

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**VYUŽITÍ FOTOSENZITIZÉRŮ A FOTODYNAMICKÉ TERAPIE
V DERMATOLOGII (REŠERŠE)**

Hradec Králové 2008

Michaela Kohlová

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli PharmDr. Miroslavu Miletínovi, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady a všestrannou pomoc při vypracování této bakalářské práce.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a uvedla jsem všechny použité zdroje.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

5-ALA	kyselina 5-aminolevulinová
b-5-ALA	butylester kyseliny 5-aminolevulinové
BCC	basal cell carcinoma
DMSO	dimetylsulfoxid
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ESR	electron spin resonance
h-5-ALA	hexylester kyseliny 5-aminolevulinové
HIV	human imunodeficiency virus
HpD	hematoporfyrin derivát
HPV	human papilloma virus
HSV-1	herpes simplex virus 1
IR	infra red
LDL	low density lipoproteid
LED	light-emitting diode
m-5-ALA	metylester kyseliny 5-aminolevulinové
PBGD	porfobilinogendeaminasa
Pc4	komplex ftalocyaninu s křemíkem
PDD	photodynamic diagnosis
PDT	fotodynamická terapie
PpIX	protoporfirin IX
PS	fotosenzitizér
ROS	„reactive oxygen species“
SCC	squamous cell carcinoma

OBSAH

1. ÚVOD	6
1.1 KŮŽE.....	6
1.2 FOTODYNAMICKÁ TERAPIE	7
1.2.1 Historie vzniku fotodynamické terapie	7
1.2.2. Princip fotodynamické terapie	8
2. CÍL PRÁCE	10
3. UŽITÍ FOTODYNAMICKÉ TERAPIE	11
4. FOTOSENZITIZÉRY	12
4.1. POŽADAVKY NA FOTOSENZITIZÉRY	12
4.2 FOTOSENZITIZÉRY I. A II. GENERACE	12
4.2.1 Porfíny.....	13
4.2.2 Chloríny.....	14
4.2.3 Ftalocyaniny a metaloftalocyaniny	15
4.3 FOTODEGRADACE FOTOSENZITIZÉRŮ	16
5. 5-AMINOLEVULINOVÁ KYSELINA	18
5.1 VZNIK 5-AMINOLEVULINOVÉ KYSELINY	18
5.2 ENZYMY ÚČASTNÍCÍ SE SYNTÉZY 5-AMINOLEVULINOVÉ KYSELINY	20
5.3 VLASTNOSTI 5-AMINOLEVULINOVÉ KYSELINY.....	21
5.4 DERIVÁTY 5-ALA.....	22
5.5 FARMAKOKINETIKA A TOXICITA 5-ALA A JEJÍCH ESTERŮ	23
5.6 FARMAKOKINETIKA 5-ALA PO LOKÁLNÍ APLIKACI.....	25
6. PROTOPORFYRIN IX	26
6.1 VZNIK PROTOPORFYRINU IX	26
6.1.1 Vznik PpIX v krvi.....	26
6.1.2 Vznik protoporfyrinu IX v kůži	26
6.1.3 PODMÍNKY PRO MÍSTNÍ VZNIK PpIX Z 5-ALA.....	27
6.2 VLIV KONCENTRACE 5-ALA NA TVORBU PpIX.....	27
6.3 ZVÝŠENÍ TVORBY PpIX NÁSLEDNĚ PO LOKÁLNÍM PODÁNÍ ALA	29
6.3.1 Tvorba chelátů.....	29
6.3.2 Enzymatická indukce	29
7. SVĚTELNÉ ZDROJE	31
7.1 VÝBĚR OPTIMÁLNÍ VLNOVÉ DÉLKY PRO 5-ALA-PDT.....	32
7.2 ABSORPCE SVĚTLA CHROMOFORY	33
8. PODMÍNKY PRO TUMOROVOU SELEKTIVITU	34
9. ÚČINKY PDT NA ORGANISMUS	35
9.1 DESTUKCE BUNĚČNÝCH ORGANEL.....	35
9.2 ÚČINKY NA IMUNITNÍ SYSTÉM	36

10. VLIV PH, TENZE KYSLÍKU A TEPLoty NA PDT	37
10.1 SPOTŘEBA KYSLÍKU BĚHEM 5-ALA-PDT	38
11. NOVÉ VYUŽITÍ PDT V DERMATOLOGII	39
11.1 LÉČBA LIDSKÉHO NEMELANOMOVÉHO KOŽNÍHO NÁDORU (NONMELANOMA SKIN CANCER, NMSC) POMOCÍ PDT	39
11.2 POUŽITÍ PDT K LÉČBĚ LIDSKÉHO PAPILLOMAVIRU	40
11.3 POUŽITÍ PDT K LÉČBĚ ACNE VULGARIS	40
11.4 POUŽITÍ PDT K LÉČBĚ POVRCHOVÝCH KOŽNÍCH INFEKcí	41
11.4 DALŠÍ MOŽNÉ UŽITÍ NA 5-ALA ZÁVISLÉ PDT	41
11.5 POROVNÁNÍ ALA- PDT S TRADIČNÍ LÉČBOU	42
12. ZÁVĚR	43
13. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	44

1. ÚVOD

1.1 Kůže

Kůže (cutis s.integumentum commune) je tvořena 3 vrstvami:

1. pokožkou (epidermis)
2. škárou (corium,s.dermis)
(souhrnné označení pro epidermis a dermis = cutis)
3. podkožním vazivem (tela subcutanea)

Pokožka tvoří povrchovou vrstvu kožní. Její tloušťka je mezi 0,07-0,4mm a plošný rozsah je u dospělého asi 1,8m². Skládá se z mnohvrstevného dlaždicového epitelu, jehož charakteristikou je neustálé rohovatění nej povrchnější buněčné vrstvy (stratum corneum). Mimo základní buňky keratinocyty v různém stadiu vývoje obsahuje i další buňky: melanocyty, Langerhansovy buňky a Merkelovy buňky.

Nejhlubší vrstva epidermis je tvořena 5-15 řadami epiteliálních buněk. Tato vrstva se nazývá zárodečná (stratum germinativum). Hraniční vrstva buněk epidermis, naléhající na corium se nazývá stratum basale (cylindricum). V této vrstvě vznikají nové buňky epidermis, které nahrazují vrstvy zrohovatělé.

Ve stratum basale je obsazen pigment, jehož množství dodává kůži zabarvení. Nad stratum basale je vytvořeno stratum spinosum a stratum granulosum. Buňky těchto vrstev ve své cytoplasmě obsahují keratohyalin.

Mezi stratum granulosum a stratum corneum je uložena vrstva stratum lucidum, tvořená 3-4 řadami buněk, které obsahují množství eleidinu. Jde o homogenní silně světlou vrstvu.

Stratum spinosum je vrstva trnitých buněk sestávajících z polygonálních buněk, spojených navzájem plasmatickými výběžky, které překlenují mezibuněčné štěrby.

Škára (corium, dermis) je tvořena hustě propletenými kolagenními a elastickými vlákny. Jsou v ní uloženy cévy, nervy, svaly, žlázy, zakotveny chlupy a nehty. Neobsahuje tukové vazivo.

Corium je tvořeno vrstvou subepiteliální (stratum papillare) a stratum reticulare. Stratum papillare je povrchová, jemná vrstva škáry. Je spojena s epidermis četnými, vazivem podloženými, papilami. Stratum reticulare je pod

stratum papillare uložená část škáry. Sestává se z hustě propletených svazků vaziva.

Corium přechází svými hlubokými vrstvami bez přesného ohraničení do tela subcutanea, kterou tvoří kolagenní a elastická vlákna vazivová s množstvím tukových buněk. Vazivové pruhy v této vrstvě oddělují tukové lalůčky a jsou připojeny ke škáře pevně, ale k periostu tak, že kůže je posunlivá. Kůže je bohatá na elastická a kolagenní vlákna. Podmiňují elasticitu a jsou výrazně vytvořena v místech, kde na kůži působí tlakové vlivy.

Barva kůže závisí na tloušťce kůže, hustotě prokrvení a na množství pigmentu. Pigment je ve formě drobných zrníček obsažen v buňkách hlubších vrstev epidermis. Vzniká v buňkách bazální vrstvy epidermis, v melanocytech, z tyrosinu za katalytického působení enzymu tyrosinasy. Pigment melanin je v buňkách ve formě subcelulárních tělísek zvaných melanosomy. Množství pigmentu v kůži se zvyšuje vlivem slunečních paprsků a pigment pak chrání hlubší vrstvy kůže před škodlivým účinkem slunečních paprsků¹

1.2 Fotodynamická terapie

1.2.1 Historie vzniku fotodynamické terapie

Fotodynamická terapie (PDT) je nový způsob léčení kancerózních i nekancerózních onemocnění. Historie PDT sahá do roku 1900, kdy O. Raab začal pozorovat, že kombinace akridinu ($C_{13}H_9N$) a světla působí toxicky na Paramecium².

Fotodynamickou terapii rozvinul na přelomu 19. a 20. století Niels Finsen, který začal používat ultrafialové světlo k léčení kožní formy TBC. Za tuto práci obdržel Finsen v roce 1903 Nobelovu cenu. Von Tappeiner aplikoval ve stejném roce topicky eosin a bílé světlo při léčbě kožního nádoru. Později zjistil, že pro účinný toxický efekt je zapotřebí také kyslík a v roce 1907 poprvé použil výraz „fotodynamický efekt“. Od roku 1970 se světoví vědci a lékaři začali více zajímat o PDT, která se začala používat k léčbě některých nemocí v mnohých lékařských odvětvích: dermatologii, gastroenterologii, oftalmologii, k léčbě mikrobiálních a virových onemocnění i ke sterilizaci krve. K největšímu rozvoji PDT došlo v posledních 10 letech, s objevem vhodných zdrojů světla, a také v souvislosti s mnoha publikacemi o hematoporfyrinu a jeho derivátech, 5-

aminolevulinové kyselině a jejich derivátech, druhé a třetí generaci fotosenzitizerů.

1.2.2. Princip fotodynamické terapie

Fotodynamická terapie využívá tři složek. Fotosenzitizeru, světla a molekulárního kyslíku. Tyto složky nejsou samy o sobě toxické a neprojevují žádné biologické efekty. Fotosenzitizer (PS) se po absorpci světla excituje a předává energii molekulárnímu kyslíku. Z toho se pak vytváří reaktivní formy kyslíku (ROS, reactive oxygen species, zejména singletový kyslík a volné radikály), jež napadají okolní molekuly tkáně, porušují jejich biologickou funkci vedoucí ke smrti buňky.

Na konečném destrukci poškozené tkáně či nádoru se podílí nejen přímý efekt ROS, ale i indukovaný cévní uzávěr v ozářené oblasti, vedoucí k nedostatečnému zásobení buněk živinami a kyslíkem. Též dochází k aktivaci imunitní odpovědi uvolněním cytokinů a mediátorů zánětu z poškozených buněk.

Základem PDT je aktivace fotosenzitizeru světlem vhodné vlnové délky. Počátečním krokem je absorpce fotonu světla fotosenzitizerem. To způsobí excitaci PS ze základního stavu do extrémně nestabilního excitovaného singletového stavu. Tento stav trvá velice krátkou dobu (několik nanosekund) na to, aby umožnil interakci s okolním prostředím, tudíž se předpokládá, že ovlivňuje pouze zanedbatelně fotodynamickou aktivitu fotosenzitizeru. Z této energetické hladiny se může fotosenzitizer uvolnit několika způsoby: fluorescencí, vnitřní konverzí nebo pomocí „intersystem crossing“. U vnitřní konverze dochází ke srážkám s molekulami rozpouštědla a přebytečná energie se uvolňuje ve formě tepla. Procesem „intersystem crossing“ se fotosenzitizer dostává do svého tripletového stavu. Dochází k inverzi spinu jednoho elektronu, což je proces „spinem zakázaný“ a je daleko méně preferovaný než tzv. „povolené“ procesy³.

