

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Bakalářská práce

Olomouc 2011

Lukáš Malina

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Studium fotodynamického vlivu
na buněčné linie**

Bakalářská práce

Lukáš Malina

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: prezenční

Olomouc 2011

Vedoucí práce: Ing. Kateřina Tománková, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně v průběhu bakalářského studia pod vedením Ing. Kateřiny Tománkové, Ph.D. a s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci 4. 5. 2011

Lukáš Malina

Rád bych poděkoval Ing. Kateřině Tománkové, Ph.D. za její čas, odborné vedení, rady, materiály a osobní pomoc při vypracování bakalářské práce. Dále pak také děkuji za pomoc a za vytvoření výborných pracovních podmínek celému kolektivu Ústavu lékařské biofyziky.

SOUHRN

Fotodynamická terapie je nová metoda léčby nádorů, která využívá tvorby reaktivních forem kyslíku ke zničení nádorových buněk. Fotodynamická terapie zahrnuje aplikaci fotosensitivní látky (fotosensitizeru) a následné světelné záření. Ozáření fotosensitizeru vede k tvorbě cytotoxických látek, které následně indukují buněčnou smrt.

Záření způsobuje excitaci fotosensitizeru do tripletového stavu. Tento stav může podlehnout dvěma různým reakcím. První typ zahrnuje reakci excitovaného fotosensitizeru se substrátem. Jeho prostřednictvím dojde k přenosu energie na kyslík, čímž dojde ke vzniku volných radikálů a radikálových iontů. Při druhém typu dochází k přenosu energie z excitovaného fotosensitizeru přímo na kyslík. Tato reakce vede k vytvoření velice cytotoxického singletového kyslíku. Vytvářené reaktivní formy kyslíku způsobují dva druhy buněčné smrti – apoptózu a nekrózu.

V této práci byl testován vliv různých fotosensitizerů a různé intenzity záření na tvorbu reaktivních forem kyslíku a na celkovou viabilitu pomocí kinetické analýzy a MTT testu. Studie byla provedena na G361 (kožní melanom) a NIH3T3 (myší fibroblasty) buněčných liniích. Jako fotosensitizer byl použit *meso*-tetrakis(4-sulfonatofenyl) porfyrin (TPPS₄) a jeho zinečnaté (ZnTPPS₄), paladnaté (PdTPPS₄) a hořečnaté (MgTPPS₄) deriváty. Jako zdroje záření byly použity luminiscenční diody (LED). Velikost světelných dávek byla 1 J/cm², 5 J/cm² a 10 J/cm².

Výsledky této práce představují závislost fotodynamické terapie na typu buněčné linie, typu fotosensitizeru, jeho koncentraci a také dávce záření.

SUMMARY

Photodynamic therapy is a new treatment modality of tumours utilizing the generation of reactive oxygen species to destruction of tumour cells. Photodynamic therapy involves application of a photosensitizing drug (photosensitizer) and subsequent light illumination. Irradiation of photosensitizer leads to the generation of cytotoxic species which subsequent induce cell death.

Irradiation causes excitation of photosensitizer to the triplet state. This state can undergo two different reactions. The first type involves reaction of excited photosensitizer with some substrate. Through it energy is transferred to oxygen to form free radicals and radical ions. During second type energy is directly transferred from excited photosensitizer to oxygen. This reaction leads to generate very cytotoxic singlet oxygen. Forming reactive oxygen species causing two types of cell death – apoptosis and necrosis.

In this work was studied effect of different photosensitizers and different light intensity on the production of reactive oxygen species and overall cell viability by kinetic analysis and MTT test. Study was performed in G361 (human skin melanom) and NIH3T3 (mouse fibroblasts) cell lines. As fotosensitizers were used *meso*-tetrakis(4-sulfonatophenyl) porphyrin (TPPS₄) and its zinc (ZnTPPS₄), palladium (PdTPPS₄) and magnesium (MgTPPS₄) derivates. As a source of radiation were used light emitting diodes (LED). Sizes of the light doses were 1 J/cm², 5 J/cm² and 10 J/cm².

Results of this work represent dependence of photodynamic therapy on type of cell line, photosensitizer type, its concentration and light doses.

OBSAH

1. CÍLE PRÁCE	9
2. ÚVOD	10
3. LITERÁRNÍ REŠERŠE	12
3.1 Historie fotodynamické terapie	12
3.2 Fotosensitizéry (PS)	13
3.2.1 Dělení PS	13
3.2.2 Distribuce PS	13
3.2.3 PS první generace	14
3.2.4 PS druhé generace	15
3.2.5 Ideální PS	16
3.3 Zdroje záření pro PDT	17
3.3.1 Typy zdrojů	18
3.3.2 Způsoby ozařování	19
3.4 Princip PDT	19
3.4.1 Reaktivní formy kyslíku (ROS)	19
3.4.2 Vznik ROS při PDT	20
3.4.3 Mechanismy poškození nádoru	23
3.4.3.1 Přímé usmrcení	23
3.4.3.2 Změna v cévním zásobení a imunitní reakce	23
3.4.3.3 Poškození biomolekul	24
3.5 Typy buněčné smrti	24
3.5.1 Apoptóza	25
3.5.1.1 Mitochondriální dráha	25
3.5.1.2 Ceramidová dráha	26
3.5.2 Nekróza	26
3.6 PDT <i>in vitro</i>	27
3.6.1 Vliv PDT a ftalocyaninu na kožní melanom	27
3.6.2 Vliv elektro-PDT na plicní adenokarcinom	27
3.7 PDT v klinické praxi	28
3.7.1 Využití PDT při léčbě rakoviny pankreatu	28
3.7.2 Dermatologické využití PDT	29
3.7.3 Využití účinků PDT pro léčbu rakoviny plic	30
3.7.4 Využití PDT u metastatického karcinomu v mozku	31
4. MATERIÁL A METODY	33
4.1 Buněčné linie	33

4.2 Fotosensitizéry	33
4.3 Ostatní materiál	34
4.4 Laboratorní přístroje + programy	34
4.5 Příprava a aplikace fotosensitizéru	34
4.6 ROS detekce	35
4.7 Ozařování	36
4.8 MTT test	37
5. VÝSLEDKY	39
5.1 Měření produkce ROS	39
5.1.1 G361 buňky (kožní melanom)	40
5.1.2 NIH3T3 buňky (myší fibroblasty)	42
5.1.3 G361 a NIH3T3 buňky bez ozáření	45
5.2 MTT test	46
5.2.1 G361 buňky (kožní melanom)	47
5.2.2 NIH3T3 buňky (myší fibroblasty)	50
5.2.3 G361 a NIH3T3 buňky bez ozáření	53
6. DISKUSE	55
7. ZÁVĚR	57
8. LITERATURA	59
9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	63

1 CÍLE PRÁCE

Prvním cílem bylo vypracovat rešerši na zadané téma bakalářské práce. Druhým cílem bylo ověřit vliv a účinnost fotodynamického efektu nově vyvíjených fotosensitizerů (TPPS₄, ZnTPPS₄, PdTPPS₄ a MgTPPS₄) na nádorových (G361) a nenádorových (NIH3T3) buněčných liniích měřením reaktivních forem kyslíku a pomocí MTT testu viability. Testování provést celkem při třech dávkách záření (1 J/cm², 5 J/cm², 10 J/cm²) a šesti koncentracích (0,5 μM; 1 μM, 5 μM; 10 μM; 50 μM; 100 μM). Výsledky jednotlivých fotosensitizerů poté porovnat.

2 ÚVOD

Fotodynamická terapie (PDT) je neustále se rozvíjející metoda, která představuje velkou naději pro léčbu určitých typů rakoviny. I když její samotné účinky jsou známé v podstatě již tisíce let, na lékařském poli se jedná stále o novou metodu. Již od svého objevu byla fotodynamická terapie pečlivě studována a spolu s ní i všechny související aspekty. Aby bylo možno navodit fotodynamický jev, je zapotřebí tří složek – fotosensitizeru, zdroje světla a kyslíku (Mitton a Ackroyd, 2008). Fotosensitizer (PS) je látka, která je po aplikaci do těla pacienta selektivně vychytávána nádorovou tkání. Druhou nezbytnou složkou je zdroj, který poskytuje světelné záření (například laser). Vlnová délka záření se odvíjí od toho, v jaké hloubce se nádor nachází. Lidská tkáň nejefektivněji propouští červenou část spektra. Čím delší je aktivační vlnová délka fotosensitizeru, tím hlouběji je světlo schopno penetrovat (Kübler, 2005). Léčba spočívá v aplikaci fotosensitizeru a následném zaměření světelného paprsku na postižené místo (nádorovou tkáň). Díky selektivnímu vychytávání je v místě nádoru větší koncentrace aplikované látky, která je zářením excitována a následným předáním energie umožní vznik fototoxických reaktivních forem kyslíku (ROS). Jejich množství je závislé na třetí důležité součásti PDT, kterou je kyslík. Vzniklé volné radikály jsou velmi důležité, protože jsou schopny různými mechanismy zprostředkovat destrukci nádorových buněk.

Existuje mnoho důvodů, proč je léčba pomocí světla čím dál populárnější. Jedním z nich je neinvazivnost PDT. Jak už samotný název napovídá, hlavním zdrojem, který se podílí na destrukci nádoru, je světelné záření. Proto není, na rozdíl od resekce, potřeba operativního zásahu do tkáně pacienta. Dalším důvodem je, že fotodynamická terapie je v podstatě bezbolestná, což není u jiných metod pravidlem (například u kryoterapie se uvádí silná bolestivost). Jednoduchý mechanismus a nenáročnost terapie umožňuje také ambulantní léčbu pacientů. Další velkou výhodou je schopnost fotosensitizeru fluorescence. Přebytečná energie, která vzniká po jeho ozáření a není využita pro vznik reaktivních forem kyslíku, se z fotosensitivní látky uvolní. Tato uvolněná energie způsobí pod ultrafialovým světlem fluorescenci, kterou je možno zachytit. Lze tak snadno lokalizovat místo, kde dochází k nádorovému bujení. I přes nesporná pozitiva má však i tato metoda léčby své nevýhody. Tou hlavní je fotosensitivita kůže. Proto je velmi důležitá dobrá ochrana před slunečním zářením. Je však nutné dodat, že fotodynamická terapie se stále vyvíjí. Používané látky jsou proto stále dokonalejší a vedlejší účinky tak minimalizovány.

V klinické praxi se v současnosti tato metoda používá například k léčbě rakoviny kůže, močového měchýře, plic, jícnu, děložních nádorů, mozkových nádorů a dalších benigních onemocnění. Využívá se jí ale také pro léčbu některých chronických onemocnění, jako je ateroskleróza, revmatická artritida nebo psoriáza. Dále se používá jako paliativní léčení,

které ani ne tak prodlouží, jako spíše značně zkvalitní život. Při chirurgickém zásahu může fotodynamická terapie také plnit roli adjuvantní léčby. Jelikož se jedná o neagresivní metodu, využívá se jí nejčastěji při léčbě nádorů v oblasti hlavy, krku a v těsné blízkosti velkých cév, kde je chirurgický zákrok velmi riskantní.

To, jak rychle a v jakém množství je fotosensitizer vychytáván, případně jak efektivně poskytuje reaktivní formy kyslíku, záleží zejména na jeho samotné struktuře. Mnoho velmi podobných fotosensitivních látek může mít dosti rozdílné vlastnosti. Přítomnost jiného kovu v jeho struktuře může ve velké míře ovlivnit to, v jak velké koncentraci bude látka schopna efektivně zničit rakovinovou tkáň. Cílem této práce je porovnat vybrané fotosensitizéry a vyhodnotit jejich účinnost při destrukci nádorových buněk.

3 LITERÁRNÍ REŠERŠE

3.1 HISTORIE FOTODYNAMICKÉ TERAPIE

Za mnohem méně účinného předchůdce fotodynamické terapie lze považovat jednoduché ozařování slunečními paprsky. Rozdíl v léčebných účincích je sice markantní, ale podstatné je, že již v dobách před naším letopočtem si lidé uvědomovali vlastnosti, které takové záření poskytuje. Využívání slunečního záření při léčbě některých onemocnění je známo již z Egypta před více než 3000 lety, ze staré Číny a také Indie.

Počátky moderních metod léčby datujeme do 19. století. V roce 1903 obdržel dánský lékař Niels Ryberg Finsen Nobelovu cenu za výzkum v oblasti fototerapie (Allison 2004). Zdárně léčil *Lupus vulgaris* (kožní TBC onemocnění) pomocí obloukové uhlíkové lampy, která imitovala sluneční spektrum.

V roce 1900 Hermann von Tappeiner popsal smrtící účinek světla a roztoku akridinu při pokusu s nálevníky (Mitton a Ackroyd, 2008). Zjistil, že akridin má letální vlastnosti pouze v přítomnosti záření (ve tmě byl neúčinný). Proto předpokládal, že bude možné použít některé fluoreskující látky k léčbě pacientů s kožními chorobami. Spolu s Albertem Jesionkem zveřejnili zprávu o svých pokusech léčby kožních nádorů. Léčba spočívala v interakci bílého světla s lokálně aplikovaným eosinem. V roce 1904 dokázali Tappeiner a Jodelbauer, že k dosažení léčebného efektu akridinu je nutná přítomnost kyslíku. Tappeiner poté začal pro ošetření fotoaktivní látkou s následným ozařováním za přítomnosti kyslíku používat pojem „fotodynamický“ efekt (Mitton a Ackroyd, 2008). V roce 1874 popsali Schulz a Baumstark fotosensitivitu u onemocnění, které nazvali *Pemphigus leprosus*. Šlo tehdy o nediodagnostikovanou kongenitální porfyrii. Tato nemoc vede až k znetvoření a k destrukci okrajových částí těla, které jsou vystavené světlu.

Německý fyzik Friedrich Meyer-Betz v roce 1913 studoval vliv porfyrinu na člověka. Účinky testoval nejprve na sobě samém. Pokus spočíval v aplikaci hematoporphyrinu a vystavení daného místa slunečním paprskům. Výsledkem byla fotosensitivita kůže, která mu způsobila otok, šokovou reakci a nakonec ho tento pokus málem stál život.

Ze současného pohledu můžeme všeobecně rozdělit vývoj fotodynamické terapie na dvě oblasti. První oblast se týká studie schopnosti, která zahrnuje hromadění se některých porfyrinů a příbuzných tetrapyrolových sloučenin v nádorech poté, co byly aplikovány do krevního řečiště. Naproti tomu druhá oblast se zabývá tumoricidním účinkem, kdy je nádor po podání fotosensitizeru ozářen viditelným světlem (Castano a kol., 2005).

3.2 FOTOSENSITIZÉRY (PS)

Jako fotosensitizer označujeme látku, která je velmi citlivá na světlo a hraje důležitou roli ve fotodynamické terapii při destrukci nádoru.

3.2.1 DĚLENÍ PS

Fotosensitizer lze dělit mnoha způsoby. Základní rozdělení je na fotosensitizer první a druhé generace (viz níže). Podle jejich charakteru lze dále rozdělit na hydrofobní a hydrofilní. Hydrofobní PS se váže přímo na membránu, kterou poškozuje a inaktivuje některé enzymy v ní vázané. Naproti tomu hydrofilní PS se kumuluje v lysozómech, mitochondriích, endoplasmatickém retikulu a různými mechanismy tak spouští kaskádu dějů, které vedou ke smrti buňky.

Systémová nebo lokální aplikace nabízí další možnost rozdělení. Systémový PS se hromadí v každé lézi, zatímco lokální musí být aplikován přímo do každé zvlášť. V případě velkého množství lézí může být snadnější použití systémového fotosensitizeru. Nicméně ten zároveň způsobuje systémovou fotosensitivitu, což je podstatnou nevýhodou. Mnoho primárních kožních lézí je však snadno přístupných topickému fotosensitizeru. Právě díky možnosti snadné aplikace a ozáření volí tuto variantu většina pacientů (Allison a kol., 2006).

3.2.2 DISTRIBUCE PS

Po aplikaci PS je třeba, aby se jeho molekuly krevním řečištěm dostaly až k nádoru. K takovému účelu se využívá několika přenašečů. Nejvýznamnějším je LDL (Low Density Lipoprotein) a albumin. Méně často se využívá HDL (High Density Lipoprotein) a velmi vzácně se pak mohou spojit molekuly PS navzájem a vytvořit tak intramolekulární agregáty, které velikostně odpovídají bílkovinným přenašečům. Na albumin se váží spíše hydrofilní (TPPS₄) a na LDL naopak více hydrofobní fotosensitizery. K intracelulární akumulaci látek poté dochází pomocí receptor-zprostředkované endocytózy (Sharman a kol., 2004). Další možnou cestu fotosensitizerů do nádoru představuje difúze a fagocytóza. PS má tendenci hromadit se v nádorech více než ve zdravé tkáni (Nowis a kol., 2005). Důvodem je zvýšená propustnost kapilár v okolí nádoru, a také zvýšené množství receptorů pro lipoproteiny, které váží molekuly PS.

Vyvíjí se však několik metod, které se snaží o přímé navádění molekul fotosensitizeru do nádorové tkáně. Jednou z nich je tzv. fotoimunoterapie. Ta se snaží využívat monoklonálních protilátek, které by cíleně směřovaly k nádoru a šetřily tak zdravou tkáň. Komplikací této metody je ale fakt, že tumor-specifické antigeny byly nalezené v experimentálně vytvořených nádorech, ale ne v tzv. spontánních nádorech. Většina zjištěných antigenů v lidském nádoru

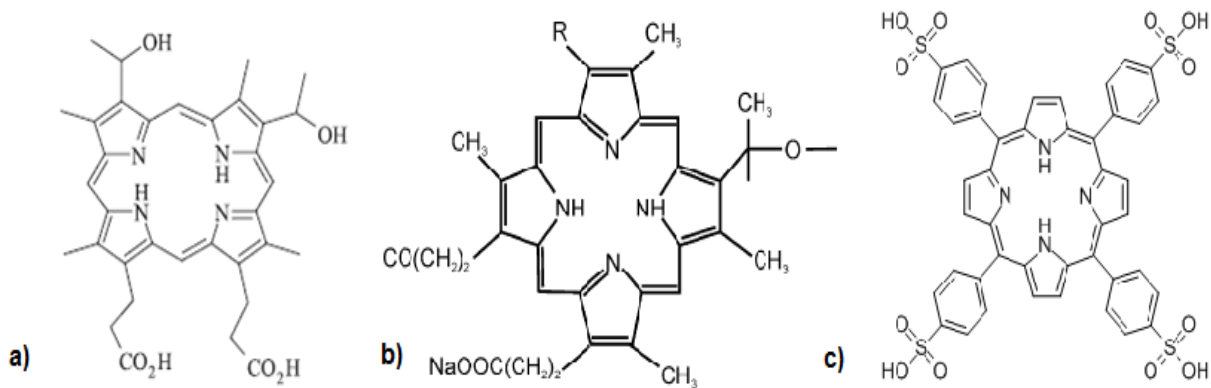
představuje tzv. tumor-asociované antigeny. Ty jsou sice přítomné na nádorech, ale lze je také najít na zdravé tkáni (Dongen a kol., 2004). Další možností, jak efektivněji dosáhnout větší koncentrace PS v nádorové tkáni, je tzv. elektro-fotodynamická terapie (EPDT). Jedná se o spojení dvou metod – elektrochemoterapie a fotodynamické terapie. Elektrochemoterapie umožňuje elektricky zprostředkovaný transport látky do buněk. Působením intenzivního elektrického pole může nastat destrukce membrány, ale také mohou vzniknout póry, kterými by fotosensitizer mohl za určitých podmínek snadněji pronikat do buňky. V elektrochemoterapii mohou buňky, které podlely elektroporaci, vykazovat 300 – 700 násobně zvýšenou intracelulární koncentraci aplikované látky Saczko a kol. (2010).

