

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOFYZIKY



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vliv hypertermie na cytotoxickou účinnost metalofarmak

Vypracovala: Anna Klimek

Studijní obor: Biofyzika

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Jitka Prachařová, Ph.D.

Olomouc 2017

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce, Mgr. Jitce Prachařové, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady, kritické připomínky, velice vstřícný přístup a trpělivost, se kterou se mi věnovala během psaní. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Alexandře Husičkové, Ph.D. za pomoc s formálními náležitostmi.

Tato práce byla podpořena studentským grantovým projektem Univerzity Palackého v Olomouci (IGA_PřF_2017_017).

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením
Mgr. Jitky Prachařové, Ph.D. a za použití literatury uvedené v závěru práce.

V Olomouci dne

SOUHRN

Metalofarmaka jako cisplatina a její deriváty jsou často používána k léčbě celé řady nádorových onemocnění. Cytotoxická účinnost těchto látek na nádorové buňky může být zvýšena kombinací s různými fyzikálními faktory (světlo, teplo, ionizující záření). Do popředí zájmu se v poslední době dostává použití platinových komplexů v kombinaci s hypertermií. Hypertermie umožňuje zvýšení aktivity těchto látek přímo v oblasti nádoru. Obzvláště účinnou se ukázala být zejména regionální hypertermie a hypertermická perfuze. V klinických studiích jsou zkoumány tyto postupy v kombinaci s platnatými sloučeninami běžně používanými při klasické chemoterapii. Ve fázi testování na buněčných kulturách jsou pak nová analoga platinových metalofarmak. Vyvíjeny jsou také látky na bázi dalších těžkých kovů (Ir, Ru, Os, Rh) nebo např. deriváty klinicky neúčinné transplatiny, které při použití v kombinaci s hypertermií vykazují cytotoxický účinek na nádorových buňkách.

Předkládaná bakalářská práce je zaměřena na hypertermii, tedy léčebný postup využívající tepla, a hypertermii v kombinaci s chemoterapií. V první části byla popsána historie hypertermie, její typy, principy ohřevu, mechanismus účinku a hypertermie v kombinaci s protinádorovými léčivy a její využití v klinické praxi. Dále byl v této práci testován vliv hypertermie na cytotoxickou účinnost dvou platnatých komplexů na buňkách lidského adenokarcinomu děložního čípku. Konkrétně vliv na účinnost již mnohokrát testovaného a v klinické praxi běžně využívaného metalofarmaka – cisplatiny a také nového komplexu *trans*-[PtCl₂(NH₃)(1-methyl-7-azaindol)]. K ohřevu buněčné kultury byly použity teploty 37 °C, 41 °C a 43 °C. Bylo zjištěno, že kombinace ošetření buněčné kultury platinovým komplexem a zvýšené teploty ovlivňuje cytotoxickou aktivitu u obou testovaných látek. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití teploty 43 °C, kdy komplex *trans*-[PtCl₂(NH₃)(1-methyl-7-azaindol)] byl účinnější než cisplatina.

SUMMARY

Metalloodrugs such as cisplatin and its derivatives are used in the treatment of a variety of human cancer. The cytotoxic activity of these agents on tumor cells can be enhanced by combination of the treatment with various physical factors (light, heat, ionizing radiation). Platinum complexes in combination with hyperthermia recently gain more interest. Hyperthermia allows an increase of activity of these substances directly in the target tumor region. Regional hyperthermia and hyperthermal perfusion are particularly effective in this case. The above mentioned procedures in combination with platinum compounds commonly used for cyclic chemotherapy are in the phase of clinical trials. Additionally, new analogs of platinum metalloodrugs are experimentally tested. Moreover, agents based on the other heavy metals (Ir, Ru, Os, Rh) and derivatives of clinically ineffective transplatin are developed and its cytotoxicity in tumor cell lines in combination with hyperthermia is being tested.

Theoretical part of this bachelor thesis describes hyperthermia (healing process using heat), and hyperthermia in combination with chemotherapy. Special focus is given to history of hyperthermia treatment, its types, principles of heating, mechanism of action, combination of hyperthermia with antitumor drugs and its use in clinical practice. In the experimental part the cytotoxic activity of two platinum complexes in combination with hyperthermia in human cervix adenocarcinoma cell line was investigated. Cisplatin, the metalloodrugs which has been tested for many times and which is often used in clinical practice, and new complex *trans*-[PtCl₂(NH₃)(1-methyl-7-azaindol)], were used for the experiments. Tested temperatures for heating cell culture were 37 °C, 41 °C and 43 °C. It was found that the cytotoxic activity of both tested substances can be potentiated by combination of treatment with hyperthermia. The best results were obtained for complex *trans*-[PtCl₂(NH₃)(1-methyl-7-azaindol)] using temperature 43 °C, when this compound was more potent than cisplatin.

SEZNAM ZKRATEK

ATB	antibiotika
cDDP	cisplatina, <i>cis</i> -diamindichloroplatnatý komplex
CT	chemoterapie (<i>Chemotherapy</i>)
<i>D</i>	tepelná dávka (<i>Thermal Dose</i>)
dH ₂ O	deionizovaná voda
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FBS	fetální hovězí sérum (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HeLa buňky	buňky lidského adenokarcinomu děložního čípku
HSP	proteiny tepelného šoku (<i>Heat Shock Protein</i>)
HT	hypertermie (<i>Hyperthermia</i>)
IC ₅₀	<i>The Half Maximal Inhibitory Concentration</i>
komplex 1	<i>trans</i> -[PtCl ₂ (NH ₃)(1-methyl-7-azaindol)]
LHT	lokální hypertermie (<i>Local Hyperthermia</i>)
MRT	magnetická rezonanční tomografie (<i>Magnetic Resonance Imaging</i>)
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid, bromthiazolová modř
NK buňky	<i>Natural Killer Cells</i>
PBS	fosfátový pufr (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PDT	fotodynamická terapie (<i>Photodynamic Therapy</i>)

RHT	regionální hypertermie (<i>Regional Hyperthermia</i>)
TID	teplotní isoefektní dávka (<i>Thermal Isoeffect Dose</i>)
WBH	celotělová hypertermie (<i>Whole Body Hyperthermia</i>)

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	3
2.1 Metalofarmaka a fyzikální faktory ovlivňující jejich účinek	3
2.2 Hypertermie	7
2.2.1 Historie hypertermie	9
2.2.2 Typy hypertermie.....	11
2.2.3 Principy ohřevu.....	16
2.2.4 Mechanismus účinku hypertermie	17
2.3 Hypertermie a protinádorová léčiva	22
2.4 Klinické využití hypertermie	24
3. CÍL PRÁCE.....	26
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
4.1 Biologický materiál a chemikálie	27
4.2 Platinové komplexy	27
4.3 Roztoky.....	28
4.4 Přístroje.....	28
4.5 Metody.....	28
4.5.1 Kultivace buněk	28
4.5.2 Nasazení buněk na experiment	29
4.5.3 Ošetření buněk testovanými látkami.....	29
4.5.4 Ohřev buněčné kultury.....	30
4.5.5 Test cytotoxicity.....	30
5. VÝSLEDKY	32
6. DISKUSE	36
7. ZÁVĚR.....	39
8. SEZNAM LITERATURY	40

9. SEZNAM OBRÁZKŮ	43
10. SEZNAM TABULEK	44

1. ÚVOD

Mezi nejčastější onemocnění dnešní doby zcela určitě patří nádorová onemocnění. Světová zdravotnická organizace (WHO = *World Health Organization*) označila zhoubné nádory za hlavní příčinu úmrtí na světě. V roce 2008 bylo zaznamenáno 7,6 miliónů úmrtí na následky nádorových onemocnění (kolem 13 % všech úmrtí) (Mjos a Orvig 2014), v roce 2012 pak 8,2 miliónů úmrtí (Sethi a Chakarvarti 2015). Pro rok 2030 se počet těchto úmrtí odhaduje na více než 13,1 miliónů (Mjos a Orvig 2014).

K léčbě nádorových onemocnění se používá mnoho osvědčených léčebných postupů. Mezi ty, které se snaží o celkové vyléčení pacienta (tzv. kurativní), patří především chirurgické zákroky, radioterapie (ozařování) nebo chemoterapie. Někdy se využívá hormonální terapie, imunoterapie, genová terapie nebo protonová léčba. Často se kombinuje více metod, ať už použitých postupně nebo souběžně (např. chemoradioterapie). U onkologických pacientů, u kterých je nemoc již ve velmi pokročilém stavu a kurativní metody nemohou být použity, přicházejí na řadu různé paliativní metody. Tyto metody mají za cíl zlepšení kvality života pacienta, nejčastěji symptomatickou terapií, která pomáhá ulevit od bolesti. Existují rovněž alternativní metody, jejichž efektivita však nikdy nebyla prokázána žádnou studií. Kombinace alternativní léčby s klasickou tak může způsobit oslabení klasické léčby nebo ji naopak může podpořit.

K jedné z nejčastějších kurativních metod v léčbě nádorových onemocnění, chemoterapii, se používají cytostatika, mezi která patří například metalofarmaka. Jedná se o léčiva obsahující jeden nebo více atomů těžkých kovů. Kovy hrají důležitou roli v biologických procesech a byly používány k léčbě mnoha onemocnění již ve starověkých civilizacích (Mjos a Orvig 2014). Mezi metalofarmaka nejčastěji využívaná v klinické praxi patří například cisplatina (*cis*-diamindichloroplatinatý komplex) a další léčiva na bázi platiny. Ve fázi testování jsou pak také látky s protinádorovým účinkem na bázi dalších těžkých kovů. Platinová léčiva se v dnešní době používají k léčbě mnoha lidských malignit. Úspěšnost těchto látek je však často omezena jejich nepříznivými vedlejšími účinky na lidský organismus a vrozenou nebo získanou rezistencí nádorových buněk k daným léčivům. Z těchto důvodů jsou stále vyvíjena nová protinádorová léčiva. Často se jedná o deriváty cisplatiny, kdy se například

jedna nebo obě aminové skupiny nahrazují jinými N-donorovými ligandy. Tyto ligandy mohou ovlivnit farmakologické chování léku (akumulaci v buňkách, distribuci, aktivaci, vazbu na DNA a další biomakromolekuly a buněčné reakce na poškození DNA) modulací jeho biologických vlastností (Pracharova a kol. 2015).

V současnosti využívají lékaři a vědci ke zvýšení efektivity léčby nádorových onemocnění rovněž nejrůznější fyzikální faktory, které ovlivňují účinek léčiv při chemoterapii. Mezi tyto faktory patří mezi jinými světlo, ionizující záření nebo teplo. Teplo vyvolává zvýšení teploty celého organismu nebo jeho částí, čehož se využívá při hypertermii jako léčebném postupu, zvyšujícím účinnost jiných kurativních metod.

Předkládaná bakalářská práce se zabývá především hypertermií v kombinaci s platinovými metalofarmaky. V teoretické části práce je přehledně shrnuta historie hypertermie, typy hypertermie, principy ohřevu cílového místa, mechanismus účinku hypertermie a využití hypertermie v klinické praxi. V rámci experimentální části bakalářské práce byl testován vliv hypertermie na cytotoxickou účinnost cisplatiny a dále nového platnatého komplexu *trans*-[PtCl₂(NH₃)-1-methyl-7-azaindol] na buňkách lidského adenokarcinomu děložního čípku.

2. TEORETICKÁ ČÁST

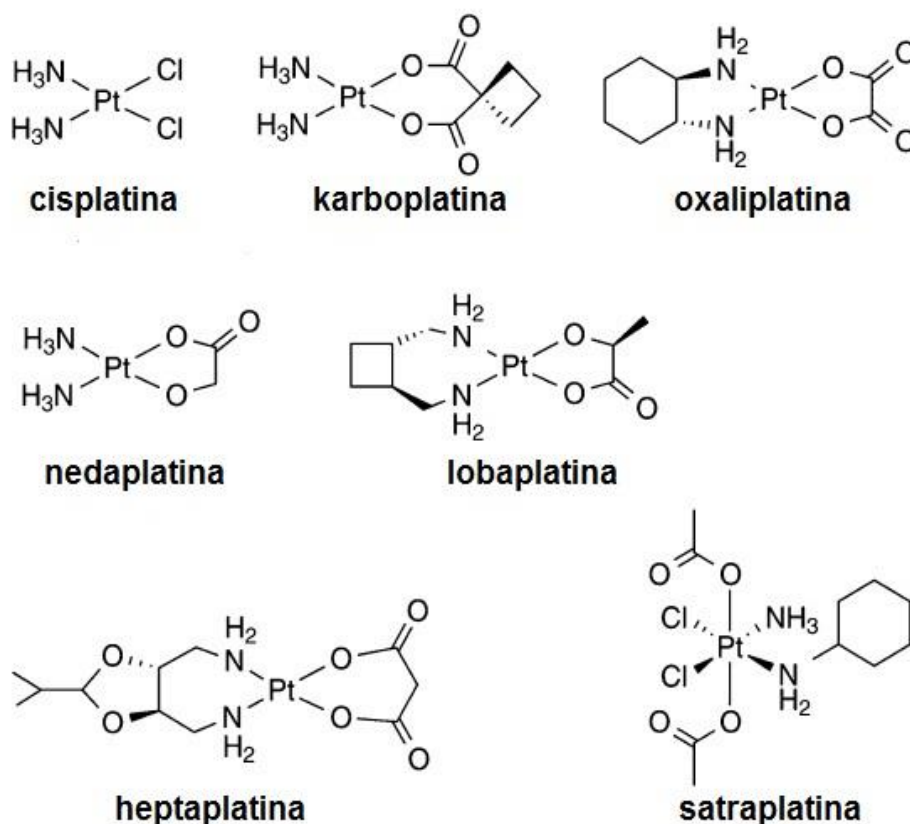
2.1 Metalofarmaka a fyzikální faktory ovlivňující jejich účinek

Metalofarmaka jsou v dnešní době používána především pro terapeutické účely. Mezi terapeutická metalofarmaka patří např. protinádorová, antimikrobiální, antiparazitární, antivirová, antiartritidní a antidiabetická metalofarmaka, metalofarmaka pro léčbu kardiovaskulárních nebo gastrointestinálních poruch a některá psychofarmaka. Radiofarmaka obsahují radioaktivní izotopy kovů a používají se např. jako kontrastní činidla při jednofotonové emisní výpočetní tomografii, zobrazovací magnetické rezonanci nebo pozitronové emisní tomografii (Mjos a Orvig 2014).