Interakce excitovaného fotosenzitizeru a okolních molekul, v přítomnosti kyslíku, vede ke dvěma typům foto-oxidativní reakce⁴. Ke změně PS může dojít dvěma cestami - mechanismus typu I a II. V reakci typu I excitovaný fotosenzitizer reaguje přímo se substrátem. To vede k přenosu

protonu (atomu vodíku) nebo elektronu. Tím vznikají radikály, které mohou reagovat s kyslíkem a produkovat volné kyslíkové radikály. Tyto radikály mohou iniciovat zásadní řetězovou reakci. U reakce typu II fotosenzitizér v tripletovém stavu přenese energii přímo na molekulární kyslík a dochází tak ke vzniku singletového kyslíku (O_2) a návratu fotosenzitizéru ze stavu excitovaného, do základního. Tento druhý typ mechanismu převažuje a je i důvodem závislosti cytotoxicity na přítomnosti kyslíku².

2. CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo zpracovat rešerší použití PDT se zaměřením na aplikace v dermatologii. Vzhledem k rozsahu problematiky byla práce zaměřena především na metody již používané v klinické praxi, případně v preklinických studiích.

3. UŽITÍ FOTODYNAMICKÉ TERAPIE

Klinická aplikace PDT je dosud většinou omezena pouze na oblasti lidského těla, které je možné bez problému ozářit laserem nebo zdrojem inkohorentního záření. PDT byla a je studována pro možné využití v léčení tumorů a neoplastických změn kůže, močového měchýře, úst a ženských reprodukčních orgánů. Sloučeniny o vyšší molekulové hmotnosti (>500 Daltonů) mají nižší permeabilitu přes stratum corneum. Proto se pro moderní PDT často používá 5-aminolevulinová kyselina, která má relativně malou molekulovou hmotnost (167,8 Daltonů).

PDT v dermatologických aplikacích je založená na lokální aplikaci 5-ALA, a je úspěšně používána k léčbě karcinomu bazálních buněk, keratinózy vyvolané zářením, vulvální a cervikální intraepiteliální neoplazie a Bowenovy dermatózy. Díky vysoce selektivní akumulaci PpIX v neoplastických buňkách, jsou principy PDT využívány také ve fotodiagnostice (PDD) neoplastických lézí úst, močového měchýře, dělohy a děložního čípku (po osvětlení léčené oblasti UV světlem, začne PpIX vysílat záření a neoplastická tkáň se jeví červenorůžově, zatímco zdravá tkáň modře).

PDT využívající místně aplikovanou 5-ALA dosahuje výborných terapeutických výsledků, kdy po léčbě kožních lézí, se pokožka vrací do původního stavu, bez jizvení, tudíž může být opakována často bez nežádoucí akumulace PpIX v kůži pacienta⁵.

4. FOTSENZITIZÉRY

4.1. Požadavky na fotosenzitizéry

Ideální fotosenzitizér pro PDT by měl být vysoce selektivní pro poškozenou tkáň, měl by být homogenně distribuován do cílové tkáně a měl by být schopný aktivace vhodnou vlnovou délkou. Dále by měl splňovat požadavek krátkého intervalu mezi podáním látky a maximální akumulací dané látky v nádorové tkáni léčené osoby a měl by mít krátký dobu clearance z normální tkáně

Pokud jsou lipofilní senzitivizéry (porfyriny, ftalocyaniny) ve vhodné formulaci pacientovi podávány intravenózně, v krevním řečišti se kvůli své lipofilnosti (a nerozpustnosti v krvi) váží na lipoproteiny (LDL), které slouží jako jejich přenašeče. Je známo, že membrány nádorových buněk mají na svém povrchu exprimováno velké množství receptorů pro LDL. To vede k vysoké akumulaci molekul fotosenzitizéru v blízkém sousedství nádorových buněk. Molekuly fotosenzitizéru se také mohou akumulovat v tumoru vlivem mikrovaskulárních abnormalit (např. porušené cévní zásobení a zvýšená permeabilita cév)⁴.

4.2 Fotosenzitizéry I. a II. generace

Fotosenzitizéry můžeme rozdělit do dvou generací. Mezi fotosenzitizéry první generace se řadí derivát hematoporfyrin (HpD)⁶, první polosyntetický fotosenzitizér, používaný pro klinickou fotodynamickou terapii. Jde o směs hematoporfyrinů a protoporfyrinů, která tvoří přibližně 50%. Zbytek je tvořen směsí oligomerních porfyrinů, které jsou pospojovány etherovou vazbou. Dalším fotosenzitizérem první generace je Photofrin[®] (porfimer sodný; Axcan Pharma, UK)⁴. Jedná se o čištěný komerční produkt, skládající se z lyofylizované a koncentrované formy monomerních a oligomerních porfyrinů. Výhodou těchto dvou přípravků je, že se selektivně akumulují v nádorové tkáni, kde jsou dlouze zadržovány ve srovnání se zdravou okolní tkání (nejvyšší koncentrace fotosenzitizéru je dosaženo za

24-72 hodin po intravenózním podání). Naopak nevýhodou u těchto fotosenzitizérů první generace je jejich relativně pomalá clearance, což způsobuje u pacientů zvýšenou citlivost na světlo po dobu 6-10 týdnů po podstoupené léčbě⁴.

hematoporfyrin

porfimer sodný

Druhá generace fotosenzitizérů byla vyvinuta na základě požadavků na rychlejší clearance a absorpci světla vyšší než 630nm, která umožní průnik světla do hlubších vrstev pokožky či orgánů. Bylo syntetizováno několik odlišných skupin fotosenzitizérů s těmito vlastnostmi⁴.

4.2.1 Porfiny⁸⁴

Porfiny jsou syntetické porfyriny. Mohou být syntetizovány jako izolované jednotlivé látky nebo jako směs izomerů. Izomer 5,10,15,20-

tetra(hydroxyfenyl)porfin vykazuje až 25-30krát silnější účinek než hematoporfyrin derivát a Photofrin. Nevýhodou však je vysoký stupeň fotosenzitivity, která je v organismu léčené osoby generalizovaná i v případě podávání malého množství látky⁷.

4.2.2 Chloriny

Chloriny jsou heterogenní skupina derivátů porfyrinů nebo chlorofylů lišící se od skupiny porfinů částečnou hydrogenací jednoho pyrolového kruhu. To se projevuje silným absorpčním pásem v rozmezí 650-700nm. Odezvu tumoru na podanou látku lze očekávat za 72 hodin po injekční aplikaci a celkovou fotosenzitivitu organismu za 96 hodin, trvající následně ještě 1-4 týdny.

Verteporfin (Visudine[®] Novartis Pharmaceuticals Corporation)^{8,9} je lipofilní polysyntetický benzoderivát protoporfyrinu IX s maximem absorpce s hodnotami vlnové délky mezi 630nm a 690nm. Optimální fotodynamické účinnosti je obvykle dosaženo do 30 až 150 minut po intravenózním podání látky. Následná fotosenzitivita kůže trvá pouze několik dní díky rychlé clearance látky z organismu.

verteporfin

Temoporfin (mesotetrahydroxyfenyl chlorin) je vyráběn pod obchodním názvem Foscan[®] (Biolitec Pharma, Ltd.)^{84,10} Tento přípravek vyžaduje pro aktivaci pouze malou dávku světla, což výrazně zkrátí dobu ozařování.

temoporfin

4.2.3 Ftalocyaniny a metaloftalocyaniny

Ftalocyaniny¹¹ a metaloftalocyaniny jsou syntetické porfyriny pro které je charakteristická kondenzace benzenových jader s pyrolovými kruhy. Silně absorbují v rozmezí 650-700nm, tumorové tkáně dosáhnou za 1-3 hodiny po intravenózním podání. Pozdější fotosenzitivita pokožky pacienta je minimální díky jejich nízké akumulaci ve zdravé tkáni a rychlé eliminaci z organismu.¹²

Do této skupiny patří také chloraluminium ftalocyanin tetrasulfonát (Photosens[®]), zinečnatý ftalocyanin, a hydrofobní, centrálně substituovaný komplex ftalocyaninu s křemíkem (Pc4)¹¹.

zinečnatý ftalocyanin
tetrasulfonát

chloraluminium

ftalocyanin

Pc4

V dnešní době je v dermatologii nejpoužívanějším fotosenzitizérem z 5-ALA vzniklý PpIX. Pro svůj význam je 5-ALA popsána v samostatné kapitole.

4.3 Fotodegradace fotosenzitizérů

Téměř všechny fotosenzitizéry jsou degradovány působením světla, resp. singletového kyslíku. Během degradace je fotosenzitizer rozdělen na menší molekuly, což způsobí pokles absorpance a fluorescence. Při rozpadu PS na menší molekuly se ale mohou odštěpit pouze periferní funkční skupiny, případně změnou skeletu se mohou vytvořit fotoprodukty, které jsou často samy ještě fotosenzitizéry a obvykle jsou více rozpustné ve vodě než předchozí sloučenina, jako je tomu např. při fotodegradaci PpIX⁵⁵.

Jelikož proces degradace není obvykle přesně znám, bylo vědci navrženo, že fotodegradace porfyrinů jako například Hp, HpD, PpIX a mesoporfyrinu probíhá procesem epoxidace dvojných vazeb mezi kruhem porfyrinu a methylovou skupinou. Výsledkem celého cyklu je tvorba bilirubinu a biliverdinu. Tyto pigmenty jsou zcela fotolabilní. Většina fotosenzitizérů je degradována a fototransformována reakcí prvního řádu, kdy stupeň degradace není závislý na počáteční koncentraci barviva¹³.

Jednou z obecných vlastností fotosenzitizérů, je tzv. „photobleaching“ (vyblednutí). Ve fotochemii je photobleaching definován jako ztráta intenzity

absorpce či emise způsobená světlem. Jsou známy typy ireverzibilních chemických změn, fotomodifikace a tzv. „pravý fotobleaching“. Při pravém fotobleachingu je chemický zásah hluboký a chromofor se rozpadá na malé fragmenty, které nemají významnou absorpci ve viditelné oblasti.

Důsledkem pro PDT je to, že PS už poté neabsorbuje světlo, kterému je tak umožněno proniknout do hlubších vrstev kůže. Na druhou stranu je rozložený PS již neaktivní a nemůže vykazovat žádné cytotoxické vlastnosti³.

Fotobleaching PS může omezovat efektivitu PDT. Pokud fotobleaching fotosenzitizéru proběhne příliš rychle po podání PS, není dostatečný čas na vznik singletového kyslíku nebo volných kyslíkových radikálů, způsobujících destrukci tkáně. Na druhou stranu působí fotobleaching preventivně před zničením buněk normální tkáně, přilehlé k oblasti výskytu tumoru, který je ozářen. Zde fotobleaching zamezí vzniku dalších reaktivních forem kyslíku, díky postupné inaktivaci fotosenzitizéru, který se vyskytuje v okolní tkáni tumoru a mohl by způsobovat u pacientů citlivost na světlo i několik týdnů po aplikaci (lokální i systémové) fotosenzitizéru.

Velké rozdíly jsou ve fotostabilitě jednotlivých fotosenzitizérů. Obvykle ve vodě rozpustná barviva mají vyšší stabilitu než fotosenzitizéry lipofilní. Alespoň jsou-li přítomny v buňkách a tkáních. Odůvodnění pro tento jev může souviset s intracelulární lokalizací fotosenzitizéru. Pro fotostabilitu jsou důležité i jiné faktory než rozpustnost fotosenzitizéru. Vazba fotosenzitizéru na protein obvykle fotostabilitu snižuje.¹⁴

5. 5-AMINOLEVULINOVÁ KYSELINA

5.1 Vznik 5-aminolevulinové kyseliny

5-aminolevulinová kyselina je dnes zdaleka nejčastěji používaným PS v PDT v dermatologii. Jedná se o proléčivo s malou molekulou, snadno rozpustné ve vodě, používané jako fotosenzitizér. 5-aminolevulinová kyselina vzniká přirozeně při biosyntéze hemu⁵.

