotosenzitizérů příznivých pro PDT jsou jejich přiměřená stabilita, schopnost absorbovat světlo dlouhých vlnových délek a nulová toxicita v nepřítomnosti světla.

Alternativní strategie dosažení fotosenzitizace je použití endogenního fotosenzitizéru protoporfyrinu IX (PpIX), produkovaného při biosyntéze protohemu. Nejpomalejší krok této syntézy je tvorba 5-aminolevulinové kyseliny (ALA) ze succinyl-koenzymu A a glycinu. Pp se ale neakumuluje jen v nádorové tkáni, ale i ve

zdravé tkáni, a proto způsobuje celkovou fotosenzitizaci. V porovnání s HpD není Pp vhodnější fotosenzitizér na základě svých absorpčních vlastností. ALA (Levulan®) ale může být injikována, podávána orálně nebo aplikována topicky do cílové tkáně. Ozáření je prováděno za 3-6 hodin. Pp s ALA jako proléčivem byl vyvinut pro PDT rakoviny kůže a gastrointestinálního traktu, prekancerózních poškození a psoriázy [42, 50].

5.1.4.2.1 Syntetické fotosenzitizéry druhé generace

Absorpce červeného světla porfyryny může být zesílena a posunuta do oblasti delších vlnových délek vhodným substituentem. 5,10,15,20-Tetra(3-hydroxyfenyl)porfyrin (*m*-THPP) a 5,10,15,20-tetra(4-sulfonatofenyl)porfyrin (*p*-TPPS₄) jsou substituované porfyryny (*I*) vyvinuté jako potenciální nové fotosenzitizéry. *m*-THPP je 25-30krát efektivnější fotosenzitizér než HpD a Photofrin.

Také expanze makrocyclického π -systému porfyrinů posouvá jejich absorpci k delším vlnovým délkám a zesiluje ji. Spojení čtyř benzenových nebo naftalenových kruhů do polohy β pyrolového jádra a substituce uhlíků v methinovém můstku dusíky vytvoří ftalocyniny a naftalocyaniny. Protože tyto komponenty silně absorbují světlo o dlouhých vlnových délkách, mohou být použity v malých dávkách 0,2-0,5 mg/kg. Pro srovnání, pro PDT Photofrinem je třeba asi 1-5 mg/kg. Navíc ftalocyniny a naftalocyniny neabsorbují silně světlo o vlnové délce 400-600 nm, proto je riziko celkové fotosenzitivity slunečním světlem mnohem menší než u porfyrinů.

Kinetika ftalocyninů v těle je mnohem rychlejší než u HpD. Jejich obsah v nádoru je maximální 1-3 hodiny po injikování. Protože jsou eliminovány z těla za 24 hodin, kožní fotosenzitivita je jen přechodná [42]. Využívá se např. Al(III)-ftalocyanin (*III*) sulfonovaný do různého stupně [4]. Na ftalocyaniny jsou často navázány polární substituenty, aby se odstranily problémy způsobené jejich vysokou hydrofobností. Byly vyvinuty nové izomericky čisté a přiměřeně hydrofilní ftalocyaniny a je možné, že v budoucnosti bude některý z nich zaveden jako fotosenzitizér v PDT.

Z důvodu vysoké hydrofobnosti jsou naftalocyaniny nerozpustné ve většině injekčních roztoků. Proto byly dlouhou dobu nahlíženy jako méně zajímavé pro PDT. Naftalocyniny absorbují velmi silně světlo dlouhých vlnových délek, které melanin absorbuje jen málo. Tato vlastnost naftalocyaninů umožnila léčbu PDT u silně pigmentovaných nádorů [42]. Použitelný je Si(IV)-naftalocyanin (*IV*) [4].

Redukce periferních dvojných vazeb porfyrynu zesiluje absorpci delších vlnových délek a posouvá λ_{\max} do červené oblasti. Takto získané dihydroporfyryny se

nazývají chloriny. V bakteriochlorinech jsou redukovány dvě dvojné vazby na protějších stranách makrocyklu, což zesiluje absorpci a posunuje ji rovněž do červené oblasti, a proto jsou vhodné k léčbě vysoce pigmentovaných nádorů. Chloriny a bakteriochloriny jsou náchylné k oxidaci zpět na porfyriny. Aby se tomuto zabránilo, je často umístěn blízko redukováného pyrolového kruhu objemný substituent nebo exocyklický kruh [42].

m-THPC (*II*) (5,10,15,20-tetrakis(3-hydroxyfenyl)chlorin, temoporfin, Foscan®) je nejnovější schválený fotosenzitizér pro paliativní léčbu rakoviny hlavy a krku. Je účinnější než porfimer sodný nebo ALA, kožní fotosenzitivita je redukována na 2-4 týdny a absorpční pík je při 652 nm (ve srovnání s 630 nm u porfimeru sodného a ALA), což mírně zlepšuje hloubku penetrace světla do tkáně [50].

Porfyriceiny jsou strukturní izomery porfyrinů a texapyfyriny jsou modifikované porfyriny, ve kterých je fenylový kruh nahrazen pyrolovým. Porfyriceiny a texafyriny generují efektivně $^1\text{O}_2$. Mohou snadno tvořit komplexy s objemnými kationy kovů jako jsou Ln(III) nebo Lu(III). Komplex Lu(III) s texafyrinem (*V*) (LuTex) je velmi stálý hydrofilní fotosenzitizér, který se velmi selektivně koncentruje v nádoru. Ozáření se provádí 3 hodiny po injikování. LuTex může během PDT způsobit kožní problémy [42]. K dalším porfyrinoidním senzitizerům patří substituované porfyceny (*VI*) [4].

5.1.4.2.2 Přírodní nebo polosyntetické fotosenzitizéry druhé generace

Důležitým přírodním zdrojem mnoha různých polosyntetických chlorinů je protohemin. Ten může být snadno izolován a přeměněn na různé dikarboxylické porfyriny, jako proto-, meso-, deuterio- a hematoporfyriny, použitím standardních metod porfyrinové chemie. Od protoheminu je odvozena BDP-MA (benzoporfyrin mono kyselina na kruhu A), která vykazovala slibné fotofyzikální vlastnosti a je právě ve druhé fázi klinického zkoumání pro léčbu solidních nádorů.

Azachloriny jsou odvozené od bilirubinu. Ve srovnání s běžnými chloriny vykazují silnější batochromně posunutý absorpční pás. Fotofyzikální parametry indikující fotodynamické chování azachlorinu jsou excelentní.

Hlavní výhodou použití přírodních chlorinů a bakteriochlorinů je, že mohou být snadno ve velkém množství izolovány z rostlin a řas. Čisté chlorofyly mohou být modifikovány parciální syntézou a tím lze získat mnoho různých derivátů.

Chlorofyl *a*, obsahující lipofilní ftylovou skupinu, je hydrofobní fotosenzitizér. Chlorofyl *a* agreguje ve vodných roztocích a nepolárních organických rozpouštědlech,

což podstatně brání v tvorbě $^1\text{O}_2$. Přidání detergentu, např. Triton X-100, monomerizuje chlorofyl *a* a zvyšuje jeho Φ_{Δ} . Ačkoli jeho fotofyzikální vlastnosti jsou vhodné pro PDT, byl jen zřídka používán jako fotosenzitizér v biologických systémech z důvodu jeho vysoké tendence k agregaci a nízké rozpustnosti ve fyziologických rozpouštědlech.

Feofoforbid *a* je narušitel od chlorofylu *a* absorbován z trávicího traktu, protože obsahuje volné zbytky kyseliny propionové. Může být proto použit jako orálně aktivní fotosenzitizér v PDT.

Chlorofyl *b* a feofoforbid *b* nebyly často zkoušeny jako možné fotosenzitizéry pro PDT, protože se těžko připravují v čisté formě.

Chlorin e_6 (Ce_6) je díky přítomnosti tří ionizovatelných karboxylových skupin hydrofilní fotosenzitizér. Má také amfifilní charakter, protože karboxylové skupiny jsou na stejné straně makrocyclu. Bylo zjištěno, že Ce_6 je fotocytotoxický. Ale od Ce_6 odvozený fotosenzitizér MACe_6 je nejslibnější kandidát pro PDT. Jeho výhody jsou nejen dobrá fotosenzitizace, ale také rychlá kinetika; jeho clearance u myši byla 30,3h. Proto nezpůsobuje prodlouženou fotosenzitivitu po PDT.

Použití konjugátů může zlepšit targeting fotosenzitizéru a tím i terapeutický efekt PDT. Preciznější zacílení by zvýšilo efektivitu fotosenzitizéru a redukovalo škodlivé vedlejší účinky léčby [42].

Hypericin je společně s dalšími naftodiantronovými deriváty nazývanými hypericiny (jako je pseudohypericin, protohypericin, protopseudohypericin a další) přírodní produkt identifikovaný ve více než 300 druzích rodu *Hypericum* (Guttiferae) [59].

Jako lipofilní molekula může být hypericin inkorporován do fosfolipidové dvouvrstvy buněčné membrány. Díky svému lipofilnímu charakteru se rozsáhle akumuluje v lipofilních strukturách membrány a obalených virů [60].

Hypericin se silně váže na plazmatické proteiny, jako je albumin nebo lipoproteiny [44]. Po střetu mikročástic s intersticiálním proteinem nebo membránou nádorové buňky může být hypericin uvolněn z lipoproteinového komplexu, což je následováno difúzí nezávislou na lipoproteinu a intracelulárním vychytáním složek [61].

Dále je důležité poznamenat, že postrádá toxické nebo genotoxické účinky in vitro nebo in vivo. Je amfifilní a proto se lokalizuje v membránových strukturách buněk a organelách [44].

Výrazná acidita střední hydroxylové skupiny umožňuje tvorbu organické a anorganické jednosytné soli za fyziologických podmínek. Sůl hypericinu je vychytávána buněčnou lipidovou membránovou strukturou a proto se chová v každém ohledu jako lipofilní iontový pár [59].

Ideální vlastnosti pro fotodiagnostiku a fotodynamickou aplikaci hypericinu jsou absorpce světla mnoha vlnových délek, fotostabilita, rychlá clearance z normální tkáně a /nebo nízké vychytávání normální tkáně, což má za následek nádorovou selektivitu.

Hypericin je rozpustný v biologických médiích, které jsou tvořeny komplexem hypericinu s biologickou makromolekulou (např. DNA, lidský albumin a další plazmatické proteiny, membránové fragmenty a buněčné komponenty) Tyto vlastnosti jsou využity v diagnostických fluorescenčních metodách in vivo a v klinických pokusech [62].

Některé studie stanovily in vivo a in vitro jeho schopnost antineoplastické aktivity při ozáření světlem laseru o 595 nm. Výzkum molekulárního mechanismu fototoxicity hypericinu v nádorových muškách odhalil, že tento fotosenzitizér může indukovat apoptózu a nekrózu způsobem závislým na koncentraci a dávce světla [59].