3.2.3 PS PRVNÍ GENERACE

První generace je tvořena deriváty hematoporphyrinu a ostatními porfyriny (Obr. 1). Jejich chemická struktura je nápadně podobná lidskému hemoglobinu, ze kterého byly první z nich také izolovány. Fotosensitivní účinek porfyrinů je známý již od sklonku minulého století. Popsali ho už roku 1874 Schulz a Baumstark.

První látkou, která byla schválena pro využívání ve fotodynamické terapii, byl porfimer sodný. V současnosti je stále rozsáhle využíván a zůstává jedním z nejběžnějších fotosensitizerů, který se používá pro léčbu nedermatologických tumorů. Porfimer sodný byl schválen pro užívání při pokročilém i raném stádiu rakoviny plic, superficiální rakovině žaludku, adenokarcinomu jícnu, rakovině děložního hrdla nebo močového měchýře. Výhody porfimeru sodného jsou takové, že dokáže efektivně zničit tumory, je netoxický a lehce rozpustný ve vodě, což umožňuje intravenózní podávání (Brown a kol., 2004). Má ovšem také jisté nevýhody, které jsou společné všem fotosensitizerům první generace. Problémem je nižší absorpční maximum v oblasti viditelného světla (630 nm), nižší produkce singletového kyslíku, určení chemické struktury a identifikace jednotlivých složek, které tvoří tyto látky. Po intravenózním podání tak často způsobují fotosensitivitu kůže, jakmile dojde k interakci se slunečním zářením. Po aplikaci je obvykle potřeba 2 - 3 dny omezit styk pacienta se světlem. V současnosti se v klinické praxi používají firemní názvy jako Photofrin (USA), Photocarcinorin (Čína), Photosan (Německo), Photogem (Rusko) či Haematodrex (Bulharsko).

Mezi fotosensitizery první generace řadíme také *meso*-tetrakis(4-sulfonatophenyl) porphyrin (TPPS₄), který v roce 1962 syntetizoval J. W. Winkelman. Bylo zjištěno, že při systémovém podání může být TPPS₄ neurotoxický. Ovšem při lokálním použití nebyla žádná neurotoxicita pozorována, pravděpodobně díky nízké koncentraci fotosensitizeru (Allison a kol., 2004). V České republice je použití TPPS₄ pro lokální použití schváleno.



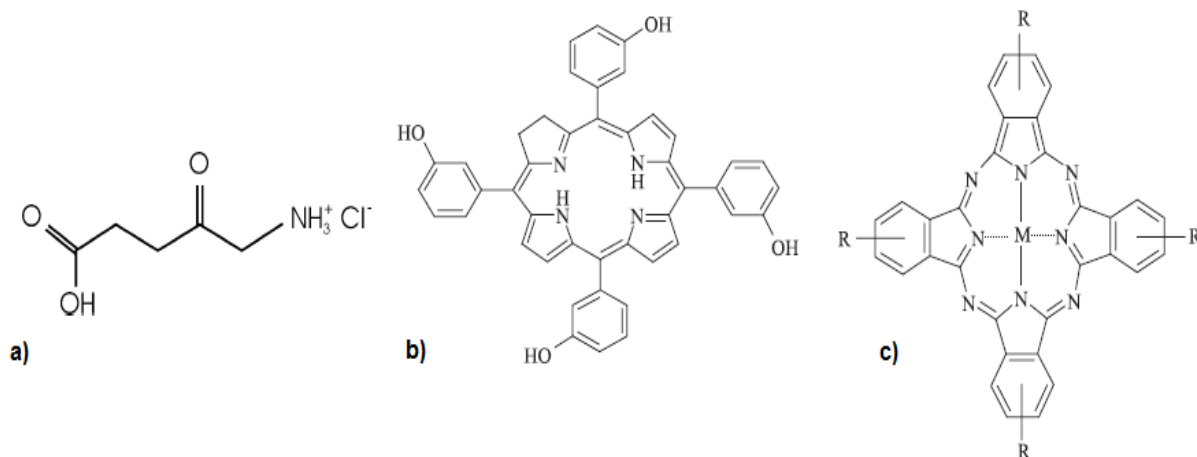
Obr. 1: Strukturní vzorce a) hematoporphyrinu, b) Photofrinu, c) TPPS₄

(převzato z http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB2146542.htm; van Dongen a kol., 2004; Allison a kol., 2004).

3.2.4 PS DRUHÉ GENERACE

Druhá generace fotosenzitizérů byla vyvíjena za účelem vylepšení vlastností generace první. Jednou z nich je snadnější a rychlejší vylučování z oběhu a kůže. Díky tomu je izolace pacientů od světla nutná jen po krátký čas (Kessel, 2004). Jelikož byla známa jejich struktura, bylo možné minimalizovat nežádoucí fotosensitivitu po ukončení léčby. Do této skupiny řadíme například 5-aminolevulovou kyselinu (ALA), chloriny, ftalocyaniny, z chlorofylu izolované pyropheoforbidy a pheoforbidy, purpuriny a naftalocyaniny (Obr. 2).

Ftalocyaniny jsou rozsáhle studovanou skupinou fotosenzitizérů, do které lze zařadit i jim příbuzné naftalocyaniny. Jsou to syntetické porfyriny, které vykazují největší absorpci v červené oblasti spektra, což odpovídá vlnové délce 630 - 700 nm. Přítomnost fenylových skupin způsobuje problémy s rozpustností a agregací. Ftalocyaniny se často připravují spolu se skupinami sulfonové kyseliny, které umožňují rozpustnost ve vodě, a také s centrálně umístěným atomem kovu (Castano a kol., 2004). Nejčastěji je tímto kovem zinek nebo hliník. Důvodem je schopnost zvýšit celkovou fototoxicitu. Pokusy se zjistilo, že pouze diamagnetické kovy (Zn, Pd, In apod.) mají pozitivní vliv na fotosenzitivní vlastnosti. Naproti tomu paramagnetické kovy (Fe nebo Cu) takovou schopnost nemají.



Obr. 2: Strukturní vzorce a) ALA, b) chlorinu, c) ftalocyaninu (převzato od van Dongen a kol., 2004; Allison a kol., 2004).

3.2.5 IDEÁLNÍ PS

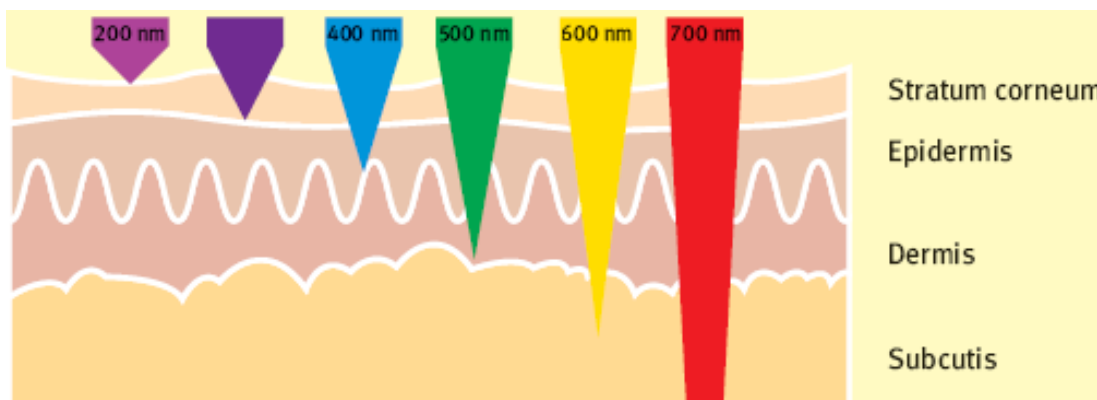
Během různých experimentů týkajících se fotodynamické terapie bylo testováno velké množství fotosensitizerů. Problémem ovšem je to, že ne každý z nich vykazuje ideální vlastnosti. To je hlavním důvodem, proč se velká část výzkumu stále soustředí právě na vývoj nových fotosensitizerů s takovými vlastnostmi, které by zvýšily jejich účinnost.

Tato účinnost závisí na několika faktorech:

- na vlnové délce dopadajícího světla
- na hloubce penetrace světla do lidské tkáně
- na absorpčním rozsahu fotosensitizeru
- na reakci na singletový kyslík

V současnosti se vedou velké debaty o tom, jak by měl takový ideální fotosensitizer vypadat. Existuje však několik základních vlastností, které by měl splňovat. Taková látka musí být sama o sobě netoxická, musí být selektivně vychytávána nádorovými buňkami a po ozáření světlem způsobovat dostatečný toxický efekt (Babjuk a kol., 2000). Ideální fotosensitizer by se měl přednostně hromadit v cílové nádorové tkáni a naopak do zdravé tkáně nezasahovat (Allison a kol., 2010). Dále je podstatná také možnost aktivace fotosensitizeru delšími vlnovými délkami, které mají schopnost pronikat hlouběji do tkáně. Důvod je jednoduchý - kratší vlnové délky mohou penetrovat pouze do povrchových částí tkáně, čímž se zvyšuje pravděpodobnost fotosensitivity. Jako nejvhodnější pro léčbu se ukázala vlnová délka v rozmezí 600 - 800 nm, protože proniká dostatečně hluboko a zároveň si zachová dostatečnou energii (Obr. 3). Při absorpci vlnové délky nižší než 600 nm, kdy

intenzita záření dosahuje maximálních hodnot, hrozí poškození kůže. Naproti tomu absorpce vlnové délky, která je větší než 800 nm, může způsobit, že fotony nebudou mít dostatečnou energii pro převedení kyslíku na ROS. Při *in vitro* metodách není však zapotřebí dlouhých vlnových délek. Záření totiž neprostupuje složitou tkání a nehrozí tedy takový rozptyl a absorpce jako v případě tkáně. Proto je pro pokusy *in vitro* dostatečné záření v modré oblasti spektra (400 nm). Další nezbytnou podmínkou je velmi rychlé vyloučení PS z pacienta (organismu). Rychlost je důležitá pro zkrácení času, po který je třeba pacienta chránit před světlem poté, co již byla léčba ukončena. Je to proto, aby se opět předešlo nechtěné fotosensitivitě. Krátký interval mezi podáním fotosensibilizéru, ozářením a vyloučením z těla umožňuje ambulantní léčbu, což je spolu s cenovými nároky pro pacienty velkou výhodou (Castano a kol., 2004).



Obr. 3: Znárodnění penetrace různých vlnových délek skrz kůži (převzato od Anstey, 2004).

3.3 ZDROJE ZÁŘENÍ PRO PDT

Aby mohla být léčba fotodynamickou terapií úspěšná, je potřeba kromě samotného fotosensibilizéru i světelný zdroj. Ten musí být velmi výkonný, aby zasáhl veškerou tkáň, tedy i hluboko pod kůží. Je potřeba si uvědomit, že světlo prochází rozličnou tkání, která může světelný paprsek do jisté míry ovlivnit. Při fotodynamické terapii je proto potřeba předvídat prostorovou distribuci světla uvnitř cílové tkáně. Světlo se po vstupu do tkáně může buď rozptýlit, nebo absorbovat. Rozsah těchto dvou procesů závisí na typu tkáně a použité vlnové délce (Robertson a kol., 2009).

Biologická tkáň je nehomogenní a obsahuje velké množství nehomogenních částí jako jsou například buněčné organely nebo různé makromolekuly. Několikanásobný rozptyl vede k rozšíření světelného paprsku a tím také ke ztrátě směru a energie. Absorpce je převážně způsobená tkáňovými chromofory jako hemoglobin, myoglobin a cytochromy (Castano a kol., 2004).

Aby byl cytotoxický účinek co největší, je potřeba dostatečného množství ROS. Toho se dosáhne, pokud světelný zdroj vykazuje takové spektrální vlastnosti, které se shodují s vlnovou délkou, při které dochází k maximální absorpci fotosensitizerem.

3.3.1 TYPY ZDROJŮ

V současnosti známe tři hlavní typy zdrojů světla pro fotodynamickou terapii:

1. Xenonové výbojky v kombinaci s filtry pro příslušné vlnové délky
2. Lasery
 - barvivové - laditelné ve viditelné oblasti spektra
 - diodové
3. Luminiscenční diody – LED (light emitting diodes)

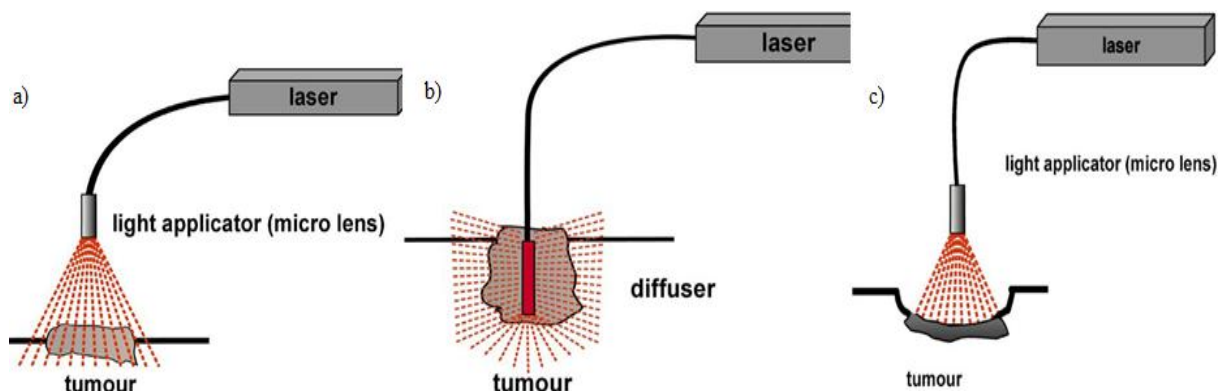
Xenonové výbojky jako zdroje světla mohou být doplněné tepelnými a barevnými filtry, které umožňují odstranit nežádoucí složky světelného záření. Ovšem jejich velkou nevýhodou je nedostatečný zářivý výkon v aktivačních vlnových délkách. Tento fakt je příčinou toho, že nedojde k dostatečnému fotodynamickému efektu v celém objemu nádoru.

Naproti tomu lasery nám poskytují na svém výstupu dostatečný výkon, intenzivní, monochromatické a koherentní záření. K laseru se také připojuje optické vlákno, které hraje důležitou úlohu při přenosu světelného paprsku k nádoru. Ten se vyskytuje i v hlubších vrstvách, a proto je třeba dopravit světelnou energii až k němu. Připojením optického vlákna dochází k určitému poklesu zářivého toku. Dnes je již běžně dostupný polovodičový laser s výstupním výkonem 400 mW. Tento výkon poskytuje dostačující zářivý tok, který je nad prahem potřeb pro fotodynamickou terapii i po připojení optického vlákna. Ideální vlastností, kterou by měl zdroj mít, je velká intenzita záření na relativně malých plochách a v co nejkratším čase. Toto vše splňuje právě laser, proto je jako zdroj nejvhodnější. Známe dva typy laserů. Zatímco dříve se spíše využívaly lasery laditelné ve viditelné oblasti spektra, v současnosti se upřednostňují lasery diodové. Důvodem jsou především pořizovací náklady, provozní náklady a menší rozměry zařízení.

Zvláštním typem světelného zdroje jsou tzv. LED diody. Ty jsou velice kompaktní, lehké a vyžadují mnohem méně energie k dosažení požadované vlnové délky (Mang, 2004). Výkon dosažený pomocí LED diod je maximálně 150 mW, což je v porovnání s lasery mnohem méně, proto se využívají zejména při lokální aplikaci fotosensitizeru, kde není hloubka penetrace tolik klíčová.

3.3.2 ZPŮSOBY OZAŘOVÁNÍ

Ozařování nádoru, respektive aktivace fotosensitizeru, může probíhat několika způsoby – superficiálně, intersticiálně a intra-operativně (Obr. 4). K superficiálnímu ozařování dochází u tenkých, snadno přístupných nádorů na povrchu kůže, případně na sliznici ústní dutiny. Nádor v tomto případě nesmí být širší, než je maximální penetrace záření. Světlo je dodáváno prostřednictvím vlákna, které má na svém konci mikročočky. Pro aktivaci fotosensitizeru v nádoru, který je širší více jak jeden centimetr, se používá intersticiální ozařování. Součástí vlákna je v tomto případě difuzor, který se vloží do tenké jehly, která se poté spolu s difuzorem implantuje do nádorové tkáně. U objemných nádorů se využívá několika jehel, které se umístí blízko sebe (ve vzdálenosti 1 – 2 cm). Tím se dosáhne ozáření celého nádoru. Další možností, která se využívá převážně v oblasti hlavy a krku, je intra-operativní metoda, při které dojde nejdříve k resekci většiny nádoru a až poté k PDT. Fotosensitizer se v takovém případě podává několik dní před operací. Tato doba závisí na tom, jak dlouho trvá akumulace látky uvnitř nádoru. Po uběhnutí časového intervalu, který odděluje podání látky a ozáření, dojde nejprve k chirurgické resekci a až poté následuje intra-operativní PDT (Kübler, 2005).



Obr. 4: Jednotlivé způsoby ozáření – a) superficiální, b) intersticiální, c) intra-operativní (převzato od Kübler, 2005 PDT).

3.4 PRINCIP PDT

3.4.1 REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU (ROS)

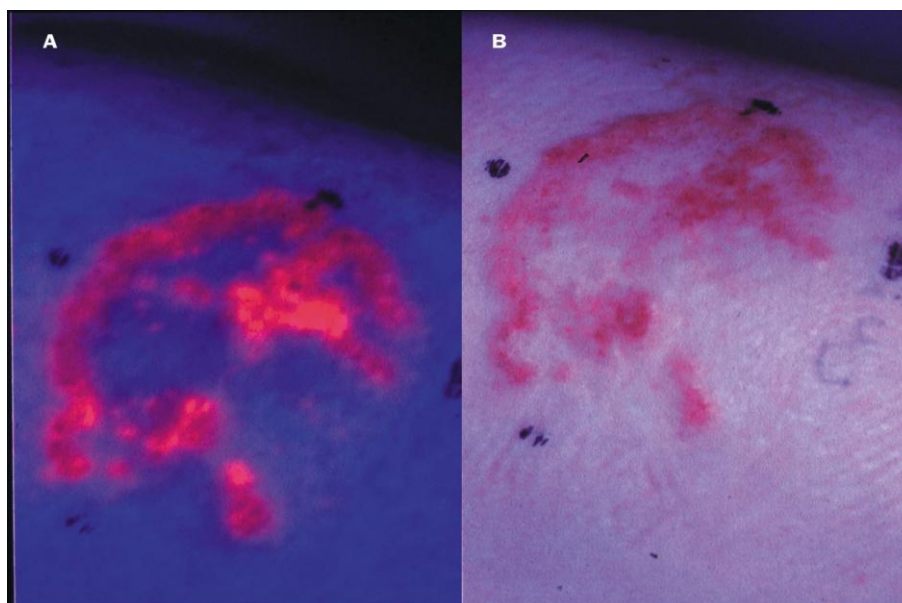
Stejně jako výše zmíněný fotosensitizer a zdroj záření, jsou i ROS velmi důležitou součástí fotodynamické terapie. Reaktivní formy kyslíku, jako je hydrogen peroxid, hydroxylové radikály a superoxidový anion, jsou vysoce reaktivní molekuly, které se účastní mnoha fyziologických a patologických procesů (Kolářová a kol., 2007). Proto se staly předmětem výzkumu, který se snaží o jejich větší uplatnění v lékařské oblasti. ROS lze rozdělit na dvě

skupiny. Na skupinu volných radikálů a na skupinu látek, které nejsou volnými radikály. Jako volné radikály se označují látky, které pohotově reagují s různými biologickými strukturami. Mezi tyto struktury patří například mastné kyseliny, lipidy, aminokyseliny, proteiny a nukleové kyseliny. Díky tomu jsou ROS významnými prostředníky při přenosu energie. Mezi volné radikály řadíme například superoxid ($\cdot\text{O}_2^-$), hydroxylový radikál ($\cdot\text{OH}$), peroxy ($\cdot\text{ROO}$), alkoxy ($\cdot\text{RO}$), hydroperoxy ($\cdot\text{HO}_2$). Druhou skupinu neradikálových látek tvoří peroxid vodíku (H_2O_2), kyselina chlorná (HOCl), ozón (O_3) a singletový kyslík ($^1\text{O}_2$).