5-aminolevulinová kyselina

Prvním krokem této biosyntézy je kondenzace glycinu a acetylu koenzymu A¹⁵. Tento proces katalyzuje 5-aminolevulinátsynthetasa (ALA – synthetasa). Při této reakci je nutná přítomnost pyridoxalfosfátu, který je aktivátorem glycinu. Reakce probíhá pouze v mitochondriích savců a u fotosyntetizujících bakterií.

Dalším krokem biosyntézy hemu je tvorba porfobilinogenu (PBG). Při této reakci, která je katalyzovaná enzymem ALA-dehydrogenasou, se spojují dvě molekuly 5-aminolevulinové kyseliny za vzniku derivátu pyrolového typu - porfobilinogenu a dvou molekul vody.

Následuje syntéza uroporphyrinogenu. Ten vzniká spojením 4 porfobilinogenů. Tímto spojením vzniká tetrapyrolové jádro uroporphyrinogenu. Toto spojení se odehrává za přítomnosti PBG – deaminasy (uroporphyrinogen – I – syntetasy) a dojde k uvolnění 4 molekul amoniaku. Podle uspořádání postraních řetězců (acetyl nebo propionyl) rozlišujeme uroporphyrinogeny typu I nebo III. Jen typ III podléhá změnám, které vyúsťují ve vytvoření hemu. Tato transformace je katalyzována uroporphyrinogenasou.

Další fází reakce je syntéza koproporphyrinogenu III. Ten vzniká jako produkt dekarboxylace 4 acetylových radikálů na radikály metylové za přítomnosti uroporphyrinogendekarboxylasy.

Následuje reakce, kterou vzniká protoporfyrinogen III. Tato reakce probíhá tak, že současně dochází k oxidaci a dekarboxylaci dvou zbytků kyseliny propionové na zbytky vinylové, za vzniku protoporfyrinogenu. Následně dochází k transformaci protoporfyrinogenu na protoporfyrin za ztráty 6 protonů. Čtyři protony pocházejí z methylenových můstků, 2 jsou přenášeny dusíkem pyrolových jader.

Posledním krokem této biosyntézy je inkorporace iontového železa (Fe^{2+}) za přítomnosti enzymu ferrochelatasy¹⁶.

Schéma 1: Cyklus tvorby hemu¹⁷

5.2 Enzymy účastníci se syntézy 5-aminolevulinové kyseliny

Struktura ALA-synthasy není u všech organismů stejná. U vyšších obratlovců nacházíme dvě izoformy ALA-synthasy: housekeepingovou formu ALA-synthasy a erythroidní specifický isoenzym. Enzym je lokalizován na vnitřní straně mitochondriální membrány a má hlavní regulační funkci v biosyntéze 5-aminolevulinové kyseliny.

Další enzym, ALA-dehydratasa je lokalizován v cytosolu spolu s porfobilinogendeaminasou a uropofyrinogen III synthasou.

Protoporfyriinogenoxidasa katalyzující finální krok v biosyntéze protoporphyrinu je stejně jako ALA-synthasa uložena ve vnitřní mitochondriální membráně. Je to na kyslíku závislý enzym s vysokou substrátovou specifitou.

Funkce všech enzymů účastníci se biosyntézy hemu, je reverzibilní a je regulována dostupností substrátu s následnou zpětnou inhibicí ALA-synthasy. Dále je regulace biosyntézy ovlivněna aktivitou jednotlivých enzymů, z nichž ALA-synthasa má aktivitu nejnižší, následuje porfobilinogendeaminasa a ferrochelataasa. Právě aktivita ALA-synthasy je hlavním regulačním krokem v této biosyntéze. Může být ovlivněn přímo enzym, jeho transkripce, translace a transport proteinů do mitochondrie či nepřímé ovlivnění koncentrací volného hemu s následnou inhibicí/indukcí její syntézy¹⁵.

Podávání exogenní 5-ALA v nadměrném množství může „obejít“ zpětnovazebnou kontrolu cyklu syntézy hemu s jeho následnou nadměrnou tvorbou. Vlivem omezené kapacity ferrochelataasy přeměňovat PpIX na hem, přítomnost nadbytečné exogenní 5-aminolevulinové kyseliny způsobí akumulaci PpIX v buňkách¹⁸. Tento jev je výrazný zejména v tukových žlázách a také neoplasticky změněných buňkách. Uvádí se, že určitý typ neoplastických buněk snižuje aktivitu ferrochelataasy a naopak zvyšuje aktivitu porfobilinogendeaminasy (PBGD)¹⁹. Snížení aktivity ferrochelataasy má menší význam při deficitu energie v mitochondriích, protože typické nádorové buňky mají nízkou aktivitu cytochromoxidasy a využívají spíše glykolýzu jako zdroj energie než oxidativní fosforylaci¹⁵. Navíc nádorové buňky mají nižší zásoby železa, které jsou charakteristické pro vysoce proliferující buňky. Obě vlastnosti nádorových buněk vedou ke zvýšení

exprese transferinových receptorů, což také přispívá k poklesu množství přeměňovaného PpIX na hem²⁰.

5.3 Vlastnosti 5-aminolevulinové kyseliny

Ačkoliv 5-aminolevulinová kyselina sama o sobě není fotosenzitivní, je široce užívána pro PDT a fluorescenční diagnózu pro různé typy kancerózních a kožních onemocnění. Enzymatická přeměna 5-ALA cestou biosyntézy hemu vede k tvorbě PpIX².

Díky hydrofilním vlastnostem je průnik kyseliny do kůže přes stratum corneum a přes plasmatickou membránu do buněk limitován a tudíž se používá pouze k léčbě povrchových lézí. Syntéza více lipofilních derivátů kyseliny vede ke snížení této nežádoucí vlastnosti².

Důležitý faktor, který ovlivňuje používání 5-ALA v PDT je její stabilita. Kyselina 5-aminolevulinová je obzvláště nestabilní ve vodných roztocích s fyziologickým pH, které jsou podávány orálně nebo intravesikulárně²¹.

Dalším nežádoucím projevem nestability 5-ALA je dimerizace. Vede k vytváření cyklických derivátů pyrazinu a tím k následnému poklesu koncentrace této látky²¹. Proces dimerizace z aminolevulinové kyseliny na pyrazin se uskutečňuje reakcí aminoskupiny s karbonylovou skupinou druhé molekuly 5-ALA²².

Schéma 2: Dimerizace 5-ALA¹⁷

Předpokládá se, že dimerizaci lze zabránit blokováním této aminoskupiny. Vyšší stability kyseliny můžeme docílit např. přidáním formylové skupiny.

Esterifikace kyseliny může zvýšit její biologickou dostupnost, propustnost přes lipofilní membrány buněk. Na druhou stranu stabilitu, která je závislá na teplotě, koncentraci a pH, tímto ovlivnit nelze²³.

5.4 Deriváty 5-ALA

Tvorba protoporphyrinu IX, probíhající v buňkách, velmi závisí na lipilitě esterů 5-aminolevulové kyseliny. Deriváty s dlouhým uhlíkatým řetězcem (např. butylester a hexylester kyseliny 5-aminolevulinové) jsou více lipofilní než 5-ALA nebo i její methylester a tvorba PpIX, který z nich vzniká, je efektivnější. Alifatické estery jsou stejně jako 5-ALA nestabilní ve vodných roztocích o $\text{pH} \geq 5,5$ ²¹. Je tedy snaha syntetizovat nové, stabilnější

sloučeniny. Podle některých autorů pro deriváty 5-ALA není nezbytná deesterifikace před jejich vstupem do syntézy hemu.

methylester 5-ALA

butylester 5-ALA

hexylester 5-ALA

N-formyl 5-ALA

Výjimečnou stabilitu v roztoku o pH 7 prokázal N-formyl derivát 5-aminolevulinové kyseliny (N-f-5-ALA). Tato zvýšená stabilita bývá přičítána sterické překážce, která brání vzniku vazeb C-N mezi dvěma molekulami aminolevulinové kyseliny. Výzkum však ukázal, že navzdory své výborné stabilitě se N-formyl 5-ALA zdá být neúčinné pro léčivo pro vznik PpIX. Důvod nedostatečné tvorby PpIX z N-f-ALA je pravděpodobně v nedostatku enzymu, který by specificky štěpil vazbu C-N.

Některé analogy 5-ALA s modifikovanou aminoskupinou (např. 5-fluorolevulinová kyselina) ovšem působí jako inhibitory syntézy porfobilinogenu^{24,25,26}.

5.5 Farmakokinetika a toxicita 5-ALA a jejích esterů

Již v roce 1997 několik nemocnic začalo systémově podávat 5-ALA při fluorescenční diagnóze a fotodynamické terapii k léčení onemocnění kůže, gastrointestinálního traktu a rakoviny plic.

Není zcela jisté, zda samotná 5-ALA působí na buňky toxicky. U několika pacientů po systémovém podávání této látky se vyskytla mírná přechodná nevolnost nebo měli přechodně změněné jaterní funkce. Některé předchozí studie dokonce uvádějí výskyt symptomů porfyrie u léčných

pacientů s rakovinou nebo u zdravých dobrovolníků, s přechodně či trvale zvýšenou plasmatickou koncentrací 5-ALA po jednotlivém nebo opakovaném systémovém podávání exogenní 5-ALA²⁷.

Plasmatické koncentrace 5-ALA (26,8 $\mu\text{mol/l}$) se dosáhne za 60 minut po jednorázovém orálním podání 3,3 mg 5-ALA na kilogram váhy pacienta, s poločasem přeměny ($T_{1/2}$) 50 minut²⁸.

Během studie Reguly a kol. byla u 13 pacientů měřena s hodinovými intervaly plasmatická koncentrace 5-ALA během orálního podávání 30 nebo 60 mg/kg 5-ALA. U 11 pacientů naměřili po 6 hodinách po podávání 5-ALA o nižší uvedené koncentraci 63 $\mu\text{mol/l}$. U zbylých 2 pacientů, kterým byla podávána 5-ALA o koncentraci 60 mg/kg, naměřené hodnoty dosahovaly 116 a 205 $\mu\text{mol/l}$ ²⁹.

Gorhein a Webber prováděli podobnou studii a zjistili, že u 2 pacientů s akutní porfyrií, byly naměřeny hodnoty 9 a 12 $\mu\text{mol/l}$. Byl též zaznamenán výskyt neurologických potíží zahrnujících respirační paralýzu, quadraplegii a rozsáhlé abnormality autonomního nervstva³⁰.

Zřejmě podávání 5-ALA jako součást PDT u pacientům s rakovinou vede k mnohem vyšší plasmatické koncentraci 5-ALA než u pacientů trpících porfyrií. Proč je PDT za použití 5-ALA doprovázena zvracením a nevolností bez jakýchkoliv jiných neuroviscerálních symptomů, přítomných i pacientů s porfyrií není bohužel známo. Nicméně je uváděno, že exogenní 5-ALA může prostoupit přes hematoencefalickou bariéru a centrální nervový systém je sám schopen syntetizovat porfyriny z 5-ALA. Proto je nutné zvýšit pozornost u klinických pokusů se systémovým podáváním exogenní 5-ALA. To zejména u pacientů s porfyrií, těžkou poruchou jater a ledvin, protože akutní záchvat hepatické porfyrie s neuroviscerálními symptomy jsou často spojeny s vysokou sekrecí 5-ALA ledvinami a v těchto případech je 5-ALA všeobecně považována za neurotoxickou látku³¹. Bohužel je dostupné jen malé množství nových informací, týkajících se farmakokinetiky a toxicity exogenní 5-ALA a souvislostí mezi na 5-ALA závislým vznikem PpIX v plasmě a tkáních¹⁵.