Nejvýznamnějším a nejpoužívanějším metalofarmakem v léčbě nádorových onemocnění je cisplatina (cDDP, *cis*-diamindichloroplatnatý komplex). Cisplatina byla poprvé syntetizována Peyronem v roce 1844, její protinádorové účinky však byly objeveny až na Michiganské státní univerzitě v roce 1965 Rosenbergem a jeho spolupracovníky, když studovali vliv elektrického proudu na bakterii *Escherichia coli*. Bylo zjištěno, že cDDP způsobuje inhibici dělení buněk. Toto první protinádorové terapeutikum na bázi kovu bylo dále zkoumáno, patentováno a v roce 1978 bylo schváleno FDA (*Food and Drug Administration*, úřad pro kontrolu potravin a léčiv v USA) pro použití v lékařství. Cisplatina je dodnes jedním z nejúspěšnějších terapeutických metalofarmak používaných samostatně nebo v kombinaci s jiným léčebným postupem. Je např. součástí standardní léčby proti mnoha formám nádorových onemocnění – po počátečním chirurgickém odstranění maligní tkáně pacient podstupuje více cyklů infuzí cDDP (Mjos a Orvig 2014).

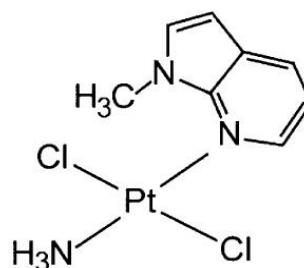
Nevýhodou cDDP jsou její vedlejší účinky projevující se nevolností nebo zvracením pacienta. Tyto vedlejší účinky jsou způsobeny necíleným účinkem cDDP, kdy tato látka působí na všechny rychle se dělící buňky v těle (tedy i na ty zdravé). Cisplatina také vyvolává neurotoxicitu (poškození nervového systému), nefrotoxicitu (poškození ledvin) nebo ototoxicitu (poškození struktur vnitřního ucha). Kvůli mnoha vedlejším účinkům cDDP jsou dodnes syntetizována nová protinádorová metalofarmaka na bázi platiny, např. oxaliplatina (Eloxatin), karboplatina (Paraplatin), nedaplatina, lobaplatina, heptaplatina, satraplatina a další. Některá z nich (např. karboplatina a oxaliplatina) již byla schválena FDA a jsou běžně používána v klinické praxi při chemoterapii, jiná

jsou teprve testována v klinických studiích. Strukturální vzorce vybraných metalofarmak na bázi platiny jsou zobrazeny na obrázku č. 1.



Obrázek č. 1 Strukturální vzorce metalofarmak na bázi platiny (převzato a upraveno dle Mjos a Orvig 2014).

Mezi nová metalofarmaka by mohla patřit také mononukleární sloučenina na bázi Pt(II) – *trans*-[PtCl₂(NH₃)-1-methyl-7-azaindol] (pro účely této bakalářské práce dále označovaná jako komplex **1**), která je zatím testována *in vitro*. Komplex **1** vznikl substitucí aminové skupiny v transplatině (jinak protinádorově neúčinné) ligandem 1-methyl-7-azaindol (N-donorový heterocyklus). Základní mechanismus biologického působení komplexu **1** je poněkud odlišný od cDDP, což umožňuje překonání mechanismů způsobujících rezistenci u cDDP (Pracharova a kol. 2015). Strukturální vzorec komplexu **1** je zobrazen na obrázku č. 2.



Obrázek č. 2 Strukturální vzorec *trans*-[PtCl₂(NH₃)-1-methyl-7-azaindol] (převzato z Pracharova a kol. 2015).

Klinickými testy rovněž prochází liposomální nanočásticové formulace cDDP (Lipoplatin) nebo oxaliplatiny (Lipoxal), které vykazují značné snížení závažných nežádoucích účinků a umožňují lepší využití protinádorové aktivity platiny (Mjos a Orvig 2014). Ne všechny syntetizované látky na bázi platiny však mají protinádorové účinky, některé jsou neúčinné, např. transplatina – izomer cDDP (Pracharova a kol. 2015; Pracharova a kol. 2016). V poslední době se stále častěji ukazuje, že v protinádorové terapii by mohly najít uplatnění také látky na bázi jiných těžkých kovů. Syntetizovány a testovány jsou např. komplexy iridia, ruthenia, osmia, rhodia nebo železa (Mjos a Orvig 2014).

Během rozsáhlých výzkumů bylo zjištěno, že účinek některých metalofarmak může být ovlivněn různými fyzikálními faktory, např. působením tepla, světla nebo ionizujícího záření. V této kapitole je blíže popsán vliv světla a ionizujícího záření na účinnost vybraných komplexů kovů. Předkládaná práce je zaměřena především na vliv tepla na účinnost metalofarmak, proto je této problematice dále věnována samostatná kapitola 2.3 Hypertermie a protinádorová léčiva.

Fotochemoterapeutická metalofarmaka

Fotoaktivace platinových léčiv by podle nedávného výzkumu mohla být jedním ze slibných přístupů zlepšujících farmakologické vlastnosti metalofarmak, zejména zvýšení selektivity pro nádorové buňky. Značné zvýšení aktivity metalofarmak díky ozařování může umožnit podávání mnohem nižších dávek těchto léčiv, než je potřeba pro konvenční terapii (bez ozáření). To znamená, že mnohým omezujícím vedlejším účinkům běžné chemoterapie by bylo možné se vyhnout rovněž díky aplikaci ozařování pouze na nádorové tkáni (Pracharova a kol. 2016).

Bylo prokázáno, že biologické působení některých již běžně používaných metalofarmak, např. cDDP, není významně ovlivněno ozářením. Naopak u derivátů cDDP obsahujících 7-azaindolové ligandy může být cytotoxicita po ozáření UVA nebo viditelným světlem výrazně zvýšena. Dalšími příklady protinádorových fotoaktivovatelných komplexů platiny jsou trifenylamin modifikované platino-diiminové komplexy ozářené červeným světlem nebo léčiva na bázi platiny (IV) obsahující azidové ligandy aktivované UVA nebo viditelným světlem (Pracharova a kol. 2016).

Jedním z moderních postupů léčby nádorových onemocnění využívajících kombinace světla a světlocitlivé látky je fotodynamická terapie (PDT = *Photodynamic Therapy*). PDT je používána jako dvoustupňová léčba, která ale prozatím v běžné klinické praxi nevyužívá metalofarmaka (ta jsou zatím stále testována). Princip PDT spočívá v tom, že se nejdříve lokálně nebo intravenózně podává fotosenzitizační činidlo a po několika hodinách nebo dnech (v závislosti na druhu léčiva a cílové ploše, která má být léčena) je pacient ozáren světlem o specifické vlnové délce. Pro systémové použití v PDT byla doposud FDA schválena dvě fotosenzitizační činidla, Photofrin a Foscan. Tyto látky fungují po ozáření v organismu jako katalyzátory, kdy dochází k transportu světelné energie prostřednictvím těchto látek na různé biologické substráty a molekuly kyslíku. Vznikají tak reaktivní formy kyslíku (ROS = *Reactive Oxygen Species*), které reagují s buněčnými komponenty. Následně může docházet k vazokonstrikci, shlukování krevních destiček, vytvoří se krevní sraženina a nakonec dojde k vaskulární okluzi nádoru. PDT se používá v klinické praxi pro léčbu nádorů jícnu a nemalobuněčného karcinomu plic. Použití u nádorů prostaty a inoperabilního cholangiokarcinomu je teprve testováno. PDT není spojena s radikálními vedlejšími účinky, jako jsou chirurgické odstranění části orgánu nebo jeho úplná excize, a může být považována za způsob účinné léčby nádorů (Mjos a Orvig 2014).

Jak již bylo řečeno, protinádorový účinek fotosenzitizačních činidel běžně používaných v lékařství je spojen s potřebou kyslíku, kterého je však obvykle v nádorové tkáni nedostatek. Z tohoto důvodu se vědci snaží vyvinout nová efektivnější léčiva, která by fungovala na jiném principu bez potřeby kyslíku. Velmi slibně se v tomto směru jeví použití diazidoplaticitých komplexů. Tyto látky jsou ve své základní formě stabilní za fyziologických podmínek a netoxické ve tmě. Po ozáření u nich dochází k „upadnutí“ azidových ligandů a dané sloučeniny jsou tak transformovány do aktivního stavu. V této formě již tedy obsahují platinu v oxidačním stupni (II) a jsou schopny efektivně zabíjet nádorové buňky, ale pouze v místě ozáření. Uvedené látky jsou nyní předmětem testování pro využití v PDT (Pizarro a Sadler 2009; Pracharova a kol. 2012).

Terapeutická metaloradiofarmaka

Bylo zjištěno, že cytotoxicita terapeutických metalofarmak v cílové tkáni může být zvýšena kombinací léčiva s ionizujícím zářením. Tento typ terapie je často používán

jako poslední možnost léčby nádorového onemocnění v pokročilém stádiu u nádorů prsu, plic, močového měchýře, štítné žlázy, Non-Hodgkinova lymfomu a při metastázích nádorů do kostí. Beta-radionuklidy emitující ^{153}Sm , ^{89}Sr , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re a ^{213}Bi se již používají v klinické praxi, protože beta-částice mají v biologické tkáni dlouhý účinný dostřel (50–1000 průměrů buněk). Tato léčba je vhodná u větších nádorů nebo nádorů s nízkým počtem cév. Alfa-radionuklidy emitující ^{223}Ra a ^{225}Ac mají mnohem kratší účinný dostřel (<10 průměrů buněk) (Mjos a Orvig 2014). V tabulce č. 1 jsou uvedena některá schválená terapeutická metaloradiofarmaka, druhy radioizotopů, typy záření a konkrétní typy onemocnění, u kterých jsou používána.

Tabulka č. 1 Schválená terapeutická metaloradiofarmaka (převzato a upraveno dle Mjos a Orvig 2014).

RADIO-IZOTOP	ZÁŘENÍ	AKTIVNÍ SLOŽKA	OBCHODNÍ NÁZEV	INDIKACE
^{89}Sr	β	Sr-89 chlorid	Metastron	kosterní metastázy
^{90}Y	β	Y-90 ibritumomab tiuxetan	Zevalin	Non-Hodgkinův lymfom
^{153}Sm	β	Sm-153 lexidronam pentasodný	Quadramet	osteoblastické kostní metastázy
^{223}Ra	α	Ra-223 dichlorid	Xofigo	inoperabilní nádor prostaty, symptomatické kostní metastázy

Jak již bylo zmíněno výše, tato bakalářská práce se zabývá především vlivem tepla na účinek léčiv používaných při chemoterapii. Další kapitoly této práce popisují samotnou hypertermii i hypertermii v kombinaci s protinádorovými léčivy.

2.2 Hypertermie

Slovo hypertermie je kombinací dvou řeckých slov *hyper* (nad, nadbytek, nárůst) a *thermo* (teplo). Termín hypertermie (HT= *Hyperthermia*) znamená zvýšení teploty v důsledku nadbytku tepla. V medicíně se HT již dlouhou dobu používá k záměrnému zvýšení teploty celého těla, části těla nebo vybrané tkáně pro dosažení přesného terapeutického účinku (Gas 2011), a to především v onkologii k léčbě různých typů nádorových onemocnění (Bleehen 1982; Hildebrandt a kol. 2002; Wust a kol. 2002; Habash a kol. 2006; Chicheř a kol. 2007; Gas 2011; Glazer a Curley 2011; Sethi

a Chakarvarti 2015; Mallory a kol. 2016). Historie HT, coby způsobu léčby nádorových onemocnění, sahá až do doby několika tisíců let před naším letopočtem (Van der Zee 2002; Gas 2011; Glazer a Curley 2011). HT vyvolala již řadu nadějí díky velkolepým úspěchům, ale byla také předmětem mnoha zklamání (Gas 2011). Samotná HT kdysi hrála významnou roli i v léčbě nádorů, u kterých již neexistoval jiný, účinnější způsob léčby (Glazer a Curley 2011) a měla za cíl zničit nádorové buňky nebo alespoň zabránit jejich dalšímu růstu (Chicheł a kol. 2007).

HT může být použita samostatně, ale nejčastěji se kombinuje s jinými, běžně zavedenými léčebnými postupy (Bleehen 1982; Hildebrandt a kol. 2002; Wust a kol. 2002; Habash a kol. 2006; Chicheł a kol. 2007; Gas 2011; Glazer a Curley 2011; Sethi a Chakarvarti 2015; Mallory a kol. 2016). Taková léčba, která zahrnuje více modalit je označována jako multimodální (Wust a kol. 2002). HT se již delší dobu aplikuje společně s radioterapií nebo chemoterapií (Bleehen 1982; Hildebrandt a kol. 2002; Habash a kol. 2006; Chicheł a kol. 2007; Gas 2011; Glazer a Curley 2011; Sethi a Chakarvarti 2015; Mallory a kol. 2016). V poslední době je používána rovněž při genové terapii nebo při imunoterapii (Wust a kol. 2002; Van der Zee a kol. 2002; Chicheł a kol. 2007; Gas 2011).