V normálních molekulách jsou elektrony každé energetické hladiny uspořádány v párech. Radikály z nich mohou vznikat několika způsoby. Jednou z možností je homolytické štěpení, kdy dochází ke štěpení kovalentní vazby v molekule. Při takovém procesu vznikají fragmenty a každý z nich si ponechá jeden nepárový elektron. Další možností vzniku je přidání (redukce) nebo ztráta (oxidace) jednoho elektronu. Proto mluvíme o volných radikálech jako o částicích, které obsahují nepárový elektron. Ten způsobuje jejich velkou nestabilitu. Právě tato nestabilita je důvodem jejich velké reaktivity. Ta spočívá v odebírání nebo poskytování elektronů, čímž se samy stabilizují. Je známo také několik reakcí, jako například Fentonova reakce, která umožňuje vznik jednoho ROS z jiného (Jamil a kol., 2002). Při ní dochází k přeměně hydrogen peroxidu na hydroxylový radikál. Superoxid zde působí jako redukční činidlo, protože dodává jeden elektron pro redukci iontu kovu (například Fe^{3+}). Tento iont zde hraje úlohu katalyzátoru při přeměně hydrogen peroxidu (H_2O_2) na hydroxylový radikál ($\cdot\text{OH}$) (Castano a kol., 2004).

3.4.2 VZNIK ROS PŘI PDT

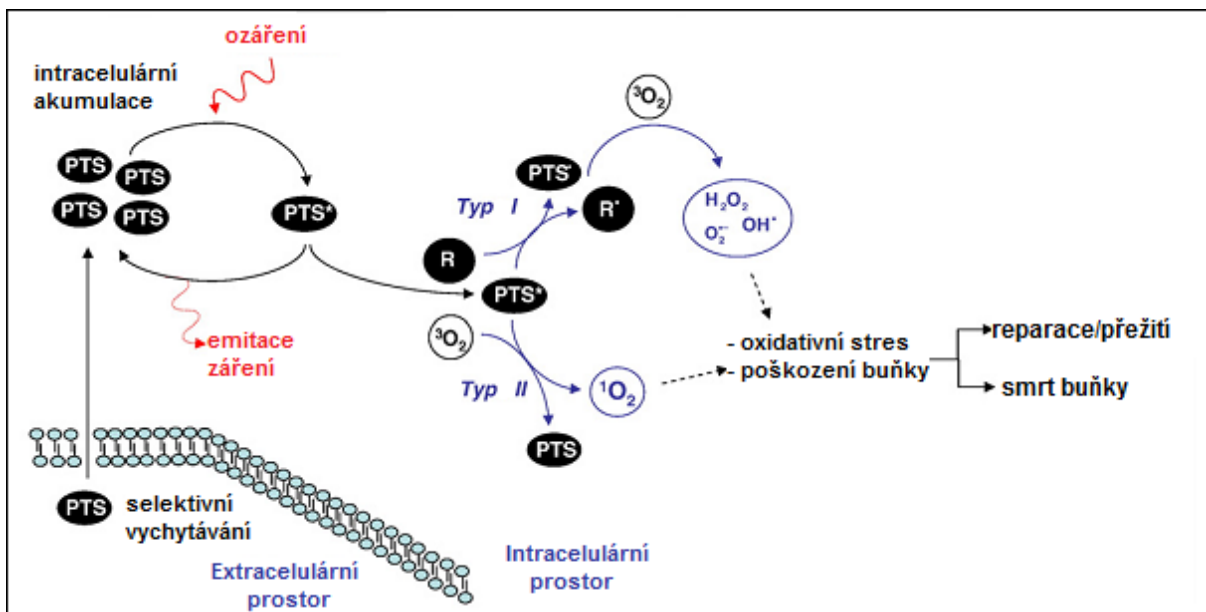
Pro úspěšný průběh fotodynamické terapie je podstatná absorpce světla a následný přenos energie. V základním stavu má fotosensitizer dva elektrony s opačným spinem v orbitalu s nižší energií. Takový stav se jinak také označuje jako singletový. Poté dojde k absorpci světelného záření ve formě fotonů. Tato absorpce způsobí vybuzení elektronu do orbitalu s vysokou energií. Stále si však udržuje svůj původní spin. Tento stav má ovšem velmi krátkou dobu trvání (nanosekundy) a získanou energii může ztratit emitováním světla (fluorescencí) nebo vnitřní konverzí přeměnou na teplo. Schopnost fotosensitizeru emitovat záření dala vědcům podnět k vytvoření nových zařízení, které by byly schopny toto záření zachytit (Obr. 5). Díky tomu můžeme snadno určit množství fotosensitizeru v tkáních a zobrazit také jeho distribuci (Castano a kol., 2004).



Obr. 5: Fluorescence fotosenzitizeru, nahromaděného uvnitř postižené tkáně, po ozáření UV světlem (převzato od Brown a kol., 2004).

Fotosenzitizer v excitovaném stavu může však podlehnout zvláštnímu procesu, kterému se říká mezisystémový přechod. Při něm dojde k přeměně na relativně dlouhotrvající (mikrosekundy) tripletový stav. V takovém stavu je elektronový spin paralelní. Tato excitovaná tripletová forma fotosenzitizeru může dále podléhat dvěma reakcím (Obr. 6). Při první může dojít k reakci přímo se substrátem, který představuje například buněčná membrána nebo molekula. V takovém případě dojde předáním energie ke vzniku radikálového aniontu nebo kationtu. Reakcí těchto radikálů s kyslíkem vznikají reaktivní formy kyslíku (Castano a kol., 2004).

Při druhém typu reakce dochází k přenosu energie přímo střítnutím excitovaného fotosenzitizeru s kyslíkem, čímž vzniká singletový kyslík (Lemp a kol., 2008). Oba typy reakcí mohou probíhat v podstatě současně. Který z nich bude častější, závisí na několika faktorech - na typu fotosenzitizeru, koncentraci v substrátu a také množství kyslíku.



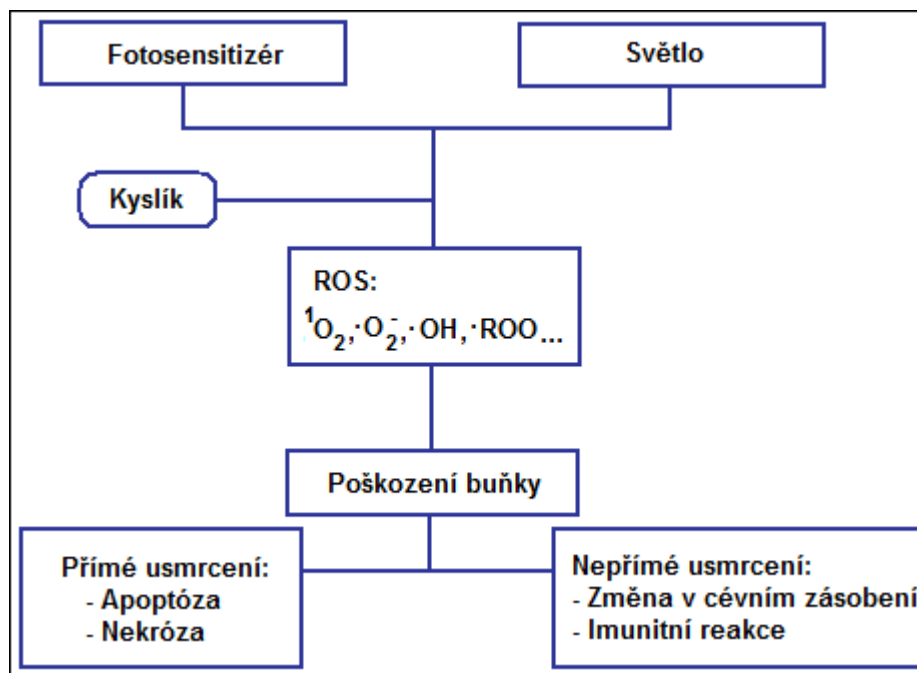
Obr. 6: Schématické znázornění vzniku ROS prostřednictvím reakce I. a II. typu (PTS - fotosenzitizer v základním stavu, PTS* - excitovaný fotosenzitizer, R - substrát v základním stavu, R* - excitovaný substrát) (převzato od Buytaert a kol., 2007).

Reakce prvního typu také často zahrnuje produkci superoxidového aniontu. Ten není sám o sobě nijak zvlášť reaktivní a nezpůsobuje příliš velké oxidační poškození. Může ovšem reagovat spolu s dalším superoxidovým aniontem za vzniku hydrogen peroxidu a kyslíku. Tato reakce se označuje jako dismutace, která je katalyzována enzymem, který se nazývá superoxid dismutáza (SOD). Hydrogen peroxid má významnou roli v biologických systémech, protože snadno prochází buněčnou membránou a zároveň nemůže být vyloučen ven z buňky. Hydrogen peroxid je dále také nezbytný pro funkčnost mnoha enzymů, a proto je tak důležitý pro zdraví (Castano a kol., 2004). Další možností je využití superoxidového aniontu při Fentonově reakci (viz výše).

Jako obranný mechanismus proti ROS slouží organismu antioxidanty. Jsou to látky, které zabraňují tvorbě řetězových radikálových reakcí, případně tyto již probíhající reakce přerušují. Za normálních podmínek je poměr ROS a antioxidantů v rovnováze. Fotodynamická terapie tuto rovnováhu v místech nádoru úmyslně narušuje a indukuje tak vznik volných radikálů. Tyto radikály, které vznikly několikasupňovými reakcemi po ozáření fotosenzitizeru, mají silný cytotoxický účinek. Hrají proto důležitou roli při poškozování cílových nádorových buněk.

3.4.3 MECHANISMY POŠKOZENÍ NÁDORU

Fotodynamická terapie ovlivňuje nádor a jeho blízké okolí několika způsoby (Obr. 7). Destrukce nádoru je tak způsobena přímým usmrcením nádorové buňky, změnou v cévním zásobení nebo imunitní reakcí. Často je zničení nádorových buněk způsobeno kombinací těchto dějů. Na subcelulární úrovni dochází k poškození proteinů, lipidů a DNA.



Obr. 7: Rozdělení mechanismů vedoucí k poškození buněk.

3.4.3.1 PŘÍMÉ USMRCENÍ

Při přímém usmrcení nádorové buňky dochází k inkorporaci fotosensitizeru a následnému toxickému účinku vzniklých ROS. Jedním z účinků reaktivních forem kyslíku je poškození buněčné membrány (případně inaktivace enzymů vázaných v membráně). Excitovaná molekula fotosensitizeru v tomto případě reaguje s buněčnou membránou, kde vytvoří radikálové ionty, které dále interagují s kyslíkem za vzniku cytotoxických kyslíkatých molekul (Gray a Fullarton, 2007). Další možností je nevratná fotodestrukce lysozómů, mitochondrií, endoplazmatického retikula či Golgiho aparátu (Buytaert a kol., 2007). Při destrukci lysozómů dojde k vylití hydrolytických enzymů, které spustí kaskádu dějů a vyvrcholí usmrcením buňky.

3.4.3.2 ZMĚNA V CÉVNÍM ZÁSOBNÍ A IMUNITNÍ REAKCE

Změna v cévním zásobení spočívá v zúžení cév v ozářené oblasti, které zapříčiní vytvoření trombu. To způsobí snížení oksylichování a zástavu dodávání živin nádoru. Imunitní

reakce zahrnuje lokální pronikání neutrofilů a makrofágů do tumoru, které doprovází uvolnění zánětlivých mediátorů. Tato rychlá reakce může poté vyústit ve více precizní imunitní reakci, která spočívá v aktivaci specifických T-lymfocytů, které se zdají být nezbytné pro konečnou kontrolu zbylých nádorových buněk (Nowis a kol., 2005). Neutrofilové vylučují celou řadu enzymů, které ničí nádorové buňky. Do poškozeného místa se poté dostávají také monocyty a makrofágy, které fagocytují zbytky mrtvých buněk.

3.4.3.3 POŠKOZENÍ BIOMOLEKUL

Vysoká produkce ROS působí významné oxidativní poškození buněčných biomolekul – lipidy, proteiny a nukleové kyseliny (Kolářová a kol., 2007). V lipidech mohou radikály mít vliv na nenasycené mastné kyseliny. Způsobují tak ztrátu dvojných vazeb, čímž se změní nejen fluidita a propustnost membrány, ale jsou také ovlivněny membránově vázané enzymy. Jinou možností je tvorba reaktivních metabolitů (peroxidů), jinak známá jako peroxidace lipidů. Konečným výsledkem tohoto procesu jsou kratší radikály a další sloučeniny, které indukují zánětlivý proces, a také inhibují některé buněčné funkce - mitochondriální funkci (respiraci), anaerobní glykolýzu nebo syntézu DNA a RNA.

V případě proteinů dochází k modifikaci některých aminokyselin (tyrosin, tryptofan). Výsledkem je pak změna transportních vlastností, vstupování vápenatých iontů do cytosolu a změna aktivity různých enzymů. Jsou také daleko náchylnější proteolytickému rozkladu. Dále pak může docházet k jejich agregaci nebo sítování.

Poškození DNA spočívá ve zlomech nukleotidových řetězců, ve štěpení deoxyribózy nebo v poškození bází - příkladem je modifikace pyrimidinových a purinových bází. Uvnitř buněk vznikající singletový kyslík efektivně působí na DNA a způsobuje tak jednovláknové zlomy. Jeho upřednostňovaná reakce s guaninovou složkou vede k delecí jednoho guaninu v sekvenci DNA. Výsledkem mohou být takové změny DNA, které vyústí v mutaci, chybu při translaci, inhibici proteosyntézy, stárnutí a smrt buněk. Poškození DNA vlivem fotodynamické terapie je závislé nejen na vlastnostech složek potřebných pro PDT, ale také na opravných mechanismech buňky (Castano a kol., 2005).

3.5 TYPY BUNĚČNÉ SMRTI

Ve fotodynamické terapii může dojít ke smrti buňky buď apoptózou nebo nekrózou. Závisí to především na typu fotosensitizeru, dávce PDT a na buněčném genotypu (Almeida a kol., 2004). Obecně se předpokládá, že nižší dávky PDT vedou spíše k apoptóze, zatímco vyšší dávky spíše k nekróze (Robertson, 2009). K ní tedy dochází především na povrchu nádorové tkáně, protože právě zde je dávka záření velmi vysoká a způsobí poškození membrány.

Naopak v hlubších vrstvách, kde je dávka záření po průchodu tkání nižší, dochází spíše k apoptóze.

3.5.1 APOPTÓZA

Apoptóza je proces, který je naprogramovaný v genech a pomocí kterého dochází ke smrti buněk. Program může být zahájen několika různými spouštěcími mechanismy – jak extracelulárními, tak intracelulárními signály. Existuje mnoho jednoduchých postupů charakterizujících apoptózu, které jsou snadno proveditelné ve všech přiměřeně vybavených laboratořích (Buytaert a kol., 2007). Apoptóza je ATP vyžadující proces, který může být spuštěn drahou mitochondriální nebo drahou zahrnující ceramid (Obr. 8).

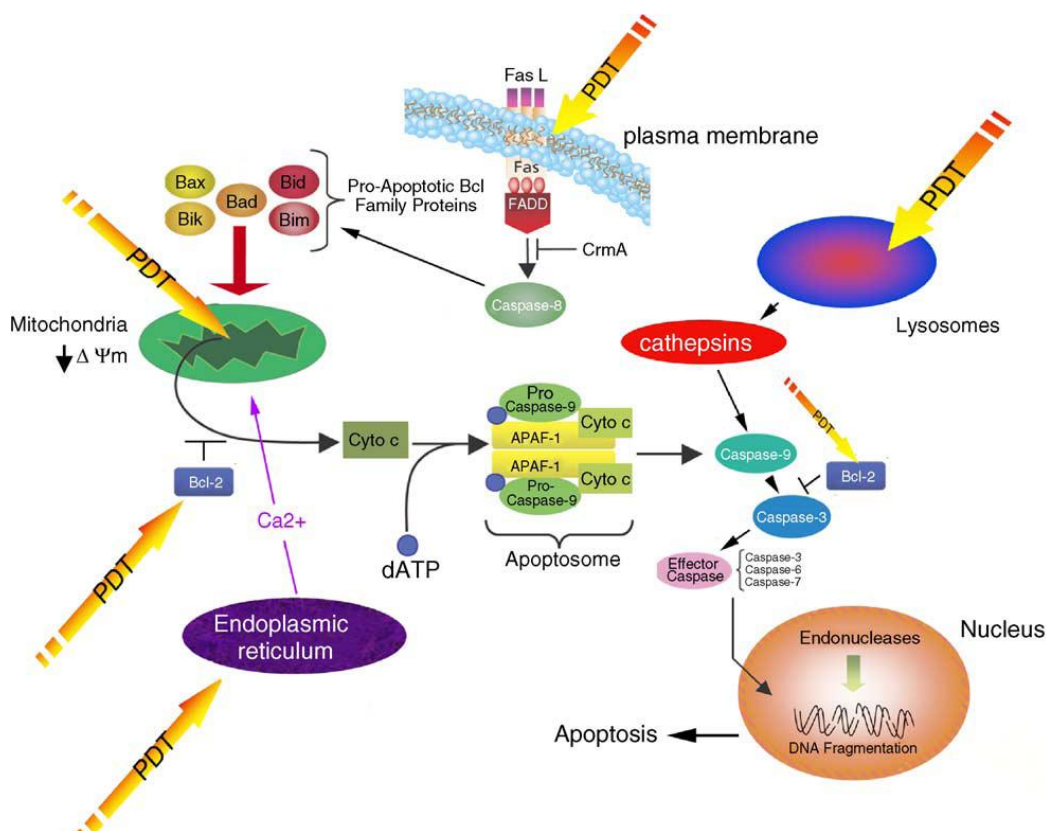
3.5.1.1 MITOCHONDRIÁLNÍ DRÁHA

V mitochondriální dráze dochází k aktivaci kaspázy (proteinkináza), která štěpí chromozomální DNA na fragmenty. Kaspáza napadá dále například laminy, které tvoří vnitřní vrstvu jaderné membrány, a také několik složek cytoskeletu. Společným dopadem tohoto proteolytického štěpení je to, že buňka, v které k němu dochází, ztrácí svou integritu. Nakonec se rozpadne na velké množství uzavřených, kulovitých vezikul, které jsou poté fagocytovány (Castano a kol., 2005). Navádění makrofágů a dalších příbuzných typů buněk je umožněno přítomností specifických markerů na povrchu vezikul. Proces fagocytózy tak zabraňuje zánětlivým reakcím, které jsou přítomny u nekrózy, kdy dojde k prasknutí buňky a uvolnění DNA, lysozomálních proteáz a celé řady dalších produktů do okolí. Pro zahájení celého procesu je nezbytný vhodný signál. Bcl-2 je anti-apoptotický protein, jehož exprese vede ke stabilizaci pro-apoptotického proteinu Bax. Po fotodestrukci proteinu Bcl-2 je pak nadbytek Bax schopný iniciovat interakci s mitochondriální membránou, což vede k uvolňování cytochromu c – tzv. spouštěče apoptózy (Kessel, 2006). Fotodynamická terapie je také doprovázena vzrůstem intracelulárních Ca^{2+} iontů, které se uvolňují z intracelulárních zásobáren (např. endoplazmatické retikulum a mitochondrie) a z vně buňky. Vápenaté ionty zde hrají úlohu posílů, které vyvolávají apoptózu mitochondriální dráhou.