5.6 Farmakokinetika 5-ALA po lokální aplikaci

5-ALA díky své malé molekule prochází do hlubších vrstev kůže prostřednictvím difúze. Avšak její hydrofilní povaha značně zhoršuje její penetraci, protože kůže představuje hydrofobní bariéru proti exogenním agens. To omezuje přestup lokálně aplikované 5-ALA neporušenou epidermis. Při poškození strata cornea a epiteliálních bariér, se zvýší prostupnost 5-ALA do neoplastických lézí, díky porušené spojitosti lipidové struktury membrány³².

6. PROTOPORFYRIN IX

6.1 Vznik protoporfyrinu IX

6.1.1 Vznik PpIX v krvi

Není stále dostupných mnoho informací o farmakokinetice vzniku PpIX z 5-ALA v lidském organismu. Avšak Lofgren a spol. uvádějí, že nejvyšší hladina vzniklého PpIX a 5-ALA se vyskytla v plasmě králíka jednu hodinu po intravenózním podání dávky 50mg/kg a 2 hodiny po dávce 200 mg/kg. Koncentrace PpIX klesá během 24 hodin s poločasem přeměny přibližně 60 minut. Podobný průběh shledal Henderson a kol. při pokusech s myším sérem³³. V roce 1997 Webber a spol. uvedli studii o farmakokinetice vzniku PPIX z 5-ALA. Testováni byli 4 pacienti trpící rakovinou, po orálním podání 60mg 5-ALA na kilogram jejich hmotnosti. Zjistili, že poločas přeměny exogenní 5-ALA byl přibližně 8 hodin po podání³⁴.

6.1.2 Vznik protoporfyrinu IX v kůži

Bylo provedeno několik výzkumů, které měly objasnit akumulaci volně cirkulujícího PpIX. Ve většině studií bylo použito neinvazivní spektrofotofluorometrických metod k měření fluorescence PpIX in vivo po systematickém podávání (i.p./i.v./p.o.) různých dávek 5-aminolevulinové kyseliny³⁵. Koncentrace PpIX vzniklého z 5-ALA dosáhne maxima přibližně po 3-8 hodinách po podání a je téměř veškerý eliminován po 24 hodinách od podání 5-ALA. Podobné výsledky byly naměřeny i při použití fluorescenční mikroskopie a chemických extrakčních technik. Zůstává otázkou, zda z 5-ALA vznikající PpIX přítomný v kůži pochází z kostní dřene a jater pomocí cirkulace krve nebo je syntetizován přímo v kůži, popřípadě jsou-li možné obě varianty vzniku současně³⁶.

V poslední době bylo velkým přínosem pro další studium kinetiky PpIX průkaz toho, že se syntéza PpIX odehrává v kůži. Lokální aplikace exogenní 5-ALA (na povrch kůže, intradermální nebo intrakutánní aplikace) na normální a poškozenou pokožku vede k fluorescenci PpIX a následně k světlem indikované fotosenzitivitě vyskytující se pouze v místě s předešlou aplikací 5-ALA³⁷.

Při lokální aplikaci Photofrinu® obsahujícího přibližně 5-10% PpIX a hematoporphyrinu, který je více polární, jsou tyto látky zadržovány v kůži ještě několik týdnů po ukončení léčby³⁸.

Rozdíl mezi aplikací exogenní 5-ALA (fluorescenci nelze detekovat po více jak 24hodinách následně po aplikaci) a Photofrinu, může být způsoben tím, že vysoké dávky exogenní 5-aminolevulinové kyseliny vedou k přechodné produkci velkého množství PpIX v kůži. Později je tento PpIX buď rychle metabolizován v kůži na fluorescence neschopný hem nebo se z pokožky uvolní a je krevním oběhem transportován do jater. Později je ve střevech metabolizován a vyloučen z organismu ve výkalech³⁹. Další vysvětlení této odlišnosti může být v přetrvávající fluorescenci v kůži pacientů díky jiným porfyrinům než PpIX¹⁵.

6.1.3 Podmínky pro místní vznik PpIX z 5-ALA

Při studiu kinetiky tvorby PpIX z derivátů 5-ALA různé koncentrace, bylo zjištěno, že nejvíce účinný byl hexylester 5-aminolevulinové kyseliny (h-5-ALA), který zvyšoval hladinu PpIX i v nejnižší testované koncentraci (0,01mM). Butylester 5-ALA (b-5-ALA) vykazoval při pokusech nižší schopnost tvořit PpIX než h-ALA, přesto při koncentraci 0,01mM významně zvyšoval hladinu PpIX, vzniklého za stejných podmínek z 5-ALA. Nejméně účinný byl methylester 5-ALA (m-5-ALA) a to i při koncentraci 0,25mM. m-5-ALA vykazuje poněkud nižší efektivitu tvorby PpIX, než 5-ALA. Avšak mají-li obě látky stejnou koncentraci 3mM, produkují shodné množství PpIX .

U N-f-5-ALA nebyl prokázán vliv na zvyšování hladin PPIX při jakékoliv koncentraci. Při pokusech N-formylderivát 5-ALA též neprokazoval toxický vliv na buňky a to ani při nejvyšší testované koncentraci (3mM). Toxicita b-5-ALA byla lehce vyšší než 5-ALA avšak značně nižší než h-5-ALA.²³

6.2 Vliv koncentrace 5-ALA na tvorbu PpIX

Klinický úspěch PDT závisí na dosažení prahové koncentrace 5-ALA po lokální aplikaci, která zvyšuje terapeutickou hladinu protoporphyrinu IX v abnormálních buňkách. Nedojde-li k dosažení této prahové koncentrace,

dochází k tvorbě PpIX v nedostatečném množství. V takovém případě nedojde v ani po ozáření k tvorbě singletového kyslíku, který by způsobil účinnou destrukci cílových buněk. Při pokusech s buněčnou kulturou bylo prokázáno, že k dosažení terapeutického účinku se koncentrace 5-ALA musí pohybovat v rozmezí 0,01mg/l a 0,17mg/l. Následně vzniká dostatečné množství PpIX, schopné poskytnout po ozáření světlem s vhodnou vlnovou délkou takové množství reaktivního kyslíku ke zničení až 90% neoplastických buněk⁴⁰.

Dosud se v mnohých studiích používala fluorescenční mikroskopie ke sledování tvorby PpIX po lokální aplikaci 5-ALA. Ve většině případů byly přípravky obsahující 5-aminolevulinovou kyselinu aplikovány povrchově na zdravou či poškozenou kůži zvířat nebo lidských dobrovolníků. Přípravek se nanese na kůži 4-6 hodin před provedením biopsie. Tenké vrstvy tkáně získané z biopsie umožní změřit intenzitu fluorescence PpIX, použitím vhodné mikroskopické metody, délkou excitačního světla kolem 400nm a vlnovou délkou emisního světla od 600 do 700nm. Eventuálně lze PpIX extrahovat z rozpuštěného vzorku tkáně a změřit fluorescenci fluorescenční spektrofotometrií při stejných vlnových délkách^{41,42}.

Často se naměřené hodnoty porovnávají s autofluorescencí pozadí, aby publikované výsledky byly přesné. König a spol. uvádějí fluorescenci PpIX v hloubce 0,6 mm za 6 hodin po aplikaci 5-ALA u pacientů s tumory kůže. Szeimies a spol. udávají fluorescenci PpIX v hloubce 0,3mm u karcinomu bazálních buněk. Wennberg a spol. využili mikrodialýzy ke stanovení množství 5-ALA v normální kůži a v karcinomu bazálních buněk po povrchové aplikaci 20% 5-aminolevulinové kyseliny ve formě gelu. Trubička na mikrodialýzu byla umístěna intrakutánně v hloubce 0,5mm a vzorek byl odebírán v pravidelných časových intervalech a dále zpracován pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Koncentrace 5-ALA v karcinomu bazálních buněk byla v rozmezí 0,0mg/ml a 0,52mg/ml. V normální zdravé kůži nebyla 5-ALA v hloubce 0,5mm pod epidermis detekována vůbec. Casas a spol. použili kapalinovou scintilační spektrometrii k průkazu, že 5-ALA může procházet do hloubky 5mm, ačkoliv většina léčiv se nachází od 2mm výše. Tuto hypotézu zkoumali na myším tumoru⁵.

6.3 Zvýšení tvorby PpIX následně po lokálním podání ALA

6.3.1 Tvorba chelátů

Mnoho pokusů o zvýšení akumulace PpIX v buňkách bylo založeno na zvýšení enzymatické aktivity enzymů cyklu hemu nebo na zastavení inzerce železa do molekuly hemu. Tvorba chelátů železa zůstává nejoblíbenější způsob minimalizace dostupného množství elementárního železa jako substrátu pro ferrochelatasy. Hydroxypyridony jsou relativně nová činidla vytvářející cheláty. Mají malou molekulovou hmotnost a vysokou lipofilitu. Mohou být podávány orálně a mohou vázat železo v poměru 3:1⁴³.

K. Berg a spol. zkoumali efekty EDTA na utváření PpIX v buňkách léčených 5-ALA. EDTA byla neúčinnější ve zvýšení tvorby PpIX. Tento efekt byl nejvýraznější i při nejnižší koncentraci 5-ALA a je připisován prokazatelné tendenci saturace ferrochelatasy, když hladina PpIX byla vysoká, způsobená nadměrným množstvím 5-ALA. Berg a spol. uveřejnili, že postup tvorby železnatých chelátů, založený na sloučeninách jako je například EDTA, může ve skutečnosti redukovat selektivitu PDT způsobující akumulaci PpIX ve zdravých buňkách. Tento objev může být vysvětlen redukcí aktivity ferrochelatasy indukované u normálních, zdravých buněk cheláty železa. V maligních buňkách je tato aktivita, v porovnání s buňkami zdravými nízká. Normální zdravé buňky přilehlé k cílovým maligním buňkám mohou být poškozené zářením, a pokud chelatační látky a 5-ALA jsou podávány systémově, může se rozšířit fotosenzitivita do okolní kůže²⁰.

6.3.2 Enzymatická indukce

Ke zvýšení penetrace 5-ALA přes lipofilní bariéry tvořené buněčnou membránou, přispívá dimethylsulfoxid (DMSO). V určité koncentraci indukuje různé enzymy biosyntézy hemu v důsledku stimulace transkripce určitého enzymu⁴⁴. DMSO je tedy prezentován jako induktor zvyšování aktivity ALA-synthasy, ALA-dehydratasy a deaminasy porfobilinogenu v kultuře testovaných buněk.^{45,46}

Byla také publikována fakta týkající se následného zvýšení PpIX v buňkách léčených kombinací 5-ALA a DMSO v porovnání podávání samotné 5-ALA. DMSO je často obsažen v přípravcích obsahujících 5-ALA určených pro povrchovou aplikaci. To je pravděpodobná příčina zvýšené

akumulace PpIX v léčené tkáni⁴⁷. Je jasné, že DMSO umožňuje pronikání 5-ALA hlouběji do tkáně jak zdravé, tak nádorové. To může mít významnou roli v dalším zlepšování úspěšnosti PDT léčení hlubokých a vysoce keratinizovaných lézí⁴⁸. Zvyšuje pravděpodobně diferenciaci maligních buněk. Byly popsány preparáty obsahující 5-ALA, DMSO a EDTA. Přidání EDTA do preparátu určeného k povrchové aplikaci vede k větší tvorbě PpIX než při obsahu samotné 5-ALA či DMSO. Tento výsledek je limitován neschopností EDTA penetrovat do kůže i v přítomnosti DMSO⁴⁹.