Způsob buněčné smrti při PDT je často apoptóza při nízké koncentraci senzitizeru a nízké energii světla na jednotku plochy, zatímco nekróza nastává při použití vysoké koncentrace senzitizeru a vysoké energii světla na jednotku plochy. Dále iniciace apoptózy závisí na subcelulární lokalizaci fotosenzitizéru (např. apoptotická odpověď může být získána, když jsou cílem poškození indukovaného světlem lyzozomy nebo mitochondrie). Hypericin indukuje rychlý kolaps mitochondriálního transmembránového potenciálu. Katepsin D aktivuje kaspázu-3, která stimuluje přídavné apoptotické mechanismy. Uvolnění enzymu z lyzozomu do cytosolu interaguje s mitochondriální membránou za uvolnění cytochromu c do cytosolu a indukování apoptózy buněk aktivovaných kaspázou-8, kaspázou-9 a kaspázou-3. Cytosolický cytochrom c působí jako kofaktor v tvorbě komplexu s Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1), prokaspázou-9 a apoptozomem dATP/ATP vedoucí k aktivaci kaspázy-9. Kaspáza-9 vede k inaktivaci popravčích kaspáz (-3, -6, -7), které katalyzují štěpení vitálních proteinů. Smrt nádorových buněk fotoaktivovaným hypericinem je také zprostředkována proteázami. Apoptotické signály mohou být spouštěné nejen působením hypericinu jako fotosenzitizéru, ale také jeho schopností inhibovat proteinkinázu C [62].

Maligní gliomy vykazují vysokou aktivitu proteinkinázy C ve srovnání s gliovými buňkami. Proto je hypericin zajímavá substance pro terapii glioblastomu díky své roli v inhibici signální transdukce a buněčné proliferace.

Byla také popsána aktivita proti retrovirům, včetně HIV [60]. Hypericin je zřejmě inaktivátor volného virionu a interferuje s fází replikačního cyklu. Hypericin zabraňuje pučení a uvolňování viru z buňky interferencí s vlastním kompletováním a maturací virového jádra pučících částic. Bylo zjištěno, že působí inaktivaci virů obdařených lipidovým pláštěm, zatímco je neúčinný proti neobaleným virům. Inaktivace HIV-1 je patrně charakterizovaná fotochemickým pozměněním hlavního proteinu kapsidy HIV p24 a *gag* prekursoru obsahujícího p24 a je doprovázená neschopností aktivovat reverzní transkriptázu v léčeném virionu [62].

Hypericin je vhodný fluorescenční marker pro rozlišení mezi neurony a lidskými buňkami glioblastomu. Rozdílná intracelulární akumulace fotosenzitizéru je základ pro rozlišení zranitelnosti (náchylnosti) fotodynamickou terapií. Hypericin byl lokalizován více ve vícevrstevném gliovém obalu a ve spojovací tkáni obklopující neuron než v neuronu samotném [60]. Dále je hypericin studován jako diagnostikum pro fluorescenční detekci plochých neoplastických poškození močového měchýře, používané ve fotodynamické diagnostice [59].

Hypericin se akumuluje především v malých nádorech, které mohou být detekovány nástroji fluorescenční diagnostiky. Díky své vysoké senzitivitě a specifitě při nízkých koncentracích v lidských dutých orgánech jako je močový měchýř a žaludek, je hypericin nádorově selektivní látka [62].

Protože akumulace hypericinu a tok krve závisí ve stejné míře na hmotnosti nádoru, data studie Van de Putte *et al.* ukazují, že akumulace hypericinu v nádorové tkáni je rozhodně závislá na míře lokální perfuze krve. V souladu s touto hypotézou odhalila analýza fluorescenční mikroskopii sekce nádoru homogennější distribuci cévami v malých nádorech s vysokým procentem funkčních cév. Naopak velké nádory mají spíše heterogenní distribuci cévami s velmi dobře perfundovanými oblastmi v periferii a menším tokem krve v centrálně lokalizovaných oblastech. Proto je hypericin převážně akumulován v periferii těchto nádorů [61].

Bylo zjištěno, že po PDT hypericinem došlo následně ke snížení hladin VEGF (vascular endothelial growth factor) v séru myších modelů s fibrosarkomem a že toto souvisí s prodlouženou dobou přežití v porovnání s kontrolami. PDT může působit

snížením hladin VEGF v séru a inhibovat tím schopnost nádorové tkáně tvořit nové cévy a obnovit růst [45].

Huygens *et al.* provedli stanovení akumulace a penetrace hypericinů a dvou jeho jodovaných derivátů v 2-D a 3-D kultuře nádorových buněk močového měchýře a srovnání jejich PDT potenciálu. Elektrofilní jodace v pozici 2 a 5 zvýšila lipofilní charakter hypericinů. Dále substituční reakce měly za výsledek malý batochromní posun v absorpčním spektru.

Nicméně vyplynulo, že monojodový analog byl asi tak účinný jako hypericin, zatímco dihydrohypericin vykazoval významně nižší fotodynamický potenciál. Protože je známo, že buněčná odpověď na kyslíkové radikály je dramaticky závislá na subcelulární pozici fotosenzitizéru, předpokládá se, že ve srovnání s hypericinem vykazují lipofilní analogy rozdílnou subcelulární distribuci nebo modifikovanou interakci se svým molekulárním okolím, což vyplývá v menší senzitivitu buněk.

Dihydrohypericin se téměř výhradně váže na nejzevnější část sferoidu s velmi malou penetrací. Zdá se, že mezi mírou vychytávání fotosenzitizéru buňkami za 2-D podmínek a penetrací panuje nepřímá úměra: vyšší vychytávání, menší penetrace. Pravděpodobně se dihydrohypericin váže dychtivěji k buněčným strukturám, vytváří vysokou koncentraci na okraji a zabraňuje další penetraci do hlubších oblastí ve sferoidu.

Výsledky fototoxických účinků v 3-D systému jsou v souladu s výsledky získanými v 2-D systému s dihydrohypericinem, který je nejméně účinným fotosenzitizérem. Nicméně fototoxický efekt pozorovaný v 3-D kulturách buněk je dramaticky nižší. Ve srovnání s konvenčními monovrstevnými strukturami, buňky v 3-D agregátech se podobají více situaci *in vivo* s ohledem na buněčný tvar a okolí.

Naše studie ukázala, že ačkoli je pokusem používat v preklinických studiích monovrstvy jako jedinou cestu stanovení potenciálu nově objeveného fotosenzitizéru *in vivo*, použití 3-D buněčných agregátů se podobá situaci *in vivo* mnohem lépe a je rozhodující pro správné stanovení jeho účinnosti [63].

5.1.4.3 Targeting fotosenzitizéru

Díky selektivitě fotosenzitizéru je terapeutický efekt PDT většinou omezený na cílovou tkáň a tím je minimalizována fotosenzitizace jinde v organismu. Také účinky $^1\text{O}_2$ jsou lokální kvůli jeho krátké době životnosti *in vivo*. K selektivitě PDT také přispívá různá schopnost regenerace buněk po fotodynamickém poškození. Zdravá tkáň se na rozdíl od

nádorové po PDT dobře hojí. Dále může zvýšit selektivitu vyblednutí fotosenzitizéru, tím že světlo zničí fotosenzitizér ve zdravé tkáni. Síla účinku PDT je závislá na použité dávce světla a dostupnosti kyslíku. Aby byla způsobena smrt buněk, musí síla účinku PDT překročit určitou prahovou hodnotu. Překročení prahové hodnoty ve zdravé tkáni může být zabráněno použitím malé dávky světla a vyblednutím fotosenzitizéru, které sníží jeho koncentraci ve zdravé tkáni.

Selektivita PDT může být lépe zvýšena použitím fotosenzitizéru, který je více koncentrován v nádorové tkáni. Kinetika fotosenzitizéru je závislá na vlastnostech fotosenzitizéru a tkáně, stejně tak jako na možném použití nosiče [42].

Některé vlastnosti jsou typické pro hyperproliferativní tkáně jako je nádor. Mezi ně patří nízké pH intersticiální tekutiny, způsobené zvýšenou glykolýzou a sníženým zásobováním $^3\text{O}_2$ v tkáni, vysoký výskyt LDL receptorů v buněčné membráně, stejně jako velké množství makrofágů a nově vytvořeného kolagenu v tkáni. Kapiláry v nádorech jsou neobvykle permeabilní, což usnadňuje pohyb fotosenzitizéru z krve do širokého intersticiálního prostoru nádoru. Fotosenzitizér také opouští tento prostor mnohem pomaleji díky redukované lymfatické drenáži v nádoru. To podporuje hromadění ve vodě rozpustných porfyrinů jako agregátů nebo proteinových komplexů v nádorové tkáni. Lipofilní fotosenzitizátory jsou vychytávány endoteliálními buňkami v komplexu s LDL [42, 46].

Hlavní nosiče hydrofobních fotosenzitizérů (oligomery derivátů hematoporfyrinu, monosulfonované porfyriny, nesulfonované ftalocyaniny) v krevním řečišti jsou lipoproteiny [46]. Časté přenašeče jsou také lipozomy, emulze, polymery, nanočástice a mikrosféry [42]. Nádorové buňky spolu s dalšími rychle proliferujícími buňkami mají zvýšený nárok na cholesterol pro biosyntézu membrány. Proto zvyšují množství LDL receptorů a vychytávají více fotosenzitizéru vázaného na lipoprotein než normální buňky. Fotosenzitizér vstupuje endocytózou do lyzozomů. Po následném vystavení světlu je lyzozomální membrána poškozena a do cytoplasmy jsou uvolněny hydrolázy, které zničí buňku.

Hydrofilní fotosenzitizéry (např. tetrasulfonované porfíny – TPPS₄, monomery odvozené od hematoporfyrinu) se vážou na plasmatický albumin a globuliny a lokalizují se nejvíce ve stroma nádoru. Intracelulárně se také vážou na mikrotubuly a po ozáření je zastaveno dělení buněk v metafázi [46].

Hydrofilní fotosenzitizéry jsou méně náchylné k agregaci v plazmě než hydrofobní. Aby se zabránilo agregaci, která je při PDT nežádoucí, je udržována nízká

koncentrace fotosenzitizéru v injekčním roztoku a jeho hydrofilnost je zvýšena vhodným substituentem nebo ligandem. Na druhou stranu zvýšení hydrofility brání schopnosti fotosenzitizéru penetrovat fosfolipidovou dvojvrstvou buněčné plazmatické membrány a tím snižuje množství fotosenzitizéru hromaděného v cílových buňkách. Z důvodu těchto opačných účinků jsou obvykle nejlepší fotosenzitizéry amfifilní, které mají hydrofilní i hydrofobní oblasti. Ačkoli agregáty fotosenzitizéru nemohou normálně penetrovat plazmatickou membránu buňky, nádorové buňky mohou pohltit menší agregáty endocytózou a makrofágy v nádoru mohou pohltit i větší agregáty.

Fotosenzitizér může být také napojen kovalentně na makromolekulu nebo monoklonální protilátku. Makromolekuly mají jisté imunologické a farmakokinetické vlastnosti, které zvyšují hromadění fotosenzitizéru v nádoru.

Byly vyvinuty také takzvané „inteligentní nosiče“ skládající se z několika funkčních komponentů. Ty transportují fotosenzitizér etapu po etapě do cílové buňky sekvenčním použitím svých komponentů. Je možné, že takové přenašeče budou zahrnuty do třetí generace fotosenzitizérů.

Targeting fotosenzitizéru může být výhodný také na úrovni organel. Jádru je organela nejcitlivější na fotodynamické poškození, které vede velmi rychle ke smrti buňky. Proto byl vyvinut inteligentní přenašeč, který transportuje fotosenzitizér do jádra buňky [42].

5.1.5 Aplikace světla

Záření používané při PDT je světlo z viditelné a blízké infračervené oblasti. Obvykle jsou vybírány co nejdelší možné vlnové délky, aby bylo dosaženo terapeutického účinku tak hluboko, jak je možné. Příležitostně je vhodnější povrchní terapeutický účinek, například k dosažení ruptury stěny tkáně. V tomto případě může být použita kratší vlnová délka [42].