Díky tomu, že vytvořené ROS mohou přímo poškozovat mitochondrie, které mají roli klíčových regulátorů aktivní buněčné smrti, je fotodynamická terapie schopna spustit apoptotickou kaskádu i v těch buňkách, které se ukázaly být rezistentní vůči apoptóze během působení chemoterapie nebo ionizujícího záření (Plaetzer a kol., 2003).

3.5.1.2 CERAMIDOVÁ DRÁHA

Ceramid je stresem indukovaný druhý posel, vznikající ze sfingofosfolipidů (součásti buněčné membrány) pomocí sfingomyelinázy. Tento enzym štěpí sfingofosfolipidy, jako je například sfingomyelin, za vzniku ceramidu a fosforylcholinu. Bylo vědecky prokázáno, že ceramid jako sekundární posel reguluje různé buněčné procesy jako je apoptóza, buněčný cyklus nebo buněčná diferenciací (Castano a kol., 2005).



Obr. 8: Znárodnění mitochondriální a ceramidové signální dráhy, která vede k apoptóze při PDT (převzato od Castano a kol., 2005).

3.5.2 NEKRÓZA

Posun od apoptotické k nekrotické smrti buňky může být obvykle vyvolaný zvýšenou intenzitou dávky PDT (zvýšením dávky světla nebo koncentrace fotosensitizujícího barviva) (Buytaert a kol., 2007). Nekróza, neboli pasivní buněčná smrt, může být způsobena také dalšími extrémními vnějšími podmínkami (např. extrémní teplota, tlak nebo pH). Další možností je těžké poškození buňky indukované chemickými procesy (např. velké dávky ionizujícího záření, metabolických inhibitorů nebo jiných druhů toxických látek). Tento typ buněčné smrti je obecně doprovázen ztrátou membránové integrity a metabolické homeostáze. Jakmile nekróza jednou započne, je její průběh nevratný. Pasivní buněčnou

smrt doprovází charakteristické morfologické změny, které zahrnují nabobtnání buňky a následné prasknutí membrány (Plaetzer a kol., 2003). Toto uvolnění vnitřního obsahu buňky do okolí způsobuje zánětlivé reakce v dané oblasti.

3.6 PDT *IN VITRO*

3.6.1 VLIV PDT A FTALOCYANINU NA KOŽNÍ MELANOM

Kolářová a kol. (2007) zkoumali, jaký vliv má po ozáření ftalocyanin na nádorové G361 buňky. Při studii byl použit CIAIPcS₂ (Chloroaluminium phthalocyanin disulphonate), který patří mezi fotosensitizéry druhé generace. Jako buněčné linie byly použity G361 buňky (kožní melanom), které byly kultivovány v DMEM médiu a následně inkubovány při 37 °C a 5 % CO₂.

Při měření množství ROS byl k buňkám přidán fotosensitizér ve třech koncentracích – 0,75 µg/ml; 7,5 µg/ml a 75 µg/ml. Jako zdroj byl použit polovodičový laser. Vlnová délka byla 675 nm a dávka záření 10 J/cm² a 20 J/cm². Množství ROS bylo měřeno pomocí sondy 5-(a-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H₂DCFDA). K detekci sondy byl použit luminiscenční spektrometr. Pro měření fototoxicity byly G361 buňky kultivovány s CIAIPcS₂ v koncentraci 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml. Vlnová délka byla 675 nm a dávka záření 10 J/cm² a 25 J/cm².

Výsledky studie prokázaly, že tvorba ROS roste v přítomnosti vyšších koncentrací fotosensitizéru. Jako nejvhodnější se pro tvorbu maximálního množství ROS ukázaly být takové podmínky, kdy je koncentrace fotosensitizéru 75 µg/ml a dávka záření je 10 J/cm². Výzkum životaschopnosti prokázal, že optimálního fototoxického účinku bylo dosaženo u těch G361 buněk, které byly vystaveny dávce záření o velikosti 25 J/cm² a obsahovaly 5 nebo 10 µg/ml fotosensitizéru. Kombinace této dávky záření a koncentrace fotosensitizéru byla pro buňky melanomu letální.

3.6.2 VLIV ELEKTRO-PDT NA PLICNÍ ADENOKARCINOM

Elektrochemoterapie (ECT) a fotodynamická terapie (PDT) patří mezi málo invazivní a cílené metody léčby. Saczko a kol. (2010) zkoumali účinek obou metod, tzv. elektro-fotodynamické terapie (EPDT), na buňkách karcinomu plic.

Jako fotosensitizér byl použit hematoporfyrinový derivát (HpD), který byl aplikován na A549 buňky (plicní adenokarcinom). Elektroporace byla provedena pomocí elektroporátoru ECM 830. Pro pokus bylo použito pět elektrických pulsů o velikosti 700 – 1400 V/cm. Každý puls trval 50 µs. Buňky po ozáření lampou s červeným filtrem dostaly dávku o velikosti 1,9 J/cm². Pro posouzení životaschopnosti buněk byl použit MTT test. Pro posouzení vlivu

elektroporace na fototoxicitu HpD byla životaschopnost porovnáována s kontrolními skupinami, u kterých proběhla buď pouze elektroporace nebo standardní PDT.

Výsledky ukázaly, že pulsy nižší než 1000 V/cm nemají při samotné elektroporaci dostatečný cytotoxický účinek. Při kombinaci elektroporace o velikosti 800 V/cm a PDT se fotodynamický efekt i při nižší koncentraci ztrojnásobil a při běžné koncentraci PS byl až šestinásobný. Při velikosti pulsů 1000 V/cm vzrostl fotodynamický efekt dokonce až 15krát při nízké koncentraci a až 30krát při běžné koncentraci PS. Experimentálně se tedy prokázalo, že kombinace ECT a PDT umožňuje snížit dávku podávané látky, zkrátit dobu akumulace látky v cílové oblasti a také výrazně zvýšit celkovou efektivitu léčby.

3.7 PDT V KLINICKÉ PRAXI

V průběhu dvaceti let bylo v různých zemích podrobena fotodynamické terapii více jak tisíc pacientů, ale studie se týkaly jen několika z nich. Navíc všeobecně poskytovaly pouze neoficiální data, která byla nedostačující k přesvědčení vědeckých pracovníků a poskytovatelů zdravotní péče o výhodách PDT jako standardní léčby. Tato situace byla částečně také způsobena problémy se stanovením optimálních léčebných podmínek, které vyžadují nastavení několika proměnných (např. množství látky, dávky záření nebo interval mezi podáním látky a ozářením). Potíže působila také fotosensitivita kůže a nízká selektivita. Značně zlepšená znalost tkáně, porozumění buněčným faktorům (kontrolující fotodynamickou terapii) a větší zkušenost v klinické praxi vedla k lepšímu průběhu klinických testů a ke schválení několika fotosensitizujících látek pro léčbu rakoviny (Brown a kol., 2004).

V dnešní době směřuje klinický výzkum k používání fotodynamické terapie pro léčbu nádorových onemocnění. Převážně to jsou nádory na kůži, hlavě, krku, v močovém měchýři a v podstatě na všech místech, kde může být použito povrchové ozařování a kam dosáhne vláknová optika laseru. O fotodynamické terapii se také uvažuje jako o možném prostředku pro odstraňování aterosklerotických plátů v cévách, i když výzkum prozatím probíhá pouze na zvířecích modelech. Dalším cílem, jak využít PDT, je léčba makulární degenerace (degenerace žluté skvrny) (Kessel, 2004), benigní nádory a kožní problémy.

3.7.1 VYUŽITÍ PDT PŘI LÉČBĚ RAKOVINY PANKREATU

Studia se účastnilo celkem 16 pacientů, u kterých byl histologicky potvrzený, neoperabilní adenokarcinom pankreatu. Ve čtrnácti případech bylo zjištěno, že je nádor propojen s důležitými cévami, nebo že je v jejich těsné blízkosti, což brání jeho resekcí. Endoskopií nebo počítačovou tomografií (CT) bylo u dvanácti pacientů zjištěno, že mají zasažené také

dvanáctník. Pacientům bylo podáno 0,15 mg/kg fotosensitizeru *meso-tetrahydroxyfenylchlorinu*. Ten byl vybrán proto, že v preklinických testech prokázal tvorbu nekrózy ve velkém rozsahu a vyžaduje nejmenší dávky záření pro každé léčené místo. Fotoaktivace byla provedena o tři dny později prostřednictvím perkutánně (skrze kůži) umístěných jehel, které byly do nádoru umístěny pomocí ultrazvuku nebo počítačové tomografie. Zdrojem světla byla laserová dioda, která poskytovala červené záření o vlnové délce 652 nm. Toto záření bylo rozděleno rovnoměrně mezi jednotlivá optická vlákna, která se poté vložila do jehly tak, aby 3 mm vlákna od hrotu jehly byly v kontaktu s nádorem.

Objem nekrotické tkáně po PDT se pohyboval v rozmezí 9 - 60 cm³. Nebyly také zjištěny žádné duodenální perforace, nicméně u třech pacientů se vyvinula duodenální obstrukce, která může mít spojení s léčbou. U dvou pacientů, jejichž nádor byl propojen s gastroduodenální tepnou, došlo k vážnému krvácení, které však bylo zastaveno endoskopickou a radiologickou intervencí. Ve 14 případech pozdní stádium choroby nakonec převážilo a došlo k opětovnému vytvoření nádoru z okrajových částí léčené oblasti. Průměrná doba přežití po PDT byla 9,5 měsíce (v rozmezí 4 - 36 měsíců). Pro srovnání je třeba dodat, že po chemoterapii je průměrné přežití okolo 5 měsíců (v rozmezí 2,2 – 23 měsíců) a 9 měsíců (v rozmezí 8 - 12,7 měsíců) po chemoradioterapii.

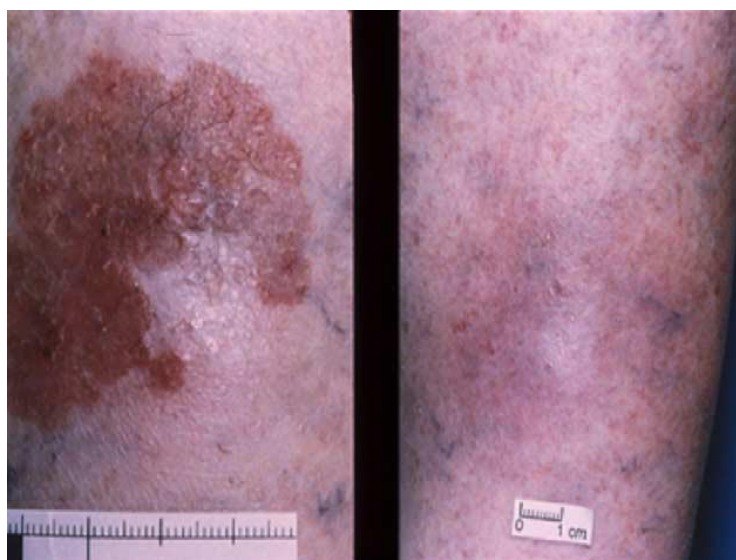
Tato studie prokázala proveditelnost PDT pro karcinom pankreatu pomocí perkutánně umístěných optických vláken. V tomto případě byla ovšem PDT čistě paliativní, neboť pouze 44 % pacientů přežilo jeden rok po PDT. Teprve až další studie budou schopny posoudit skutečný vliv fotodynamické terapie na přežití a její potencionální roli jako paliativní chemoterapie této nemoci (Ayaru a kol., 2004).

3.7.2 DERMATOLOGICKÉ VYUŽITÍ PDT

Jednou ze závažných chorob, které postihují kůži, je Bowenova choroba (Obr. 9). Jméno dostala podle svého objevitele Johna T. Bowena. Jedná se o zvláštní druh nádoru, který napadá povrchové části kůže a neproniká tedy do hlubších vrstev. Ibbotson a kol. (2004) aplikovali PDT na léčbu Bowenovi choroby (BD) a další kožní nádorová onemocnění – superficiální bazaliom (BCC) a aktinická keratóza (AK). Jako fotosensitizer zde byla použita kyselina aminolevulová (ALA). Po její aplikaci do léze je třeba místo obvázat a chránit před světlem - u aktinické keratózy a Bowenovy choroby po 4 hodiny, v případě superficiálního bazaliomu až po 6 hodin. Poté je pacient připraven podstoupit ozáření, při kterém je zasaženo pouze postižené místo. Dávka záření při použití laserových zdrojů (např. diodový 630 nm laser - Diomed) byla 125 J/cm², v případě použití LED zdrojů (např. Omnilux) 37,5 J/cm². Během ozařování označilo přibližně 20 % pacientů léčbu jako bolestivou. Z tohoto důvodu se začala používat celá řada metod pro zmírnění bolesti, včetně těch

nejjednodušších, jako je povídání si s pacientem a jeho uklidňování. Pokud byl pacient při předchozí léčbě vystaven velké bolesti, je možné aplikovat hodinu před ozáření lokální gelové anestetikum lidokain. Poté je pacientům doporučeno vyhýbat se dva dny slunečnímu světlu. Obvykle tuto proceduru podstupovali pacienti dvakrát v rozmezí osmi týdnů.

V současnosti tato studie zahrnuje celkem 436 superficiálních bazaliomů (BCC), 657 případů Bowenovy choroby (BD) a 164 případů aktinické keratózy (AK). Úspěšnost odstranění činila 95 % v případě BCC, 96 % u BD a 88 % u AK. V 17 % všech případů došlo k opětovnému vzniku nemoci. Tato hodnota vzrostla oproti výsledku v prvních třech letech studie o 10 %. Po přezkoumání výsledků recidivy bylo zřejmé, že 75 % celkové recidivy bylo u pacientů, kteří podstoupili danou proceduru pouze jednou a ne dvakrát. Z toho důvodu bylo již v posledním roce pravidlem, že pacient podstupoval dvě procedury v daném rozmezí osmi týdnů. Od té doby již nebyla hlášena žádná recidiva při léčbě těchto tří chorob pomocí PDT.



Obr. 9: Pacient s Bowenovou chorobou před a po proběhnutí jedné léčebné procedury (převzato z Ibbotson a kol. 2004).

3.7.3 VYUŽITÍ ÚČINKŮ PDT PRO LÉČBU RAKOVINY PLIC

Yorkshirské laserové centrum pracuje s fotodynamickou terapií už od roku 1990. Moghissi a kol. (2004) v článku sepsali výsledky a data, které Yorkshirské laserové centrum během několika let nashromáždilo při léčbě rakoviny plic pomocí PDT. Studie se týkala 160 pacientů, kteří byli rozděleni do dvou skupin. Skupinu A tvořilo 144 pacientů s neoperabilním nádorem. Ve skupině E bylo 16 pacientů s počátečním stádiem rakoviny a superficiálními lézemi na průduškách. Jako fotosensitizer byl použit Photofrin (porfimer sodný). Ten byl ve všech případech podán intravenózně v množství 2 mg/kg tělesné hmotnosti. Časové rozpětí

mezi podáním látky a ozářením bylo 24 – 72 hodin. Na excitaci látky byl použit laserový zdroj, který poskytoval záření o vlnové délce 630 nm. Celková dávka záření činila pro objemné nádory 200 J/cm² a pro povrchové 100 – 150 J/cm².

Celkem bylo provedeno 280 bronchoskopických zákroků. V žádné skupině nedošlo k úmrtí pacienta. V devíti případech došlo k mírné fotosensitivní reakci kůže (popálení), což je 5,6 % všech léčených pacientů, které po ošetření zmizelo do 3 – 5 dnů. Z počátku došlo po PDT celkem u osmi pacientů k zánětu průdušek a infekci dýchacího systému. Po této zkušenosti se z preventivních důvodů podávala kuřákům a pacientům s velkými endobronchiálními lézemi jedna dávka antibiotik. Díky tomu pak v posledních 100 případech nedošlo k žádným problémům. Před PDT se ve skupině A pokoušelo neúspěšně léčit 85 % pacientů i jinou metodou – radioterapií nebo chemoterapií. Již 6 – 8 týdnů po ukončení léčby došlo ke značné úlevě u všech pacientů, zejména dušnosti. U 58,1 % pacientů bylo zaznamenáno výrazné zlepšení ohledně otvírání průdušek. Průměrná délka přežití pacientů byla 9,6 měsíců. Ve skupině E měl každý pacient úplnou odpověď na léčbu, i když někteří až po druhé dávce. Průměrné přežití v této skupině bylo 75,4 měsíců.

3.7.4 VYUŽITÍ PDT U METASTATICKÉHO KARCINOMU V MOZKU

Studie uveřejněná v článku, který sepsali Aziz a kol. (2009), se zabývá účinkem fotodynamické terapie po resekci metastatického nádoru v mozku. Celkem 14 pacientům byly 48 hodin před operací podány intravenózně 2 mg/kg fotosensitizeru Photofrin. V den operace, 3 hodiny před samotným zákrokem, dostali perorálně ještě 20 mg/kg kyseliny aminolevulové (ALA) - ve směsi s 30 ml pomerančového džusu. Nádor byl mikrochirurgicky odstraněn a místo následně ozářeno modrým světlem, které způsobilo fluoreskování zbylé nádorové tkáně. Ta mohla být proto dodatečně odstraněna. Pro PDT byla pomocí diodového laseru použita vlnová délka 630 nm (100 J/cm²). Celkem pacienti podstoupili pět ozařování. První dávku záření dostali na pooperačním pokoji, další již na neurochirurgickém oddělení u svého lůžka. Pacienti se museli dostatečně chránit proti přímému slunečnímu záření pomocí klobouků, slunečních brýlí, rukavic, dlouhých rukávů a kalhot. Všichni pacienti byli pravidelně sledováni každé tři měsíce až do jejich smrti.