Autoři v odborných publikacích uvádějí pro použití HT v klinické praxi různé teplotní rozsahy. Velmi často se teploty pohybují v rozmezí 40–43 °C (Hildebrandt a kol. 2002; Wust a kol. 2002) nebo 40–45 °C (Bleehen 1982; Mallory a kol. 2016). Objevují se ale i jiné rozsahy: 40–44 °C (Van der Zee 2002), 41–45 °C (Habash a kol. 2006) nebo dokonce 40–48 °C. Léčba nádorového onemocnění s použitím HT je pacientem dobře snášena, pokud teplota nepřekročí 44 °C, kdy tato teplota jen v malé míře ovlivňuje i normální tkáň. Vyšší teploty mohou způsobit puchýře, popáleniny, bolesti nebo nekrózu (Chicheł a kol. 2007). Tyto teploty se ale využívají např. pro lokální terapii nebo pro ošetření krve při mimotělním oběhu v léčbě nádorů krve. Některé z prvních preklinických studií byly mylně založeny na předpokladu, že pro HT musí být použita taková dávka tepla, aby teplota v cílovém místě byla minimálně 43 °C. Od tohoto předpokladu se později na základě jiných klinických studií upustilo, protože byla prokázána účinnost HT i při nižších teplotách (Wust a kol. 2002).

2.2.1 Historie hypertermie

Použití ohřevu k léčbě různých onemocnění (např. pohlavně přenosných chorob, neurologických poruch, artritidy, astmatu nebo nádorových onemocnění) bylo běžné v různých kulturách již od starověku. Primárně mělo teplo sakrální význam a bylo spojeno s léčivou energií Slunce. K léčbě lokálně postižených částí těla nebo celého organismu se používalo teplé vody, teplého písku (bahenní koupele) z přírodních termálních pramenů nebo horkého vzduchu a páry v sopečných jeskyních. Lokální a systémová HT byla velmi populární ve staré Číně a Indii (Gas 2011). Ve starověkém Řecku a Římě mnoho lékařů sdílelo názor, že znalosti o řízení teploty lidského těla jim umožní vyléčit všechny nemoci (Habash a kol. 2006; Gas 2011). Dokonce takoví vědci jako Parmenidés, Hippokratés nebo Celsius věřili v pozitivní vlivy tepla na organismus člověka při různých onemocněních (Gas 2011). Ještě dlouho před tím, než došlo k pochopení podstaty nádorů a ke schopnosti je diagnostikovat, byly tyto léze řezány nebo páleny (Glazer a Curley 2011). Už Egyptan Imhotep (2655–2600 př. n. l.) léčil nádory prsu pomocí teplých nožů a tyčinek (Gas 2011).

První publikace týkající se použití vysoké teploty spojené s vyvoláním horečky z časů našeho letopočtu pochází z roku 1866 (Habash a kol. 2006; Gas 2011). Německý chirurg Carl D. W. Busch zjistil, že vysoká teplota může selektivně zabít rakovinné buňky, aniž by působila na ty zdravé. Po tomto objevu se zvýšil zájem o HT. Za otce moderního použití HT a imunoterapie při léčbě nádorových onemocnění je považován americký chirurg William B. Coley (1862–1936), který objevil toxin vyvolávající horečku. Tento toxin byl používán téměř jedno století, během něhož bylo prokázáno, že míra přežití u pacientů s inoperabilním karcinomem v závislosti na teplotě souběžné horečky se zvýšila z 28 % na 64 %. Jelikož každý pacient reagoval na tento toxin jinak, v průběhu času se od tohoto způsobu upustilo a lékaři začali hledat jiné účinnější způsoby léčby nádorových onemocnění (Gas 2011).

Nesčetné pokusy o vyvolání vysoké tělesné teploty vedly k vývoji různých metod systémové a lokální HT. Pacienti byli např. baleni do umělohmotných pokrývek a ponořování do horkého vosku nebo umístování do speciálně vytápěných místností nebo boxů. Sofistikovanější techniky využívaly např. perfuzi (z pacientova těla byla odstraněna krev, která byla po ohřátí zase vrácena zpět do těla) (Bleehen 1982; Gas 2011) nebo speciální kovové svitky zaváděné přímo do těla pacienta. Mnoho těchto technik

nebylo vhodných, protože často vedly ke smrti, k extrémním bolestem nebo mnoha nežádoucím účinkům, jiné zase byly zdokonaleny a používají se dodnes (Gas 2011).

První pokusy léčby rakoviny pomocí elektrické energie byly možné po roce 1800, kdy byla vynalezena elektřina. Prvotní léčba byla založena na spalování nádorů přímým průchodem elektrického proudu, kdy do nemocné tkáně byly zaváděny speciální jehly, dráty, nože nebo jiné typy elektrod. Na konci 19. století fyzik Nikola Tesla jako první upozornil na možnost použití vysokofrekvenčních proudů pro terapeutické aplikace. Týkalo se to nejen fyziologických účinků, ale také schopnosti zahřátí tkáně pomocí střídavého proudu nad určitou frekvencí. Nejznámější osobou využívající vysokofrekvenčních proudů pro kapacitní a induktivní ohřev byl francouzský fyzik a fyziolog Jacques-Arsene d'Arsonval. Na přelomu 19. a 20. století se těšil velké popularity a jeho metodami bylo léčeno mnoho chorob, počínaje poruchami krevního oběhu, metabolismu, centrálního nervového systému a kůže a konče tuberkulózou, gastrointestinálními poruchami a hemoroidy. Začátkem 20. století byla běžně používaná diatermie (Gas 2011), tedy prohřívání díky průchodu vysokofrekvenčního elektrického proudu.

Vzhledem k technickým nedostatkům u způsobů ohřevu a měření teploty a ne příliš pozitivním klinickým výsledkům, byla léčba pomocí HT na začátku 20. století pozastavena. Od té doby byla nádorová onemocnění léčena pouze tradiční chirurgickou metodou, radioterapií a chemoterapií (Habash a kol. 2006; Gas 2011). Oživení zájmu o HT nastalo až po 2. světové válce, když se začaly provádět experimenty s použitím HT v kombinaci s radioterapií a chemoterapií (Gas 2011). Celosvětový zájem o HT vzbudil rovněž 1. mezinárodní kongres o hypertermické onkologii ve Washingtonu v roce 1975. Došlo k rostoucímu nadšení, které se projevilo zvýšením počtu vydávaných vědeckých článků, uskutečněním mnoha klinických studií a zmiňováním HT v kapitolách mnoha knih. Toto nadšení ale opět kvůli technickým nedostatkům a tedy neuspokojivým výsledkům klinických studií brzy opadlo (Bleehen 1982; Van der Zee 2000; Habash a kol. 2006).

K technologické revoluci v léčbě HT došlo v době, kdy byly vyvinuty techniky ohřevu pomocí mikrovln (Gas 2011). To vedlo k obnovení zájmu o HT, který trvá až do současnosti (Van der Zee 2002; Habash a kol. 2006). Postupně vznikaly různé instituce zabývající se HT – v roce 1981 vznikla *North American Society Hyperthermia*,

v roce 1983 *European Hyperthermia Institute* a v roce 1984 *Japanese Society of Hyperthermia Oncology* (Habash a kol. 2006; Gas 2011). Tyto tři společnosti kooperativně založily *International Journal of Hyperthermia*, což je v současné době nejdůležitější časopis věnovaný HT. Jednou za čtyři roky se koná vědecká konference *International Symposium on Hyperthermic Oncology* (Gas 2011).

V roce 1988 byl vytvořen nový směr v boji proti rakovině – onkotermie, který se stále vyvíjí. Je spojením HT s moderními poznatky o bioelektromagnetismu a fyziologii člověka (Gas 2011).

2.2.2 Typy hypertermie

HT se v klinické praxi typicky dělí do 3 hlavních kategorií: lokální (LHT = *Local Hyperthermia*), regionální (RHT = *Regional Hyperthermia*) a celotělová (WBH = *Whole Body Hyperthermia*) (Falk a Issels 2001; Wust a kol. 2002; Habash a kol. 2006; Chicheř a kol. 2007; Sethi a Chakarvarti 2015; Mallory a kol. 2016).

Lokální hypertermie (LHT)

LHT zahrnuje povrchovou, intersticiální (Falk a Issels 2001; Wust a kol. 2002; Chicheř 2007), intrakavitální (Wust a kol. 2002; Chicheř a kol. 2007) a intraluminální HT. LHT je aplikovaná na poměrně malé nádory (od 3 cm do 5–6 cm) a je dostatečně šetrná k okolním zdravým tkáním (Chicheř a kol. 2007).

Povrchová HT se používá pro nádory uložené v blízkosti povrchu těla a může být realizována vnějšími (externími) zdroji tepla (Chicheř a kol. 2007; Mallory a kol. 2016). Aplikátory jsou většinou kladeny skrze dotykové médium (Wust a kol. 2002). Takovým dotykovým médiem může být např. vodní bolus, který zajišťuje lepší kontakt mezi aplikátorem a nerovným povrchem lidského těla a udržuje teplotu kůže na úrovni zhruba 37 °C. Mezi vedlejší účinky povrchové LHT patří např. tvorba puchýřů nebo vzácně popálení kůže (Chicheř a kol. 2007).

Intersticiální, intrakavitální a intraluminální HT se používá pro nádory uložené v tělních dutinách nebo v dutých orgánech a může být realizována vnitřními (interními) zdroji tepla zavedenými přímo do dutiny nebo orgánu (Chicheř a kol. 2007; Mallory a kol. 2016). Pro povrchovou LHT se používají mikrovlnné aplikátory (Falk a Issels 2001;

Wust a kol. 2002; Chicheł a kol. 2007), ultrazvukové aplikátory (Falk a Issels 2001; Chicheł a kol. 2007) nebo aplikátory využívající rádiové vlny (Wust a kol. 2002; Chicheł a kol. 2007). Pro intersticiální, intrakavitální a intraluminální HT se používají rovněž jiné zdroje tepla, např. ferromagnetické částice nebo laserová vlákna. Komerčně dostupné elektromagnetické aplikátory mají povrch s průměrem zhruba 15 cm a jejich terapeutická hloubka je do 3 cm. Teplota uvnitř nádorové tkáně může být řízena výkonem generátoru nebo umístěním aplikátoru. Pro LHT by byly vhodné multiaplikátory (aplikátory s více anténami), avšak tyto pomůcky byly vyvinuty jen v několika specializovaných centrech a kvůli technické náročnosti nejsou komerčně dostupné. Ultrazvukové aplikátory nabízejí lepší fyzikální vlastnosti a lepší cílenost než aplikátory využívající mikrovlny nebo rádiové vlny, ale způsobují nepříjemné pocity, proto v současné době mají méně praktický význam (Wust a kol. 2002).

Ve většině případů je intersticiální HT kombinovaná s brachyterapií (Wust a kol. 2002; Chicheł a kol. 2007), což je jedna z technik radioterapie, kdy je zdroj radioaktivního záření v blízkosti ozařovaného nádoru nebo je umístěn přímo do tkáně nádoru. Velkou výhodou této multimodální léčby je možnost aplikace brachyterapie i na těžce dostupná místa (např. do oblasti hlavy a krku nebo prostaty) (Wust a kol. 2002; Chicheł a kol. 2007).

Pro nádory, které se nacházejí v hlubokých částech těla, se zdá velmi slibná nová léčba pomocí magnetických nanočástic, kdy se nanočástice oxidu železa implantují přímo do nádorové tkáně a zahřívají se pomocí střídavého magnetického pole (Chicheł a kol. 2007).

Regionální hypertermie (RHT)

RHT se obvykle používá pro nádory uložené v hlubších vrstvách těla nebo při lokálně pokročilých onemocněních (je-li třeba léčby větší oblasti). RHT může být dosaženo invazivními metodami, např. hypertermickou perfuzí orgánů nebo končetin, kontinuální hypertermickou peritoneální perfuzí (CHPP = *Continuous Hyperthermic Peritoneal Perfusion*) nebo neinvazivními metodami pomocí externích aplikátorů, využívajících např. mikrovlny nebo rádiové vlny (Chicheł a kol. 2007; Mallory a kol. 2016).

Hypertermická perfuze je založena na *bypassu* („obcházení“) velké tepny nebo žíly, kdy krev z této tepny nebo žíly je přivedena do mimotělního oběhu, kde je zahřáta na požadovanou teplotu a poté přivedena zpět do těla pacienta. Ve srovnání s celotělovou HT je zde méně systémových vedlejších účinků (Wust a kol. 2002; Chicheř a kol. 2007; Sethi a Chakarvarti 2015), což vedlo k časně klinické aplikaci této metody. Vzhledem k tomu, že chirurgické zákroky zahrnující *bypass* jsou zavedeny již dlouhou řadu let, hypertermická perfuze s mimotělní výměnou tepla je technicky jednoduchá. Terapeutický účinek hypertermické perfuze je ovlivněn teplotou perfuzní kapaliny, průtokem (ideálně 30–40 ml·min⁻¹), složením perfuzní kapaliny (pO₂, pH) a v kombinované léčbě s chemoterapií také koncentrací cytostatika (zde jsou aplikovány vyšší koncentrace než v systémové terapii). Míra perfuze v lidských nádorech velmi kolísá – je to asi 5–15 ml na 100 g nádoru za minutu (Wust a kol. 2002). Mezi možné přechodné nežádoucí účinky hypertermické perfuze patří otoky vyhřívané tkáně, ischémie vzniklá v důsledku krevních sraženin nebo krvácení (Chicheř a kol. 2007).

Zatímco LHT používá k ohřevu neinvazivními metodami pouze jeden aplikátor (s jednou anténou), k RHT je potřeba použití aplikátoru s celým systémem antén, který umožní hloubkový ohřev (Falk a Issels 2001; Wust a kol. 2002; Chicheř a kol. 2007). Četné antény jsou často umístěny v prstenci kolem pacienta a jsou řízeny nastavením fáze, amplitudy nebo frekvence (Wust a kol. 2002; Chicheř a kol. 2007). Příkladem multianténního aplikátoru může být zařízení pro hloubkovou RHT, přístroj BSD-200/3D firmy Pyrexar (Salt Lake City, USA) (obrázek č. 3). Systém 24 dipólových antén vysílajících rádiové vlny je rovnoměrně rozdělen do tří kruhů, které vytvářejí prstencový aplikátor. Ten obklopuje tělo pacienta a umožňuje ohřev cílové oblasti. Optimalizace ohřevu



Obrázek č. 3 Zařízení pro hloubkovou regionální hypertermii BSD-2000/3D (<http://www.pyrexar.com/hyperthermia/bsd-2000/>; 2.8.2017).

je uskutečněna díky možnosti nastavení frekvence, fáze a amplitudy vln jednotlivých antén. Tím je umožněno lepší prohrátí nádoru a snížení ohřevu okolních tkání.