Konvenční širokospektré světelné zdroje, jako jsou obloukové lampy, mohou být použity pro aktivaci fotosenzitizéru. Tyto lampy jsou levné a snadno použitelné, ale obtížné je jejich spojení s vlákny vedoucími světlo, bez redukce optické energie. Je také těžké vypočítat efektivní dodanou dávku světla a energie výstupu je limitována maximem 1 W. Dále jsou vyžadovány filtry, aby odstranily UV záření a infračervenou emisi, která může způsobit ohřívání [50].

Lasery jsou schopné dodávat intenzivní světlo s vysokým stupněm monochromaticity, které umožní zaostřit světelný paprsek do optického vlákna bez

velké ztráty energie. Použití optických vláken v PDT umožňuje léčbu vnitřních nádorů endoskopicky s umístěním zdroje světla intersticiálně do nádorové tkáně. Použití laseru jako zdroje světla má také nevýhody, protože jsou drahé, komplikované a nejsou lehce transportovatelné. Proto byly vyvinuty diodové lasery vhodné pro PDT, které jsou levnější, menší a mobilnější [42].

Nicméně diodové lasery nabízí jen jednu výstupní vlnovou délku, což limituje jejich všestrannost. Diody emitující světlo (LED) jsou také vhodné pro klinické použití. Jsou méně nákladné než ostatní světelné zdroje, jsou menší a mohou zajistit výstupní energii více než 150mW/cm² při vlnové délce v rozsahu 350-1100nm.

Objevení technologie optických vláken také hraje důležitou roli v PDT. Úspěšná PDT vyžaduje dodávání světla ze zdroje do cílové oblasti a homogenní distribuci světla. Optická vlákna byla přizpůsobena, aby vyhovovala požadavkům na ozáření při různých umístěních. Pro povrchové ozáření, např. orální mukózy, jsou použita vlákna s optickou čočkou na konci, aby se světlo rozprostřelo po povrchu cílové oblasti. V dutých orgánech, např. bronchioly, jícen a močový měchýř, je ozáření často prováděno cylindrickým difuzérem kombinovaným s nafouknutými balonky pro jednotnou distribuci světla. Černý obal na jedné straně balonku je někdy používán, aby ochránil okolní normální tkáň [50].

5.2 Fotochemoterapie

Tato nová specialita fotomedicíny je zaměřena na objevení metod léčby kožních nemocí za použití neionizujícího elektromagnetického záření (UVR a viditelné záření) samostatně nebo v kombinaci s endogenní nebo exogenní fotoaktivní chemikálií. Protože energie neionizujícího UV záření má velmi nízkou penetraci, ve srovnání s ionizujícím zářením, tato nová technologie byla nejužitečnější v léčbě kožních chorob. Tento nový farmakologický koncept byl nazván fotochemoterapie, kombinované použití elektromagnetické energie a léčiva, a ačkoli první pokusy byly popsány v roce 1974, je v podstatě stará tisíce let. Byla používána v Egyptě a Indii 1200-2000 před naším letopočtem.

Extrakorporální fotochemoterapie (fotoferéza), používaná pro léčbu kožního erytrodermálního T-buněčného lymfomu, byla shledána použitelnou jako modifikátor imunitní odpovědi s potenciálně širokou klinickou aplikací u takových chorob jako progresivní systémová skleróza (sklerodermie), pemphigus vulgaris, syndrom související s AIDS a akutní reakce štěp versus hostitel. Nový terapeutický způsob

nazývaný extrakorporální fotochemoterapie pro zvládnutí poškození způsobeného abnormálními lymfocyty, a hematogenně diseminovaný kožní T-buněčný lymfom (CTCL), byl představen v roce 1987. Zahrnuje použití psoralenů a UVA (PUVA) v extrakorporálním systému toku a představuje modernější adaptaci PUVA terapie pro zvládnutí poškození způsobeného abnormálními T-lymfocyty. Po ozáření v extrakorporálním fotoferézním systému je krev retransfundována do pacienta, dochází k zjevné imunologické reakci proti residuálním CTCL buňkám [64].

Fotoferéza byla nejprve použita pro léčbu pacientů s leukemickou formou kožního T-lymfomu. Dnes je používána v klinické medicíně také k čištění kostní dřevě od maligních buněk před autologní transplantací. Byla také navržena pro mimotělní eliminaci aktivovaných buněk při autoimunitních chorobách. Některé obalené viry, včetně HIV, byly úspěšně eliminovány z krve produkty PDT. Fotosenzitizér se akumuluje ve virovém lipidovém obalu [46].

Terapie PUVA je efektivní ve zvýšeném počtu kožních poškození jako je novotvar, který vyvstává z kůže, např. T-buněčný lymfom. U některých chorob (např. vitiligo), je PUVA jediná možná efektivní léčba; v jiných je to přiměřená možnost a u jiných je bezpečnější než kortikosteroidy.

Pro repigmentaci u pacientů s vitiligem, odstranění psoriázy na dlaních a chodidlech (s nebo bez etretinátu) a vesikulárního dermatického ekzému na rukou a nohou je PUVA bezpečnější než systémové podávání kortikosteroidů; pro aktinický retikuloid je PUVA léčba stejně efektivní jako azathioprin.

Zajímavým aspektem PUVA je její použití v prevenci chorob. Byla dosažena dlouhodobá tolerance slunečního záření. Došlo ke zvýšení opalování jako ochranný mechanismus proti UV poškození. Koncept PUVA fotochemoprotekce zahrnuje použití perorálních nebo topických psoralenů a expozici UVA, získaného z umělých UVA zářičů nebo ze slunečního světla, za účelem podporovat a indukovat hyperplazii epidermálních buněk a zvyšovat pigmentaci epidermálním melaninem.

Byl pozorován malý ale ne nevýznamný počet pacientů přijímajících při PUVA terapii perorálně 8-MOP, kteří měli pravidelně zkušenost s nepříjemným pocitem na zvracení, malátností a fototoxicitou ve formě bolestivého erytému, edému nebo tvorby puchýřů. Bergapten (5-MOP) se zdá být lepší při perorálním podání v adekvátních dávkách než methoxalen (8-MOP) z důvodu relativně malého množství rušivých vedlejších účinků, obzvláště nauzey. Snížení nebo absence nauzey a kožní fototoxické reakce je hlavní výhoda a důvod pro použití bergaptenu v PUVA fotochemoterapii.

Kromě toho byl časem 8-methoxypsoralen shledán fototoxickou a potenciálně karcinogenní látkou a začaly se hledat použitelné netoxické a nekarcinogenní psoraleny [64].

5.3 Fototerapie

Třebaže se nejčastěji kombinuje s 8-methoxypsoralenem nebo jinými fotochemoterapeutickými látkami, širokopásmové UVA záření obsahující UVA1 (340-400 nm) a UVA2 (315-340 nm) bylo použito jako monoterapie např. u léčby atopické dermatitidy. Dnes širokopásmové může hrát UVA v moderní fototerapii vedlejší roli, s výjimkou terapie kombinované s psoraleny, třebaže je stále používána pro velký počet pacientů díky své široké použitelnosti, ačkoli ještě nebyla přímo srovnána s UVA1, pro mnoho sklerotizujících poškození. Byly popsány tři různé modely dávkování UVA1: vysokodávková UVA1 fototerapie dodávající dávku UVA1 okolo 90-130 J/cm² při jednotlivém ozáření, střednědávková UVA1 fototerapie přinášející dávky mezi 20-90 J/cm² a nakonec nízkodávková UVA1 fototerapie dodávající jednotlivou dávku UVA1 ≤ 20 J/cm². Na rozdíl od systémové PUVA terapie topická PUVA aplikovaná například jako koupel, sprcha nebo krém, je zejména charakterizovaná absencí nebo redukcí systémových vedlejších účinků a omezení na určitou oblast. Proto byla systémová PUVA většinou nahrazena topickou PUVA léčbou představující efektivní dobře tolerovatelnou alternativu k perorálnímu podávání methoxypsoralenu.

Různé typy UVA fototerapie byly představeny jako inovativní a slibné terapeutické možnosti v léčbě zánětlivých nemocí jako atopická dermatitida a nověji v terapii lymfoproliferativních onemocnění jako kožní T buněčný lymfom a odvozená kožní poškození. Dále série expozičních UVA může být použita v léčbě lupus erythematosus, i když je známá jako fotosenzitivní stav.

Vedle velkého počtu různých vedlejších indikací (systémová skleróza, lokalizovaná sklerodermie, extragenitální lichen sclerosus et atrophicus) bylo ukázáno, že systémová a obzvláště topická PUVA léčba vyvolává významné odstranění psoriatických plaků a kožních T buněčných lymfomů. Na druhou stranu UVA1 fototerapie dosahuje praktickou hodnotu v léčbě zánětlivých a maligních kožních chorob souvisejících s T buňkami. Typické indikace zahrnují exacerbovanou atopickou dermatitidu, kožní T buněčný lymfom, parapsoriázu nebo folikulární mucinózu způsobenou indukci apoptózy T buněk a dermální imunoregulací. Dále je účinná také u lokalizované sklerodermie a sklerodermické reakce štěp versus hostitel.

Zdá se, že po expozici UVA1 se u jedinců všech typů kůže objevuje více nebo méně bezprostřední pigmentové ztmavnutí, které je způsobeno reverzibilní fotochemickou reakcí (oxidace melaninu a jeho prekurzorů a metabolitů). Naopak širokopásmové UVA záření, dokonce po srovnatelně nižším dávkování, je schopné vyvolat erytém a opožděné opálení, které je způsobeno enzymaticky kontrolovanou produkcí polymerů melaninu. Po topické nebo systémové PUVA léčbě pacienti vykazují charakteristický erytém závislý na dávce methoxsalenu dosahující 3-6 dnů následujících po ozáření. Systémová PUVA je často spojena s nauzeou a zvracením. Nicméně za daných okolností, s vyloučením kritérií jako autoimunitní choroby spojené s abnormálním zvýšením fotosenzibility nebo anamnéza polymorfní erupce na světle, slunce a teplo indukují kopřivku obzvláště v případě PUVA terapie. Po použití účinné sluneční ochrany v závěru terapie nejsou obvykle předpokládány další klinicky relevantní akutní vedlejší účinky [65].

Csoma *et al* se zajímali, zda může být UVB fototerapie účinná pro léčbu atopické dermatitidy a alergické rinitidy. Popsali, že XeCl excimer laser je efektivní v supresivní reakci kožního vpichového testu a u klinických symptomů pacientů se sennou rýmou. Tyto výsledky naznačují, že intranasální fototerapie může sloužit jako nový nástroj v antialergickém arzenálu pro léčbu alergické rinitidy.

V této studii Csoma *et al.* shledali, že intranasální UVB fototerapie středními dávkami 308 nm XeCl excimer laseru významně potlačila nasální symptomy u pacientů s těžkou sennou rýmou, zatímco nízké dávkování nemělo na symptomy žádný efekt. XeCl excimer laser také inhibuje alergickou reakci v kožním vpichovém testu způsobem závislým na dávce, naznačujícím, že excimer laser inhibuje alergenem indukované uvolnění histaminu z žírných buněk.

Mírná suchost nasální mukózy byl jediný pozorovaný nežádoucí účinek, ale ten kompletně vymizel za několik dní po poslední léčbě XeCl laserem.