U levamisolu a lonidaminu, inhibitorů respiračního cyklu a glykolýzy, byl prokázán synergisticky působící efekt s 5-ALA při poškozování normálních buněk v okolní tkáni. Lonidamin významně snižuje syntézu PpIX, zatímco levamisol ji naopak zvyšuje. Tento synergistický efekt je přičítán ke zvýšení rychlosti tvorby PpIX⁵.

7. SVĚTELNÉ ZDROJE

Ve PDT se používá celá řada světelných zdrojů, laserů a zdrojů nekoherentního světla. Lasery produkují koherentní, monochromatické světlo o vysoké intenzitě. Toto světlo vede přes optické vlákno a dostává se přímo do cíleného místa. Pro klinickou PDT se používají nejčastěji argonové lasery, lasery využívající fosforečnan draselno-titaničitý, kovové výpary (například mědi a zlata) a laserové diody. Lasery vyzařují spojité vlny nebo pulzní světlo^{50,51}.

Byla hypotéza, že vysoce intenzivní světelné pulsy (první část pulsu) mohou pronikat hlouběji do tkáně než spojité vlny světla a způsobí přechodný pokles absorpce chromoforem v tkáni. Tento proces dovolí zbytku pulsu projít skrz tkáň bez většího zeslabení intenzity⁵². Většina klinických studií však uvádí, že není podstatný rozdíl mezi účinností PDT při použití zdroje světla vysílajícího souvislé vlny světla nebo v pulsech.

Laser jako zdroj světla se často využívá tam, kde je potřeba úzký paprsek světla. Výhoda používání laseru je v tom, že je možné ho snadno spojit se systémem optických vláken. Takto se dostane i ke špatně přístupným místům, jako jsou močový měchýř, plíce a zažívací trakt. Použití laseru o definované vlnové délce k ozáření umožní přesné dávkování světla na povrch poškozeného místa. V případě zdrojů, vysílajících široký pás světelných paprsků mohou být hloubka průniku světla, extinkční koeficient fotosenzitizérů a intenzita spektra velmi variabilní. Proto dávky světla z laseru, světla prošlého filtry a denního světla nejsou srovnatelné. Jiné zdroje světla než lasery se využívají zejména pro dermatologii. Jsou lepší než systém laserů, protože jejich světelné pole je širší, jejich velikost je menší než u laserů, snadnější je i konstrukce a jejich pořizovací cena je nižší než cena laserů^{50,53}.

Nekoherentní halogenový a xenonový oblouk a kovová halogenidová lampa, fluorescenční trubice, světlo emitující diody (LED) a intenzivní pulzní zdroj světla, vyzařující významný podíl infračerveného záření spolu se světlem potřebného pro PDT, jsou nejvíce používané světelné zdroje v dermatologii pro fotodynamickou terapii².

Široká emisní spektra těchto světelných zdrojů však mají nevýhody, jako je například termální efekt nebo obtížné měření absorbovaného světla (dosimetrie). Infračervené termální záření může být odstraněno filtrem, aby nedocházelo k hypertermii. Hypertermie (více jak $150\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$) vznikající deplecí kyslíku má na PDT velký vliv a musí být zvažována doba osvětlení léčeného pacienta. Avšak někteří výzkumníci zjistili, že mírná hypertermie ($40\text{--}42^\circ\text{C}$) napomáhá či působí synergisticky s PDT. Bohužel hypertermie může být sdružená s větší bolestí⁵⁴.

Nekoherentní zdroje světla a lasery, které mohou být použity pro PDT, obvykle vykazují stejnou efektivitu. Jednotný zdroj světla nemusí být ideální pro všechny možné aplikace PDT. Výběr zdroje světla by měl být založený na hodnotě absorpčního maxima fotosenzitizéru, na onemocnění (lokalizace, velikost léze a její dostupnost), bezpečnosti, jeho ceně a velikosti.

Při výběru zdroje světla se zvažuje, do jaké hloubky tkáně sahá poškození a vlnová délka se musí nacházet uvnitř absorpčního pásu daného fotosenzitizéru. Pro léčbu hlubokých lézí, je vhodné použít fotosenzitizéry s vysokou absorpcí, nejlépe sahající až do červené oblasti spektra. Mnohé fotosenzitizéry druhé generace absorbují v delších vlnových délkách (více než 630nm) než dříve používané fotosenzitizery².

7.1 Výběr optimální vlnové délky pro 5-ALA-PDT

Vlnová délka světla aktivujícího fotosenzitizér je pro použití PDT velice limitující. Světlo o nižších vlnových délkách proniká živými tkáněmi pouze do hloubky několika milimetrů a zasažená oblast je velice malá³.

Ve většině případů se ve fotodynamické terapii v dermatologii používá světlo s vlnovou délkou 630nm . Světlo v oblasti Soretova pásu (přibližně 410nm) poskytuje sice největší inaktivaci buněk, ale je vhodné pouze pro velmi superficiální PDT, zatímco pro zásah v hloubce větší než 2mm (pod povrchem lidské kůže a ve svalové tkáni, stejně jako u karcinomu bazálních buněk) je optimální vlnová délka 635nm .

Výběr optimální vlnové délky pro PDT může být prováděn na základě odpovídajícího absorpčního spektra PS.

Při fotodegradaci PpIX, jsou-li přítomny proteiny, se vytvářejí fotoproducty chlorinového typu. Jedním z hlavních fotoproductů je fotoprotoporfyrin, který je stále ještě fotoreaktivní a dobrý fotosenzitizér, ale je zároveň fotolabilní. Chloriny mají absorpční vrchol kolem 670nm, proto je vhodné používat při PDT širokospektré zdroje světla, překrývající toto absorpční maximum.⁵⁵

Nejoptimálnější vlnová délka by měla poskytovat maximální výtěžek volného kyslíku v maximální možné hloubce v kůži.

7.2 Absorpce světla chromofory

Protože neinvazivní PDT závisí na dodání světla, aplikuje se pouze na tumory a jiné léze, na které se světelný paprsek dostane. Buď přímo nebo přes optické vlákno. Zdroj světla a systém podílející se na rozvodu světla, jsou dvě ze základních podmínek PDT. Světlo je ve tkáni, kterou vstupuje hlouběji pod povrch, absorbováno nejvýznamnějšími chromofory, především hemoglobinem, melaninem a případně vodou. Absorpce světla chromofory určí, jak hluboko do tkáně světlo pronikne. Každý chromofor absorbuje světlo o různé vlnové délce jinak. Toto je určováno absorpčním spektrem chromoforu. Hloubka penetrace se mění s vlnovou délkou světla. Takzvané „optické okno“ živé tkáně se nachází mezi 600nm (více než je absorpce hemu) a 1300nm (méně než absorpce vody). V podstatě by tedy mohly být používány fotony až do 1240nm. Foton ale musí poskytnout energii rozdílu mezi singletovým a tripletovým stavem fotosenzitizéru a fotony nad 850nm nebudou tvořit tripletové stavy s dostatečně vysokou energií k vytvoření singletového kyslíku².

8. PODMÍNKY PRO TUMOROVOU SELEKTIVITU

Dosud bylo navrženo mnoho teorií objasňujících, proč fotosenzitivní léčiva se selektivně zachycují v nádorové tkáni. Tyto teorie jsou založeny na speciálních vlastnostech nádorových buněk nebo na fyziologických rozdílech mezi tkání normální a tkání tumoru. V souhrnu jde o spojení těchto faktorů: nízké pH tumoru (související s nedostatečnou vaskularizací tumoru vedoucí se zvýšené glykolýze s následným růstem hladiny laktátu)⁵⁶; tumor obsahuje mnoho magrofágů, které mohou pohltnout agregáty fotosenzitizéru a následně ho monomerizovat⁵⁷; na povrchu nádorové buňky bylo nalezeno velké množství receptorů pro lipoproteiny o nízké hustotě (LDL)⁵⁸; tumor má nedostatečný mízní odvod a propustný cévní systém⁵⁷; buňky tumoru mají odlišné množství vody než buňky normální a další fyziologické parametry mezi normální a nádorovou tkání hrají roli v lokalizaci fotosenzitizéru⁵⁹.

Tumory jsou obvykle chudé na zásobení kyslíkem a následkem PDT dojde k destrukci vaskulárního systému, což bohužel vede k poklesu nádorové selektivity. Změna metabolického kroku v biosyntéze hemu po aplikaci ALA může být jeden z hlavních důvodů prozvučující se akumulací PpIX v neoplastických buňkách a tkáni. V některých maligních buňkách a tkáních aktivita porfobilinogendeaminasy vzrůstá, zatímco aktivita ferrochelatasy klesá⁶⁰. Jelikož ferrochelatasy katalyzuje inzerci iontů železa do protoporfyrinového kruhu, hladina volného železa ovlivní akumulaci PpIX⁶¹.

Rozdíly mezi tkání nádorovou a normální závisí na fyziologické struktuře jednotlivých tkání, mohou ovlivnit produkci a akumulaci PpIX a vedou tedy k tumorové selektivitě. Rozdíly mezi nádorovou a normální buňkou s ohledem na proliferaci, diferenciaci a mitochondriální obsah, pH atd. mohou vést k selektivní akumulaci a retenci PpIX. Tedy důvod pro selektivní akumulaci PpIX v neoplastické i jinak nádorově pozměněné tkáni může být enzymatický, morfologický nebo způsobený vlivem prostředí. Mezi všemi zmiňovanými faktory mohou existovat složité interakce, závislé na

povaze onemocnění, také na jeho lokalizaci a stádiu, i na použitých prekurzorech PpIX stejně jako na způsobu a trvání jejich aplikace⁶².

9. ÚČINKY PDT NA ORGANISMUS

9.1 Destrukce buněčných organel

Subcelulární cíle a celulární odpověď na PDT může být odlišná při použití různých fotosenzitizérů⁶³. Poškození buněčné membrány po PDT bylo dříve prokazováno pomocí mnoha metod (ESR, elektronovou mikroskopií).⁶⁴

Bariérová funkce membrány je umožněna zvýšením soudržnosti buněk ve stratu corneou a snížením vazby suspendovaných buněk. To má velký význam pro redukci potenciálně rakovinných buněk z přežívajících buněk v tumoru.

Poškození mikrotubulů způsobené PDT, což je významné u ve vodě rozpustných fotosenzitizérů, vede k akumulaci buněk ve fázi mitosy což postupně vede k jejich smrti^{65,66}.

Protože se negativně nabitě fotosenzitizéry hromadí mimo jádro, je jen velmi málo poškození DNA zapříčiněno PDT. Pouze malý zlomek DNA umístěný blízko jaderné membrány je PDT poškozen⁶⁷.

Optimální cesta zničení tumoru je diskutována již desetiletí. PDT může usmrcovat buňky navozením apoptózy a/nebo přímo vede k nekróze buněk nebo nepřímo uzavřením cévního zásobení buněk tumoru. Mimoto se může u pacienta vyskytnout stimulace nebo suprese imunitního systému^{68,69}.

Způsob usmrcení nádorových buněk závisí na typu použitého fotosenzitizéru, na aplikované dávce PDT a buněčném genotypu⁷⁰.

Subcelulární lokalizace fotosenzitizéru hraje klíčovou roli pro konečný výsledek PDT. Fotosenzitizéry, které se naakumulovaly v mitochondriích, jsou schopné indukovat apoptózu⁷¹, v lysozomech umístěné nekrózu nebo apoptózu buňky. Po protržení lysozomální membrány dojde k uvolnění uvnitř obsažených fluoroforů, což vede ke zvýšení intenzity fluorescence. Bylo prokázáno, že tento mechanismus funguje jak *in vivo*, tak i *in vitro*⁷².