U 14 pacientů bylo celkem léčeno 14 mozkových metastáz. Sedm z nich bylo původně z plic, dva z rakoviny prsu, dva z rakoviny tlustého střeva, dva z rakoviny vaječníku a jeden neznámého původu. Jeden pacient s metastázemi z plic zemřel z nesouvisejících důvodů, zatímco zbylých šest pacientů zůstalo bez dalších mozkových metastáz až do jejich smrti. Ze zbývajících sedmi pacientů umřeli dva kvůli mozkové recidivě, jeden po čtyřech týdnech kvůli rakovině střeva a jeden zemřel po 70 týdnech na rakovinu bez určení primární oblasti. Celkem 79 % pacientů podlehl rakovině na základě jejího primárního výskytu, zatímco

pouze dva ze čtrnácti zemřeli kvůli opětovnému výskytu metastází na mozku. Největší účinnost přitom tato metoda prokázala u léčby mozkových metastází při rakovině plic.

Tato studie prokázala, že fotodynamická terapie může sloužit jako vynikající pomocná metoda při léčbě metastází na mozku. S její pomocí se tak může velmi snížit pravděpodobnost recidivy.

4 MATERIÁL A METODY

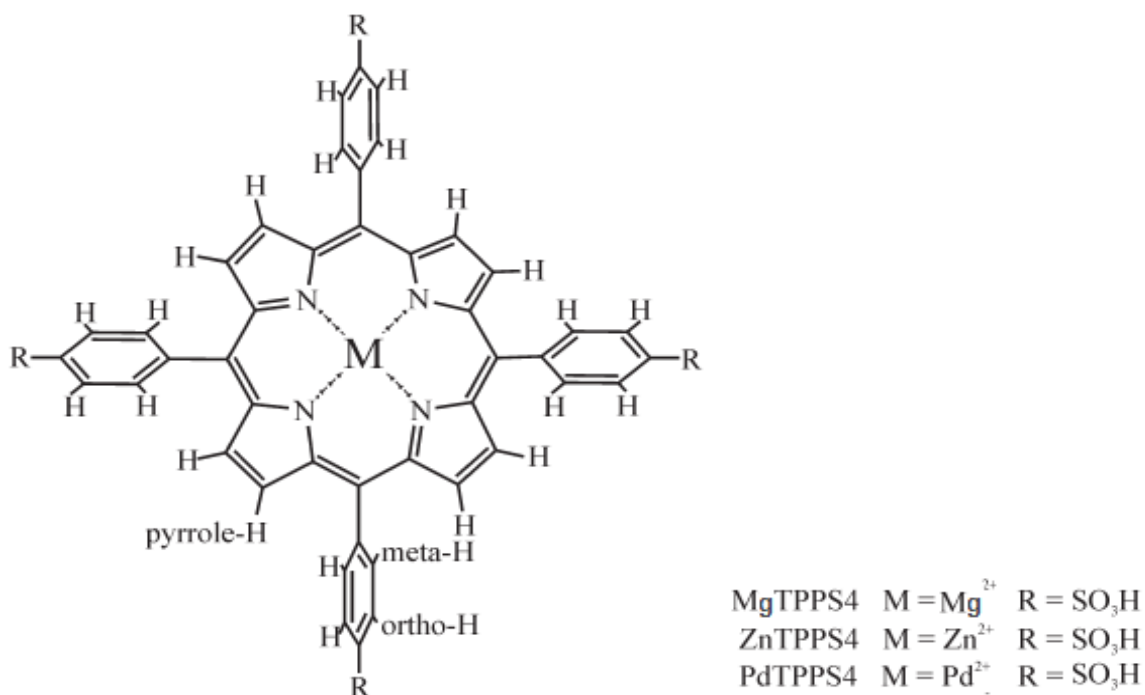
4.1 BUNĚČNÉ LINIE

- G361 buněčné linie
- NIH3T3 buněčné linie

Fotodynamická terapie byla provedena na dvou různých buněčných liniích, které byly předem připraveny do 96-ti jamkových mikrotitračních destiček. Pro demonstraci účinku terapie na nádorovou tkáň byl použit kožní melanom (G361 buňky). Druhý typ buněk tvořily myší fibroblasty (NIH3T3 buňky).

4.2 FOTOSENSITIZÉRY

- TPPS₄ (4-zinc-5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrine)
- ZnTPPS₄ (zinečnatý derivát TPPS₄)
- PdTPPS₄ (paladnatý derivát TPPS₄)
- MgTPPS₄ (hořečnatý derivát TPPS₄)



Obr. 10: Struktura použitých fotosensitizérů (převzato od Mosinger a kol., 2002).

4.3 OSTATNÍ MATERIÁL

1) ROZTOKY A MÉDIA

- PBS 10× (Phosphate Buffered Saline), pH 7,4
= 80 g NaCl; 2 g KCl; 14,4 g Na₂HPO₄; 2,4 g KH₂PO₄; dest. voda do 1 litru + HCl
k úpravě pH
- DMSO (Dimethyl sulfoxid)
- kultivační DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
= práškové DMEM - (D 5523-10L, Sigma); 500 ml 10% fetálního séra - (F 7524, Sigma); 100 ml 1% penicilin/streptomycin - (P 4333, Sigma); 100 ml 1% glutaminu - (G 7513, Sigma)

2) KOMERČNÍ KITY

- MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) - (M 5655, Sigma)
- DCF (5-(a-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát, acetyl ester (CM-H₂DCFDA)) - (C 6827, Invitrogen)

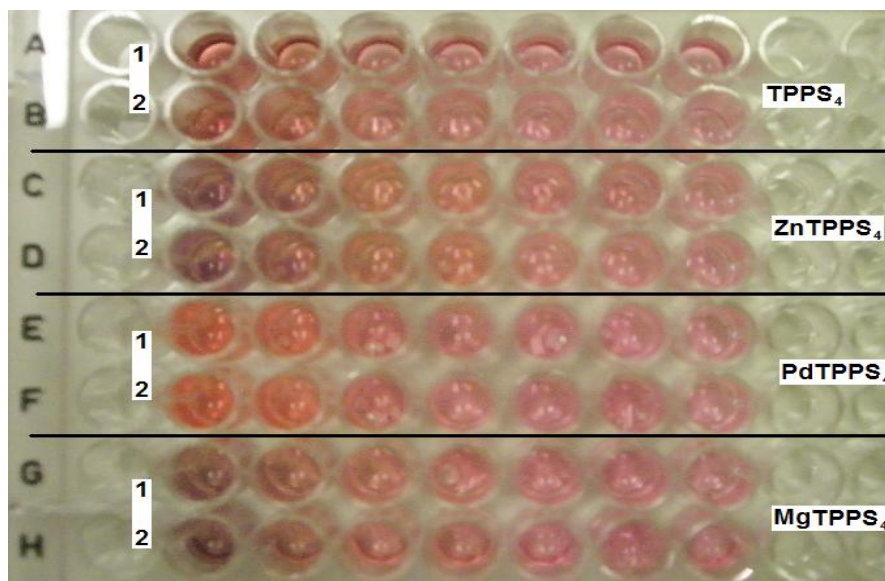
4.4 LABORATORNÍ PŘÍSTROJE + PROGRAMY

- Laboratorní váhy
- Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (BioTek, USA)
- CO₂ inkubátor (BioTek, USA)
- LED diody (Kingbright Corporation, Taiwan)
- Microsoft Excel (statistická analýza – průměr, lineární regrese, směrodatná odchylka)

4.5 PŘÍPRAVA A APLIKACE FOTOSENSITIZÉRU

Aby mohly být použité fotosensitizéry aplikovány, byly pomocí kultivačního DMEM média převedeny z pevného stavu do roztoku. Postupným ředěním bylo dosaženo požadovaných koncentrací (100 µM; 50 µM; 10 µM; 5 µM; 1 µM; 0,5 µM).

Na předem připravené G361 a NIH3T3 buňky byly pomocí multikanálové pipety aplikovány fotosensitizéry v určených koncentracích, a to ve dvou opakováních (Obr. 11). Množství fotosensitizéru v každé jamce činilo 10,53 µl. Následná inkubace buněk probíhala v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO₂ po 24 hodin.

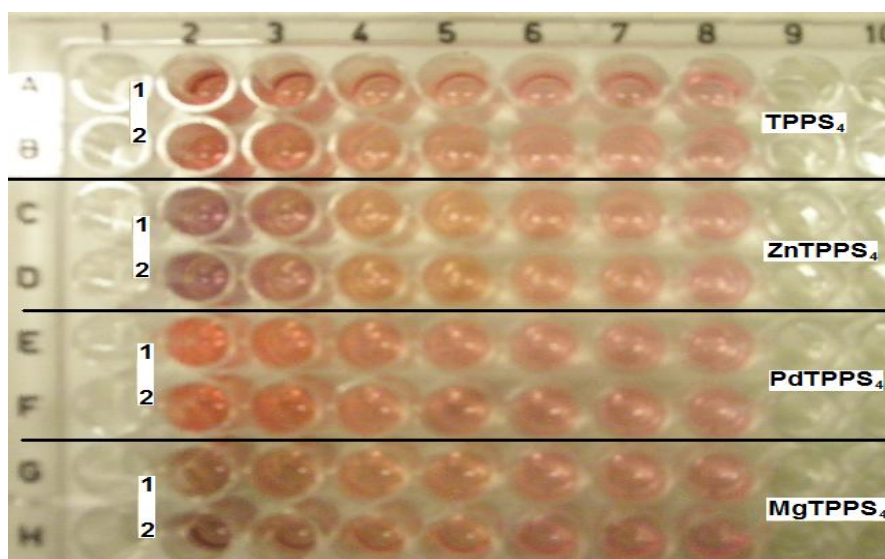


Obr. 11: Jednotlivé fotosenzitizéry aplikované ve dvou opakováních.

4.6 ROS DETEKCE

DCF je fluorescenční značka, která umožňuje detekovat ROS. Po vstupu (5-(a-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetátu, acetyl esteru (CM-H₂DCFDA) do buňky dojde k jeho přeměně na nerozpustný CM-H₂DCF. Ten reaguje s ROS, které vznikají po ozáření, a mění se na fluorescenční CM-DCF. Měření této vznikající fluorescence tedy současně měří produkci ROS.

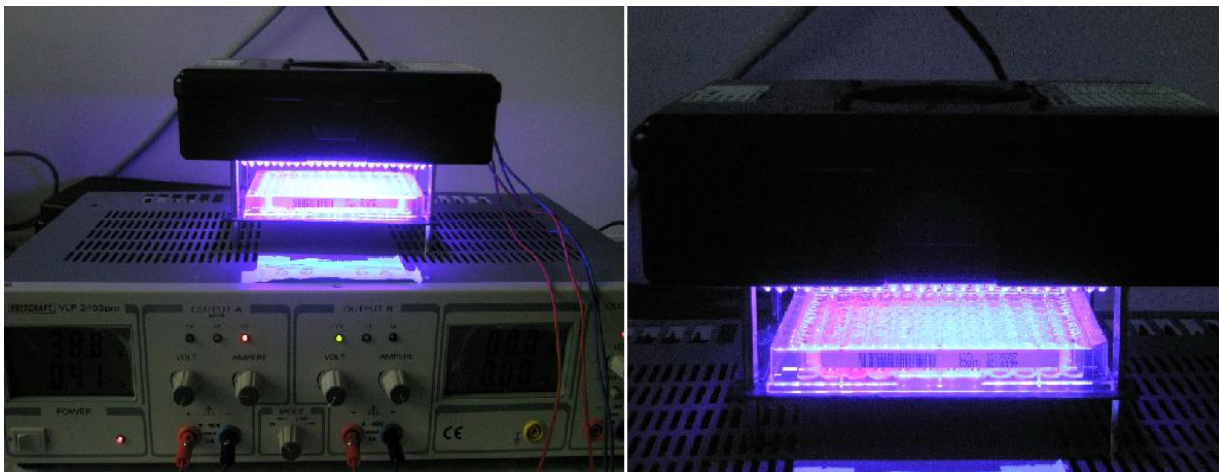
Po uplynutí inkubační doby a řádném odstranění fotosenzitizéru z destičky bylo do každé jamky přidáno 50 μ l roztoku DCF a PBS 1 \times , který byl připraven v poměru 10 μ l DCF na 1 ml PBS 1 \times . Poté byly buňky inkubovány 20 minut při 37 $^{\circ}$ C a 5 % CO₂.



Obr. 12: Mikrotitrační destička s aplikovaným DCF.

4.7 OZAŘOVÁNÍ

Od každé buněčné linie byly ozářeny tři mikrotitrační destičky. Každá ovšem byla vystavena různě velké dávce záření. První destičky každého typu buněk byly vystaveny záření po 20 sekund, čímž bylo dosaženo dávky 1 J/cm^2 . Doba záření na druhé destičky byla 100 sekund, což odpovídalo dávce 5 J/cm^2 . Třetí destičky dostaly po 200 sekundách dávku záření 10 J/cm^2 (Tab. I). Vlnová délka záření byla 414 nm, hustota výkonu 50 mW/cm^2 a velikost proudu 0,48 A (Obr. 13).

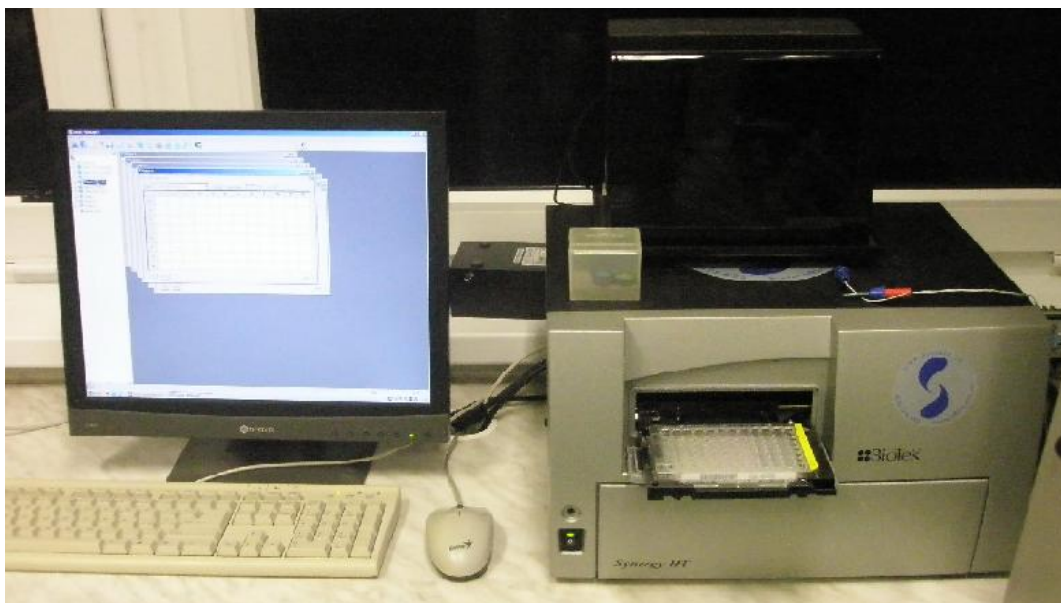


Obr. 13: Ozařování mikrotitrační destičky při 414 nm pomocí zdroje LED záření.

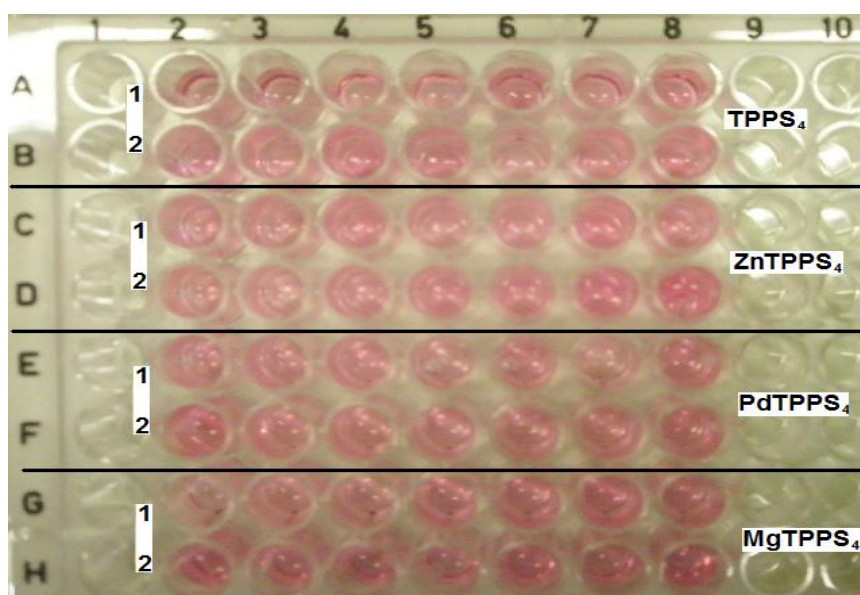
Tab. I: Znárodnění doby, po kterou je třeba působit zářením na buněčné linie, aby bylo dosaženo požadované dávky záření.

číslo destičky	doba záření [s]	dávka záření [J/cm^2]
1.	20	1
2.	100	5
3.	200	10

Po ozáření byla destička vložena do Synergy HT fluorescenčního readeru (Obr. 14), jehož pomocí bylo změřeno kinetickou analýzou množství ROS obsažené v buňkách. Po změření bylo přidáno do každé jamky 100 μl DMEM (Obr. 15) a opět inkubováno po 24 hodin při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a 5 % CO_2 .



Obr. 14: Mikrotitrační destička vložená do Synergy HT readeru.



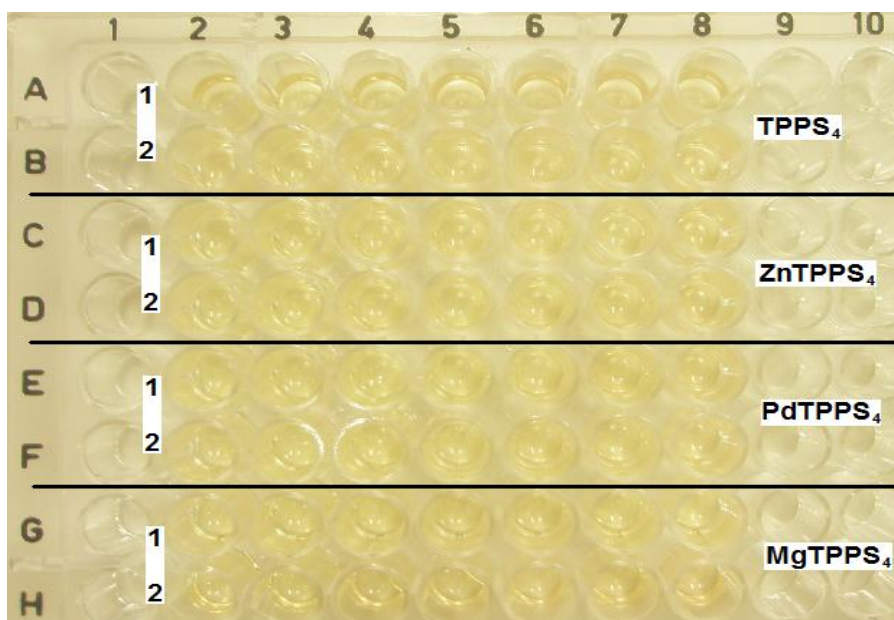
Obr. 15: Buňky po přidání 100 μ l čerstvého DMEM.