UVB záření má za následek redukci počtu epidermálních Langerhansových buněk, zvýšení produkce imunosupresivních cytokinů v makrofázích, indukuje apoptózu v T buňkách, v aktivovaných žírných buňkách a eozinofilech, inhibují uvolnění histaminu z žírných buněk *in vitro*.

Je dobře známo, že opakované ozařování UV zářením ve vysokých dávkách má karcinogenní potenciál. Ten závisí na kumulativní dávce, a dávky záření aplikované při fototerapii nasální mukózních membrán jsou mnohem nižší než dávky vedoucí ke

zvýšenému riziku rakoviny. Riziko rakoviny při současném terapeutickém schématu je proto velmi nízké [66].

6 Fotoprotekce

Lidská pokožka disponuje přirozenými ochrannými mechanismy proti UV záření, které mohou snižovat výskyt akutních a pozdních poškození. Reparační enzymy, většinou k napravení poškozené DNA, mohou být účinné jen do určitého stupně poškození genetického materiálu. Také poškození kůže jako aktinická elastóza jsou po odstranění UV noxy částečně opraveny.

První bariéru pro UV tvoří stratum corneum obsahující řadu keratinů, které odráží, rozptylují a absorbují UV. Jeho tloušťka je na různých částech těla různá. Jako důsledek ozáření sluncem, obzvláště UVB zářením, dojde po krátkodobém stagnování k zvětšení tvorby buněk ve stratu basale. To vede ke ztluštění epidermis a stratum corneum. UVA naopak nezpůsobuje žádné ztluštění rohové vrstvy.

Druhá důležitá endogenní ochrana se skládá z pigmentace melaninem, jejíž měřítko je dáno geneticky. Melanogeneza byla za normálních podmínek stimulována UVB a ne UVA. Okamžitá pigmentace katalýzou z předstupňů melaninového barviva, vzniklá působením UVA, nabízí na rozdíl od UVB záření podstatně menší ochranu. Rohová vrstva, pigmentace melaninem a antioxidační mechanismy tak jako okamžitá a následná oprava DNA zajišťují přece jen vlastní ochranu až do „vysílení“ intenzivním a opakovaným ozařováním sluncem.

6.1 Exogenní ochrana před sluncem

Externí ochranné prostředky představují nejslabší formu v řetězci externích ochran. Nejistější opatření je zamezení sluneční expozici překračující fyziologickou hranici nezbytnou pro syntézu vitamínu D. Oblečení nepropouštějící slunce z česaných přírodních vláken, včetně klobouku s širokou křempou, lehké bavlněné boty stejně jako nošení slunečních brýlí redukuje penetraci slunečního záření nejúčinněji. Dodržování těchto zásad však je pro mnoho spotřebitelů příliš nepohodlné [67].

Aplikace opalovacích krémů na kůži redukuje riziko skvamózního buněčného karcinomu a bazálního buněčného karcinomu. Další výzkumy ukazují schopnost opalovacích krémů chránit před odezvou p53 a fotopoškozením DNA [68].

Bylo požadováno, aby takzvané širokospektré ochranné prostředky chránily jak před UVB tak před UVA zářením, aby zabránily tvorbě erytému a imunosupresi [67].

Jako ochrana před infračerveným zářením by přicházela v úvahu nyní jen voda. To dokazují pokusy s infračerveným světlem filtrovaným přes vodu. Nejdříve po vysokých dávkách se vyskytnou nepatrně nepříjemné pocity, zatímco bez této filtrace dojde rychle k přehřátí kůže a erytému. Ačkoli dosud neproběhly žádné přímé výzkumy, bylo očekáváno, že také ochranné prostředky obsahující oxid titaničitý chrání proti infračervenému záření.

Důležitá je také voděodolnost prostředků, které mají na jedné straně zmenšovat časté krémování po koupání a na druhé straně zabránit působení UVB záření na kůži plavce.

Účinnost ochranného prostředku je určována podle obsažené ochranné látky. Tyto látky jsou rozděleny do dvou skupin: absorpční látky (UV filtry, chemická ochrana proti slunci) a látky odrážející světlo (pigmenty, fyzikální ochrana). Nemělo by zůstat opomenuto, že samotné ochranné prostředky mohou zvyšovat riziko kožních nádorů možnou mutagenitou svých obsahových látek [68].

Protože na jedné straně UV záření tlumí buněčné imunitní reakce, na druhé straně je buněčná imunita potřebná pro kontrolu kožní imunity proti vystávajícím kožním nádorům stejně jako infekcím, pokládá se oprávněná otázka, zda ochranné prostředky chrání také před imunosupresí [14].

6.1.1 Chemická ochrana

Podle svého absorpčního spektra se mohou ochranné látky rozdělit na UVA a UVB filtry. Absorpce UV záření dojde k aktivaci elektronů molekuly filtru. Tím přejdou tyto elektrony do excitovaného stavu. Při přeměně zpět do základního stavu se může energie opět vydat ve formě tepelného nebo fluorescenčního záření. základní stav je opět obnoven a cyklus může v závislosti na množství a kompaktnosti opalovacího krému znovu začít.

Preparáty, které nabízejí ochranné chemické látky jak v UVB tak i v UVA oblasti, jsou nazývány UV blokátory; pokud obsahují ještě navíc minerální krycí pigmenty, jsou všeobecně označovány jako takzvané sluneční blokátory.

Označení, INCI název	Typ filtru	Doporučené dávkování	Skupenství
Eusolex® 2292 <i>Ethylhexylmethoxycinnamat</i>	UVB filtr do opalovacích přípravků rozpustný v oleji.	< 10 %	L
Eusolex® 232	UVB filtr do opalovacích	< 8 % *	S

<i>Phenylbenzimidazolsulfonová kyselina</i>	přípravků rozpustný ve vodě.		
Eusolex® 4360 <i>Benzophenon-3</i>	UVA / UVB filtr do opalovacích přípravků rozpustný v oleji.	< 10 %	S
Eusolex® 6007 <i>Ethylhexyldimethyl PABA</i>	UVB filtr do opalovacích přípravků rozpustný v oleji.	< 8 %	L
Eusolex® 6300 <i>4-Methylbenzylidencamphor</i>	UVB filtr do opalovacích přípravků rozpustný v oleji.	< 4 %	S
Eusolex® 9020 <i>Butylmethoxydibenzoylmethane</i>	UVA filtr do opalovacích přípravků rozpustný v oleji.	< 5 %	S
Eusolex® HMS <i>(Homomethylsalicylat)Homosalat</i>	UVB filtr do opalovacích přípravků rozpustný v oleji.	< 10 %	L
Eusolex® OCR <i>Oktokrylen</i>	UVB filtr do opalovacích přípravků rozpustný v oleji.	< 10 %*	L
Eusolex® OS <i>Ethylhexylsalicylat</i>	UVB filtr do opalovacích přípravků rozpustný v oleji.	< 5 %	L
Eusolex® UV-Pearls™ OMC <i>Aqua; Ethylhexylmethoxycinnamat; Silica; PVP; Chlorphenesin; BHT</i>	Nový typ UV filtru pro zvláště citlivou pleť.		D

Tabulka 2. Chemické UV filtry. * jako kyselina, L...kapalné skupenství, S...pevné skupenství, D...disperze [35].

6.1.2 Fyzikální ochrana

Jako fyzikální ochranné prostředky jsou označovány látky, které zabraňují, aby sluneční paprsky prostoupily do kůže, převážně odražením a rozptýlením světla. Jsou to oxid titaničitý, oxid zinečnatý, oxid železitý, kaolin a mastek. Tyto látky nejsou chemicky měněny. Fyzikální ochrana je kosmeticky méně dobře akceptovaná, protože některé tyto látky krátkodobě nebo středně dlouho (minuty až hodiny) tvoří na pokožce bílý film. Proto se dostaly do popředí preparáty s mikronisovaným oxidem titaničitým (mikropigmentem), který je kosmeticky akceptovatelný.

Pigmenty působí ochranně jak v UVB tak i v UVA oblasti, přičemž velikost částec od 1 do 30 nm umožňuje navážky tohoto mikropigmentu v poměrně velké koncentraci. Nové průzkumy ukazují, že oxid titaničitý absorbuje přes 70% UV záření a tím může zabraňovat tvorbě hydroxylových radikálů.

Takové mikropigmenty mají dobrou snášlivost, takže mohou být použity také u dětí. Vyzdvížena je absence alergenních a fotoalergenních vlastností. Ne zcela vyloučené jsou fotokatalytické vlastnosti především u oxidu titaničitého, které mohou měnit složky kůže. Zásyp a také částecy pigmentu mohou pronikat do hlubších vrstev rohové vrstvy. Aktuální výzkumy ale mluví převážně o tom, že mikropigmenty prakticky nedosáhnou žijící buňky kůže. Penetrace je ovšem usnadněna ve vazbě s tuky. To by znamenalo, že pigmenty mohou za vnějších podmínek způsobit dosud neznámé

reakce na kůži. Moderními metodami je možné dosáhnout vysokých ochranných faktorů mezi jinými také kombinací s absorpčními ochrannými látkami.

6.1.3 Stanovení ochranného faktoru

Ke zkoušení působení ochranných prostředků bylo doporučeno srovnatelné ozáření ochráněné a neochráněné pokožky u testovaných jedinců sluncem prostřednictvím takzvaného světelného stupně. Kvocienty časů, které byly potřebné k vyvolání erytému, tedy minimální erytemová dávka (MED), ukázaly sluneční ochranný faktor (SPF). Vypočítání SPF je ve všech zemích stejné a odpovídá vzorci vytvořenému Schulzem:

$$\text{SPF} = \text{doba vyvolání erytému s ochranou proti slunci} / \text{doba vyvolání erytému bez ochrany před sluncem}$$

K realizaci tohoto testu všeobecně závaznou metodou pro evropskou oblast byla provedena standardizace jednotlivých parametrů a provedení pokusu. V této metodě zpracované COLIPA je pro všechny stanovované velikosti slunečního ochranného faktoru předepsáno použití adekvátního slunečního spektra a nanášené množství 2mg ochranného prostředku/cm². Stupeň účinnosti SPF se ale nedá libovolně zvyšovat. Od faktoru 10 nastane téměř nasycení účinku. Produkty s velmi vysokým faktorem (20-35) dosahují růstu účinku jen okolo 5%.

UVB-SPF by měl být určen především pokusy in vivo. Neustále vyžadované metody in vitro, např. fotometrické měření, neposkytují žádné spolehlivé svědectví o chování produktu za takzvaných „in-use“ podmínek. Rozhodující vliv na SPF má rozdělovací koeficient a s ním spojená síla vrstvy produktu na kůži. Většího významu je vzájemné působení produktu a kůže pod vlivem slunečního simulátoru. Protože tyto podmínky (sekrece potu a mazu, teplota, část těla) nemohou být při provádění in vitro simulovány a tím není možné dosažené výsledky kompletně převést, je nezbytné určení in vivo. Nyní neexistuje žádná jednotná norma k určení SPF. Nejdůležitější normy pocházejí z Evropy, USA a Austrálie/Nového Zélandu. V rámci sjednocování Evropy byla v roce 1994 představena metoda COLIPA.

Metoda COLIPA povoluje, aby bylo zkoušení ochranných prostředků prováděno jen na 10 jedincích. Aby se mohlo zkoušení ukončit už po 10 jedincích, vyžaduje vedle vysoké přesnosti slunečního simulátoru především přesné dodržování nanášeného množství a způsobu nanášení produktu.