Celotělová hypertermie (WBH)

WBH se obvykle používá k léčbě metastáz. Nejčastějším přístupem WBH je použití infračervené komory. Jinými metodami jsou např. zahřívání pacienta ve speciální místnosti nebo pomocí vyhřívaných příkrývek (Chicheł a kol. 2007; Mallory a kol. 2016). Ohřev na maximální teplotu 42 °C může být realizován pouze s hlubokou analgezií nebo sedací nebo v celkové anestezii pacienta (Wust a kol. 2002; Chicheł a kol. 2007), což vyžaduje intenzivní lékařskou péči. WBH sice vytváří více homogenní teplotní rozložení (Chicheł a kol. 2007), ale díky tomu má také mnohem více vedlejších účinků než LHT nebo RHT. Mezi vedlejší účinky WBH patří např. srdeční poruchy, změny v koagulačním systému (trombocytopenie a diseminovaná intravaskulární koagulace), poruchy propustnosti endotelu kapilár (Wust a kol. 2002), tepelné namáhání plic, jater nebo mozku a přechodný průjem, nevolnost nebo zvracení (Chicheł a kol. 2007). WBH je tedy náročná na provedení a má mnoho vedlejších účinků, proto není široce využívána v běžné praxi a je stále velmi intenzivně zkoumána (Wust a kol. 2002).

Realizace WBH je v klinické praxi velmi náročná i z důvodu dlouhé doby dosažení požadované teploty. Bazální metabolismus člověka o hmotnosti kolem 70 kg je při 37 °C 85 W a při teplotě 42 °C je dvakrát vyšší, tzn., že zvýšení teploty z 37,5 °C na 42 °C trvá 180 minut (je-li systém ohřevu dokonale izolován). Vzhledem k tomu bylo v 80. letech 20. století mnoho snah zkracování doby ohřevu. Různé metody (pyrogeny, mimotělní ohřívání, kontaktní ohřev) byly opuštěny z důvodu omezené účinnosti a u pyrogenů se objevovaly rovněž nepříjemné toxické účinky. Dnes jsou používány sálavé systémy s dobou ohřevu 60–90 minut s teplotou od 37,5 °C výše (Wust a kol. 2002).

Zvláště zajímavé jsou dva systémy pro WBH používané v dnešní době ve světě. V Institutu pro výzkum rakoviny v New Yorku (*Cancer Research Institute*) je používána

neinvasivní metoda ohřevu pro WBH, která využívá sálavého tepelného zařízení *Aquatherm*, které umožňuje dosažení až 41,8 °C (Falk a Issels 2001). Systém *Aquatherm* tvoří izolovaná komora vybavená rozvodem s proudící vodou (50–60 °C) ve stěnách místnosti,



Obrázek č. 4 Systém *Iratherm* pro celotělovou hypertermii (<http://med.ardenne.de/?cat=90&lang=en>; 2.8.2017).

ve které je umístěn pacient. Ohřev je realizován emitováním dlouhých vln infračerveného záření. Dochází k podstatnému zvýšení cirkulace krve v kůži pacienta a povrchově absorbovaná energie je transportována do systémového oběhu. Díky poměrně krátké době ohřevu nedochází k uvolnění energie z těla pacienta prostřednictvím potu (Wust a kol. 2002). Druhým systémem je systém *Iratherm* výzkumného institutu Von Ardenne Institut Für Angewandte Medizinische Forschung GmbH (Dážďany, Německo) (obrázek č. 4), který používá speciální infračervené zářiče (Wust a kol. 2002).

Každý systém pro WBH může způsobit povrchové přehřívání, což má za následek tepelné poškození celého organismu nebo jeho částí. K zajištění bezpečného průběhu terapie je tedy nutná pozorná průběžná kontrola teploty kůže pacienta a řízení vstupního výkonu zařízení, které realizuje ohřev (Wust a kol. 2002).

Přehledné shrnutí typů HT používaných pro terapii různých druhů nádorů s uvedením lokalizace nádoru, použitého typu energie a vybavení pro daný typ HT je uvedeno v tabulce č. 2. Principy ohřevu a využití jednotlivých typů HT v klinické praxi jsou popsány v dalších částech této bakalářské práce.

Tabulka č. 2 Přehledné shrnutí typů hypertermie využívaných v terapii různých nádorů (převzato a upraveno dle Chicheł a kol. 2007).

TYP HYPERTERMIE	TYP/ UMÍSTĚNÍ NÁDORU	KLINICKÉ APLIKACE	TYPY ENERGIE/ VYBAVENÍ
LOKÁLNÍ: - povrchová - intrakavitální - intraluminální - intersticiální	- superficiální - intrakavitální - intraluminární - nitrolební	- nádory hlavy a krku - lokálně pokročilé nebo opakující se nádory prsu - maligní gliomy - nádory konečníku - nádory jícnu - sarkomy měkkých tkání	- mikrovlny - rádiové vlny - ultrazvuk JINÉ: - perfuze teplou vodou - odporové drátové implantáty - ferromagnetické částice - nanočástice
REGIONÁLNÍ: - břišní - pánevní - končetinová	- hloubkové - lokálně pokročilé	- nádory děložního hrdla - nádory konečníku - nádory močového měchýře - nádory prostaty - sarkomy měkkých tkání - nádory vaječníků - mezoteliomy - peritoneální karcinomatóza	
CELOTĚLOVÁ	- diseminované/ metastazující	- maligní melanom - opakující se sarkomy měkkých tkání - nádory vaječníků	- infračervené záření - teplovodní pokrývky - tepelné komory

2.2.3 Principy ohřevu

Zvýšení teploty nad 37,5 °C v definované oblasti cílové tkáně je technicky náročné, proto se vyvíjejí stále nové metody k dosažení tohoto cíle a ty stávající jsou dále rozvíjeny a zdokonalovány. Zvýšení teploty na požadovanou hodnotu je specifikováno hustotou tepelné energie specifické míry absorpce (SAR = *Specific Absorption Rate*; jednotka: [W·kg⁻¹]) (Wust a kol. 2002). SAR je fyzikální parametr, který se používá k popisu interakce mezi elektromagnetickým polem a hmotou (Chicheł a kol. 2007). K dosažení terapeutické teploty kolem 42 °C v některých částech nádorů je potřebná hustota energie asi 20–40 W·kg⁻¹ na cílovou oblast (pro srovnání, míra bazálního metabolismu člověka je vyšší než 1 W·kg⁻¹) (Wust a kol. 2002).

Teplu může být v klinické praxi vyvoláno ultrazvukem, technikami spojenými s elektromagnetickým polem (mikrovlnami, rádiovými vlnami, infračerveným zářením) (Falk a Issels 2001; Chicheř a kol. 2007; Mallory a kol. 2016) nebo jinými specifickými metodami (pomocí ferromagnetických částic, nanočástic nebo odporových implantátů) (Chicheř a kol. 2007).

V posledních dvaceti letech bylo zdokonaleno řízení distribuce tepla *in vivo* díky vývoji plánovacích systémů a dalších nástrojů pro modelování (Van der Zee a kol. 2002; Wust a kol. 2002). To vedlo k návrhu multianténních aplikátorů a zavedení systémů pro sledování elektrického pole (např. elektro-optické senzory) a teploty (především online magnetická rezonanční tomografie (MRT = *Magnetic Resonance Imaging*)), která může sledovat teplotu a perfuzi, tedy průtok krve (Wust a kol. 2002). Toto monitorování teploty se využívá zejména u hloubkové RHT a WBH (Chicheř a kol. 2007). Integrace systému pro HT a MRT je technicky velmi náročná. Takovýto hybridní systém se realizuje např. použitím magnetického pole s nízkou indukcí. Zatím ale není jasné, zda při nízkém magnetickém poli může být dosaženo přiměřené informace o teplotě. Úspěšná realizace hybridního systému by mohla pomoci formulovat jasné definice významných a prognosticky relevantních termometrických charakteristik (např. minimální teplotu v okolí nádoru) a mohla by vést k lepší standardizaci tepelného ošetření (Wust a kol. 2002).

2.2.4 Mechanismus účinku hypertermie

Přesný mechanismus buněčné smrti přímo způsobené HT není i přes desítky let výzkumu stále přesně znám (Gas 2011; Mallory a kol. 2016). Předpokládá se, že je kombinací buněčné smrti (indukované teplem) a inaktivace proteinů (např. opravných enzymů) (Issels 2008; Mallory a kol. 2016). Hlavním výsledkem působení HT na organismus pacienta nebo jeho část je přímé poškození nádorových buněk a zvýšení citlivosti těchto buněk k jiným způsobům léčby (radioterapie, chemoterapie, genová terapie a imunoterapie) při minimálním nebo ideálně žádném poškození normálních zdravých tkání (Chicheř a kol. 2007).

K přímému zabíjení nádorových buněk (selektivnímu poškození) dochází při teplotách nad 40 °C (Hildebrandt a kol. 2002; Wust a kol. 2002; Habash a kol. 2006; Mallory a kol. 2016). V *in vitro* experimentech bylo prokázáno, že u buněk vystavených

HT nejdříve dochází k jejich reverzibilnímu neletálnímu tepelnému poškození a následně kvůli nevratnému poškození struktur buňky k buněčné smrti. Schopnost indukovat buněčnou smrt je nižší u teplot pod 42–43 °C a výrazně vyšší u teplot nad 43 °C (Hildebrandt a kol. 2002). V této kapitole je popsán mechanismus účinku samotné HT, zatímco mechanismus účinku HT jako součást multimodální léčby (především při chemoterapii) je popsán v kapitole 2.3 Hypertermie a protinádorová léčiva.

Změny průtoku krve a mikroprostředí nádoru

Hlavní myšlenkou mechanismu účinku HT je rozdíl termosenzitivity normální (zdravé) a nádorové tkáně způsobený fyziologicky odlišným cévním systémem a tedy krevním zásobením těchto tkání (Falk a Issels 2001; Hildebrandt a kol. 2002; Chicheł a kol. 2007; Glazer a Curley 2011; Mallory a kol. 2016). I když byl nejprve předpoklad o různé termosenzitivě nádorových a zdravých buněk považován za chybný (Bleehen 1982), v dnešní době je stále brán v úvahu. Předpokládá se, že cévy v normálních tkáních jsou nepoškozené, tedy výkonné, zatímco cévy v nádorové tkáni jsou často nefunkční a děravé (Mallory a kol. 2016). Nefunkčnost cév v nádorové tkáni je způsobena morfologickými změnami, např. otokem endotelu, přesunem tekutiny plazmy do intersticia, mikrotrombózou (v důsledku aktivace hemostázy) nebo změnou viskozity krve (Hildebrandt a kol. 2002). Abnormální a poměrně slabé cévní zásobení v oblasti nádoru způsobuje špatné prokrvení nádorové tkáně (Falk a Issels 2001; Hildebrandt a kol. 2002; Issels 2008; Mallory a kol. 2016). V některých případech jsou změny v mikrocirkulaci krve nevratné a může dojít i ke zhroucení cévního zásobení nádoru (Hildebrandt a kol. 2002). V důsledku výše popsaných změn dochází k nižší konvekci (proudění) tepla (Falk a Issels 2001; Chicheł a kol. 2007), hypoxii (nedostatek kyslíku) a acidóze (vyvolané nedostatkem živin) vedoucí ke snížení pH v tkáni postižené nádorem (Hildebrandt a kol. 2002; Chicheł a kol. 2007).

Cytotoxický účinek hypertermie

Existuje hypotéza, že cytotoxický účinek HT je založen především na denaturaci cytoplazmatických a membránových proteinů (Hildebrandt a kol. 2002; Chicheł a kol. 2007; Issels 2008) a změnách ve stavbě buněk, které vedou k narušení pohyblivosti buněk

a intracelulární transdukce signálu (Habash a kol. 2006; Chicheř a kol. 2007; Mallory a kol. 2016). Mezi molekulární efekty HT tedy patří buněčná membrána, cytoskelet, intracelulární proteiny i nukleové kyseliny. Dochází ke změnám v tekutosti a stabilitě buněčné membrány, změnám membránového potenciálu a tvaru buňky, zhoršenému transmembránovému transportu, modulaci efluxní transmembránové pumpy, indukci apoptózy, snížení syntézy proteinů, denaturaci proteinů, agregaci proteinů v jaderné matrix, indukci syntézy proteinů tepelného šoku (tyto proteiny jsou popsány níže), snížení syntézy RNA nebo DNA, změnám konformace DNA a změnám v genové expresi a přenosu signálu (Hildebrandt a kol. 2002).

Imunologické účinky hypertermie

Proteiny tepelného šoku (HSP = *Heat Shock Protein*) byly kdysi spojeny s tolerancí tepla nádorovými buňkami a předpokládalo se, že HT indukovaním tepelné tolerance potlačuje imunitní systém (Mallory a kol. 2016). Nicméně pozdější studie prokázaly, že po aplikaci HT dojde k aktivaci HSP a následné modulaci vrozené a specifické (adaptivní, získané) imunitní odpovědi proti nádorovým buňkám (Chicheř a kol. 2007; Issels 2008; Mallory a kol. 2016). Mírnější zahřívání nádorových buněk má za následek pouze inaktivaci proteinů, dostatečně vysoké zahřívání však způsobuje denaturaci proteinů. Tím dojde k vypnutí hlavních intracelulárních enzymů, zvýšení exprese HSP a koncentrace intracelulárních nádorových antigenů. HSP a nádorové antigeny jsou rozpoznány dendritickými buňkami a makrofágy a dále vyvolávají specifickou protinádorovou imunitu. Tímto způsobem může např. aplikace LHT vést k systémovému zabíjení nádoru (Mallory a kol. 2016).