4.8 MTT TEST

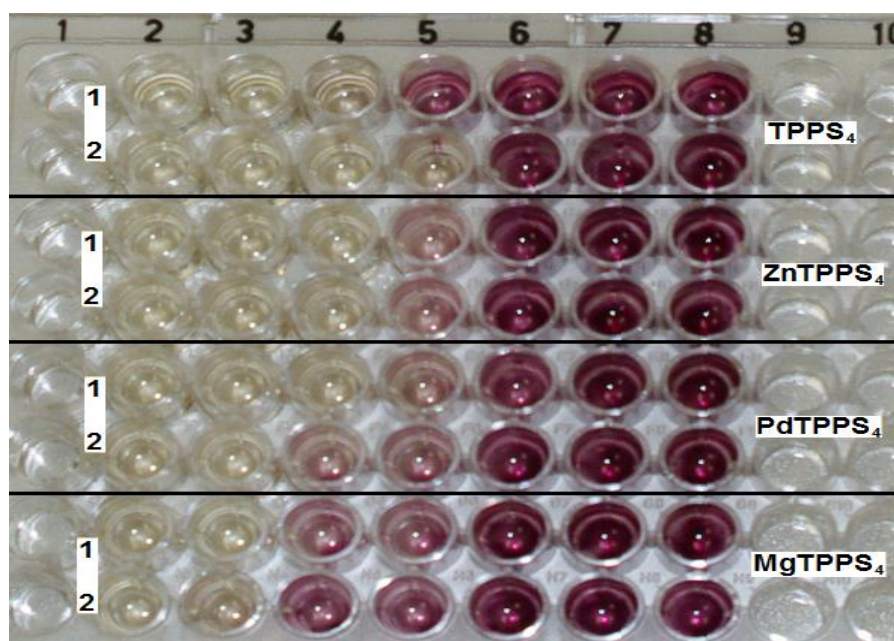
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide je látka, která umožňuje zviditelnit živé buňky. Po uplynutí inkubační doby a důkladném odstranění předchozí látky, bylo do každé jamky napipetováno 50 μ l připraveného roztoku MTT (Obr. 16). Ten byl připraven přidáním 20 mg MTT do 4 ml PBS 1 \times . Po rozpuštění krystalů MTT bylo přidáno dalších 32 ml PBS 1 \times .

Během 3 hodin další inkubace (37 °C, 5 % CO₂) došlo k fialovému zbarvení (vytvořením formazanových krystalů) buněk, které přežily. Po inkubaci a odstranění roztoku z destiček bylo přidáno 100 μl DMSO (Obr. 17).

Poté byly destičky vloženy opět do Synergy HT readeru, který změřil absorbanci při 570 a 690 nm.



Obr. 16: Aplikovaný roztok MTT.



Obr. 17: Destička po přidání 100 μl DMSO.

5 VÝSLEDKY

Výše zmíněný postup byl aplikován při třech na sobě nezávislých měřeních, ze kterých se v konečném porovnání vytvořily průměrné hodnoty.

V každé mikrotitrační destičce je kromě aplikovaných fotosensitizerů v šesti koncentracích (0,5 μM ; 1 μM ; 5 μM ; 10 μM ; 50 μM ; 100 μM) přítomna i kontrola (K). Do této kontroly nebyl přidán žádný fotosensitizer. Představuje tak buňky, u kterých neproběhla fotodynamická reakce. To umožní lepší a nezbytné porovnání účinku fotodynamické terapie.

5.1 MĚŘENÍ PRODUKCE ROS

Detekce množství vytvořených ROS je umožněna fluorescenční sondou DCF. Ta se aplikuje k buněčným liniím v mikrotitrační destičce, která se následně vloží do readru. Ten podrobí destičku kinetické analýze, při které dochází každou minutu k měření fluorescence, která koresponduje s aktuálním množstvím ROS. Celková doba analýzy byla deset minut. Po skončení analýzy program zpracuje výsledky destičky do tabulek. Každá tabulka odpovídá jednomu fotosensitizeru (Tab. II).

Kinetické měření provádíme proto, že je přesnějším ukazatelem nárůstu ROS než měření v jednom určitém časovém bodě. Velká dávka záření může zvyšovat nárůst ROS při různých koncentracích. Výpočtem lineární regrese dostaneme hodnoty z 10-ti minutového intervalu nárůstu ROS, což nám umožní získat přesnější výsledky, než kdybychom použili výsledek získaný v jeden určitý čas.

Tab. II: Hodnoty tvorby ROS v G361 buněčných liniích za přítomnosti fotosensitizeru TPPS₄ a při dávce záření 1J/cm².

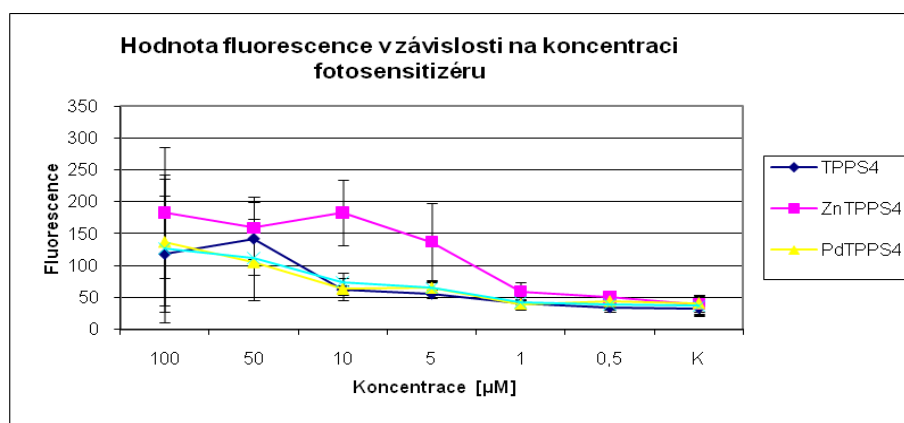
Doba měření [min]	Koncentrace [μM]						
	0,5	1	5	10	50	100	K
0:00:00	486	595	664	822	1959	2534	576
0:01:00	559	691	771	962	2313	2945	675
0:02:00	618	767	852	1069	2594	3302	752
0:03:00	667	833	921	1161	2815	3622	817
0:04:00	711	891	982	1240	3005	3900	873
0:05:00	752	936	1033	1305	3173	4144	924
0:06:00	786	980	1075	1365	3320	4370	965
0:07:00	817	1021	1119	1414	3450	4581	1005
0:08:00	844	1055	1158	1460	3567	4772	1034
0:09:00	867	1086	1191	1501	3666	4950	1068
0:10:00	894	1116	1220	1538	3764	5114	1094

Analýza probíhá na čtyřech fotosensitizérech, ve dvou různých buněčných liniích a při třech různých dávkách záření. Po provedení tří na sobě nezávislých měřeních byly výsledky zprůměrovány a následně zpracovány v programu Microsoft Excel do grafů pro lepší orientaci.

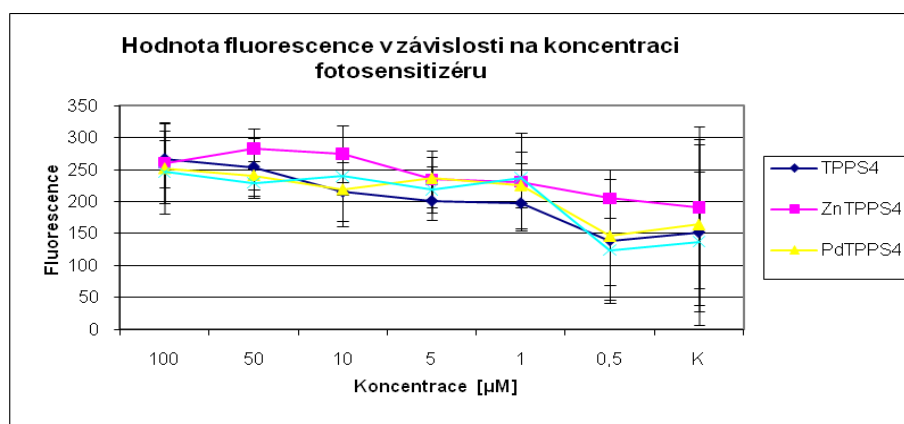
5.1.1 G361 BUŇKY (KOŽNÍ MELANOM)

Při porovnání množství ROS, které koreluje s velikostí fluorescence, je patrné, že s vzrůstající koncentrací jednotlivých fotosensitizérů docházelo k tvorbě většího množství ROS (Graf 1 - 3). Kromě koncentrace je důležitým faktorem také dávka záření, které byly buňky vystaveny. U všech fotosensitizérů se prokázalo, že s rostoucí dávkou záření roste i množství ROS (Graf 4 - 7).

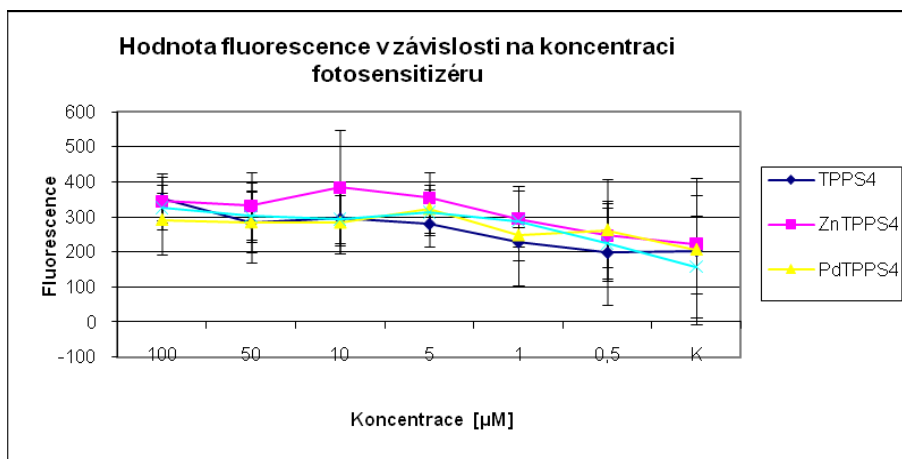
Jako nejúčinnější se ukázal být fotosensitizér ZnTPPS₄. V jeho přítomnosti byla hodnota fluorescence nejvyšší, a to při všech dávkách záření.



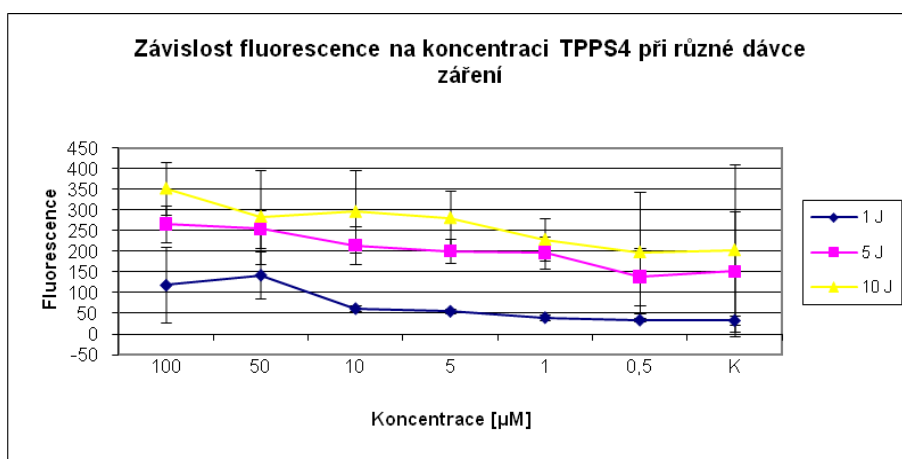
Graf 1: Závislost minutového přírůstku fluorescence na koncentraci jednotlivých PS při dávce záření 1 J/cm².



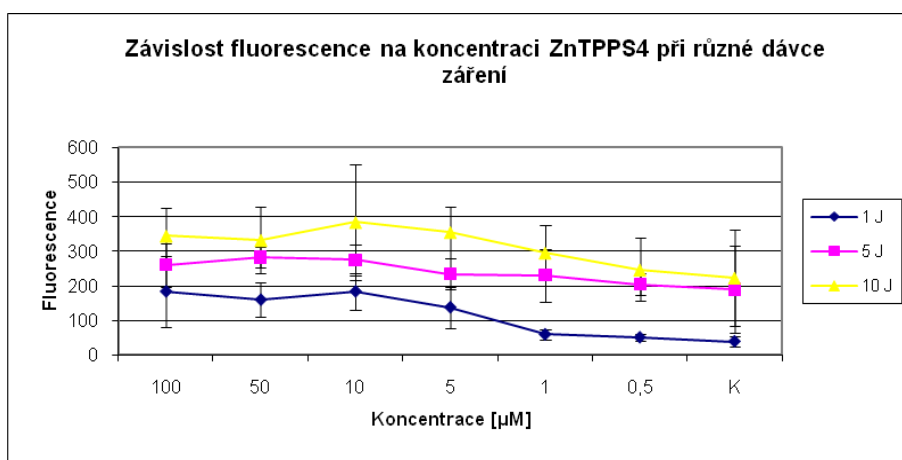
Graf 2: Závislost minutového přírůstku fluorescence na koncentraci jednotlivých PS při dávce záření 5 J/cm².



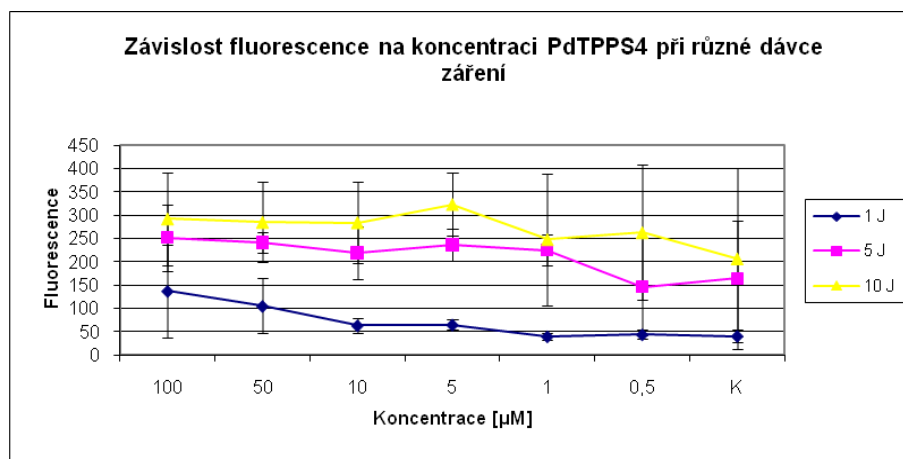
Graf 3: Závislost minutového přírůtku fluorescence na koncentraci jednotlivých PS při dávce záření 10 J/cm^2 .



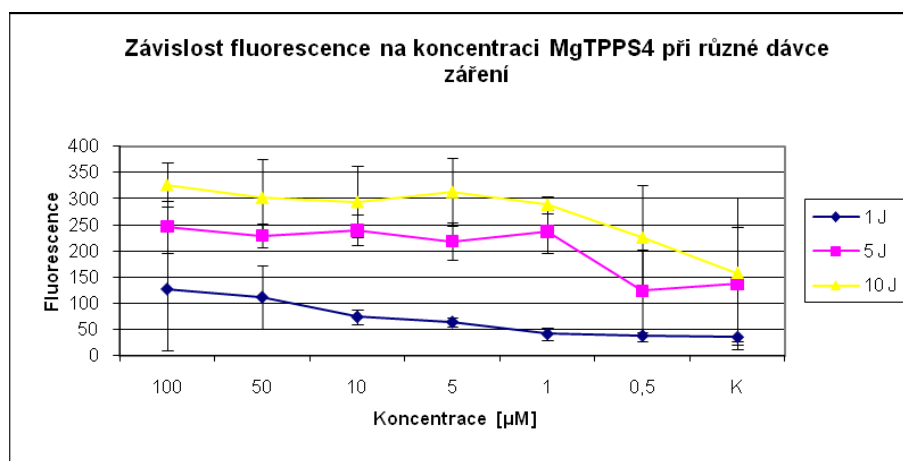
Graf 4: Závislost minutového přírůtku fluorescence na koncentraci TPPS₄ při jednotlivých dávkách záření.



Graf 5: Závislost minutového přírůtku fluorescence na koncentraci ZnTPPS₄ při jednotlivých dávkách záření.



Graf 6: Závislost minutového přírůstku fluorescence na koncentraci PdTPPS₄ při jednotlivých dávkách záření.



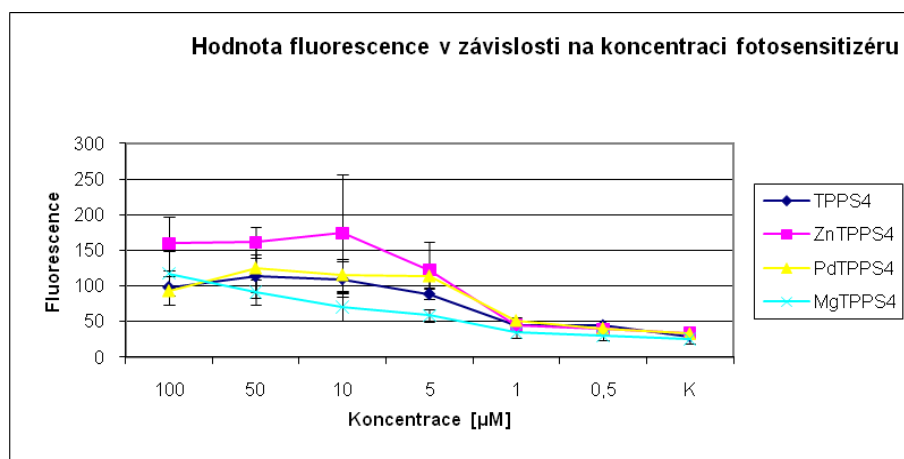
Graf 7: Závislost minutového přírůstku fluorescence na koncentraci MgTPPS₄ při jednotlivých dávkách záření.

5.1.2 NIH3T3 BUŇKY (MYŠÍ FIBROBLASTY)

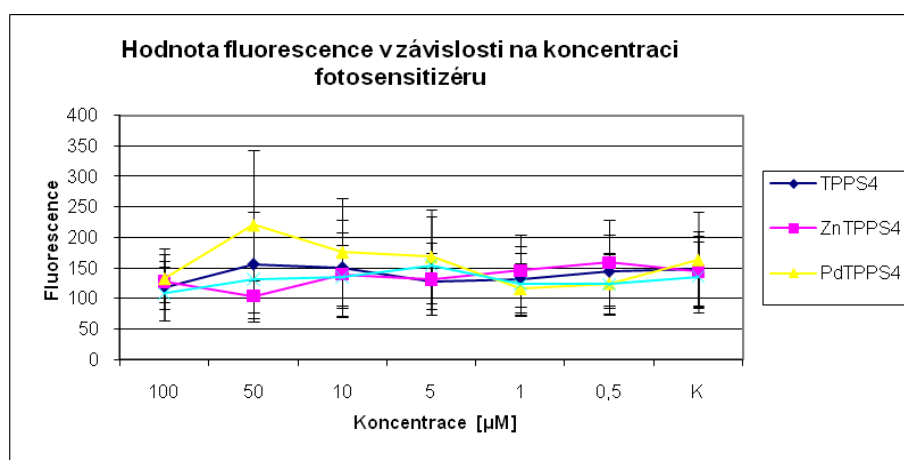
V porovnání s G361 buňkami nedošlo k tak přímému nárůstu množství ROS u jednotlivých fotosenzitizérů v závislosti na jejich koncentraci. Křivka, která znázorňuje množství ROS, se s rostoucí koncentrací příliš nezvyšuje a zůstává spíše lineární s původně obsaženým množstvím ROS, které reprezentuje kontrolní vzorek (K) (Graf 8 - 10). Důvodem je neselektivní vylučování fotosenzitizéru zdravými NIH3T3 buňkami. Nedochozí tedy k tak výrazné akumulaci látky uvnitř buněk (jako tomu je u G361 buněk), kde po ozáření dochází k reakcím, při kterých se ROS tvoří. Proto nárůst v závislosti na koncentraci není tak radikální. K určitému vzrůstu dochází až při největších koncentracích.