Další vylepšení nové metody COLIPA je přesná definice minimální erytérové dávky (MED), doplněk k určení MED prostřednictvím kolorimetrického měření, stanovení definovaného nejvyššího standardu jako posudek ke zkoušce u vysokých UVB faktorů jakož i návod k výběru vhodného kolektivu testovaných jedinců s ohledem na barvu a typ pokožky. Tím nevznikla u metody COLIPA závislost určovaných slunečních ochranných faktorů na typu kůže a stáří testovaných jedinců [67].

Biologická aktivita opalovacích krémů, reprezentovaná slunečním ochranným faktorem (SPF – sun protect factor), je hodnocena jeho schopností chránit lidskou pokožku před erytémem a edémem. Nicméně sluneční záření spouští mnoho biologických procesů jako je předčasné stárnutí (photoageing), imunosuprese a mutace kožních buněk. Nedávno bylo naznačeno, že SPF hodnota nemůže být dostatečné kritérium schopnosti opalovacího krému chránit před mnoha škodlivými biologickými reakcemi indukovanými sluncem. Proto byl navržen imunitní ochranný faktor (IPF) získaný měřením účinnosti ochrany opalovacího krému proti imunitní supresi indukované UV nebo mutační ochranný faktor (MPF) stanovený jako ochranná aktivita opalovacího krému, která byla získána měřením mutace p53 v kůži myši ozářených UVB.

Schopnost opalovacích krémů blokovat světlo byla stanovena měřením transmitance světla skrz petriho misku, na kterou byl natřen opalovací krém. Ochranná aktivita těchto opalovacích krémů před genotoxicitou byla zvýšena s vyšší hodnotou SPF.

Efekt opalovacích krémů je ovlivněn způsobem jejich aplikace jako je čas a dávka a samotná hodnota SPF nemůže odrážet účinnost ochrany ovládanou tímto opalovacím krémem.

Existuje možnost, že se absorbance UV záření opalovacím krémem může měnit po expozici UV záření. Toyoshima *et al.* pozorovali významné zvýšení transmitance u pokusů s SPF 20 během 2 hodinové periodické expozice slunci, ale tento fenomén nebyl pozorován u SPF 40. Fotoinaktivace opalovacího krému může být zodpovědná za podhodnocení UV poškození, jak bylo popsáno [68].

6.1.4 Nesnášenlivost slunečních ochranných prostředků

UVA a UVB filtry v slunečních ochranných prostředcích mohou vyvolat alergické, fotoalergické a fototoxické kožní reakce. Jsou v současné době nejčastější příčinou fotoalergických kontaktních ekzémů. Tento viditelný paradoxní fenomén je úzce svázán

s působením substancí filtru. Vlastnost absorbovat UVA nebo UVB totiž vede ne vždy jen k žádoucímu efektu přeměny škodlivé sluneční energie v neškodné teplo, nýbrž může také mít za následek sekundární fotochemické reakce. Toto je zase předpoklady pro fototoxické alergické a fotoalergické reakce zesílené UVA zářením.

UVA filtry vyvolávají více alergických a mnohem více fotoalergických reakcí než UVB filtry [69].

Navíc k reaktivitě na aktivní součásti opalovacích krémů mohou pacienti představovat alergii nebo fotokontaktní alergii na inaktivní součásti ve formulaci opalovacích krémů. Mezi nejvýznamnější patří parfémů, látky uvolňující formaldehyd, konzervační látky a lanolin alkohol.

Fotoalergická kontaktní dermatitida je hypersenzitivní reakce pozdního typu zprostředkovaná T-buňkami. Ta nastává při odezvě na fotoalergen nebo antigen u člověka dříve senzitivizovaného na stejnou nebo na zkříženě reagující látku. Toto se stává při odezvě na UV (nejčastěji UVA) i viditelné světlo. Mechanismus, při kterém má UV světlo podíl na tvorbě fotoantigenu, není ještě dobře pochopen. Kůže má několik endogenních chromoforů (keratinové proteiny, porfyriny, lipoproteiny, hemoglobin, melanin a aminokyseliny), které mohou absorbovat UV záření. Tyto chromofory mohou přejít do excitovaného stavu po expozici UV záření a, při návratu do základního stavu, se mohou konjugovat s nosičem. UV záření může indukovat stabilní fotoprodukt, který slouží jako haptenu. Hapten by poté konjugoval s přenašečovým proteinem, aby sloužil jako kompletní antigen.

Prevalence alergie na aktivní účinné látky opalovacích krémů je nízká, pravděpodobně menší než 1%.

Prevalence senzitivizace účinnými látkami opalovacích krémů u jedinců uvedených pro hodnocení fotosenzitivity je mnohem vyšší.

Používání opalovacích krémů širokou veřejností se značně zvýšilo za posledních 20 let, protože byly rozpoznány fotokarcinogenní vlastnosti UV záření a předčasné stárnutí. Chemické absorbéry jsou často začleňovány nejen do vyhrazených opalovacích krémů, ale také do osobních přípravků jako jsou zvlhčovače, výrobky pečující o rty a krémové základy.

Rizikové faktory alergií na opalovací krémy nejsou příliš známé, ale mohou zahrnovat pohlaví, již existující fotodermatózy, zaměstnání pod širým nebem a atopie [70]. Schauder a Ippen shledali, že jedinci se závažnými alergickými a fotoalergickými kontaktními dermatitidami, 65% byly ženy. Předpokládali, že toto by mohlo být

způsobeno buď vysokým používáním opalovacích krémů a kosmetických produktů nebo větším používáním dermatologických služeb mezi ženami [69].

Ostatní potenciální rizikové faktory pro senzitivizaci pacientů opalovacími krémy zahrnují používání opalovacích krémů na poškozenou pokožku, atopická dermatitida v anamnéze a zaměstnání pod širým nebem [70].

Skupina dibenzoylmetanů vyvolala nejvíce kontaktních a fotokontaktních alergií. Celkově byl isopropyldibenzoylmetan (Eusolex 8020) nejčastější fotosenzitizér. Tato látka byla používána v Evropě od roku 1979 jako UVA filtr v medicínsky doporučených opalovacích krémech pro pacienty s fotodermatózami, ale také v obličejové kosmetice. Tento produkt byl svým kvůli fotosenzitizačním vlastnostem odstraněn z trhu v roce 1993.

Strukturně odvozený butylmethoxydibenzoylmetan byl méně častý fotosenzitizér [69].

Benzophenon-3 (2-hydroxy-4-methoxybenzofenon) byl používán v Evropě od roku 1980 jako UVA filtr. Je nejčastěji používaným benzofenonem a je současně jedna z nejčastějších příčin fotokontaktních alergií. Je znám kdekoli na trhu pod jménem oxybenzon nebo Eusolex 4360. Kromě jeho využití jako účinné látky opalovacích krémů, mohou benzofenony působit také jako konzervanty. Je známo, že chrání kosmetické produkty před barevnými skvrnami způsobenými slunečním zářením a jsou z podobných důvodů často inkorporovány do textilií, umělých hmot, barev a gumových výrobků.

3-(4-methylbenzyliden)camphor (Eusolex 6300) je účinná látka opalovacích krémů používaná v Evropě. Absorbuje nejlépe v UVB spektru. Existuje několik případů alergie a fotoalergie na tuto látku [70].

Tereftalylidencamphorsulfonová kyselina je známá také pod svým tradičním jménem Meroxyl SX. Zatím se objevil jen jeden případ fotoalergie na tuto složku opalovacích krémů.

Paraaminobenzoová kyselina a oktyldimethylparaaminobenzoová kyselina je známá svými senzitivizačními a fotosenzitizačními vlastnostmi, které vedly k změně na opalovací krémy bez PABA, které jsou považovány za bezpečnější [69].

Mechanismy vedoucí k tvorbě častých alergenních haptenuů zůstávají nejasné. Scheuer *et al* se domnívají, že odpovědné hapteny jsou v případě PABA a jejích zkříženě reagujících komponentů aminy chininu, oxidační produkty paraaminolátek. Stupeň alergenní zkřížené reaktivity mezi různými paraaminokomponenty je variabilní

a může být vysvětlen schopností různých pacientů transformovat tyto produkty na jejich chinolaminové metabolity.

Pacienti alergičtí na PABA mohou také reagovat s ostatními paraaminoalergeny jako je para-fenylendiamin, anestetické estery para-aminosalicylové kyseliny, sulfonamidy a azobarviva.

Ovšem při představování alergických reakcí pacienti mohou popsat přechodné bodavé nebo pálivé pocity po aplikaci produktů obsahujících PABA. Scheuer *et al.* se domnívají, že tento jev je mnohem častější než pravá alergie a může vést k tomu, že se pacient mylně považuje za alergického na tuto látku [70].

Methylbenzilidenkamfor byl často používán s isopropylbenzoylmetanem, aby se fotostabilizoval tento UVA absorbér. Tato kombinace je známá jako Eusolex 8021. Vysoká incidence alergických a fotoalergických reakcí byla spojena s častou fotosenzitizací isopropylidenmetanu. Po jeho stažení z trhu byly pozorovány jen 2 případy na methylbenzilidencamphor [69].

Cinamáty jsou skupina odvozených látek používaných v ochucovadlech, parfémeh a méně často v opalovacích krémech. V opalovacích krémech jsou většinou používány v kombinaci s benzofenony. Cinamáty jsou především UVB absorbéry. Díky jejich malé rozpustnosti ve vodě jsou často používány v opalovacích krémech označovaných jako voděodolné. Nejčastěji používaný cinamát je ethylhexyl-p-methoxycinamát také známý jako Parsol MCX [70].

Oktylmethoxycinamát je nejčastěji používaný UVB absorbér v opalovacích krémech a kosmetice. Ve srovnání s častou expozicí výskyt alergických a fotoalergických reakcí je nízký [69].

Byla popsána kopřivka po použití cinamátů v jiných kosmetických produktech, nicméně zkřížené reakce s cinamáty v opalovacích krémech jsou zřejmě možné.

Salicyláty jsou slabé UVB absorbéry; proto jsou používány ve vysokých koncentracích. Salicyláty byly použity jako standard pro určení SPF z důvodu jejich bezpečného profilu. Navíc jsou schopné solubilizovat nerozpustné látky jako benzofenony, ale oni sami jsou ve vodě nerozpustné. Jsou snadno inkorporovatelné do jiných látek a jsou proto často používány v kosmetických produktech, které jsou označovány jako doprovodné opalovací krémy. Současně je hlavním salicylátovým komponentem v opalovacích krémech oktylsalicylát.

Alergické kontaktní dermatitidy byly u salicylátů popsány jen zřídka.

Další chemické účinné látky opalovacích krémů zabudovávané do komerčních produktů zahrnují etokrilén (ethyl-2-cyano-3,3-difenylakrylát), drometrizol trisiloxan, bisethylxyloxyfenol methoxyfenol triazin, drometrizol (2-(2-hydroxy-5-methylfenyl)benzotriazol) a dioktyl-butamido-triazon.

Fyzikální blokátory nikdy nebyly popsány jako příčina kontaktní dermatitidy nebo fotoalergie. Zajímavé je, že několik zdrojů literatury podotklo, že tyto látky mohou blokovat výskyt fotoalergie na účinné látky opalovacích krémů nebo jiné látky díky jejich silnému blokování UV záření [70].