Odhlédneme-li od působení HT přes HSP, HT může zesílit imunitní reakci proti nádorovým buňkám mnoha dalšími způsoby (Mallory a kol. 2016). Odborné studie prokázaly, že i imunologické odezvy lymfocytů u člověka jsou závislé na teple, konkrétně byl zjištěn specifický účinek HT u NK buněk (*Natural Killer Cell*) (Wust a kol. 2002). Bylo zjištěno, že HT zvyšuje aktivitu NK buněk a počet neutrofilních granulocytů s protinádorovou aktivitou (Mallory a kol. 2016). Předpokládá se, že lepší pochopení mechanismu účinku HT na NK buňky otevře nové možnosti klinické aplikace HT (Wust a kol. 2002).

Bylo rovněž prokázáno, že HT má vliv na indukci terapeutických genů v genové terapii a zvyšuje účinnost léků a protilátek (Mallory a kol. 2016).

Termotolerance

Všechny buněčné kultury vykazují do 24–48 hodin po tepelném šoku termotoleranci (Wust a kol. 2002; Chicheř a kol. 2007). Termotolerance působí jako antagonista buněčné smrti způsobené HT. Je to především reverzibilní děj, při kterém buňky vykazují snížení citlivosti na cytotoxicitu vyvolanou HT. Faktorů způsobujících termotoleranci je několik (Hildebrandt a kol. 2002). Jedná se částečně o zvýšenou syntézu HSP a adaptační procesy (např. zástava buněčného cyklu v G2-fázi, změny buněčného metabolismu) (Hildebrandt a kol. 2002; Issels 2008). Termotolerance se může vyskytovat rovněž s některými vrozenými nebo nabytými rezistencemi na léky (Hildebrandt a kol. 2002). Kvůli termotoleranci je nepraktické používat dvě aplikace HT po sobě v intervalu kratším než 48–72 hodin. Termotoleranci je možné se vyhnout, je-li dosaženo teploty v nádoru nad 43 °C, což je v klinické praxi velmi těžce proveditelné (Chicheř a kol. 2007).

Faktory ovlivňující účinnost hypertermie

Mechanismus HT a stupeň poškození nádorových buněk (tedy pozitivní terapeutický účinek HT) ovlivňuje mnoho faktorů, mj. teplota v místě nádoru, doba ohřevu (Bleehen 1982; Akaboshi a kol. 1994; Habash a kol. 2006; Chicheř a kol. 2007; Issels 2008; Gas 2011; Mallory a kol. 2016), objem cílové tkáně (Gas 2011), rychlost ohřevu (Mallory a kol. 2016) a fáze buněčného cyklu, ve které se nádorové buňky zrovna nacházejí (Breehen 1982; Hildebrandt a kol. 2002; Issels 2008).

Zdravé savčí buňky na rozdíl od rakovinných buněk snášejí teploty v rozmezí 41–43 °C i po dobu několika hodin (Glazer a Curley 2011). Hraniční teplotou je 44 °C (Mallory a kol. 2016). Při teplotách nad 42,5–43 °C může být doba expozice s každým nárůstem o 1 °C snížena na polovinu při zachování zabíjení ekvivalentního počtu buněk (Habash a kol. 2006; Chicheř a kol. 2007; Mallory a kol. 2016). Proto je důležité nalezení rovnováhy mezi teplotou v cílové tkáni a dobou ohřevu, které vyvolají požadovanou smrt nádorových buněk bez negativního vlivu na normální, zdravé buňky (Glazer a Curley,

2011). Avšak čím vyšší je teplota a delší doba expozice HT, tím silnější je letální účinek na nádorové buňky a je indukováno méně termotolerance (Chicheř a kol. 2007).

Co se týče rychlosti ohřevu, tak *in vitro* a *in vivo* studie prokázaly, že při větší rychlosti zvýšení teploty v cílovém místě, dojde k většímu poškození buněk. Z výše uvedeného faktu vyplývá, že v budoucnu by při zvýšení rychlosti přenosu tepla mohly být používány nižší tepelné dávky (tepelná dávka je popsána níže) (Mallory a kol. 2016).

Bylo zjištěno, že nejvyšší citlivost na teplo je u buněk pozorována během mitotické fáze (M-fáze) a fáze syntézy (S-fáze) buněčného cyklu (Breehen 1982; Hildebrandt a kol. 2002). V M-fázi dochází vlivem HT k poškození mitotického aparátu vedoucímu k neefektivní mitóze, kdy mohou u buněk vznikat polyploidie. V S-fázi pak dochází k chromozomálnímu poškození. Buňky, které jsou vystaveny HT během G1-fáze, jsou relativně odolné vůči teplu a nevykazují žádné mikroskopické poškození. Může však u nich dojít k rychlé buněčné smrti bezprostředně po přehřátí organismu (Hildebrandt a kol. 2002).

Tepelná dávka

Tepelná dávka ($D = \textit{Thermal Dose}$) potřebná k vyvolání buněčné smrti pomocí HT je u různých typů buněk rozdílná (Hildebrandt a kol. 2002; Wust a kol. 2002). Tato dávka úzce souvisí s denaturací buněčných proteinů. U nádorových buněk se pohybuje kolem $140 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ (Hildebrandt a kol. 2002) a může být také závislá na vlastnostech mikroprostředí (např. pH) (Wust a kol. 2002) nebo procentu cév, u kterých zůstaly funkční procesy tepelné regulace. D může být odvozena od doby expozice (t) při použití dané teploty (T):

$$D = tR^T,$$

kde $R = 2$ pro teploty $\geq 43 \text{ }^\circ\text{C}$ a $R = 4$ pro teploty $< 43 \text{ }^\circ\text{C}$. V případě různých T se sumarizují frakce $t + T$ (Hildebrandt a kol. 2002).

Teplotní isoefektní dávka

Teplotní isoefektní dávka ($TID = \textit{Thermal Isoeffect Dose}$) je běžně používána v klinické praxi pro porovnání různých expozic HT (Hildebrandt a kol. 2002; Chicheř

a kol. 2007; Issels 2008) a zahrnuje výpočet tepelné dávky (viz výše). *TID* byla zavedena pro převedení dané tepelné dávky (*D*) do tzv. rovnocenných minut ohřívání při 43 °C (*EM43*). K výpočtu *TID* se využívá faktu, že pokles teploty o 1 °C v teplotním rozsahu mezi 42,5–47 °C může být kompenzován zdvojnásobením času expozice ($R = 2$), zatímco při teplotě nižší než 42,5 °C musí být doba působení tepla ještě více prodloužena ($R = 4$) (Hildebrandt a kol. 2002). I když je *TID* v klinické praxi ovlivněna řadou faktorů (např. nestálostí teploty v průběhu ohřevu, distribucí teploty, teplotní tolerancí, intracelulárním pH), zdá se být užitečná k popisu práce s teplotou v klinické praxi (Hildebrandt a kol. 2002; Issels 2008).

2.3 Hypertermie a protinádorová léčiva

Klinické studie a experimenty *in vitro* a *in vivo* prokázaly, že HT zvyšuje cytotoxicitu různých antineoplastických léčiv (Van Bree a kol. 2001; Hildebrandt a kol. 2002). Je všeobecně známo, že cytotoxický účinek většiny alkylačních činidel a sloučenin platiny roste přímo úměrně při zvýšení teplot z 37 °C na více než 40,5 °C, zatímco cytotoxicita většiny antimetabolitů, vinca alkaloidů a taxanů nijak nezávisí na vyšší teplotě (Hildebrandt a kol. 2002). Zvláštní skupinu léků tvoří tzv. termosensitizátory, které působí cytotoxicky pouze při vyšších teplotách. Mezi termosensitizátory patří např. analgetikum lidokain nebo antimykotikum amfotericin B (Hildebrandt a kol. 2002).

Léčebný postup využívající kombinace HT s chemoterapií (CT = *Chemotherapy*) získal větší popularitu v rámci oboru lékařské onkologie teprve na začátku roku 2000 (Issels 2008) a to díky technickému zlepšení komerčně dostupných zařízení pro LHT a RHT (zejména pro hloubkový a systémový ohřev). Kombinace HT a CT je často používána u lokálně pokročilých nádorů jako neoadjuvantní léčba (Falk a Issels 2001), tj. léčebný postup, který má za cíl pouze zvýšení terapeutického účinku další léčby, je prováděn před hlavní léčbou. Díky této neoadjuvantní léčbě je možné dosáhnout lokální kontroly nad nádorem a případně předejít vytvoření metastáz (Falk a Issels 2001; Issels 2008). Multimodální léčba HT a CT je tedy používána u nádorových onemocnění v pokročilém stádiu, u nádorů, které se nacházejí v anatomicky nepříznivých místech (kde nemůže být provedena primární resekce) a u nádorů, kde nemůže být z důvodu vysoké toxicity požadované terapeutické dávky použita radioterapie (Falk a Issels 2001). Po mnoho let panovala neprokázaná hypotéza, že pro úspěšnost

kombinované léčby založené na použití HT a antineoplastických činitelů, jsou v klinické praxi nezbytné teploty nad 43 °C. Na základě dalšího výzkumu však bylo stanoveno klinicky relevantní teplotní rozmezí HT v kombinaci s CT na 40,5–43 °C (Issels 2008).

Přesný mechanismus účinku HT v kombinaci s CT není v současné době zcela přesně znám (Hildebrandt a kol. 2002) a molekulárně-biologická podstata synergického efektu HT a CT na nádorové buňky je stále intenzivně zkoumána (Wust a kol. 2002). Obecně platí, že při kombinaci HT a CT dochází ke změnám v zásobování nádorové tkáně krví, a tyto změny následně ovlivňují i distribuci cytostatik v neoplastické tkáni (Hildebrandt a kol. 2002). Samotná HT poškozují nádorové buňky a zvyšuje jejich citlivost na CT. Když teplota nebo doba aplikace HT roste, pak se zvyšuje také míra usmrcení nádorových buněk. Krátká aplikace mírné HT (<42 °C) na dobře vaskularizovanou tkáň má za následek lepší prokrvení nádoru, což vede ke zvýšení koncentrace kyslíku (pO₂) a dodávky léčiva v cílové tkáni (Hildebrandt a kol. 2002; Wust a kol. 2002; Mallory a kol. 2016). Dále je díky antineoplastickým vlastnostem chemoterapeutických činidel indukována buď nekrotická nebo apoptická programovaná buněčná smrt (Issels 2008). U většiny lidských nádorů dochází vlivem HT ke zvýšené perfuzi ještě hodiny po aplikaci HT. Pouze u některých druhů nádorů bylo prokázáno zhroucení jejich cévního zásobení (Wust a kol. 2002). Je také pravděpodobné, že vliv na rozpustnost a distribuci léčiv by mohly mít změny tekutosti buněčné membrány, elektrolytické rovnováhy a pH, které jsou vyvolány působením HT (Hildebrandt a kol. 2002).

V mnoha studiích byl ověřován synergický efekt působení HT a různých cytostatik v závislosti na sekvenci aplikace HT a CT a na době mezi HT a CT (Hildebrandt a kol. 2002; Wust a kol. 2002). Sekvence nebo doba mezi HT a CT může mít velký vliv na poškození normální, zdravé tkáně (Baba a kol. 1989). Bylo zjištěno, že pro většinu protinádorových léčiv dochází k největší chemosensitizaci při současné aplikaci HT a CT (Cohen a Robins 1987; Baba a kol. 1989; Ohno a kol. 1994; Hildebrandt a kol. 2002; Issels 2008) nebo při aplikaci v krátkém časovém rozmezí (Hildebrandt a kol. 2002). Existují však určité výjimky (Hildebrandt a kol. 2002). Cohen a Robins (1987) zjistili, že u HT v kombinaci s karboplatinou je největší účinnost zajištěna, pokud je HT aplikována současně s karboplatinou nebo bezprostředně před ní. Účinnost byla naopak snížena, pokud HT předcházela aplikaci karboplatiny o více než hodinu a nebyla prokázána žádná účinnost, když HT následovala až po podání léčiva. Ohno a kol. (1994)

došli ke stejným závěrům jako Cohen a Robins (1987), ale místo karboplatiny testovali cDDP. Pro optimalizaci multimodální léčby (HT + CT) jsou nezbytné další preklinické a klinické studie (Hildebrandt a kol. 2002).

2.4 Klinické využití hypertermie

I když mechanismus účinku HT není ani dodnes přesně objasněn a existuje mnoho neověřených hypotéz, HT je již řadu let používána v klinické praxi (Wust a kol. 2002). Účinnost HT je i nadále ověřována v randomizovaných studiích pro celou řadu nádorových onemocnění, ale rozšířenému přijetí HT v klinické praxi brání ještě poměrně hodně překážek (Mallory a kol. 2016).

Toxicita samotné HT je obecně velmi nízká (Falk a Issels 2001; Van der Zee 2002). U některých pacientů se ale projevují nežádoucí účinky, jako např. opakující se bolesti v léčené oblasti, popáleniny, puchýře (Falk a Issels 2001) a přechodný průjem, nevolnost nebo zvracení (Chicheł a kol. 2007).

Různých typů HT i různých generátorů tepelné energie se využívá v závislosti na lokalizaci, hloubce a stádiu nádoru (Chicheł a kol. 2007). HT našla uplatnění v léčbě nádorů prsu, kůže, hlavy a krku, mozku, jícnu, prostaty, dělohy, děložního čípku, močového měchýře (Gas 2011; Mallory a kol. 2016), konečníku, plic, vulvy a vagíny, sarkomů a v léčbě nemelanomové a melanomové rakoviny kůže (Mallory a kol. 2016). V současné době existuje celá řada komerčně dostupných systémů pro HT vyráběných různými společnostmi nebo testovaných ve vědeckých institucích. I přesto jsou hypertermické techniky stále dále rozvíjeny a zdokonalovány a to z důvodu hledání nejlepšího řešení pro různé typy nádorového onemocnění (především v multimodální terapii) (Hildebrandt a kol. 2002; Chicheł a kol. 2007). Vědci stále hledají nové techniky, které udělají HT jednodušší, bezpečnější, účinnější a široce dostupnou. Obzvláště slibná se jeví např. magnetická fluidní hypertermie, která využívá nanotechnologii a v dnešní době se s ní hodně experimentuje (Gas 2011).