Díky tomu, že buňky byly detekovány po dobu deseti minut od ozáření, přestalo množství ROS ve dvou případech (Graf 9, 10) v koncentraci 100 μM pomalu narůstat. Pokud bychom však pokračovali v ozařování, množství ROS by dále narůstalo.

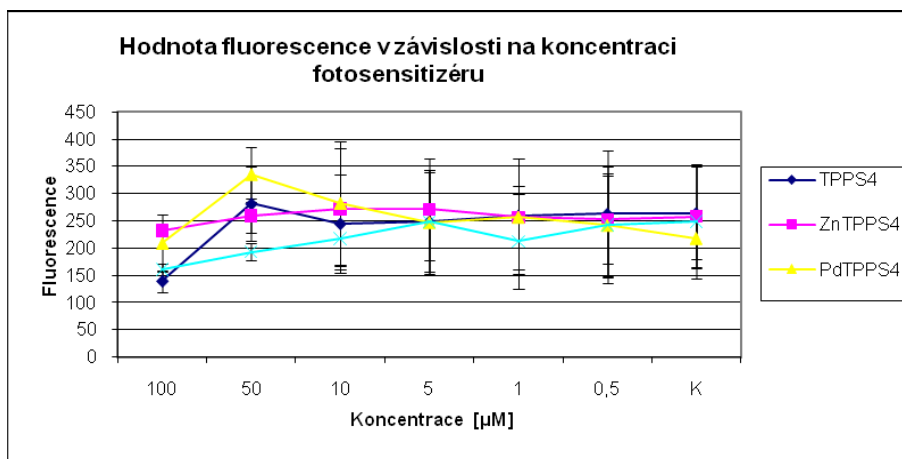
I přes nevelký nárůst množství ROS se potvrdilo i u nenádorové buněčné linie, že tvorba ROS se zvyšuje s rostoucí dávkou záření (Graf 11 - 14).



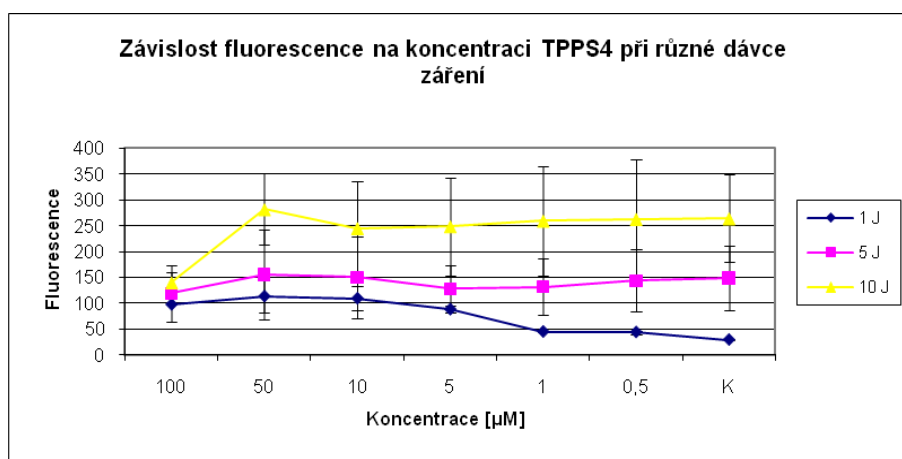
Graf 8: Závislost minutového přírůstku fluorescence na koncentraci jednotlivých PS při dávce záření 1 J/cm^2 .



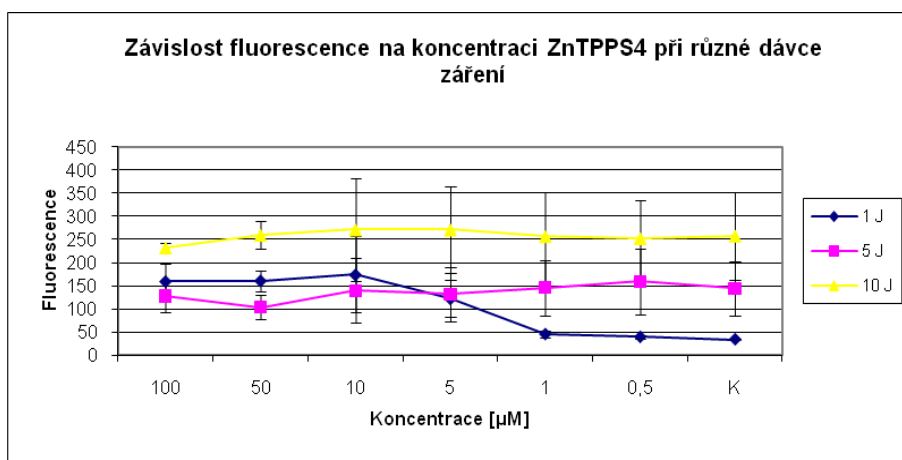
Graf 9: Závislost minutového přírůstku fluorescence na koncentraci jednotlivých PS při dávce záření 5 J/cm^2 .



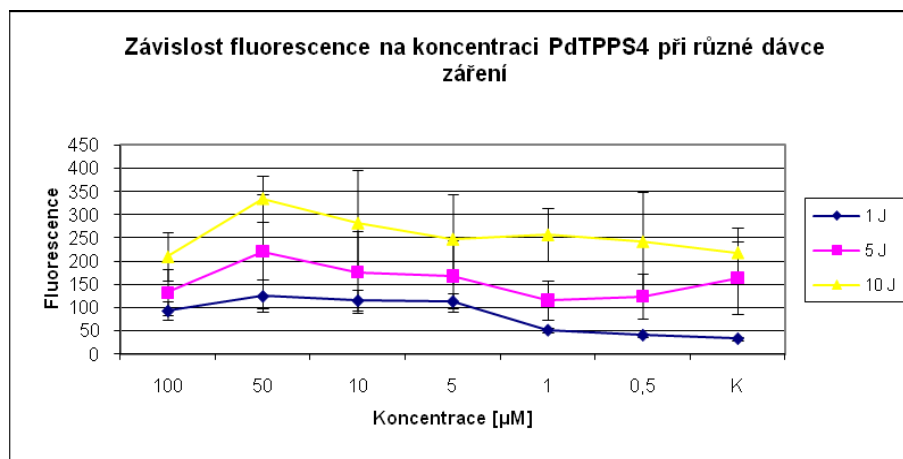
Graf 10: Závislost minutového přírůstku fluorescence na koncentraci jednotlivých PS při dávce záření 10 J/cm^2 .



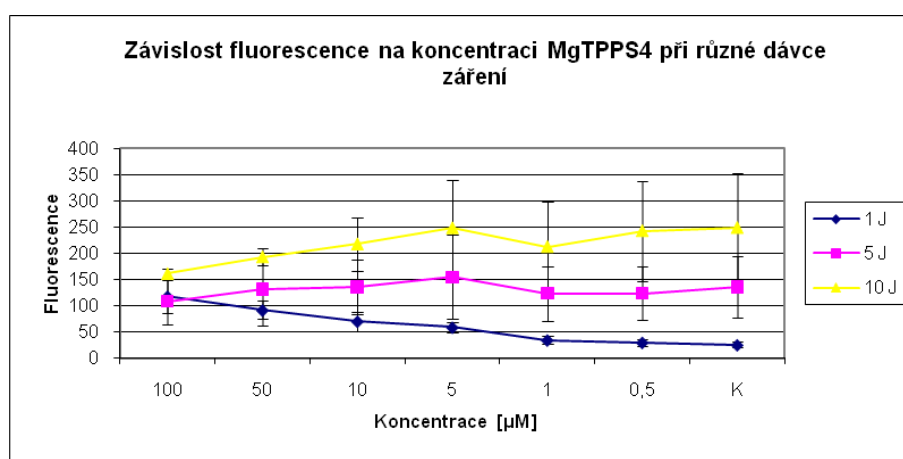
Graf 11: Závislost minutového přírůstku fluorescence na koncentraci TPPS₄ při jednotlivých dávkách záření.



Graf 12: Závislost minutového přírůstku fluorescence na koncentraci ZnTPPS₄ při jednotlivých dávkách záření.



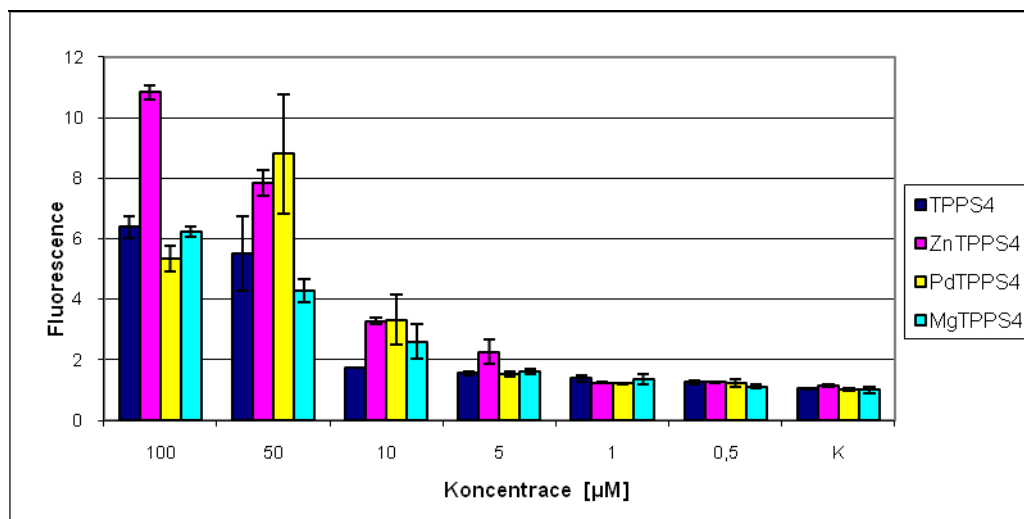
Graf 13: Závislost minutového přírůstku fluorescence na koncentraci PdTPPS₄ při jednotlivých dávkách záření.



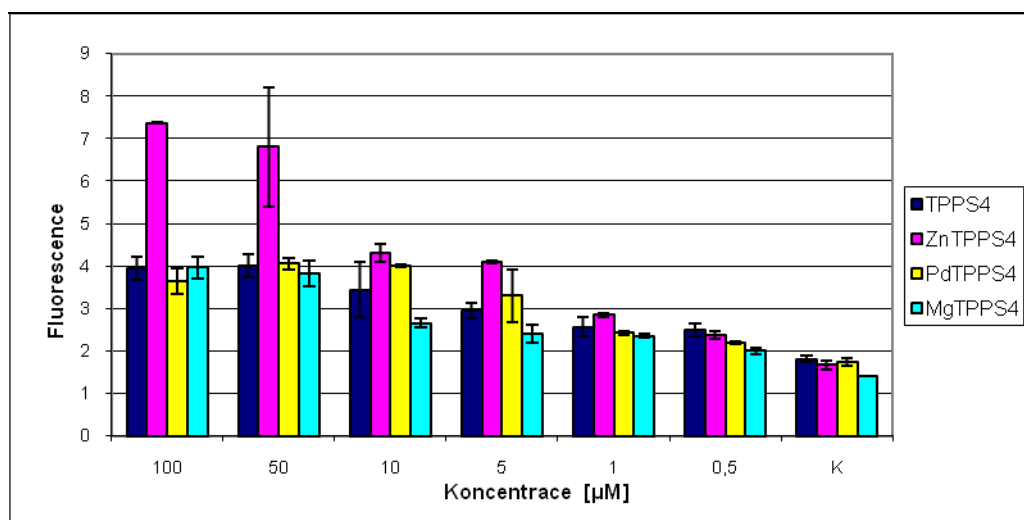
Graf 14: Závislost minutového přírůstku fluorescence na koncentraci MgTPPS₄ při jednotlivých dávkách záření.

5.1.3 G361 A NIH3T3 BUŇKY BEZ OZÁŘENÍ

Pro demonstraci toho, jak důležitou roli má ve PDT záření, byla produkce ROS měřena také u G361 a NIH3T3 buněk, které nebyly ozářeny. Výsledky potvrzují nezbytnost záření pro tvorbu ROS, které poté poškozují buňky. Bez ozáření dochází k opravdu minimálnímu nárůstu množství ROS (Graf 15, 16). Za těchto podmínek došlo ve většině případů k největšímu nárůstu při použití fotosensitizeru ZnTPPS₄. Při porovnání G361 a NIH3T3 buněk lze opět vyzorovat, že za stejných podmínek došlo k tvorbě většího množství ROS u G361 buněk. Důvodem je již zmiňované selektivní vylučování fotosensitizeru nádorovými buňkami.



Graf 15: Závislost minutového přírůstku fluorescence na koncentraci jednotlivých PS bez ozáření u G361 buněčných linií.



Graf 16: Závislost minutového přírůstku fluorescence na koncentraci jednotlivých PS bez ozáření u NIH3T3 buněčných linií.

5.2 MTT TEST

Pro posouzení fototoxického účinku fotosensitizerů byl použit tzv. MTT test. Ten spočívá ve změně ve vodě rozpustného 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromidu na nerozpustný formazan, který má fialové zbarvení. Tato reakce probíhá pouze v živých buňkách, proto je intenzita zbarvení přímo úměrná počtu přeživších buněk. Vyhodnocení probíhá pomocí readeru, který měří absorbanci při 570 nm a 690 nm (Tab. III).

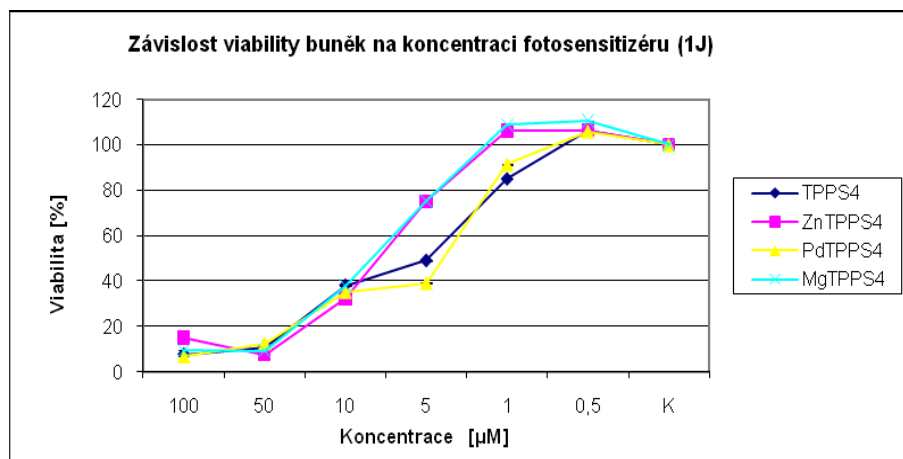
Tab. III: Velikost absorpance fotosensitizerů při 570 nm a 690 nm u G361 buněčných liniích po dávce záření 1 J/cm².

Fotosensitizer	100	50	10	5	1	0,5	K	Vlnová délka [nm]
TPPS ₄	0,097	0,106	0,313	0,549	0,808	0,828	0,818	570
TPPS ₄	0,092	0,101	0,32	0,522	0,772	0,774	0,809	570
ZnTPPS ₄	0,107	0,101	0,236	0,435	0,822	0,815	0,922	570
ZnTPPS ₄	0,093	0,096	0,2	0,487	0,712	0,812	0,838	570
PdTPPS ₄	0,09	0,088	0,163	0,314	0,766	0,78	0,784	570
PdTPPS ₄	0,088	0,094	0,148	0,268	0,712	0,751	0,782	570
MgTPPS ₄	0,091	0,101	0,435	0,599	0,786	0,736	0,862	570
MgTPPS ₄	0,098	0,108	0,441	0,536	0,645	0,706	0,72	570
Fotosensitizer	100	50	10	5	1	0,5	K	Vlnová délka [nm]
TPPS ₄	0,065	0,068	0,073	0,075	0,095	0,084	0,084	690
TPPS ₄	0,062	0,069	0,07	0,075	0,079	0,078	0,077	690
ZnTPPS ₄	0,079	0,069	0,065	0,071	0,075	0,081	0,133	690
ZnTPPS ₄	0,063	0,065	0,065	0,073	0,074	0,093	0,077	690
PdTPPS ₄	0,06	0,062	0,065	0,068	0,078	0,082	0,091	690
PdTPPS ₄	0,064	0,067	0,068	0,066	0,079	0,081	0,105	690
MgTPPS ₄	0,063	0,063	0,069	0,07	0,077	0,079	0,115	690
MgTPPS ₄	0,063	0,064	0,067	0,069	0,072	0,078	0,086	690

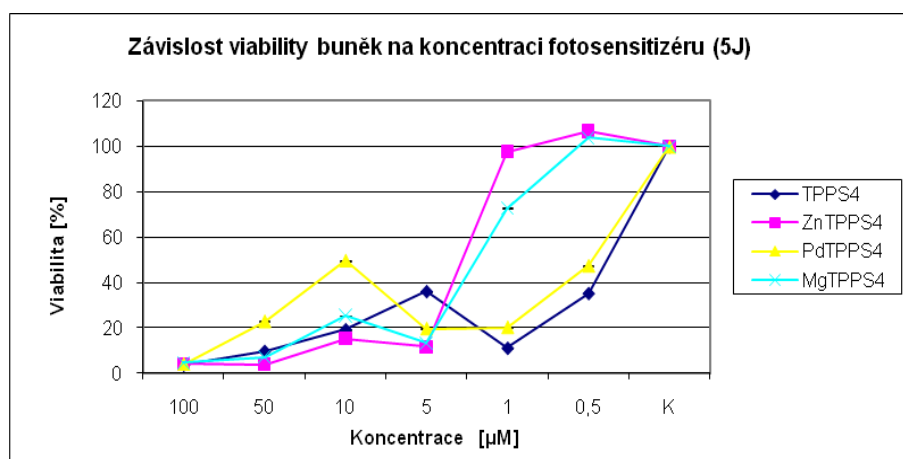
V programu Microsoft Excel byly hodnoty vlnové délky 570 nm odečteny od 690 nm a převedeny na procenta vztážené ke kontrole. Výsledné hodnoty ze tří na sobě nezávislých měření byly poté pro každý fotosensitizer zprůměrovány a dále zpracovány pro větší přehlednost do grafů.