6.2 Endogenní ochrana proti slunci

Antioxidanty jsou schopné potlačit škodlivé působení volných radikálů indukovaných UV zářením. Rozlišují se enzymatické a neenzymatické antioxidanty, rozpustné v tucích a ve vodě. Protože enzymaticky působící antioxidanty jsou takzvané enzymy zbavující jedů známé jako superoxid-dismutáza, glutathionperoxidáza, kataláza, NAD(P)-chinonreduktáza a thioredoxin-reduktáza. Naproti tomu stojí neenzymatické ve vodě rozpustné antioxidanty jako kyselina askorbová, glutathion, kyselina močová a neenzymatické antioxidanty rozpustné v tucích jako např. tokoferol, koenzym Q a beta-karoten. Ideální by byla orální (systémová) ochrana proti slunci např. beta-karotenem. Výzkumy ukázaly, že hladina beta-karotenu a retinolu v krvi v kůži po přirozené i umělé expozici slunci klesá; a proto množství beta-karotenu dodané z epidermis nepostačuje.

Kyselina askorbová, alfa-tokoferol a beta-karoten tvoří patrně antioxidační kaskádu, přičemž se zdá, že kyselina askorbová chrání tokoferol a tokoferol zase beta-karoten. Z výsledků studie Berlin-Eilath jednoznačně vyplývá, že u testovaných jedinců, kteří byli exponováni přírodnímu slunečnímu záření a suplementováni beta-karotenem, zůstala hladina beta-karotenu v epidermis a séru stabilní, popřípadě nepoklesla pod patologickou hranici, ale v této skupině hladina alfa-tokoferolu významně poklesla, zatímco u nesuplementované skupiny ve srovnání s tím sotva poklesla. Z toho se dá vyvodit, že monosuplementace beta-karotenem se zdá málo smysluplná a trojkombinace podávaná preventivně a za UV záření dále požívaná, tvoří přirozenou endogenní ochranu jako izolované podávání těchto jednotlivých antioxidantů.

Dále by mohlo být prokázáno, že beta-karoten ve vazbě s topicky aplikovanými ochrannými prostředky vede k lepší protekci než samostatné použití ochranného prostředku. Proto je kombinované použití k ochraně proti zesílené UV expozici v oblastech se silným slunečním zářením velmi doporučována [67].

Glutathion tripeptid (glutamylcysteinylglycin, GSH) je endogenní neenzymatický antioxidant, který hraje roli v ochraně savčích buněk před oxidativním poškozením a je prekurzor selen-dependentního antioxidantního enzymu glutathionperoxidázy, která pomáhá odbourávání produktů poškození DNA (peroxid vodíku a lipidové peroxidy) reaktivními druhy kyslíku (ROS). GSH je syntetizován z aminokyselin ve dvou krocích. Počáteční krok s omezenou rychlostí je katalyzován γ -glutamylcysteinylsyntetázou, která může být inhibována v experimentálních systémech sulfoximinovým analogem aminokyseliny, L-buthionin-[S,R]-sulfoximin (BSO). Tato inhibice má za následek zvýšení buněčného poškození ROS.

Také existují sekundární obranné mechanismy jako je oprava DNA a apoptóza, tyto procesy opravují DNA nebo odstraňují poškozené buňky.

Pro ochranu před škodlivým působením UV záření mají buňky různé mechanismy opravující DNA. Aby se odstranily cyklobutanpirimidinové dimery (CPD), má mnoho organismů specifické enzymy, které se vážou na poškození a zvrátí ho pomocí energie světla při fotoaktivaci. Takovými enzymy jsou fotolyázy. Jsou přítomné od bakterií po mnohobuněčná eukaryota, ale mnoho druhů je postrádá, včetně člověka, ačkoli nové studie odhalily fotoreparaci i u člověka. Fotolyázy jsou monomerní flavoproteiny a obsahují dva chromofory jako kofaktory [6]. Jeden je vždy 1,5-dihydroflavinadeninindinukleotid ($FADH_2$) a druhý může být buď methenyltetrahydrofolát nebo 8-hydroxydeazaflavin [5]. Katalýza je započata světlem. Druhý chromofor absorbuje foton o 350-450 nm a přenese excitační energii na katalytický kofaktor, který přenese elektron na dimer. Enzym rozštěpí vazby 5-5 a 6-6 cyklobutanového kruhu, zpětný přenos elektronu obnoví pyrimidiny a flavin je regenerovaný pro nový cyklus katalýzy.

Fotoaktivovaná fotolyáza by mohla kompletně opravit UVB indukované CPD v lidských keratinocytech předupravené Photosomem[®] 2 h pře ozáření UVB. Topická aplikace liposomů obsahujících fotolyázu (Photosome[®]) nebo jakýkoliv xenogenní opravný enzym (např. Ultrasome[®]), které by mohli být obsaženy v opalovacích krémech, by mohla redukovat riziko vzniku rakoviny kůže [6].

Chyby v opravách poškození jsou spojeny s mutací v genech kontrolujících buněčný cyklus a buněčnou funkci a takové chyby mohou mít za následek iniciaci neoplazie. Ačkoli má lidská kůže rozsáhlý antioxidantní ochranný mechanismus k ochraně buněčné DNA před oxidativním poškozením tato ochrana může být přemožena expozicí UV záření.

N-acetyl-L-cystein byl identifikován jako možný antioxidant částečně pro jeho schopnost nahradit cystein v syntéze GSH, ale také protože se zdá být pravým antioxidantem (zhášec volných radikálů).

Mechanismus zhášení volných radikálů GSH byl spojen se sulfydrylovou částí řetězce cysteinového zbytku. Mechanismus, kterým N-acetyl-L-cystein (NAC) může chránit ozářené buňky, je pravděpodobně dvojitý; za prvé jako zdroj cysteinu pro syntézu GSH a za druhé možným působením jako zhášec ROS sám o sobě.

Výsledky studie Morley *et al.* ukazují, že NAC suplementace může zpozdit zvýšené poškození DNA indukované UVA, UVB a viditelným zářením, možná přímým zhášením ROS indukovaným UVR a přímým nahrazením cysteinu v syntéze endogenního antioxidantu GSH. Toto počáteční zpoždění poškození DNA může také usnadnit aktivitu DNA ligázy. NAC suplementovaný do kožních buněk, před a během doby ozařování, by mohl být použitelný v dermatologické fotoprotekci [71].

Azzi *et al.* ovšem tvrdí, molekuly představované jako antioxidanty *in vitro* mohou mít dodatečné vlastnosti v komplexnějším systému. Například estrogény byly zahrnuty jako antioxidanty s lipoproteinovou a neutrální ochranou. Nicméně estrogény působí nejčastěji signalizací zprostředkovanou receptorem a ne slabými antioxidačními vlastnostmi molekuly. Podobně retinol, antioxidant *in vitro*, reaguje ve spojení s opsinem za tvorby reverzibilního komplexu rodopsinu, který interaguje se světlem a zahajuje proces vidění. Je dobře stanoveno, že tento jev je způsoben izomerizací pigmentu a ne redoxním a nebo antioxidačním procesem. Nicméně naneštěstí existuje okolo tohoto problému zmatek a v mnoha studiích byl klasifikován retinol jako plazmatický antioxidant a studovaly se jeho souvislosti s nemocemi. Podobně byl melatonin považován za antioxidant, ale koncentrace dosažitelné v lidském těle činí takový účinek nepravděpodobným.

Azzi *et al.* podotkli, že nazývání molekuly antioxidantem na buněčné úrovni nebo *in vivo* je zjednodušené.

Terapie antioxidanty zaměřené na produkování a vyrovnávání oxidativního stresu daly rozporuplné výsledky. Závěry ohledně *in vivo* efektivity antioxidantu mají daleko k jednomyslnosti. Popis situace „oxidačního stresu“ je použitelný jen, pokud jsou známy molekulární detaily nerovnováhy. Nedostatek takových detailů v mnoha publikovaných studiích antioxidantů tvoří zmatek v této oblasti. V podobném duchu je stále široce předpokládáno, že podání antioxidantu bude vždy skýtat prospěch.

Antioxidant může chránit nebo zvýšit poškození v závislosti na situaci, a proto jejich použití by mělo vždy činěno s plným porozuměním situaci.

Zvýšení evidence ukazuje, že produkce ROS je přesně regulována a její proud je specificky zaměřen. Významný pokrok byl učiněn v definování specifického redoxně závislého zaměření intracelulárních oxidantů stejně dobře jako nespočetné dráhy, kde jsou použity antioxidanty jako efektory v různorodých procesech od tumorigeneze po stárnutí.

Peroxid vodíku stimuluje mitogenní aktivitu proteinkinázy 1 zprostředkovanou c-Src a signální dráhu MEF2C v buňkách PC12. Tato reakce hraje potenciální roli v buněčném přežití následované po oxidativním poškození. Peroxid vodíku působí jako messenger v signální dráze p70 indukované růstovým faktorem. Navíc podporuje aktivitu kalciově závislé endoteliální syntetázy oxidu dusnatého (NO) koordinovanou změnou fosforylovaného stavu enzymu zprostředkovanou aktivací 3'-fosfoinositidkinázy závislé na receptoru Src a ErbB. Lepší identifikace cílových molekul peroxidu vodíku a objasnění mechanismu, při kterém peroxid vodíku působí ve spouštěcí signální transdukcii, je oblast velkého slibu pro budoucí průzkum.

Oxidované lipidy se dosud zdály mít jen možné signální funkce v patologických situacích. Na příklad oxidované lipidy jsou prozánětliví agonisté podporující chronický zánět v ateroskleróze; a mohou inhibovat expresi zánětlivých adhezních molekul. Inhibují lipopolysacharidy, ale ne TNF- α nebo IL-1 β , indukovanou zvýšenou expresi zánětlivých genů blokováním interakce lipopolysacharidů s proteinem vázajícím lipopolysacharidy a CD14 [72].

V mnoha studiích bylo ukázáno, že UVA poskytuje imunoprotekci před supresivním účinkem UVB záření nebo epidermálních fotoproduktů, kyseliny cis-urokanové (cis-UCA), zvýšení enzymové aktivity stresového proteinu hemoxygenázy-1 (HO-1) v kůži podporovanou zvýšením exprese HO-1, mRNA a proteinu v epidermálních i dermálních buňkách v kůži myši. Enzymatické produkty HO-1 jsou volné Fe²⁺, biliverdin, který je rychle konvertován na bilirubin všudypřítomnou biliverdinreduktázou, a plynným oxidem uhelnatým (CO). Nová data indikují, že je to CO, který poskytuje fotoimunoprotektivní vlastnosti UVA. Topicky aplikované molekuly uvolňující CO mohou napodobovat imunomodulační působení UVA záření v myších.

Tento poznatek je shodný s důkazem, že CO je účinná signální molekula, která má protizánětlivé, apoptotické, antiproliferativní a imunomodulační vlastnosti podobné oxidu dusnatému (NO).

Proto existuje oblast expozičních dávek UVA, které nejsou imunosupresivní, ale pokud jsou překročeny, UVA záření zvýšeně indukuje potlačení kontaktní přecitlivělosti.

Schopnost fotoimunoprotekce před UVB byla dávkově závislá na UVA a byla zvýšeně patrná a statisticky významná mezi 16,13 a 580,5 kJ/m² UVA, s optimální imunoprotekcí při UVA dávkách 387 a 580,5 kJ/m². Když byla UVA expozice zvýšena na 870,8 a 1161 kJ/m², ochranný protizánětlivý účinek byl postupně ztracen.