V plasmatické membráně, kde se akumuluje většina fotosenzitizérů, bývá zahájena reakce vedoucí k apoptóze nebo nekróze. Dochází

k fosforylaci kaskády proteinů umístěných v membráně, dojde k poškození jejich regulační funkce v reakci na PDT^{73,2}.

9.2 Účinky na imunitní systém

Ze studie G. Cantihho a jeho spolupracovníků vyplývá, že se metastazující buňky vyskytují méně po aplikaci PDT než po operaci. Studii prováděli na myším tumoru.⁷⁴ Toto zajisté souvisí s vlivem PDT na imunitní systém.

Bylo prokázáno zesílení proteinů na povrchu buněk, modulace prezentace antigenu a přímý vliv na buňky imunitního systému. PDT způsobí akutní zánět, expresi proteinů tepelného šoku, dochází k hromadění a infiltraci leukocytů a může dojít ke zvýšené presentaci antigenů pocházejících v tumoru na T lymfocytech⁷⁵. Naproti tomu, operace, radioterapie a chemoterapie působí imunosupresivně.

PDT resistance, teplotní šok nebo exprese stresových proteinů nejsou zatím zcela ojasněné mechanismy. Porozumění těmto molekulárním mechanismům a buněčné odpovědi na PDT přispívá ke zlepšení PDT.

10. VLIV PH, TENZE KYSLÍKU A TEPLoty NA PDT

U normální tkáně je předpokládaná extracelulární pH mezi 7,0-7,4, zatímco v celulórní matrix tumoru může být různé od 6,5 do 6,8⁷⁶. Tento rozdíl může ovlivnit výsledek PDT⁷⁷.

Experimentem bylo zjištěno, že tvorba PpIX je maximální při extracelulárním pH kolem 7,4. To navzdory tomu, že penetrace 5-ALA do buňky probíhá nejefektivněji okolo pH 5⁷⁸. Toto je přisuzováno závislosti aktivity porfobilinogendeaminasy pH, která je nejvyšší při pH 7,4. Ačkoliv maximální tvorba PpIX probíhá tedy přibližně pH 7,4, stupeň usmrcení buněk fotodynamickou terapií při nižším uvedeném extracelulárním pH zůstává většinou nezměněný. Důvodem toho může být zvýšená citlivost k toxickým účinkům volných radikálů nebo přestavba celulórních reparačních enzymů díky kyselému prostředí. Kromě toho, retence vytvořeného PpIX v buňkách je za nízkých hodnot pH (5,8-6,8) zvýšená jak ve zdravé, tak i nádorové tkáni⁷⁹.

Nižší hodnoty extracelulárního pH (pod pH 6) může ovlivnit citlivost buněk v klidovém stádiu k PDT. Ty jsou méně citlivé k PDT než buňky v proliferační fázi⁸⁰.

ALA preparáty pro lokální podání by měly být nastaveny na pH 7,4. Jako povrchově aplikované preparáty mohou totiž ovlivnit lokální extracelulární pH, tudíž i tvorbu PpIX. To je však obtížné díky nestabilitě ALA v neutrálním a alkalickém pH⁸¹.

Obvykle přípustná tenze kyslíku v normální tkáni je v rozmezí 5-10%. V nádorové tkáni od 0 do 5%. Tato nízká tenze kyslíku způsobuje redukcí tvorby PpIX a to díky závislosti enzymů biosyntézy hemu na kyslíku⁸².

Tvorba PpIX v lidské kůži je silně závislá na teplotě. P.Juzenas a spol. uveřejnili, že při teplotě pokožky 12 a 42°C se tvorba PpIX významně zvyšovala při vyšší zmíněné teplotě⁸³.

Zvyšující se produkce PpIX u lehce stoupající teploty kůže je způsobena pravděpodobně zvyšující se aktivitou porfobilinogendeaminasy.

Mimo to porfobilinogendeaminasa (PBGD) je limitující stupeň pro tvorbu PpIX v neoplastických buňkách. Proto tedy místní hypertermie může zvyšovat aktivitu PBGD, tvorbu PpIX a míru úspěšnosti PDT. Hypertermie dále způsobí hypoxii buněk, které jsou pak více citlivé k PDT a úspěšnost PDT tak může být dále zvýšena.⁸⁴

10.1 Spotřeba kyslíku během 5-ALA-PDT

Kyslík je potřeba k reakcím probíhajícím během fotodynamické terapie. Bylo zjištěno, že efektivita PDT je poloviční, pokud koncentrace kyslíku je zmenšena z 20% na 1% v kyslíkem dobře zásobené tkáni⁸⁵.

Během PDT je koncentrace kyslíku v tkáních redukována dvěma cestami. První vede přes destrukci cévního systému a druhá přes spotřebu kyslíku během oxidativních reakcí lokalizovaných v tkáni. Krevní perfúze tkáně určuje limitní hodnotu, při jejímž překročení se začne objevovat vyčerpání kyslíku. V mnoha případech ozáření povrchu může vést k depleci O₂ pouze v horních vrstvách tkáně.

Koncentrace kyslíku se mění během PDT, protože dochází k poškození cévy, a protože se zvýší přímá konzumpce kyslíku ve vlastním fotochemickém procesu. Dochází k ovlivnění přímo fotochemickou spotřebou kyslíku¹⁵.

11. NOVÉ VYUŽITÍ PDT V DERMATOLOGII

11.1 Léčba lidského nemelanomového kožního nádoru (nonmelanoma skin cancer, NMSC) pomocí PDT

Nemelanomový kožní tumor je druh rakoviny vyskytující se převážně u populace se světlou pletí. Většina těchto nádorů jsou karcinomy bazálních buněk (BCC) a karcinomy skvamózních buněk (SCC)⁸⁶. BCC a SCC vznikají z epidermis. Přibližně 15-35% všech BCC jsou karcinomy superficiální⁸⁷.

Donedávna se k léčbě nádorů tohoto typu využívalo operativního vyříznutí, kyretáže, chemoterapie a radioterapie. Jako novější léčba nemelanomových kožních nádorů se používá systémové podávání HpD/Photofrinu ve PDT⁸⁸.

K aplikaci fotosenzitizérů na kožní lézi se standardně při PDT používá emulze olej/voda obsahující 5-ALA nebo její methylester. Místo s aplikovanou emulzí se přikryje prodyšnou náplastí. Následně je léze vystavena světelnému záření, způsobujícímu tvorbu singletového kyslíku. Koncentrace 5-ALA v emulzi je 2-40%, nejčastěji 20%. Koncentrace závisí na tom, jak dlouho se 5-ALA aplikuje. Např. emulze s 2-5% 5-ALA aplikována po dobu 8-12 hodin, produkuje stejné množství PpIX, jako 20% 5-ALA aplikovaná 3 hodiny.

Jediné, oficiálně povolené přípravky obsahující 5-ALA jsou Levulan[®] Kerastick[®] (DUSA Pharmaceuticals, Inc.)⁸⁹ a Metvix[®] (methylester 5-ALA, Photocure ASA)⁹⁰. Některé kliniky si pro vlastní použití vyrábějí přípravky pro PDT sami, inkorporací esterů 5-ALA do krémů, častěji však do gelů.

Optimální doba lokální aplikace 5-ALA je 3-8 hodin. Po této době penetruje 5-ALA přes kůži do léze a začne biosyntéza PpIX. Penetrace 5-ALA do hlubších vrstev BCC může být zvýšena delším časem aplikace 5-ALA nebo přidáním DMSO do emulze⁹¹.

Obvykle se jako zdroje světla používá wolframová, halogenová nebo xenonová lampa nebo laser, vysílající světlo o vlnové délce přibližně 630nm¹⁵.

Zhojení léze po PDT obvykle nastává do 1-2 měsíců po léčbě¹⁵.

11.2 Použití PDT k léčbě lidského papillomaviru

PDT může být použita k léčbě i nemaligních onemocnění, jako je lidský papillomavirus (HPV). Kožní léze vyvolaná tímto virem se může projevit jako bradavice na chodidle, ruce nebo na genitáliích⁹².

Selektivní akumulace PpIX vzniklého z 5-ALA ve virem infikovaných buňkách umožní odlišit pozměněnou tkáň od okolní zdravé tkáně, která do PDT zůstane bez poškození.

Při fotodynamické terapii dojde k pozměnění obalu a nukleové kyseliny viru. To způsobí ztrátu jeho aktivity. Mechanismus PDT může spočívat v absorpci fotosenzitizéru virem, především vazbě na jeho DNA, což může podpořit lokální efekt fotochemicky generovaného singletového kyslíku⁹³. Další mechanismus se závislý na vazbě fotosenzitizéru na povrchu virové částice a snižuje tak jeho infektivitu v organismu. Pro HSV-1 byl použit jako fotosenzitizér amfifilní hlinitý dibenzodisulfoftalocyanin. Způsobil změny ve struktuře proteinů obalu viru, vedoucí k redukci infekivity⁹⁴.

Ve PDT používané deriváty hematoporfyrinu způsobí inhibici počátečního stádia infekčního procesu viru (omezí adhezi viru k hostitelské buňce a jeho následný průnik do buňky). Tento antivirový účinek HpD je důležitý pro inaktivaci intracelulárně lokalizovaných virů (HPV a HIV)⁹⁵.

11.3 Použití PDT k léčbě acne vulgaris

K experimentální léčbě akné byl použit Metvix[®] a krém obsahující 20% 5-ALA. Oba přípravky byli v množství přibližně 2g nanoseny na jednu polovinu obličeje dobrovolníků a místa aplikace byla na 3 hodiny přikryta nepropustnou náplastí a ozářena IR světlem. Léčba PDT trvala 12 týdnů. Po zhodnocení výsledků léčby acne vulgaris vyšli z testu oba přípravky se stejnou účinností celkového zlepšení (59%) a jen nepatrným procentuálním rozdílem ve zlepšení zánětlivých ložisek na kůži obličeje dobrovolníků⁹⁶.

11.4 Použití PDT k léčbě povrchových kožních infekcí

Při testování účinku PDT na dermatofyty a kvasinky se zjistilo, že jsou *in vitro* citlivé na podávání fotosenzitizerů. Byly použity PS ze tří chemických skupin: fenothiaziny, porfyrity, ftalocyaniny. PS po ozáření postrádaly genotoxickou a mutagenní aktivitu a působili selektivně, protože k usmrcení hub je potřeba menšího množství fotosenzitizeru než k destrukci keratinocytů. Úspěšnost zničení eukaryontní DNA u hub je redukována přítomností membrány, která kryje jádro a funguje jako bariéra pro vstup PS nebo vzniklých fotoproduktů do jádra⁹⁷.

Antimikrobiální fotodynamický efekt naprosto závisí na fyzikálních a chemických parametrech, jako např. absorpční maximum PS, intenzita absorpce a množství vzniklého singletového kyslíku⁹⁸.

11.4 Další možné užití na 5-ALA závislé PDT

Existují atraktivní možnosti využívající ALA k odhalení a léčbě maligních buněk vyskytujících se v krvi. Vysoká akumulace PpIX vzniklého z 5-ALA se vyskytuje u cirkulujících transformovaných buňkách⁹⁹. Průtoková cytometrie krve nebo kostní dřeně detekovala průkazně nižší koncentraci určitého typu maligních buněk, které byly odebrány od pacientů trpících rakovinou a *in vitro* inkubovány s 5-ALA. Postupně mohou být maligní buňky selektivně usmrceny dávkou světla před autotransplantací krve nebo kostní dřeně.

Mimo to je tento způsob možný pro fotoinaktivaci virů vyskytujících se v krevních produktech a parazitů v erytrocytech. ALA v kombinaci se světlem může být také využita pro diagnostické i terapeutické účely pro kardiovaskulární aplikaci¹⁰⁰.