V současné době není známa optimální distribuce teplot pro klinické účely. Minimální teploty obvykle leží mezi 39,5–40,5 °C a to především kvůli fyzickým a fyziologickým vlastnostem nádorové tkáně (elektrická mez tkáně, lokální kolísání perfuze, regulace perfuze aj.). Pouze asi 50 % hloubkově umístěných nádorů dosáhne alespoň 42 °C (Wust a kol. 2002). Většina normálních tkání (kromě tkáně centrální

nervové soustavy) nevykazuje trvalé poškození u léčby HT po dobu jedné hodiny při teplotě do 44 °C (Mallory a kol. 2016). I přesto, že optimální teploty pro ošetření různých typů nádorů, které musí být dosaženy pro klinickou účinnost nebyly stále jednoznačně definovány, mělo by být vždy dosaženo nejvyšší možné distribuce a homogenity tepla v dané tkáni (Wust a kol. 2002; Mallory a kol. 2016).

Na klinickém hodnocení kvality HT je zásadní a velmi důležité měření aktuální teploty v nádoru nebo v jeho blízkosti během aplikace HT (Falk a Issels 2001; Wust a kol. 2002; Chicheř a kol. 2007; Mallory a kol. 2016). Jak již bylo zmíněno výše, neinvazivní metody termometrie hlubokých tkání jsou stále předmětem výzkumu, zvláště online MRT, která se jeví velmi slibně (Falk a Issels 2001; Mallory a kol. 2016). Invazivní metody termometrie zahrnují aplikaci tenkých plastových katetrů se sondou (např. termočlánkem nebo optickým vláknem) do tkáně postižené nádorovým onemocněním buď pomocí jehly (která je aplikována pod kontrolou počítačové tomografie) anebo během chirurgického zákroku (Falk a Issels 2001; Chicheř a kol. 2007).

3. CÍL PRÁCE

- Systematicky pracovat s literaturou a vytvořit literární přehled z oblasti dané problematiky.
- Provést experimenty zaměřené na stanovení vlivu zvýšené teploty na cytotoxicitu cisplatiny a nového komplexu *trans*-[PtCl₂(NH₃)-1-methyl-7-azaindol] s protinádorovým účinkem *in vitro*.
- Porovnat získané výsledky s daty dostupnými v odborné literatuře se zaměřením na srovnání s poznatky obdobných studií pro další kovové komplexy.
- Diskutovat získané výsledky z hlediska biologické aktivity testovaných látek.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Biologický materiál a chemikálie

- růstové médium DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*): Biosera, Francie
- fetální hovězí sérum (FBS = *Fetal Bovine Serum*): SIGMA, Česká republika
- antibiotika (ATB):
 - streptomycin ($10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$): SIGMA, Česká republika
 - penicilin ($10 \text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$): SIGMA, Česká republika
- dimethylsulfoxid (DMSO): Duchefa, Nizozemsko
- dimethylformamid (DMF): Serva, Německo
- trypsin/EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová): SIGMA, Česká republika
- trypanová modř: SIGMA, Česká republika
- bromthiazolová modř (MTT; 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid): Duchefa, Nizozemsko
- chlorid sodný (NaCl): SIGMA, Česká republika
- chlorid draselný (KCl): SIGMA, Česká republika
- hydrogenufosforečnan disodný (Na_2HPO_4): SIGMA, Česká republika
- dihydrogenufosforečnan draselný (KH_2PO_4): SIGMA, Česká republika
- buňky lidského adenokarcinomu děložního čípku (HeLa): American Type Culture Collection, USA
- Pro přípravu fosfátového pufru (PBS = *Phosphate Buffered Saline*) byla použita deionizovaná voda (dH_2O).

4.2 Platinové komplexy

Cisplatina byla zakoupena od firmy SIGMA, Česká republika. Komplex *trans*-[PtCl₂(NH₃)(1-methyl-7-azaindol)] (komplex **1**) byl poskytnut partnerskou laboratoří prof. G. Natile z University of Bari (Itálie). Obě látky byly skladovány ve tmě při 4 °C. Roztoky komplexů pro experiment byly vždy připraveny až těsně před použitím. Cisplatina byla rozpouštěna v DMSO a komplex **1** v DMF.

4.3 Roztoky

0,5% MTT

- 0,5 g MTT
- 100 ml PBS 1x

PBS 10× (7,4 pH)

- 150 mM NaCl
- 2 mM KCl
- 10 mM Na₂HPO₄
- 2 mM KH₂PO₄
- doplnit dH₂O do objemu 1 l a adjustovat pH na hodnotu 7,4

4.4 Přístroje

Při experimentech byly používány tyto přístroje: laminární box (SafeFAST Classic 212, Faster, Itálie), CO₂ inkubátor (MCO-18AC-PE CO₂ Incubator, Panasonic Biomedical, Japonsko), třepačka (Universal Orbital Shaker OS-20, BOECO, Německo), termoblok (Ultimate Dry Bath Incubator MC-01 series, Major Science, USA), automatická počítáčka buněk (TC20 Automated Cell Counter, Bio-Rad Laboratories, USA) a destičkový spektrofotometr (SynergyMx, BioTek Instruments, USA).

4.5 Metody

4.5.1 Kultivace buněk

HeLa buňky byly kultivovány v T-75 lahvích (TPP, Švýcarsko) v růstovém médiu DMEM doplněném o 10 % tepelně inaktivovaného FBS a ATB (penicilin a streptomycin) a drženy v CO₂ inkubátoru při teplotě 37 °C v prostředí s 95% obsahem vzduchu a 5% obsahem CO₂. Po dosažení 85–95% konfluence (vytvoření jednotné souvislé vrstvy) byly buňky dle standardního protokolu pasážovány pomocí trypsinu/EDTA a přesazeny na novou lahev (zhruba 2× týdně).

4.5.2 Nasazení buněk na experiment

Buňky byly spočteny na automatické počítače buněk. Pro zjištění životaschopnosti (viability) buněk byla k vzorku přidána trypanová modř. Na speciální sklíčko bylo napipetováno 10 μ l vzorku s tímto kyselým azobarvivem.

Automatická počítačka buněk vyhodnocuje absolutní počet buněk a jejich životaschopnost na základě obrazové analýzy. Viabilita je vyhodnocována díky obarvení mrtvých buněk trypanovou modří. Živé buňky zůstávají neobarvené, protože polární makromolekuly tohoto barviva se buď nedostanou přes neporušenou buněčnou membránu, nebo jsou vypuzeny ven díky aktivnímu transportu. Modře obarveny jsou proto jen buňky se značně narušenou integritou buněčné membrány, tedy většina mrtvých buněk (Kim a kol. 2016). Pokud nejsou buňky silně prostoupeny barvivem, pak je automatická počítačka nevyhodnotí jako mrtvé. Proto je detekováno zhruba 60 % mrtvých buněk (Mascotti a kol. 2000). Měření musí být provedeno co nejdříve po přidání trypanové modři ke vzorku. Toto cytotoxické barvivo rychle ničí živé buňky a postupně je obarvuje (Kim a kol. 2016).

Na experiment byly nasazeny pouze buňky s viabilitou vyšší než 90 %. Buňky byly nasazeny na 96jamkovou kultivační desku (5000 buněk v 100 μ l růstového média na jednu jamku v kultivační desce) a inkubovány po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C v prostředí s 5% obsahem CO₂. Počet buněk nasazených na experiment byl stanoven tak, aby hodnoty absorbancí u MTT testu byly v rozsahu 0,1–1,0.

4.5.3 Ošetření buněk testovanými látkami

Platinové komplexy (cDDP nebo komplex **1**) byly připraveny vždy čerstvé v příslušném rozpouštědle (DMSO nebo DMF) a dále v ředícím plastu ředěny kultivačním médiem na koncentrace 2–1000 μ M.

K buňkám kultivovaným v 100 μ l média bylo vždy přidáno 100 μ l komplexu o příslušné koncentraci. Finální koncentrace testovaných látek byly v rozmezí 1–500 μ M (1 μ M; 1,9 μ M; 3,9 μ M; 7,8 μ M; 15,6 μ M; 31,2 μ M; 62,5 μ M; 125 μ M; 250 μ M; 500 μ M). Pro kontrolu správnosti měření ve dvou řadách jamek nebyl žádný platinový komplex – v jedné řadě jamek bylo pouze kultivační médium a v druhé pouze kultivační médium

s DMSO nebo DMF. Koncentrace DMSO a DMF byly menší než 0,1 %; tedy rozpouštědla v takto nízkých koncentracích nijak neovlivňovala viabilitu buněk.

4.5.4 Ohřev buněčné kultury

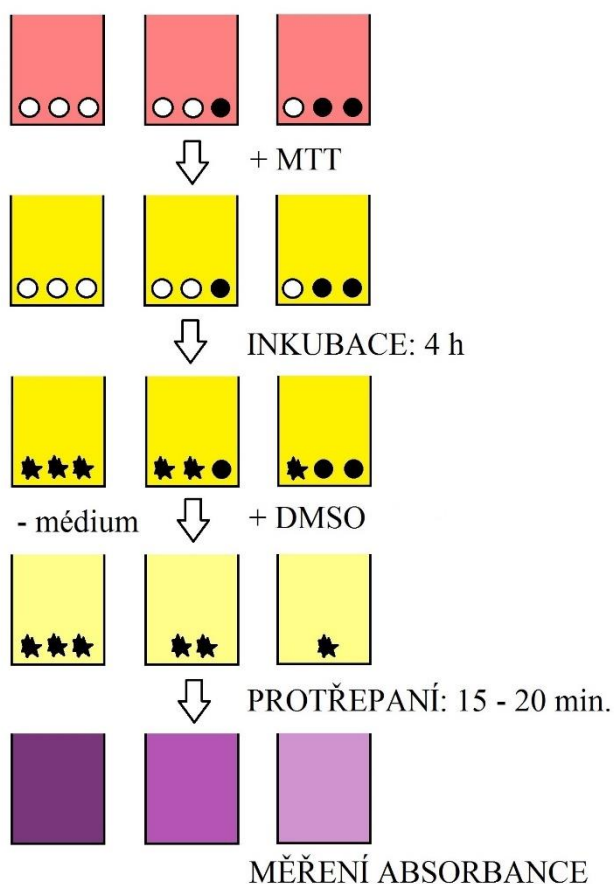
Ihned po ošetření testovanou látkou byly buňky umístěny na termoblok a zahřívány na teplotu 37 °C, 41 °C nebo 43 °C po dobu 1 hodiny. Poté bylo odstraněno růstové médium s komplexem, buňky byly opláchnuty 100 µl PBS 1× na jednu jamku kultivační desky a po přidání 100 µl čerstvého růstového média na jednu jamku kultivační desky byly inkubovány po dobu 72 hodin.

4.5.5 Test cytotoxicity

Cytotoxicita testovaných komplexů platiny (schopnost těchto chemických látek ničit živé buňky) byla zjišťována pomocí MTT testu. Principem MTT testu je redukce žluté soli MTT (rozpuštěné ve vodě) na tmavě fialový formazan (nerozpuštěný ve vodě) (Mosmann 1983; Freimoser a kol. 1999). Tato enzymatická reakce probíhá díky dehydrogenázám dýchacího řetězce na mitochondriální membráně pouze metabolicky aktivních (tedy živých) buněk. Hvězdicovité krystalky formazanu jsou následně rozpuštěny pomocí silného detergentu. Intenzitu fialového zbarvení, která je přímo úměrná počtu živých buněk, vyhodnocujeme spektrofotometricky (Freimoser a kol. 1999). Čím je roztok tmavší, tím je vyšší hodnota absorbance a také procento živých buněk.

K buňkám ošetřeným danou látkou bylo po 72 hodinách inkubace přidáno 10 µl 0,5% MTT na jednu jamku v kultivační desce. Buňky byly drženy v inkubátoru po dobu 4 hodin, kdy dehydrogenázy živých buněk přeměňovaly sůl MTT na formazan. Poté bylo odstraněno kultivační médium a přidáno 100 µl DMSO, který rozpustil vzniklé formazanové krystalky. Pro dobré rozpuštění byly kultivační destičky ponechány na třepače po dobu 15–20 minut. Pomocí spektrofotometru byly měřeny absorbance roztoků při vlnové délce 570 nm. Jako referenční byla nastavena absorbance při vlnové délce 630 nm. Schéma znázorňující průběh MTT testu je zobrazeno na obrázku č. 5. Procento živých buněk ve vzorcích ošetřených testovanou látkou bylo vypočteno normalizací ke kontrole. Kontrola představovala viabilitu 100 % a byly to buňky ošetřené pouze samotným DMSO nebo DMF. Z grafické závislosti viability buněk [%]

na koncentraci testované látky [μM] byly pomocí programu GraphPad Prism4 (GraphPadPrism Software, Inc., USA) vypočteny hodnoty IC_{50} (*The Half Maximal Inhibitory Concentration*), tedy hodnoty, které udávají koncentraci platinového komplexu, při níž tato látka způsobí smrt 50 % buněk. Pomocí programu Microsoft Excel (Microsoft, USA) byly vypočteny aritmetické průměry a směrodatné odchylky hodnot IC_{50} obou testovaných látek pro teploty 37 °C, 41 °C a 43 °C. Dále byly výsledky statisticky vyhodnoceny t-testem pomocí programu GraphPad Prism4.