Významné zvýšení cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP) korelovalo s expozicemi UVA (193,5 a 387 kJ/m²), které také indukují optimální fotoimunoprotekci. Toto ukazuje, že zatímco koncentrace cGMP se zdá být hlavní rozhodující činitel UVA fotoimunoprotekce, mohou být aktivní také další dráhy.

Schopnost expozičních dávek v této oblasti UVA protektivně interagovat s imunosupresivními vlastnostmi UVB záření byla shledána úzce závislou na dávce UVA. Byla stanovena oblast zvýšených imunoprotektivních dávek UVA, přibližující se obsahu UVA mezi 0,7 a 25 minimální edematózní dávky (MEdD) simulátoru slunečního UV záření, které optimálně redukuje UVB supresi kontaktní přecitlivělosti.

Oxid dusnatý (NO) nebo chemické donorové molekuly NO byly shledány, že chrání myší a lidské keratinocyty před UVB indukovanou apoptózou, mechanismem závislým na guanylylcykláze. Proto se zdá, že kožní guanylylcykláza může být aktivována jak fotoprotektivním CO, tak fotopoškozujícím NO [73].

7 Závěr

Ultrafialové záření je součástí slunečního záření, setkáváme se s ním v běžném životě denně a nelze se mu úplně vyhnout. Při dopadu na kůži působí přímo nebo prostřednictvím singletového kyslíku změny bioaktivních molekul jako jsou proteiny, DNA a lipidy. Tyto změny mohou vyvolat poškození buněk, apoptózu a ve výsledku předčasné stárnutí a karcinogenezi. UV záření je také nezbytné v syntéze vitamínu D₃, jehož deriváty by se mohly v budoucnosti využívat jako prostředky fotochemoprotekce.

UV záření ale nemá jen negativní účinky. UV záření má velký potenciál hlavně v lékařství, kde je využíváno k terapeutickým účelům při léčbě rakoviny a kožních chorob, lze ho použít také v terapii bakteriálních infekcí rezistentních na antibiotika. Zejména malé vedlejší účinky oproti klasické chemoterapii jsou největší výhodou fotodynamické terapie a také možná kombinovatelnost s konzervativními metodami léčby. Tento druh terapie má velký příslib i do budoucnosti. Stále se provádějí studie a výzkumy pro zlepšení targetingu fotosenzitizéru, nacházení nových senzitizerů s lepšími fyzikálně chemickými vlastnostmi.

Další pokroky je možné udělat v oblasti fotoprotekce, zejména fotochemoprotekce a podpory přirozených ochranných a opravných mechanismů, aby se zabránilo vzniku a rozvoji rakoviny a předčasnému stárnutí pokožky, která je námáhána zhoršenými podmínkami životního prostředí.

8 Použitá literatura

1. Prof. L. Malina. DrSc: Fotodermatózy, Maxdorf 1999, str.209
2. K. Lang, J. Mosinger, D.M. Wagnerová: Singletový kyslík v praxi – současnost a perspektiva, *Chem. listy*, 100. 169-177 (2006)
3. S. Madronich, S. Flocke: The role of solar radiation in atmospheric chemistry, in: P. Boule: Environmental photochemistry, Vol. 2, (1999) 1-26
4. K. Lang, J. Mosinger, D.M. Wagnerová: Pokroky ve fotochemii singletového kyslíku, *Chem. listy*, 99, 21B.Krammer, (2005) 1-221
5. P.F. Heelis, S.-T. Kim, T. Okamura, A. Sancar : The photo repair of pyrimidine dimers by DNA photolyase and model systems, *J. Photochem. Photobiol. B*, 17 (1993) 219-228
6. L. Decome *et al.*: Evaluation of photolyase (Photosome[®]) repair activity in human keratinocytes after a single dose of ultraviolet B irradiation using the comet assay, *J. Photochem. Photobiol. B*, 79 (2005) 101-108
7. A. Rapp, C. Bock, H. Dittmar, K.O. Greulich: UV-A breakage sensitivity of human chromosomes as measured by COMET-FISH depends on gene density and not on the chromosome size, *J. Photochem. Photobiol. B*, 56 (2000) 109-117
8. A.W. Girotti: Photosensitized oxidation of cholesterol in biological systems: reaction pathways, cytotoxic effects and defense mechanisms, *J. Photochem Photobiol. B*, 13 (1992) 105-118
9. T. Sarna: Properties and function of the ocular melanin – A photobiophysical view, *J. Photochem. Photobiol. B*, 12 (1992) 215-258
10. R.M. Haywood, C. Linge: An experimental and theoretical model for solar UVA-irradiation of soluble eumelanin: towards modelling UVA-photoreactions in the melanosome?, *J. Photochem. Photobiol. B*, 76 (2004) 19-32
11. V. Maresca *et al.*: UVA-induced modification of catalase charge properties in the epidermis is correlated with the skin prototype, *J. Investig. Dermatol.*, 126 (2006) 182-190
12. M.D. Carbonare and M.A. Pathak: Skin photosensitizing agents and the role of reactive oxygen species in photoaging, *J. Photochem, Photobiol. B*, 14 (1992) 105-124
13. D.B. Yarosh: The role of DNA damage and UV-induced cytokines in skin cancer, *J. Photochem. Photobiol. B*, 16 (1992) 91-94

14. P. Elsner, S. Beissert, T.A. Luger: Lichtschutz: Möglichkeiten und Grenzen, *JDDG*, 2 (2005) 40-44
15. F. Hazane *et al.*: Ageing effects on the expression of cell defence genes after UVA irradiation in human male cutaneous fibroblasts using cDNA arrays, *J. Photochem. Photobiol. B*, 79 (2005) 171-190
16. H. Lopez, J.Z. Beer, S.A. Miller, B.Z. Zmudzka: Ultrasound measurements of skin thickness after UV exposure: a feasibility study, *J. Photochem. Photobiol. B*, 73 (2004) 123-132
17. M. Berneburg *et al.*: Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoageing-associated mitochondrial common deletion, *J. Biol. Chem.*, 274(22) (1999) 15345-15349
18. K.L. Tober *et al.*: Importance of the EP₁ receptor in cutaneous UVB-induced inflammation and tumor development, *J. Investig. Dermatol.*, 126 (2006) 205-211
19. A.C. Santos Nogueira, I. Joekes: Hair color changes and protein damage cause by ultraviolet radiation, *J. Photochem. Photobiol. B*, 74 (2004) 109-117
20. R. Dubakienė, M. Kuprienė :Scientific problems of photosensitivity, *Medicina (Kaunas)*, 42(8) (2006) 619-624
21. B.H. Jeng, T.P. Margolis, N.S. Chandra, T.H. McCalmont: Ocular findings as a presenting sign of hydroa vacciniforme, *Br. J. Ophthalmol.*, 88 (2004) 1478-1479
22. A.-B. Modeste *et al.*: Hydroa vacciniforme: dietary fish oil (Maxepa®) as an effective treatment, *Ann. Dermatol. Venereol.*, 128 (2001) 247-249
23. V.K. Somani: Chronic actinic dermatitis - A study of clinical features, *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.*, 71 (2005) 409-413
24. A. Gómez, A. Umaña, A.A. Trespalacios: Immune response to isolated human skin antigens in actinic prurigo, *Med. Sci. Monit.*, 12(3) (2006) 106-113
25. S. Onoue, Y. Tsuda: Analytical studies on the prediction of photosensitive/phototoxic potential of pharmaceutical substance, *Pharmaceutical Research*, 23(1) (2006) 156-164
26. Ditrichová D., Jírová D., Kolářová H., Kejlová K., Bendová H.: Nežádoucí reakce kůže na sluneční záření a xenobiotika v životním prostředí, *Hygiena* 44 (1999) No.2 102-109
27. L. Lankerani, E.D. Baron: Photosensitivity to exogenous agents, *J. Cutan. Med. Surg.*, 8(6) (2004) 424-431

28. J.W.Gould, M.G. Mercurio, C.A. Elmetts: Cutaneous photosensitivity diseases induced by exogenous agents, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 33(4) (1995) 551-573
29. D. Jírová, K. Kejlová: Alternativní metody testování toxicity in vitro kosmetických prostředků, Alternativní metody testování toxicity chemikálií, sborník semináře 050427, callisto 96, 2005
30. Směrnice komise 2000/33/ES, Úřední věstník L136, 08/06/2000S. 0090-0107
31. A. Khachemoune, K. Khechmoune, D. Blanc: Assessing phytophotodermatitis: Boy with erythema and blisters on both hands, *Dermatology Nursing* 18(2) (2006) 153-154
32. C.M. Schempp, E. Schöpf, J.C. Simon: Durch Pflanzen ausgelöste toxische und allergische Dermatitis (Phyto dermatitis), *Hautarzt* 53 (2002) 93-97
33. M. Placzek *et al.*: Tobacco smoke is phototoxic, *Brit. J. Dermatol.*, 150 (2004) 991-993
34. J. Sladká, Doc. MUDr.P. Martásek, DrSc.: Porfyrie – od kliniky k molekulární biologii a zpět, *Medicína* 4 (2002) roč IX 14-15
35. M.H. Beers, MD: The Merck Manual of medical information, published by Merck Research Laboratories, Merck & Co., Inc., 2004-2007 (www.merck.com/mmhe/sec12/ch160/ch160a.html)
36. A. LeMaistre, MD: Medic: Clinical handbook, University of Texas – Houston Medical school, DPALM MEDIC 1995 (<http://medic.uth.tmc.edu/path/00000884.htm>)
37. J.E. Arrese, F. Henry, G.E. Piérard: Génophotodermatoses, *Rev. Med. Liege*, 60 (2005) 66-70
38. R.B. Misra *et al.*: Effect of UVB radiation on human erythrocytes in vitro, *Toxicology in Vitro*, 19 (2005) 433-438
39. X.Q. Mi *et al.*: A comparative study of 632,8 a 532 nm laser irradiation on some rheological factors in human blood in vitro, *J. Photochem. Photobiol. B*, 74 (2004) 7-12
40. P. De Haes *et al.*: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and analogues protect primary human keratinocytes against UVB-induced DNA damage, *J. Photochem. Photobiol. B*, 78 (2005) 141-148
41. A.P. Castano, P. Mroz, M.R. Hamblin: Photodynamic therapy and anti-tumour immunity, *Nature reviews, Cancer* 6 (2006) 535-543
42. E.S. Nyman, P.H. Hynninen: Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitisers for photodynamic therapy, *J. Photochem. Photobiol. B*, 73 (2004) 1-28
43. A. Misra, K. Maybury, T.A. Eltigani: Late erythema after photodynamic therapy to the face, *Plastic and Reconstructive Surgery*, 117(7) 2006 2522-2523