V Česku se od roku 2006 na PDT speciálně zaměřuje Centrum fotonické medicíny 1. lékařské fakulty a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Od roku 1989 se terapie využívá i v klinické práci. Skupina odborníků pod vedením MUDr. Šmuclera využívá fotodynamickou terapii ve Všeobecné fakultní nemocnici a centru estetické medicíny Asklepion také v kosmetice pro estetické účely¹⁰¹. PDT se používá i na jiných pracovištích jako např.

v Institutu lékařské kosmetiky, s.r.o. centrum plastické a laserové chirurgie v Českých Budějovicích¹⁰² a na klinice kožních a pohlavních chorob ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové¹⁰³.

11.5 Porovnání ALA- PDT s tradiční léčbou

Obvykle výsledky PDT závisí na druhu a množství fotosenzitivního činidla absorbovaného tumorem, na vlnové délce, hloubce průniku světla do tkáně a dodané energii světlem. PDT je obvykle dosud i v dermatologii používána spíše v případě neúspěchu jiné léčby, než za metodu první volby pro pacienty s rakovinou. Pacienti často podstoupí rozmanité terapie, jako např. ionizační radiaci, operativní vyříznutí nádorové tkáně, kyretáž a jiné, před samotnou PDT. Naneštěstí u většiny pacientů tato předcházející léčba selže nebo se potíže po čase opět objeví.

Lokální aplikace 5-ALA-PDT má několik výhod oproti obvyklé léčbě. Je to metoda neinvazivní, má krátkou dobu následné fotosenzitivity kůže pacienta, metoda má výborné kosmetické výsledky a je pacienty dobře tolerována. Může být použita k léčbě četných povrchových lézí v krátké časové relaci, u pacienta, který odmítne chirurgický zákrok nebo má pacemaker či má sklony ke krvácivosti a také je-li léze zvláště umístěna, například v mukose dutiny ústní. Tato léčebná metoda může být používána opakovaně bez zvyšující se toxicity¹⁵.

12. ZÁVĚR

V bakalářské práci jsem se zabývala využitím fotodynamické terapie v dermatologii. V kapitole o používaných fotosenzitizérech jsem největší část věnovala 5-aminolevulinové kyselině, která je v této oblasti nejpoužívanější a z ní vzniklému protoporfytinu IX. Zmínila jsem její vlastnosti, farmakokinetiku a používané deriváty.

V další kapitole jsem se zaměřila na hlavní světelné zdroje používané ve PDT a vlnovými délkami vhodnými k absorpci PS.

Následující kapitoly jsem věnovala účinkům PDT na organismus a příkladům nové aplikace PDT v dermatologii.

Fotodynamická terapie je doposud považována spíše za experimentální, byť už poměrně rozšířenou, techniku. Bezpochyby je přínosná pro dermatologii k léčbě různých kožních onemocnění, a má významné výsledky i při použití v kosmetice.

Stále jsou vyvíjeny nové druhy fotosenzitizérů, majících výhodnější farmakokinetické a fotodynamické vlastnosti a poskytující větší efektivnost PDT, optimalizuje se doba aplikace i forma lékového podání. Snižují se vedlejší účinky terapie i náklady na léčbu.

Tato metoda najde zajisté v budoucnu využití i pro jiné terapeutické účely v mnoha lékařských odvětvích.

13. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ¹ Čihák, R. (1997) *Anatomie* 3, 559-571
Aeneis, H. (1996) *Anatomický obrazový slovník*, 390-395
- ² Juzeniene, A., Peng, Q., Moan, J. (2007) Milestones in the development of PDT and fluorescence diagnosis. *Photochem. Photobiol. Sci.* **6**, 1234-1245
- ³ Zimčík, P., Miletín, M. (2004) Fotodynamická terapie jako nová perspektivní metoda léčby nádorových onemocnění. *Čes. slov. Farm.* **53**, 219-224
- ⁴ Stapleton, M., Rhodes, L. E. (2003) Photosensitizers for photodynamic therapy of cutaneous diseases. *J. Dermatol. Treat.* **14**, 107
- ⁵ Donnelly R. F. et al. (2005) Drug delivery of aminolevulinic acid from topical formulations intended for photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **81**, 750-767
- ⁶ Calzavara-Pinton P.G., Venturini M., Sala R. (2005) A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **78**, 1-6
- ⁷ Santoro O. et al. (1990) Photodynamic therapy by topical meso-tetraphenylporphinesulfate tetrasodium salt administration in superficial basal cell carcinomas. *Cancer res.* **50**, 4501-3
- ⁸ Novartis [online] 2008 [cited 2008-08-23]. Available from: www.visudyne.com
- ⁹ Lui H., Hobbs L., Tope W.D., Lee P.K. et al. (2004) Photodynamic therapy of multiple nonmelanoma skin cancers with verteporfin and red light-emitting diodes - Two-year results evaluating tumor response and cosmetic outcomes. *Arch. Dermatol.* **140**, 26-32
- ¹⁰ Niels Bendsoe, Linda Persson, Ann Johansson (2007) Fluorescence monitoring of a topically applied liposomal temoporfin formulation and photodynamic therapy of nonpigmented skin malignancies. *J. Environ. Pathol., Toxicol. Oncol.* **26**, 117-126
- ¹¹ Colussi V.C., Feyes D. K., Mukhtar H. (2004) Perspectives of photodynamic therapy for skin diseases. *Skin Pharm. App. Physiol.* **11**, 336-346
- ¹² Milgrom, L., MacRobert, S. (1998). Light ahead. *Chem. Br.* **May**, 45-50

-
- ¹³ Moan J. (1986) Effect of bleaching of porphyrin sensitizers during photodynamic therapy. *Cancer Lett.* **33**, 54-53
- ¹⁴ Moan J. (1984). The photochemical yield of singlet oxygen from porphyrins in different states of aggregation. *Photochem. Photobiol.* **39**, 445-449
- ¹⁵ Peng Q., Warloe T., Berg K. et al. (1997) 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: clinical research and future challenges. *Cancer* **79**, 2282-2308
- ¹⁶ Projekt α [online] 2008. [cited 2008-08-23]. Available from: <http://projektafa.ic.cz/hemoglobin.htm>
- ¹⁷ Zimčik P., Miletín M. (2008). New Research: Photodynamic therapy. Dyes and Pigments, submitted.
- ¹⁸ Kennedy, J.C., Portiér, R.H. and Pross, D.C. (1990) Photodynamic therapy with exogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *J.Photochem. Photobiol. B: Biol.* **6**, 143-148
- ¹⁹ De Rosa, F. S. and Bentley, M. V. L. B. (2000) Photodynamic therapy of skin cancers: sensitizers, clinical studies and future directives. *Pharm. Res.* **17**, 1447-1455
- ²⁰ Berg, K., H. Angoly, O. Bech and J. Moan (1996) The influence of iron chelators on the accumulation of protoporphyrin IX in 5-aminolevulinic acid-treated cells. *Br. J. Cancer* **74**, 688-697
- ²¹ Kaliszewski, M., Kwasny, M., Kamiski, J. et al. (2004). The stability of 5-aminolevulinic acid and its ester derivatives. *Acta Pol. Pharm. Drug Res.* **61(1)**, 9-15
- ²² Bunke A., Zebre O. (2000) Degradation mechanism and stability of 5-aminolevulinic acid. *J. Pharm. Sci.* **89(10)**, 1335-41
- ²³ Kaliszewsky M., Juzeniene A. (2005) Formation of protoporphyrin IX from carboxylic- and amino- derivatives of 5-aminolevulinic acid. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2**, 129-134
- ²⁴ Nardet C., Stauffer F., Henz M. E., et al. (2000). Inhibition of Escherichia Coli porphobilinogen synthase using analogs of postulated intermediates. *Chem. Biol.* **7(3)**, 143-8
- ²⁵ Frere F., Schubert W. D., Stauffer E., et al. (2002). Structure of porphobilinogen synthase from Pseudomonas aeruginosa in complex with

-
- 5-aminolevulinic acid suggests a double Schiff base mechanism. *J. Mol. Biol.* **320(2)**, 237-47
- ²⁶ Lopez R. F., Lange N., Guy R., Bentley M. W. (2004). Photodynamic therapy of skin Cancer: controlled drug delivery of 5-ALA and its esters. *Adv. Drug Del. Rev.* **56**,77-94
- ²⁷ Milkvy P., Messmann H., Regula J., et al. (1995) Sensitization and photodynamic therapy of gastrointestinal tumors with 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrinIX:a pilot study, *Neoplasma* **42**, 109-13
- ²⁸ Mustajoki P., Timonen K., Gorchein A. (1992) Sustained high plasma 5-aminolaevulinic acid concentration in a volunteer, no porphyric symptoms. *Eur. J. Clin. Invest.* **22**, 407-411
- ²⁹ Regula J., MacRobert A.J., Gorchein A. et al. (1995) Photosensitization and photodynamic therapy of oesophageal, duodenal, and colorectal tumors using 5-aminoaevulinic acid induced protoporphyrin IX: a pilot study. *Gut* **36**, 67-75
- ³⁰ Gorchein A., Webber R. (1987) 5-Aminolevulinic acid in plasma, cerebrospinal fluid, saliva and erythrocytes: studies in normal, uraemic and porphyric subjects. *Clin. Sci.* **72**, 103-12
- ³¹ Mustajoki P., Kostelo P et al. (1976) Hereditary hepatic porphyrias in Finland. *Acta Med. Scand.* **200**,171-8
- ³² Soler A. M., Warloe T., Berner A. (2001) A follow-up study of recurrence and cosmesis in completely responding superficial and nodular basal cell carcinomas treated with methyl 5-aminolevulinate-based photodynamic therapy alone with prior curettage. *Br. J. Dermatol.* **145**, 467-471
- ³³ Henderson B. W., Vaughan L., Bellnier D.A. et al. (1995) Photosensitization of murine tumor, vasculature and skin by using 5-aminolevulinic acid induced porphyrin. *Photochem. Photobiol.* **62**, 270-9
- ³⁴ Webber J., Kessel D., Fromm D. et al. (1997) Plasma levels of protoporphyrin IX in human after administration of 5-ALA. *J. Photochem. Photobiol. B* **37**, 151-3
- ³⁵ Pottier R. H., Chow Y. F. A. et al. (1989). Non-invasive technique for obtaining fluorescence excitation and emission spectra in vivo. *Photochem. Photobiol.* **44**, 679-687

-
- ³⁶ Peng Q., Evensen J.F., Rimington C., et al. (1987). Comparison of different photosensitizing dyes with respect to uptake by C3H-tumors and tissue of mice. *Cancer Lett.* **36**, 1-10
- ³⁷ Kennedy J. C., Pottier R. H., Pross D. C. (1992). Endogenous protoporphyrin IX: a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B.* **14**, 275-92
- ³⁸ Wooten R. S., Smith K. C. et al. (1988). Prospective study of cutaneous phototoxicity after systemic hematoporphyrin derivatives. *Lasers Surg Med.* **8**, 294-300
- ³⁹ Peng Q., Berg K., Moan J., et al. (1997). 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: principles and experimental research. *Photochem. Photobiol.* **65**, 235-251
- ⁴⁰ Moan J., Streckyte G., Bagdonas S., et al. (1997) Photobleaching of protoporphyrin IX in cells incubated with 5-ALA. *Int. J. Cancer* **70**, 90-97
- ⁴¹ Berg K., Angoly H., Bench O., Moan J. (1996). The influence of iron chelators on the accumulation of protoporphyrin IX in 5-aminolevulinic acid-treated cells. *Br. J. Cancer* **74**, 688-697
- ⁴² Casas A., Fukuda H., Del A. M., Batlle C. (1999). Tissue distribution and kinetics of endogenous porphyrins synthesized after topical application of ALA in different vehicles. *Br. J. Cancer* **81**, 13-18
- ⁴³ Curnow A., B. W. McIlroy (1998) Enhancement of 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy in normal rat colon using hydroxypyridinone iron-chelating agents. *Br. J. Cancer* **78**, 1278-1282
- ⁴⁴ Peng Q., Berg K. (1997) 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy of skin cancers: principles and experimental research. *Photochem. Photobiol.* **65**, 235-251
- ⁴⁵ Galbraith R. A., Sassa S., Kappas A. (1986). Induction of haem synthesis in Hep G2 human hepatoma cells by dimethyl sulfoxide. *Biochem. J.* **237**, 597-600
- ⁴⁶ Fujita H., Yamamoto M., Yamagami T. et al. (1991). Sequential activation of hemes for heme pathway enzymes during erythroid differentiation of mouse friend virus-transformed erythroleukemia cells. *Biochem. Biophys. Acta* **1090**, 311-316