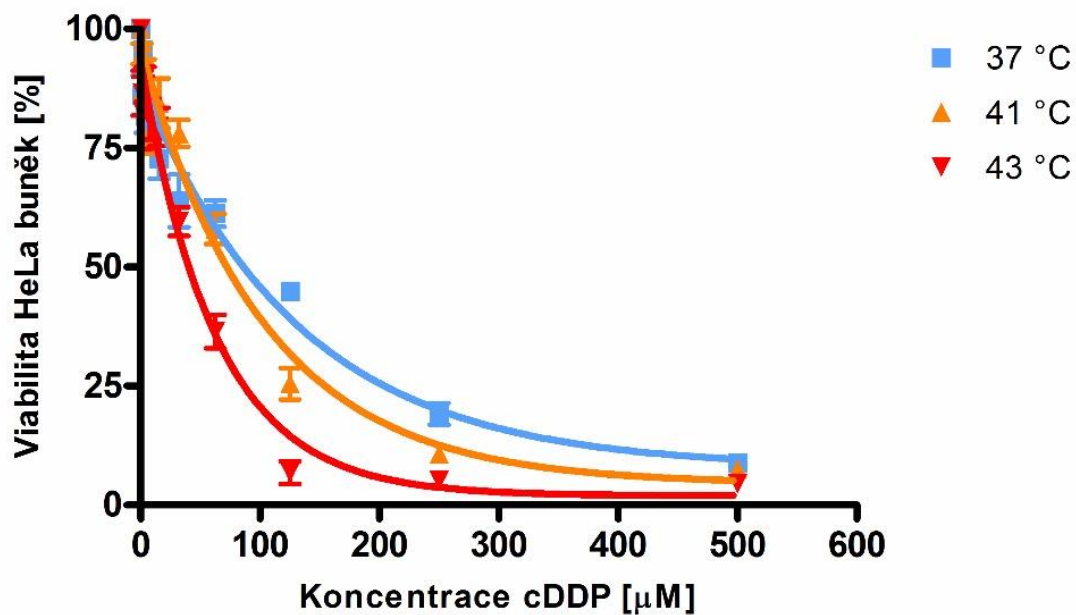


Obrázek č. 5 Schéma MTT testu. (Živé buňky (○) redukují žlutou sůl MTT na tmavě fialový formazan. Mrtvé buňky (●) nejsou metabolicky aktivní a tuto schopnost nemají. Intenzita fialového zbarvení je přímo úměrná počtu živých buněk).

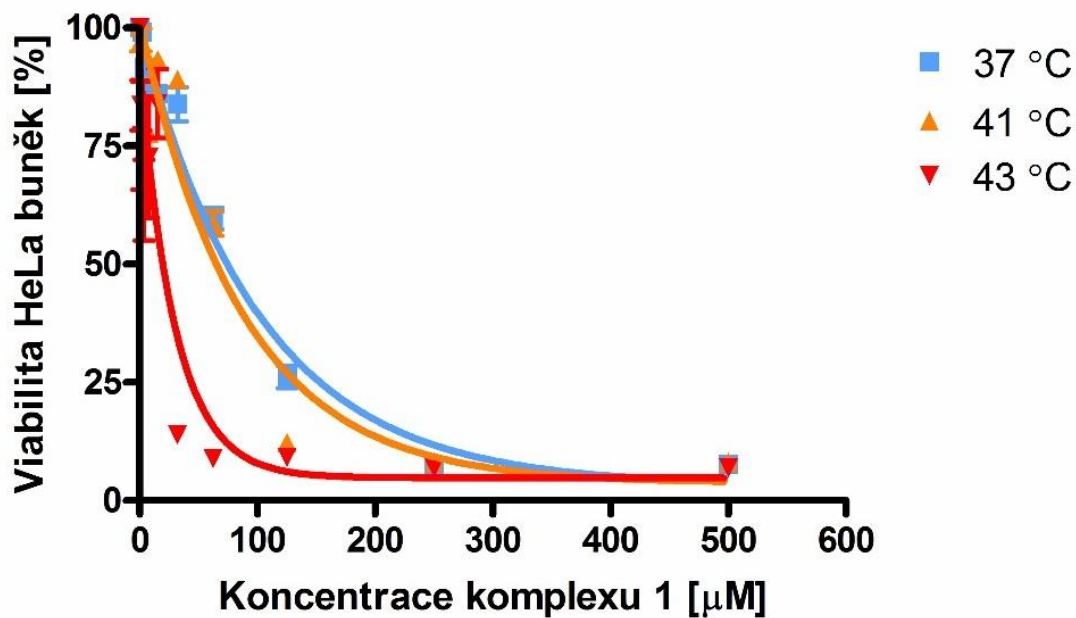
5. VÝSLEDKY

V této kapitole jsou uvedeny výsledky experimentů realizovaných v Laboratoři molekulární biofyziky a farmakologie Univerzity Palackého v Olomouci v roce 2016. Uvedené experimenty byly zaměřeny na testování vlivu hypertermie na cytotoxicitu cDDP a nového platinového komplexu *trans*-[PtCl₂(NH₃)(1-methyl-7-azaindol)] s protinádorovým účinkem. Pro tuto práci byly použity HeLa buňky, tedy buňky lidského adenokarcinomu děložního čípku. Buňky byly ošetřeny testovanými látkami o různých koncentracích v rozmezí 1–500 μM. Bezprostředně po ošetření byly buněčné kultury zahřáty na teplotu 41 °C nebo 43 °C a inkubovány za dané teploty v přítomnosti platinového komplexu po dobu 1 hodiny. Pro srovnávací účely byl stejný experiment proveden také při teplotě 37 °C. Viabilita buněk byla stanovena pomocí MTT testu 72 hodin po ošetření. Všechna měření byla provedena v aseptickém prostředí a zopakována nejméně čtyřikrát v kvadruplikátu. Ze získaných hodnot viability buněk pro různé koncentrace testovaných komplexů a pro různé teploty byly pomocí programu GraphPad Prism4 sestaveny grafy závislosti viability HeLa buněk [%] na koncentraci testovaného komplexu [μM] pro teploty 37 °C, 41 °C a 43 °C. Podrobný postup provedení experimentů je popsán v kapitole 4.5 Metody této bakalářské práce.

Bylo zjištěno, že kombinace ošetření buněčné kultury platinovým komplexem a zvýšené teploty ovlivňuje cytotoxickou aktivitu u obou testovaných látek. Graf závislosti viability HeLa buněk [%] na koncentraci cDDP nebo komplexu **1** [μM] pro teploty 37 °C, 41 °C a 43 °C je zobrazen na obrázku č. 6, respektive č. 7. Z obou grafů vyplývá, že viabilita HeLa buněk s rostoucí koncentrací testované látky klesá zhruba exponenciálně. V závislosti na teplotě je pak největší pokles životaschopnosti zřejmý u nejvyšší teploty, tj. 43 °C, pro oba testované komplexy. Viabilita buněk byla naopak nejméně snížena při použití teploty 37 °C. Z grafů je dále patrné, že komplex **1** byl ve srovnání s cDDP efektivnější ve snižování viability HeLa buněk při teplotách 37 °C a 43 °C.



Obrázek č. 6 Graf závislosti viability HeLa buněk [%] na koncentraci cDDP [μM] pro teploty 37 °C, 41 °C a 43 °C.



Obrázek č. 7 Graf závislosti viability HeLa buněk [%] na koncentraci komplexu 1 [μM] pro teploty 37 °C, 41 °C a 43 °C.

Z grafických závislostí viability HeLa buněk na koncentraci testovaného komplexu byly rovněž pomocí programu GraphPad Prism4 vypočteny hodnoty IC_{50} . Hodnota IC_{50} odpovídá koncentraci platinového komplexu, při které tato látka způsobí smrt 50 % testovaných buněk. Aritmetické průměry IC_{50} a jejich směrodatné odchylky pro teploty 37 °C, 41 °C a 43 °C vypočtené pomocí programu Microsoft Excel jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Obdržené aritmetické průměry hodnot IC_{50} obou testovaných látek byly rovněž pomocí programu GraphPad Prism4 statisticky vyhodnoceny t-testem. Bylo zjištěno, že rozdíly v hodnotách IC_{50} mezi testovanými komplexy pro teplotu 41 °C nejsou statisticky významné, zatímco pro teploty 37 °C a 43 °C byly statisticky významné (tedy pravděpodobnost $P < 0,01$). Pro teplotu 37 °C byla pravděpodobnost $P < 0,0001$ a pro teplotu 43 °C $P < 0,0005$.

Tabulka č. 3 Hodnoty cytotoxicity cDDP a komplexu **1** vyjádřené jako IC_{50} [μ M] pro teploty 37 °C, 41 °C a 43 °C. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky.^a

IC_{50} [μ M]	37 °C	41 °C	43 °C
cDDP	85,2 ± 1,3	67,4 ± 2,4	42,9 ± 1,5
komplex 1	73,4 ± 1,9*	66,5 ± 0,9	23,9 ± 1,9*

^aHodnoty označené hvězdičkou jsou statisticky odlišné od hodnot IC_{50} pro stejné teploty u cDDP.

Z výsledků uvedených v tabulce pro cDDP je patrné, že hodnoty IC_{50} pro 41 °C a 43 °C klesly zhruba 1,3×; respektive 2× v porovnání s hodnotou IC_{50} pro 37 °C. Při uvedených zvýšených teplotách byla tedy potřebná menší koncentrace testovaného léčiva než při teplotě 37 °C k usmrcení stejného počtu buněk, přičemž nejlepších výsledků bylo dosaženo při nejvyšší testované teplotě. Hodnota IC_{50} pro 43 °C v porovnání s hodnotou IC_{50} pro 41 °C pak klesla zhruba 1,6×. Pro komplex **1** bylo dosaženo podobného trendu v poklesu hodnot IC_{50} se zvyšující se teplotou ošetření nádorových buněk. Hodnota IC_{50} pro 41 °C v porovnání s hodnotou IC_{50} pro 37 °C klesla zhruba 1,1× a pro 43 °C v porovnání s hodnotou pro 37 °C klesla zhruba 3,1×. Hodnota IC_{50} pro 43 °C v porovnání s hodnotou IC_{50} pro 41 °C pak klesla zhruba 2,8×.

Na základě získaných výsledků lze konstatovat, že cytotoxická účinnost studovaných komplexů stoupá se zvyšující se teplotou aplikovanou na buněčnou kulturu. Při porovnání cytotoxicity obou látek pro teplotu 37 °C je patrná zhruba o 13,8 % vyšší aktivita komplexu **1**. Pro teplotu 41 °C jsou hodnoty IC₅₀ obou komplexů zhruba stejné (pomocí t-testu nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl). Pro teplotu 43 °C je opět hodnota IC₅₀ komplexu **1** menší než hodnota IC₅₀ cDDP a to zhruba o 44,3 %. Při ošetření HeLa buněk komplexem **1** v kombinaci s hypertermií při 43 °C bylo tedy dosaženo nejvyšší cytotoxicity v uvedené kultuře. Relativní chyba všech měření se pohybovala v rozmezí 1,4–7,9 %. U obou testovaných komplexů byla relativní chyba měření nejvyšší pro teplotu 43 °C.

6. DISKUSE

Postup experimentu, který testoval vliv hypertermie na cytotoxicitu dvou platinových komplexů – cisplatinu a komplexu *trans*-[PtCl₂(NH₃)(1-methyl-7-azaindol)], byl naplánován na základě údajů získaných z odborné literatury a dále upraven dle možností technického zázemí testovací laboratoře.

Jak již bylo řečeno, pro testování byla zvolena cDDP, u které bylo dříve potvrzeno zvýšení schopnosti ničit nádorové buňky při kombinaci ošetření s hypertermií (Baba a kol. 1989; Xu a Alberts 1988; Herman a kol. 1989; Akaboshi a kol. 1994; Ohno a kol. 1994; Van Bree a kol. 2001). Postup celého experimentu byl nejprve optimalizován a proveden s použitím cDDP. Pomocí zavedeného testu byl následně zkoumán vliv hypertermie na cytotoxickou aktivitu nového protinádorově účinného komplexu *trans*-[PtCl₂(NH₃)(1-methyl-7-azaindol)]. Tento komplex byl vybrán, protože byl již dříve testován v Laboratoři molekulární fyziky a farmakologie Univerzity Palackého v Olomouci a bylo zjištěno, že i přes to, že je to derivát jinak klinicky neúčinné transplatinu, tak vykazuje protinádorovou účinnost.

Rozsah koncentrací cDDP pro experimenty byl zvolen na základě informací uvedených v publikaci Herman a kol. (1989), kteří testovali vliv cytotoxicity cDDP a dalších nových platinových komplexů na buňkách karcinomu prsu EMT6 a dosáhli pozitivních výsledků. Při tomto experimentu použili koncentrace léčiv 1–500 μM. Pro srovnání byly totožné koncentrace použity také při ošetření buněk komplexem **1**.

Dále bylo při optimalizaci pracovního postupu nezbytné stanovit testovací teploty a dobu expozice buněčné kultury těmto teplotám. V mnoha odborných publikacích, mj. Cohen a Robins 1987; Xu a Alberts 1988; Hermann a kol. 1989; Akaboshi a kol. 1994; Ohno a kol. 1994 byla HT aplikována po dobu jedné hodiny. Baba a kol. 1989 však použili dobu ohřevu dvě hodiny a Van Bree a kol. 2001 dobu 70 minut. Jelikož pro HT po dobu jedné hodiny kombinovanou s působením cDDP bylo v uvedených pracích dosaženo nejlepších výsledků, zvolili jsme tento druh ošetření i pro náš experiment. Také teploty použité při HT se v různých publikacích liší. Většina se pohybuje v rozmezí 40–44 °C (Cohen a Robins 1987; Xu a Alberts 1988; Baba a kol. 1989; Herman a kol. 1989; Akaboshi a kol. 1994; Ohno a kol. 1994; Van Bree a kol. 2001). Jelikož teplota 44 °C je již hraniční teplotou, kterou snášejí zdravé savčí buňky (Mallory a kol. 2016) a k selektivnímu poškození nádorových buněk dochází

při teplotách nad 40 °C (Hildebrandt a kol. 2002; Wust a kol. 2002; Habash a kol. 2006; Mallory a kol. 2016), byly pro náš experiment zvoleny teploty 41 °C a 43 °C. V některých studiích (Cohen a Robins 1987; Xu a Alberts 1988; Herman a kol. 1989; Akaboshi a kol. 1994; Ohno a kol. 1994) byla použita rovněž kontrolní teplota 37 °C (tedy zhruba fyziologická teplota lidského těla), která byla v našich experimentech také testována, aby bylo možné porovnat případný rozdíl aktivity studovaných sloučenin při HT a normální teplotě.