44. Ž. Lukšienė, P.A.M. de Witte: Hypericin as novel and promising photodynamic therapy tool: studies on intracellular accumulation capacity and growth inhibition efficiency, *Medicina*, 39 (2003) 677-682
45. P.S.P. Thong *et al.*: Hypericin-photodynamic therapy (PDT) using an alternative treatment regime suitable for multi-fraction PDT, *J. Photochem. Photobiol. B*, 82 (2006) 1-8
46. Z. Vančíková: Principles of the photodynamic therapy and its impact on the immune system, *Sborník lékařský*, 99 (1998) 1-11
47. W.C. Eisenberg, K. Taylor, R.R. Guerrero: Cytogenetic effects of singlet oxygen, *J. Photochem. Photobiol. B*, 16 (1992) 381-384
48. M. Seshadri *et al.*: Tumor vascular response to photodynamic therapy and antivascular agent 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid: Implications for combination therapy, *Clin. Cancer. Res.*, 11 (2005) 4241-4250
49. B. Krammer, A. Hubmer, A. Hermann: Photodynamic effects on the nuclear envelope of human skin fibroblasts, *J. Photochem. Photobiol. B*, 17 (1993) 109-114
50. M. Triesscheijn *et al.*: Photodynamic therapy in oncology, *The Oncologist* 11 (2006) 1034-1044
51. S.K. Bisland *et al.*: Metronomic photodynamic therapy as a new paradigm for photodynamic therapy: Rationale and preclinical evaluation of technical feasibility for treating malignant brain tumors, *Photochem. Photobiol.*, 80 (2004) 22-30
52. M.R. Hamblin, T. Hasan: Photodynamic therapy: A new antimicrobial approach to infectious disease?, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 3 (2004), 436-450
53. R. Ideta *et al.*: Nanotechnology-based photodynamic therapy for neovascular disease using a supramolecular nanocarrier loaded with a dendritic photosensitizer, *Nano Letters*, 5 (2005) 2426-2431
54. C.M. Perrett *et al.*: Topical photodynamic therapy with methyl aminolevulinate to treat sebaceous hyperplasia in an organ transplant recipient, *Arch. Dermatol.*, 142 (2006) 781-782
55. B.K. Manjunath *et al.*: Autofluorescence of oral tissue for optical pathology in oral malignancy, *J. Photochem. Photobiol. B*, 73 (2004) 49-58
56. T. Maisch, R.M. Szeimies, G. Jori, Ch. Abels: Antibacterial photodynamic therapy in dermatology, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 3 (2004) 907-917

57. G. Jori *et al.*: Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: Basic principles and perspective applications, *Lasers in Surgery and Medicine* 38 (2006) 468-481
58. S.A.G. Lambrechts *et al.*: Effect of albumin on the photodynamic inactivation of microorganisms by a cationic porphyrin, *J. Photochem. Photobiol. B*, 79 (2005) 51-57
59. D. Skalkos *et al.*: Photophysical properties of Hypericum perforatum L. extracts – Novel photosensitizers for PDT, *J. Photochem. Photobiol. B*, 82 (2006) 146-151
60. R. Ritz *et al.*: Hypericin: a promising fluorescence marker for differentiating between glioblastoma and neurons in vitro, *Int. J. Oncol.*, 27 (2005) 1543-1549
61. M. Van de Putte *et al.*: Elucidation of the tumortropic principle of hypericin, *Br. J. Cancer*, 92 (2005) 1406-1413
62. A. Kubin *et al.*: Hypericin – The facts about a controversial agent, *Current Pharmaceutical Design*, 11 (2005) 233-253
63. A. Huygens *et al.*: Accumulation and phototoxicity of hypericin and analogs in two- and three-dimensional cultures of transitional cell carcinoma cells, *Photochem. Photobiol.*, 78(6) (2003) 607-614
64. M.A. Pathak, T. B. Fitzpatrick: The evolution of photochemotherapy with psoralens and UVA (PUVA): 2000 BC to 1992 AD, *J. Photochem. Photobiol. B*, 14 (1992) 3-22
65. F. Breuckmann, T. Gambichler, P. Altmeyer, A. Kreuter: UVA/UVA1 phototherapy and PUVA photochemotherapy in connective tissue diseases and related disorders: a research based review, *BMC Dermatology*, 4(11) (2004) 1-14
66. Z. Csoma *et al.*: Intranasal irradiation with the xenon chloride ultraviolet B laser improves allergic rhinitis, *J. Photochem. Photobiol. B*, 75 (2004) 137-144
67. J.U. Grundmann, H. Gollnick: Präventivmaßnahmen gegen UV-Lichtschäden: äußerer und innerer Lichtschutz, *Therapeutische Umschau*, 56(4) (1999) 225-232
68. M. Toyoshima *et al.*: Alternative methods to evaluate the protective ability of sunscreen against photo-genotoxicity, *J. Photochem. Photobiol. B*, 73 (2004) 59-66
69. S. Schauder, H. Ippen: Contact and photocontact sensitivity to sunscreens, *Contact dermatitis*, 37 (1997) 221-232
70. E. Scheuer, E. Warshaw: Sunscreen allergy: a review of epidemiology, clinical characteristics, and responsible allergens, *Dermatitis*, 17(1) (2006) 3-11
71. N. Morley *et al.*: N-acetyl-L-cysteine prevents DNA damage induced by UVA, UVB and visible radiation in human fibroblasts, *J. Photochem. Photobiol. B*, 72 (2003) 55-60

72. A. Azzi, K.J.A. Davies, F. Kelly: Free radical biology – terminology and critical thinking, *Febs Letters*, 558 (2004) 3-6
73. M. Allanson, D. Domanski, V.E. Reeve: Photoimmunoprotection by UVA (320-400 nm) radiation is determined by UVA dose and is associated with cutaneous cyclic guanosine monophosphate, *Journal of Investigative Dermatology*, 126 (2006) 191-197

Abstrakt

Při dopadu na organismus interaguje UV záření s bioaktivními molekulami a tím dochází k jejich změnám s různými následky jako jsou mutace, karcinogeneze, fotosenzitivita a další poruchy. Tato práce se zabývá negativními vlivy UV záření na člověka, chorobami, které vyvolává, jeho využitím v medicíně a také fotoprotekcí a možným zmírněním poškození způsobených tímto zářením.

Abstract

When the UV radiation strikes on the organism, it interacts with bioactive molecules, which leads to their changes with various consequences including mutations, cancerogenesis, photosensitivity and other disorders. This writing deals with UV radiation negative effects on human, diseases, which are induced by it, its utilization in medicine and also with photoprotection and possible modulation of damage induced by this radiation.

Tamara Záborcová

FOTOTOXIKOLOGIE A DOPADY NA ZDRAVÍ ČLOVĚKA

Univerzita Karlova, fakulta farmaceutická
Katedra farmaceutické botaniky a ekologie
Počet stran:109

Abstrakt

Při dopadu na organismus interaguje UV záření s bioaktivními molekulami a tím dochází k jejich změnám s různými následky jako jsou mutace, karcinogeneze, fotosenzitivita a další poruchy. Tato práce se zabývá negativními vlivy UV záření na člověka, chorobami, které vyvolává, jeho využitím v medicíně a také fotoprotekcí a možným zmírněním poškození způsobených tímto zářením.

Tamara Záborcová

FOTOTOXICOLOGY AND IMPACTS ON HUMAN HEALTH

Charles University, Faculty of Pharmacy
Department of Pharmaceutical Botany and Ecology
Pages: 109

Abstract

When the UV radiation strikes on the organism, it interacts with bioactive molecules, which leads to their changes with various consequences including mutations, cancerogenesis, photosensitivity and other disorders. This writing deals with UV radiation negative effects on human, diseases, which are induced by it, its utilization in medicine and also with photoprotection and possible modulation of damage induced by this radiation.

Vysvětlivky

AIP – akutní intermitentní porfyrie

ALA – kyselina 5-aminolevulinová

ARMD – makulární degenerace spojená s věkem (age-related macular degeneration)

BPD – deriváty benzoporfyrinu

Ce₆ – chlorin e₆

CNV – neovaskularizace cévnatky

CO – oxid uhelnatý

COIL – chemický kyslíko-jodový laser

COLIPA – Evropská asociace výrobců kosmetických toaletních potřeb a parfémů

COX-2 – cyklooxygenáza 2

CPD – cyklobutanpyrimidinové dimery

CTCL – kožní T buněčný lymfom

DLE – diskoidní erythematod

DLI – interval mezi podáním léčiva a světla (drug-light interval)

DMXAA – kyselina 5,6-dimethylxanthenon-4-octová

DOPA – 3,4-dihydroxyfenylalanin

DP – dendrimer porfyrin

EBV – virus Epstein-Barrové

EC₅₀ – koncentrace, při které dojde k poklesu životnosti buněčné kultury na 50%

EP – E prostanoidní receptor

ES – Evropské společenství

Φ_{Δ} – pravděpodobnost, že fotosenzitizér po absorpci kvanta světla přejde do tripletového stavu a přenesení přebytečnou energii na kyslík

Φ_t – pravděpodobnost, že fotosenzitizér po absorpci kvanta světla přejde do excitovaného tripletového stavu

G+ - Gram pozitivní bakterie

G- - Gram negativní bakterie

GCSF – granulocytární kolonie stimulující faktor

GM-CSF – granulocytární a makrofágové kolonie stimulující faktor

GSH – glutathion tripeptid, glutamylcysteinylglycin

Hbm - hemoglobin vázaný na membráně

HIV – virus lidské imunodeficiency

HLA – lidský leukocytární antigen

HO-1 – hemoxygenáza-1

Hp – hematoporfyrin

HpD – deriváty hematoporfyrinu

HPV – lidský papilomavirus

HSA – lidský sérový albumin

HSV – herpes simplex virus

ICAM-1 – intracelulární adhezivní molekula 1

IL-1 – interleukin 1

IL-6 – interleukin 6

IPF – imunitní ochranný faktor

LDL – lipoproteiny o nízké hustotě

MED – minimální erytemová dávka

MIC – minimální inhibiční koncentrace

MMP1, MMP3 - metaloproteinázy

*m*PDT – metronomická PDT

MPE – střední světelný účinek

MPF – mutační ochranný faktor

mtDNA – mitochondriální DNA

m-THPC - (5,10,15,20-tetrakis(3-hydroxyfenyl)chlorin

m-THPP - 5,10,15,20-tetra(3-hydroxyfenyl)porfyrin

NAC – N-acetylcystein

NADPH - nikotinamidadeninukleotidfosfát

NFκB – jaderný faktor κB

NO – oxid dusnatý

3T3 NRU – vychytávání neutrální červeně (neutral red uptake) 3T3 buňkami

NSAID – nesteroidní antiflogistika

¹O₂ – singletový kyslík

O₂^{•-} – superoxidový anion-radikál

OECD – Organizace pro ekonomickou spolupráci a rozvoj

OH[•] - hydroxylový radikál

PABA – para-aminobenzoová kyselina

PACT – fotodynamická antimikrobiální chemoterapie

PBS – fosfátový pufr
PCT – porphyria cutanea tarda
PDI – fotodynamická inaktivace
PDT – fotodynamická terapie
PGE₂ – prostaglandin E₂
Photoageing – dermatohelióza, předčasné stárnutí vlivem světla
PIC micela – polyiontová komplexní micela
PIF – fotoiritační faktor
PMLE – polymorfní reakce na světlo, (polymorphous light eruption)
PpIX – protoporfyrin IX
p-TPPS₄ - 5,10,15,20-tetra(4-sulfonatofenyl)porfyrin
PUVA – kombinace psoralenů s UVA zářením
RES – retikuloendoteliární systém
ROS – reaktivní druhy kyslíku
RPE – retinální pigmentovaný epitel
SLE – systémový erythematod
SPF – sluneční ochranný faktor
 $\tau\Delta$ – experimentální doba života
TGF- β – nádorový růstový faktor, (tumour growth factor)
TLR – Toll-like receptory
TNF- α – tumor nekrotizující faktor α
VEGF – vaskulární endoteliální růstový faktor
1,25-(OH)₂D₃ – 1,25-dihydroxyvitamin D₃
8-MOP – 8-methoxypsoralen