-
- ⁴⁷ Casas A., Fukuda H., Di Venosa G. et al. (2000) The influence of the vehicle on the synthesis of porphyrins after topical application of 5-aminolevulinic acid. Implications in cutaneous photodynamic sensitization. *Br. J. Dermatol.* **143**, 564-572
- ⁴⁸ Soler A. M., Warloe T., Tausjo J., Berner A. (1999) Photodynamic therapy by topical aminolevulinic acid, dimethyl sulfoxide and curettage in nodular basal cell carcinoma: a one-year follow-up study. *Acta Dermatol. Venerol.* **79**, 204-206
- ⁴⁹ Malik Z., Kostenich H., Roitman L. et al. (1995) Topical application of 5-aminolevulinic acid, DMSO and EDTA: protoporphyrin IX accumulation in skin and tumours of mice. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **28**, 213-218
- ⁵⁰ Brancalion L., Moseley H. (2002). Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers Med. Sci.* **17**, 173-186
- ⁵¹ Mang T. S. (2004). Lasers and light sources for PDT: past, present and future. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **1**, 43-48
- ⁵² Sterenberg H.J., van Gemert M.J. (1996) Photodynamic therapy with pulsed light sources: a theoretical analysis. *Phys. Med. Biol.* **4**, 835-849
- ⁵³ Panjehpour M., Overholt B. F., Haydek J. M. (2000). Light sources and delivery device for photodynamic therapy in the gastrointestinal tract. *Gastrointest. Endosc. Clin. N. Am.* **10**, 513-532
- ⁵⁴ Waldow S.M., Dougherty T.J. (1984) Interaction of hyperthermia and photoradiation therapy. *Radiat. Res.* **97**, 380-385
- ⁵⁵ Streckyte G., Berg K., Moan J. (1993) Photomodification of ALA-induced protoporphyrin IX in cells in vitro. *Proc. SPIE* **2325**, 58-65
- ⁵⁶ Gerweck L. E., Seetharaman K. (1996) Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: potential exploitation for the treatment of cancer. *Cancer Res.* **56**, 1194-1198
- ⁵⁷ Korbelik M., Krosi G., Olive P. L., Chaplin D. J. (1991) Distribution of Photofrin between tumour cells and tumour associated macrophages. *Br. J. Cancer* **64**, 508-512
- ⁵⁸ Maziere J. C., Morliere P., Sanktus R. (1991) The role of the low density lipoprotein receptors pathway in the delivery of lipophilic photosensitizers

-
- in the photodynamic therapy of tumours. *J. Photochem. Photobiol. B.* **8**, 351-360
- ⁵⁹ Jain R. K. (1987). Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. *Cancer Res.* **47**, 3039-3051
- ⁶⁰ Wohrle D., Hirth A., Shopova M. et al. (1998) Photodynamic therapy of cancer : second and third generations of photosensitizers. *Russ. Chem. Bull.* **47**, 807-816
- ⁶¹ Pourzand C., Reelfs O., Kvam E., Tyrrel R. M. (1999) The iron regulatory protein can determine the effectiveness of 5-aminolevulinic acid in inducing protoporphyrin IX in human primary skin fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* **112**, 419-425
- ⁶² Collaud S., Juzeniene A., Moan J., Lange N. (2004) On the selectivity of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX formation. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* **4**, 301-316
- ⁶³ Gomer C. J., Luna M., Ferrari A. et al. (1996) Cellular targets and molecular response associated with photodynamic therapy. *J. Clin. Laser Med. Surg.* **14**, 315-321
- ⁶⁴ De Geoid A. F. et al. (1975) Photodynamic effects of protoporphyrin on the architecture of erythrocyte membranes in protoporphyrinemia and in normal red blood cells. *Clin. Chim. Acta* **62**, 287-292
- ⁶⁵ Berg K., Moan J., et al. (1990) Cellular inhibition of microtubule assembly by photoactivated sulfonated meso-tetraphenylporphyrines. *Int. J. Radiat. Biol.* **58**, 475-487
- ⁶⁶ Berg K., Moan J. (1992) Mitotic inhibition by phenylporphyrines and tetrasulphonated aluminium phthalocyanine in combination with light . *Photochem. Photobiol* **56**, 333-339
- ⁶⁷ Evensen J. F., Moan J. (1982) Photodynamic action and chromosomal damage: a comparison of haematoporphyrin derivate (HpD) and light with X-irradiation. *Br. J. Cancer* **45**, 456-465
- ⁶⁸ Fingar V. H. (1996) Vascular effect of photodynamic therapy. *J. Clin. Laser Med. Surg.* **14**, 323-328

-
- ⁶⁹ Oleinick N. L., Morris R. L., Belichenko I. (2002) The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem. Photobiol. Sci.* **1**, 1-21
- ⁷⁰ Almeida R. D., Kanafas B. J. et al. (2004) Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochim. Biophys. Acta* **1740**, 59-86
- ⁷¹ Kessel D., Luo Y. (1996) Photodynamic therapy.: a mitochondrial inducer of apoptosis. *Cell Death Differ.* **6**, 28-35
- ⁷² Moan J., Berg K., Kvam E. et al. (1989) Intracellular localization of photosensitizers. *Ciba Found. Symp.* **146**, 95-107
- ⁷³ Berg K., Selbo P.K., Prasmickaite L. et al. (1999) Photochemical internalization: a novel technology for delivery of macromolecules into cytosol. *Cancer Res.* **59**, 1180-1183
- ⁷⁴ Canti G., Ricci L., Cantone V. et al. (1983) Hematoporphyrin derivate photoradiation therapy in murine solid tumors. *Cancer Lett.* **21**, 233-237
- ⁷⁵ Castano A. P., Mroz P., Hamblin M. R. (2006) Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 535-545
- ⁷⁶ Wike-Hooley J., Haveman J. and Reinhold H. S. (1984) The relevance of tumour pH to the treatment of malignant disease. *Radiother. Oncol.* **2**, 343-366
- ⁷⁷ Tyld L., M. W. R. Reed and Brown N. J. (1998) The influence of hypoxia and pH on aminolevulinic acid-induced photodynamic therapy in bladder Cancer cells in vitro. *Br. J. Cancer* **77**, 1621-1627
- ⁷⁸ Rud E., Gederaas O., (2000) 5-Aminolevulinic acid, but not 5-aminolevulinic acid esters, is transported into adenocarcinoma cells by system BETA transporters. *Photochem. Photobiol.* **7**, 640-647
- ⁷⁹ Fuchs C., Riesenberger R., Siegert J., Baumgartner R. (1997) pH dependent formation of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in fibrosarcoma cells. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **40**, 49-54
- ⁸⁰ Schick E., Kaufmann R., Ruck A. et al. (1995) On the effectiveness of photodynamic therapy. *Acta Dermatol. Venereol.* **75**, 276-279

-
- ⁸¹ Novo M., Huttman G., Diddens H. (1996) Chemical instability of 5-aminolevulinic acid used in the fluorescence diagnosis of bladder tumours. *Photochem. Photobiol. B: Biol.* **34**, 143-148
- ⁸² De Bruijn H. S., Van der Veen N. et al. (1999) Improvement of systemic 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in vivo using light fraction with a 75-minute interval. *Cancer Res.* **59**, 901-904
- ⁸³ Juzenas P., Sorensen R., Iani V., Moan J. (1999) Uptake of topically applied 5-aminolevulinic acid and production of protoporphyrin IX in normal mouse skin: dependence on skin temperature. *Photochem. Photobiol.* **69**, 478-481
- ⁸⁴ Stapleton M., Rhodes L. E. (2003) Photosensitizers for photodynamic therapy of cutaneous disease, *J. Dermatol. Treat.* **14**, 108-110
- ⁸⁵ Moan J., Sommer S. (1985) Oxygen dependence of the photosensitizing effect of hematoporphyrin derivative in NHIK 3025 cells. *Cancer Res.* **45**, 1608-1610
- ⁸⁶ Miller S.J.(1991) Biology of basal cell carcinoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* **24**, 161-175
- ⁸⁷ Emmett A. J. (1990) Surgical analysis and biological behaviour of 2277 basal cell carcinomas. *Aust. N. Z. J. Surg.* **60**, 855-63
- ⁸⁸ Dougherty T. J. (1986) Photosensitization of malignant tumors. *Semin. Surg. Oncol.* **2**, 24-37
- ⁸⁹ DUSA Pharmaceuticals, Inc. [online]. 2008 [cited 2008-08-23]. Available from: www.dusapharm.com
- ⁹⁰ Photocure [online]. 2008 [cited 2008-08-23]. Available from: www.photocure.com
- ⁹¹ Peng Q., Warloe T. (1995) Distribution of 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins in noduloulcerative basal cell carcinoma. *Photochem. Photobiol.* **62**, 906-13
- ⁹² Szeimies R. M. (2003) Photodynamic therapy for human papilloma virus-related diseases in dermatology. *Med. Laser Appl.* **18**, 107-116
- ⁹³ Specht K. G. (1994) The role of DNA damage in PM2 viral inactivation by methylene blue photosensitization. *Photochem. Photobiol.* **59**, 506-514

-
- ⁹⁴ Smetana Z., Malik Z., Orenstein A. (1997) Treatment of viral infections with 5-aminolevulinic acid and light. *Laser Surg. Med.* **21**, 351-358
- ⁹⁵ Ben-Hur E., Oetjen J., Horowitz B. (1997) Silicon phthalocyanine Pc 4 and red light cause apoptosis in HIV-infected cells. *Photochem. Photobiol.* **65**, 456-460
- ⁹⁶ Wiegekk S. R., Wulf H. Ch. (2006) Photodynamic therapy of acne vulgaris using 5-aminolevulinic acid versus methylaminolevulinate. *J. Am. Acad. Dermatol.* **54**, 647-651
- ⁹⁷ Zeina B. et al. (2001) Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. *Br. J. Dermatol.* **144**, 274-278
- ⁹⁸ Calzavara-Pinton P. G. et al. (2005) A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infection of the skin. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **75**, 1-6
- ⁹⁹ Malik Z., Ehrenberg B. (1989) Inactivation of erythrocytic, lymphocytic and myelocytic leukemic cells by photoexcitation of endogenous porphyrins. *J. Photochem. Photobiol. B.* **4**, 195-205
- ¹⁰⁰ Nyamekye I. (1996) Vascular and other non-tumor application of photodynamic therapy. *Lasers Med. Sci.* **11**, 3-10
- ¹⁰¹ iDnes.cz [online] 2007 [cited: 2008-08-24]. Available from: http://zdravi.idnes.cz/s-fotodynamickou-terapie-jsou-jizvy-minulosti-fru-/zdravi.asp?c=A070222_183800_zdravi_ves
- ¹⁰² Institut lékařské kosmetiky, s.r.o. Centrum laserové a plastické chirurgie [online] 2008 [cited: 2008-08-26] Available from: <http://www.ilc.cz/?id=kontakt>
- ¹⁰³ Fakultní nemocnice v Hradci Králové [online] 2008 [cited: 2008-08-26] Available from: <http://www.fnhk.cz/cze/index.php?dir=42&id=973>