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.3 Hypertermie a protinádorová léčiva, Hildebrandt a kol. 2002 a Wust a kol. 2002 ve svých publikacích uvádějí, že efektivita synergického působení HT a CT je ovlivněna sekvencí aplikace HT a CT a dále dobou mezi HT a CT. Cohen a Robins 1987; Baba a kol. 1989; Ohno a kol. 1994; Hildebrandt a kol. 2002 a Issels 2008 ve svých odborných článcích prezentují, že k největší chemosensitizaci nádorových buněk na většinu testovaných protinádorových léčiv dochází při současné aplikaci HT a CT. Hildebrandtovi a kol. 2002 se rovněž nejlépe osvědčilo dodržet co nejkratší časové rozmezí mezi ošetřením buněčné kultury testovanou látkou a aplikací zvýšené teploty. Z tohoto důvodu byl v našem experimentu zvolen ohřev buněčné kultury ihned po ošetření testovaným platinovým komplexem.

Většina autorů (Cohen a Robins 1987; Xu a Alberts 1988; Baba a kol. 1989; Herman a kol. 1989; Akaboshi a kol. 1994; Ohno a kol. 1994; Van Bree a kol. 2001) použila k ohřevu buněčné kultury vodní lázeň, kde cirkulovala voda a požadovaná teplota byla kontrolována pomocí teploměrů. Jelikož všechny tyto studie jsou již staršího data a v dnešní době jsou díky technickému pokroku běžně komerčně dostupné termobloky, které efektivně udržují nastavenou teplotu, vybrali jsme pro experiment termoblok Ultimate Dry Bath Incubator MC-01 series (Major Science, USA). Prostor pro ohřev vzorků měl u tohoto termobloku přesně rozměry 96jamkové kultivační desky, čímž byla zajištěna homogenita ohřevu buněk ve všech jamkách.

Z výsledků optimalizovaných experimentů na HeLa buňkách, které byly provedeny v rámci této bakalářské práce bylo potvrzeno, že se vzrůstající teplotou ohřevu a zvyšující se koncentrací cDDP, roste cytotoxicita této látky. Obdobných výsledků bylo dosaženo také pro komplex **1**. Byla tedy potvrzena naše hypotéza, že také aktivita této nové látky může být zvýšena při kombinaci s hypertermií.

Získané údaje byly porovnány s výsledky obdobných studií dostupných v odborné literatuře. Xu a Alberts (1988) uvádějí, že při vzrůstu teploty o 3 °C, klesá hodnota IC₅₀ cDDP zhruba 10×. Ohno a kol. (1994) při použití stejného metalofarmaka prokázali zhruba 4× nižší hodnotu pro teplotu 41 °C než pro teplotu 37 °C. V našem experimentu se hodnota IC₅₀ se vzrůstající teplotou zmenšila poněkud méně. Tento rozdíl mohl být způsoben použitím rozdílných buněčných linií. V našem experimentu byly použity HeLa buňky, zatímco Xu a Alberts (1988) prováděli testování na buňkách lidského ovariálního adenokarcinomu UACC-66 a Ohno a kol. (1994) na myši leukemické buněčné linii L1210.

Kromě cisplatin byly v některých studiích testovány také jiné platinové komplexy, např. karboplatina (Cohen a Robins 1987; Xu a Alberts 1988; Herman a kol. 1989) nebo iproplatina (Xu a Alberts 1988). Ve všech výše uvedených studiích byl prokázán synergický účinek hypertermie a daných komplexů. Xu a Alberts (1988) srovnávali účinnost hypertermie v kombinaci s cDDP, karboplatinou a iproplatinou na buňkách lidského ovariálního adenokarcinomu UACC-66. Z jejich studie vyplývá, že nejvíce účinná je cDDP (má nejnižší hodnotu IC₅₀). Největší účinnost cDDP byla prokázána rovněž Hermanem a kol. (1989), který srovnával cDDP a další platinové komplexy (karboplatinu; *trans*-Pt(NH₃)₂Cl₂; K₂PtCl₄; KPt(NH₃)Cl₃; [Pt(NH₃)₃Cl]Cl; [Pt(NH₃)₄]Cl₂).

Potenciace cytotoxického působení vlivem HT byla testována také u platinových komplexů s *trans* geometrií. V práci Hermana a kol. (1989) bylo zjištěno, že komplex *trans*-Pt(NH₃)₂Cl₂ byl zhruba 7× více cytotoxický při teplotě 43 °C než při teplotě 37 °C. V našem experimentu byla cytotoxicita komplexu **1** při 43 °C zhruba 3,1× vyšší než při teplotě 37 °C.

7. ZÁVĚR

V první části této bakalářské práce byla popsána metalofarmaka a fyzikální faktory (světlo, teplo a ionizující záření) ovlivňující jejich účinek. Největší pozornost byla věnována teplu – hypertermii (historii, typům, principům ohřevu, mechanismu), hypertermii v kombinaci s protinádorovými léčivy a klinickému využití hypertermie. Hlavním cílem této práce bylo zkoumání vlivu hypertermie na cytotoxickou účinnost dvou platnatých komplexů – metalofarmaka cisplatiny a komplexu *trans*-[PtCl₂(NH₃)(1-methyl-7-azaindol)], který by v budoucnu mohl být vhodným kandidátem pro kombinovanou léčbu s použitím hypertermie. Cytotoxicita byla testována na HeLa buňkách (buňky lidského adenokarcinomu děložního čípku) při 37 °C (fyziologická teplota lidského organismu) a k vyvolání hypertermie byly použity teploty 41 °C a 43 °C.

Z obdržených výsledků vyplývá, že cytotoxická aktivita obou testovaných komplexů byla ovlivněna hypertermií. Bylo zjištěno, že komplex *trans*-[PtCl₂(NH₃)(1-methyl-7-azaindol)] je účinnější než cisplatina a nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití teploty 43 °C. Komplex *trans*-[PtCl₂(NH₃)(1-methyl-7-azaindol)] by tedy mohl být dále testován pro použití v multimodální léčbě.

8. SEZNAM LITERATURY

Akaboshi M, Tanaka Y, Kawai K, Akuta K, Masunaga S, Ono K (1994) Effect of hyperthermia on the number of platinum atoms binding to DNA of HeLa cells treated with ^{195m}Pt-radiolabelled *cis*-diaminedichloroplatinum(II). *Int J Radiat Biol* 66, 215–220

Baba H, Siddik ZH, Strebel FR, Jenkins GN, Bull JMC (1989) Increased Therapeutic Gain of Combined *cis*-Diaminedichloroplatinum(II) and Whole Body Hyperthermia Therapy by Optimal Heat/Drug Scheduling. *Cancer Res* 49, 7041–7044

Bleehen NM (1982) Hyperthermia in the treatment of cancer. *Brit J Cancer* 45, 96–100

Cohen JD, Robins HI (1987) Hyperthermic Enhancement of *cis*-Diammine-1,1-cyclobutane Dicarboxylate Platinum(II) Cytotoxicity in Human Leukemia Cells *in Vitro*. *Cancer Res* 47, 4335–4337

Falk MH, Issels RD (2001) Hyperthermia in onkology. *Int J Hyperther* 17, 1–18

Freimoser FM, Jakob CA, Aebi M, Tuor U (1999) The MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] Assay Is a Fast and Reliable Method for Colorimetric Determination of Fungal Cell Densities. *Appl Environ Microb* 65, 3727–3729

Gas P (2011) Essential Facts on the History of Hyperthermia and their Connections with Electromedicine. *Prz Elektrotechniczn* 87, 37–40

Glazer ES, Curley SA (2011) The Ongoing History of Thermal Therapy for Cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 20, 229–235

Habash RW, Bansal R, Krewski D, Alhafid HT (2006) Thermal Therapy, Part 2: Hyperthermia Techniques. *Crit Rev Biomed Eng* 34, 491–542

Herman TS, Teicher BA, Chan V, Collins LS, Abrams MJ (1989) Effect of heat on the cytotoxicity and interaction with DNA of a series of platinum complexes. *Int J Radiat Oncol* 16, 443–449

Hildebrandt B, Wust P, Ahlers O, Dieing A, Sreenivasa G, Kerner T, Felix R, Riess H (2002) The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit Rev Oncol Hemat* 43, 33–56

Chicheł A, Skowronek J, Kubaszewska M, Kanikowski M (2007) Hyperthermia – description of a method and a review of clinical applications. *Rep Pract Oncol Radiother* 12, 267–275

Issels RD (2008) Hyperthermia adds to chemotherapy. *Eur J Cancer* 44, 2546–2554

Kim SI, Kim HJ, Lee HJ, Lee K, Hong D, Lim H, Cho K, Jung N, Yi YW (2016) Application of a non-hazardous vital dye for cell counting with automated cell counters. *Anal Biochem* 492, 8–12

Mallory M, Gogineni E, Jones GC, Greer L, Simone CB (2016) Therapeutic hyperthermia: The old, the new, and the upcoming. *Crit Rev Oncol Hemat* 97, 56–64

Mascotti K, McCullough J, Burger SR (2000) HPC viability measurement: trypan blue versus acridine orange and propidium iodide. *Transfusion* 40, 693–696

Mjos KD, Orvig C (2014) Metallodrugs in Medicinal Inorganic Chemistry. *Chem Rev* 114, 4540–4563

Mosmann T (1983) Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J Immunol Methods* 65, 55–63

Ohno S, Siddik ZH, Kido Y, Zwelling LA, Bull JMC (1994) Thermal enhancement of drug uptake and DNA adducts as a possible mechanism for the effect of sequencing hyperthermia on cisplatin-induced cytotoxicity in L1210 cells. *Cancer Chemoth Pharm* 34, 302–306

Pizarro AM, Sadler PJ (2009) Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes. *Biochimie* 91, 1198–1211

Pracharova J, Radosova Muchova T, Dvorak Tomastikova E, Intini FP, Pacifico C, Natile G, Kasparkova J, Brabec V (2016) Anticancer potential of a photoactivated transplatin derivative containing the methylazaindole ligand mediated by ROS generation and DNA cleavage. *Dalton T* 45, 13179–13186

Pracharova J, Saltarella T, Radosova Muchova T, Scintilla S, Novohradsky V, Novakova O, Intini FP, Pacifico C, Natile G, Ilik P, Brabec V, Kasparkova J (2015) Novel Antitumor Cisplatin and Transplatin Derivatives Containing 1-Methyl-7-Azaindole: Synthesis, Charakterization, and Cellular Responses. *J Med Chem* 58, 847–859

Pracharova J, Zerzenkova L, Stepankova J, Novakova O, Farrer NJ, Sadler PJ, Brabec V, Kasparkova J (2012) Interactions of DNA with a New Platinum(IV) Azide Dipyridine Complex Activated by UVA and Visible Light: Relationship to Toxicity in Tumor Cells, *Chem Res Toxicol* 25, 1099–1111

Sethi M, Chakarvarti SK (2015) Hyperthermia Techniques for cancer treatment: A Review. *Int J PharmTech Res* 8, 292–299

Van Bree C, Franken NAP, Snel FAM, Haveman J, Bakker PJM (2001) Wild-type p53-function is not required for hyperthermia-enhanced cytotoxicity of cisplatin. *Int J Hyperther* 17, 337–346

Van der Zee J (2002) Heating the patient: a promising approach? *Ann Oncol* 13, 1173–1184

Wust P, Hildebrandt B, Sreenivasa G, Rau B, Gellermann J, Riess H, Felix R, Schlag PM (2002) Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol* 3, 487–497

Xu MJ, Alberts DS (1988) Potentiation of platinum analogue cytotoxicity by hyperthermia. *Cancer Chemoth Pharm* 21, 191–196

9. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1 Strukturní vzorce metalofarmak na bázi platiny (převzato a upraveno dle Mjos a Orvig 2014).	4
Obrázek č. 2 Strukturní vzorec trans-[PtCl ₂ (NH ₃)-1-methyl-7-azaindol] (převzato z Pracharova a kol. 2015).	4
Obrázek č. 3 Zařízení pro hloubkovou regionální hypertermii BSD-2000/3D (http://www.pyrexar.com/hyperthermia/bsd-2000 ; 2.8.2017).	13
Obrázek č. 4 Systém Iratherm pro celotělovou hypertermii (http://med.ardenne.de/?cat=90&lang=en ; 2.8.2017).	15
Obrázek č. 5 Schéma MTT testu.	31
Obrázek č. 6 Graf závislosti viability HeLa buněk [%] na koncentraci cDDP [μM] pro teploty 37 °C, 41 °C a 43 °C.	33
Obrázek č. 7 Graf závislosti viability HeLa buněk [%] na koncentraci komplexu 1 [μM] pro teploty 37 °C, 41 °C a 43 °C.	33

10. SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1 Schválená terapeutická metaloradiofarmaka (převzato a upraveno dle Mjos a Orvig 2014).	7
Tabulka č. 2 Přehledné shrnutí typů hypertermie využívaných v terapii různých nádorů (převzato a upraveno dle Chicheř a kol. 2007).....	16
Tabulka č. 3 Hodnoty cytotoxicity cDDP a komplexu 1 vyjádřené jako IC ₅₀ [μM] pro teploty 37 °C, 41 °C a 43 °C.....	34