5.2.1 G361 BUŇKY (KOŽNÍ MELANOM)

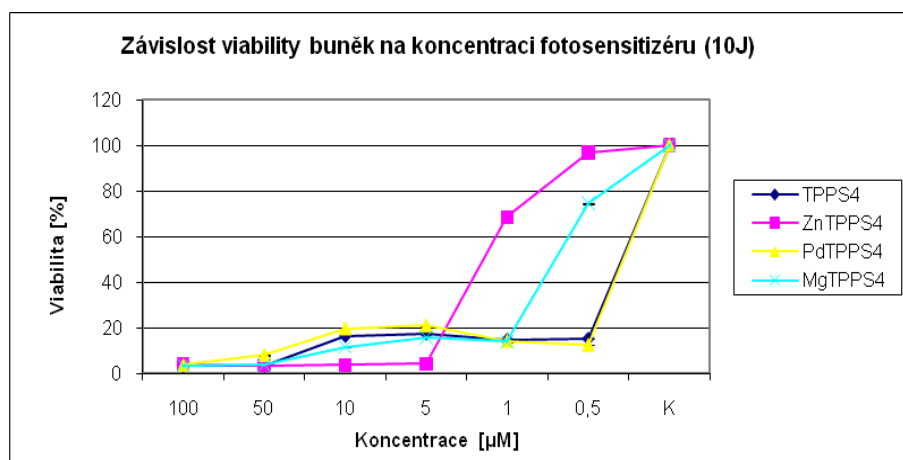
Výsledky MTT testu viability odpovídají výsledkům měření množství ROS. S větší koncentrací fotosensitizeru roste množství vytvářených ROS, které způsobují poškození buněk a snižují tak viabilitu (Graf 17 - 19). Porovnání vlivu dávky záření na celkovou viabilitu při všech koncentracích každého fotosensitizeru ukázalo, že s rostoucí dávkou záření klesá celková viabilita (Graf 20 - 23). Největší cytotoxický účinek při nízkých koncentracích prokázaly fotosensitizery TPPS₄ a PdTPPS₄. Ovšem s rostoucí koncentrací se ukázal být účinnější fotosensitizer ZnTPPS₄.



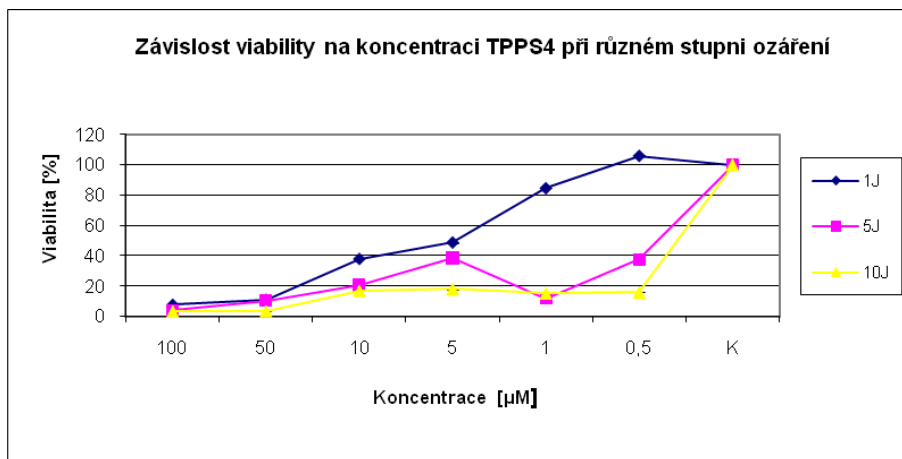
Graf 17: Závislost viability na koncentraci jednotlivých fotosenzitizérů při dávce záření 1 J/cm^2 .



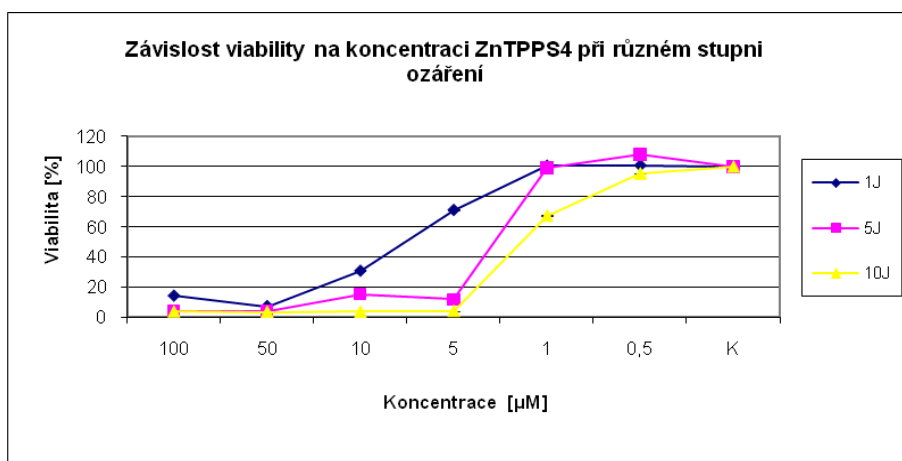
Graf 18: Závislost viability na koncentraci jednotlivých fotosenzitizérů při dávce záření 5 J/cm^2 .



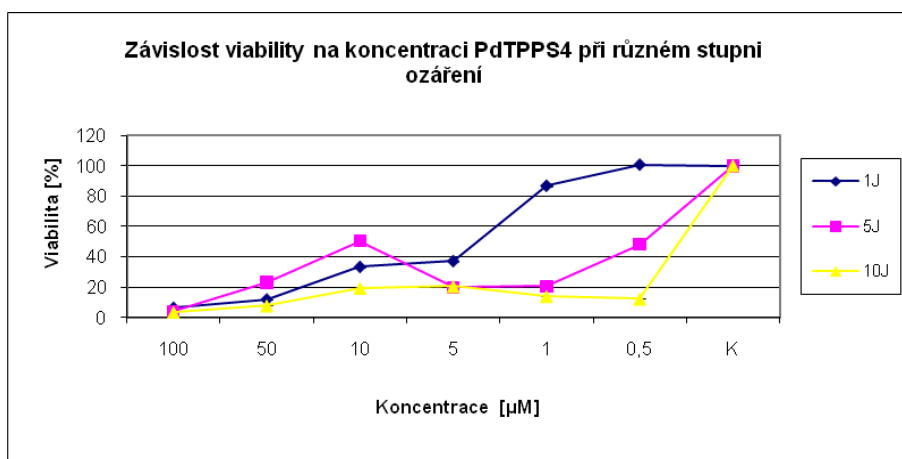
Graf 19: Závislost viability na koncentraci jednotlivých fotosenzitizérů při dávce záření 10 J/cm^2 .



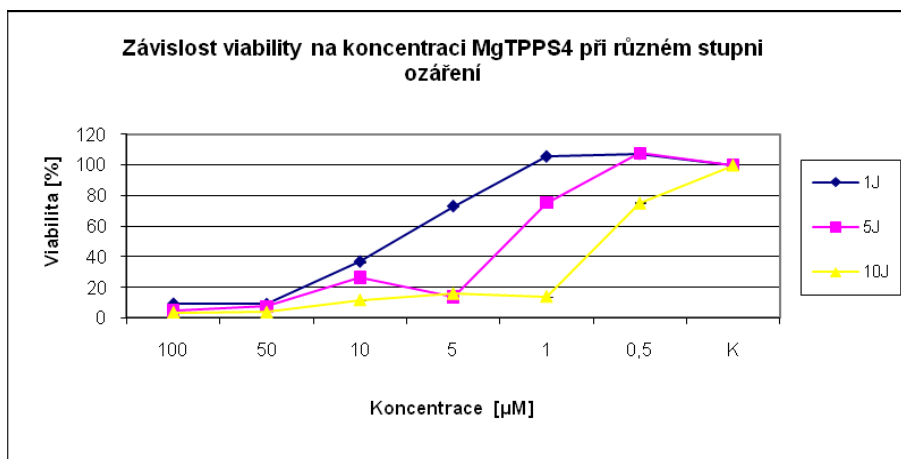
Graf 20: Závislost viability na koncentraci TPPS₄ při jednotlivých dávkách záření.



Graf 21: Závislost viability na koncentraci ZnTPPS₄ při jednotlivých dávkách záření.



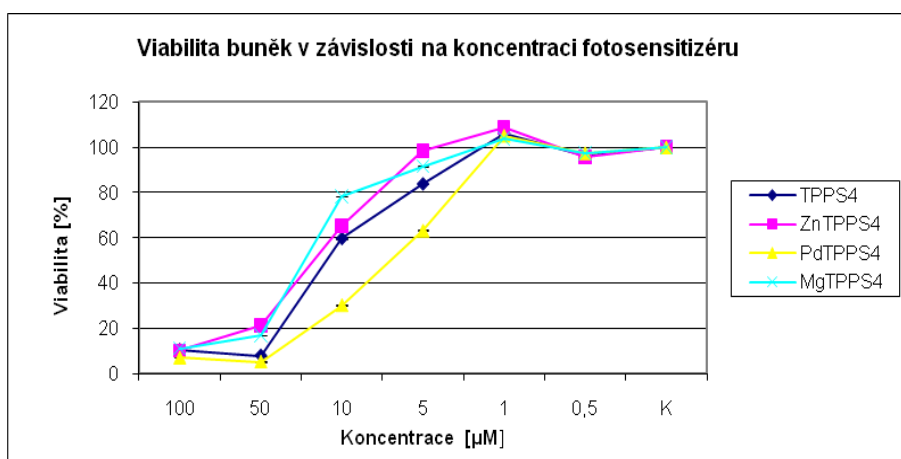
Graf 22: Závislost viability na koncentraci PdTPPS₄ při jednotlivých dávkách záření.



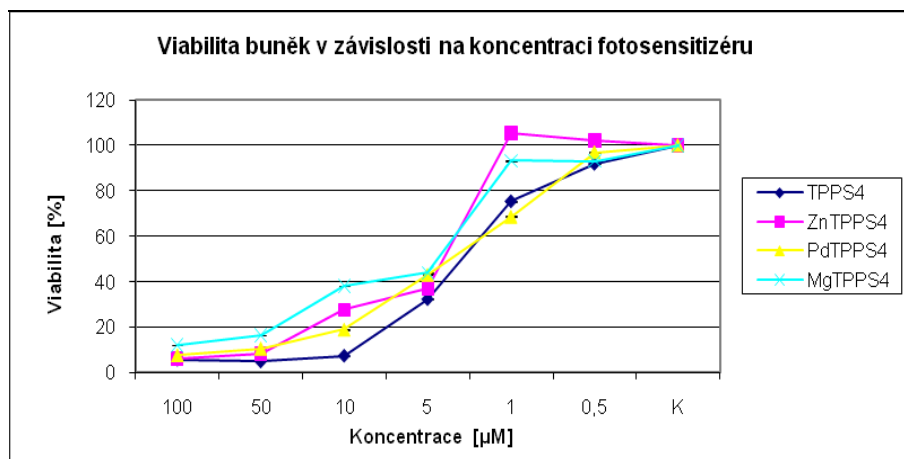
Graf 23: Závislost viability na koncentraci PdTPPS₄ při jednotlivých dávkách záření.

5.2.2 NIH3T3 BUŇKY (MYŠÍ FIBROBLASTY)

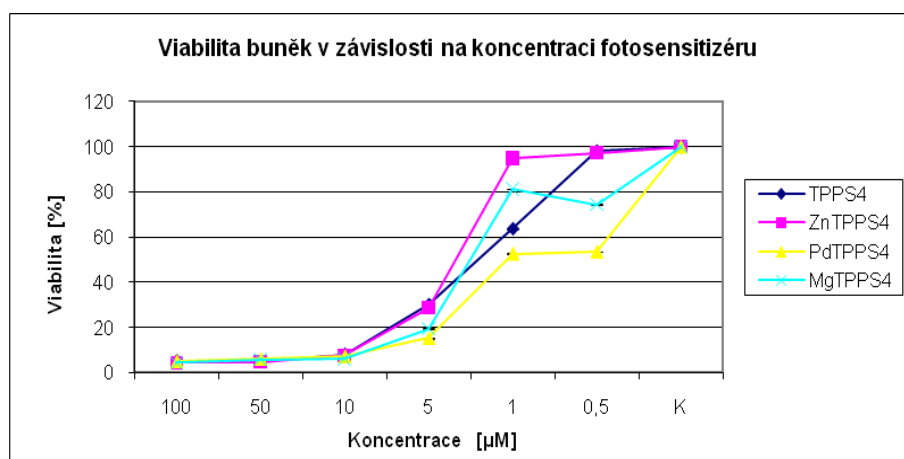
Stejně jako u G361 buněk, i viabilita NIH3T3 buněk klesala s rostoucí koncentrací fotosenzitizéru (Graf 24 - 26). Vyšší dávka záření způsobila v přítomnosti každého fotosenzitizéru umocnění fotodynamického efektu a tím snížení viability (Graf 27 - 30). Velký rozdíl mezi G361 a NIH3T3 buňkami byl v koncentracích, ve kterých docházelo ke značnému poklesu viability. Zatímco G361 buňky měly nízkou viabilitu i při nižších koncentracích fotosenzitizéru, viabilita NIH3T3 buněk výrazně klesla až při větší koncentraci a při vyšších dávkách záření, což je způsobeno právě výše zmíněným selektivním vychytáváním fotosenzitizéru nádorovými buňkami.



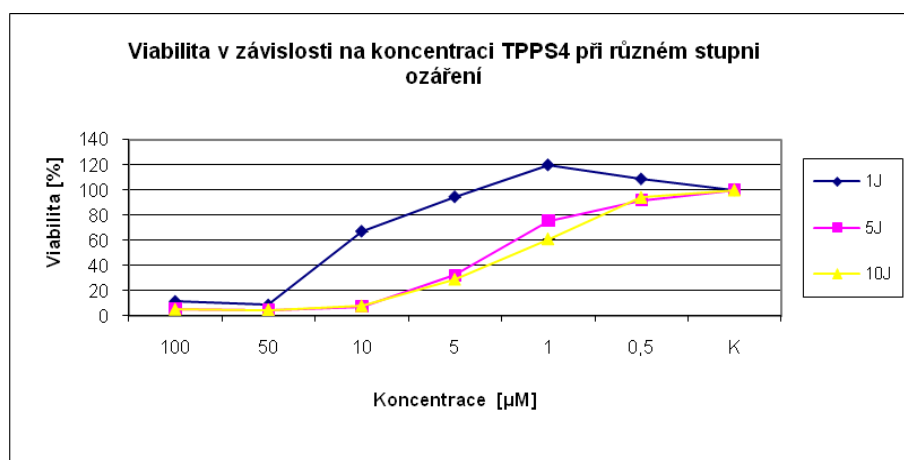
Graf 24: Závislost viability na koncentraci jednotlivých fotosenzitizérů při dávce záření 1 J/cm².



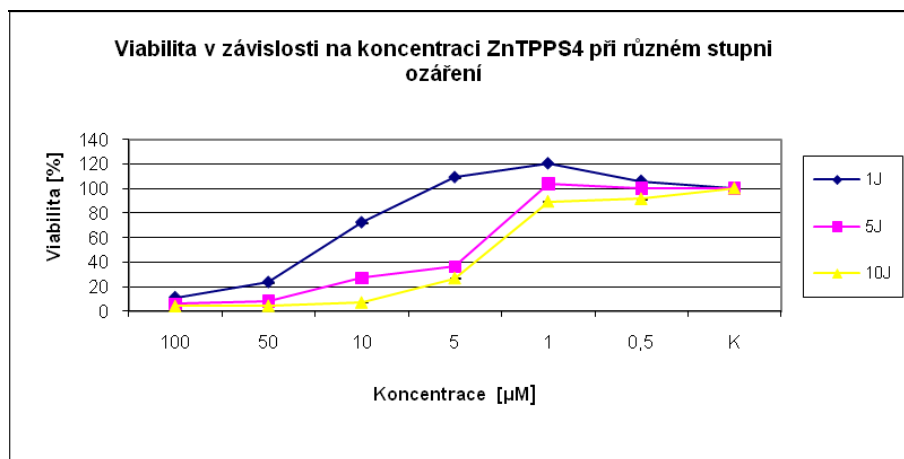
Graf 25: Závislost viability na koncentraci jednotlivých fotosenzitizérů při dávce záření 5 J/cm².



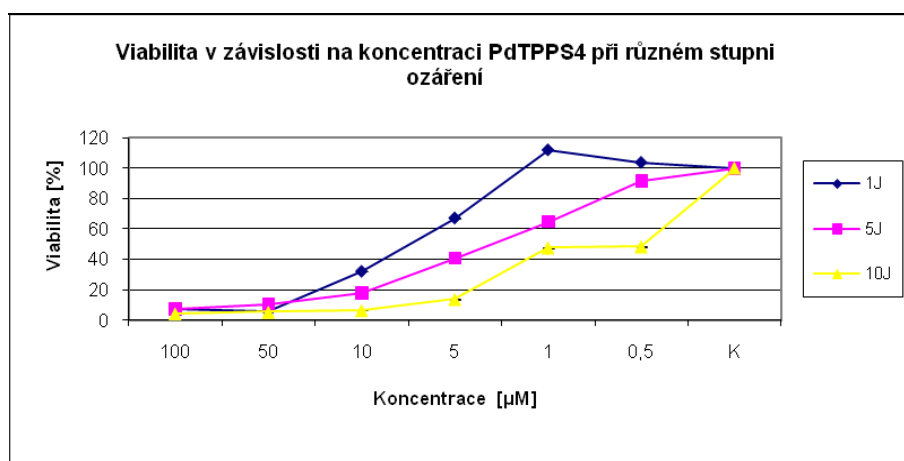
Graf 26: Závislost viability na koncentraci jednotlivých fotosenzitizérů při dávce záření 10 J/cm².



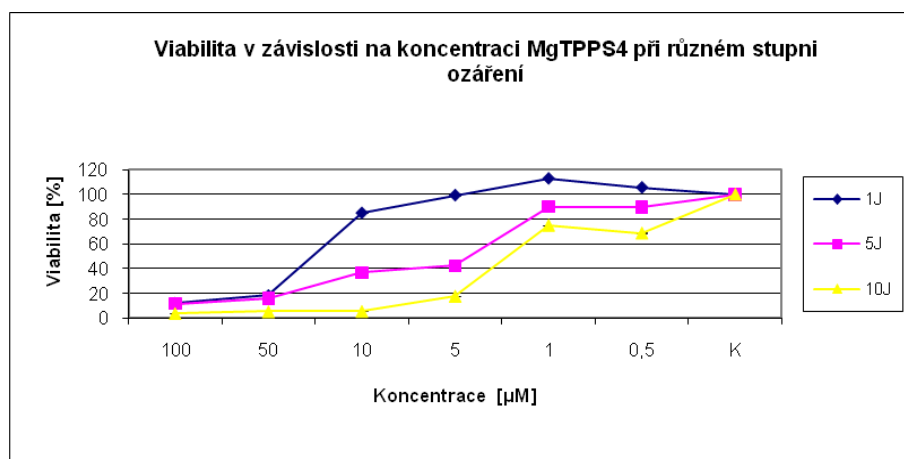
Graf 27: Závislost viability na koncentraci TPPS₄ při jednotlivých dávkách záření.



Graf 28: Závislost viability na koncentraci ZnTPPS₄ při jednotlivých dávkách záření.



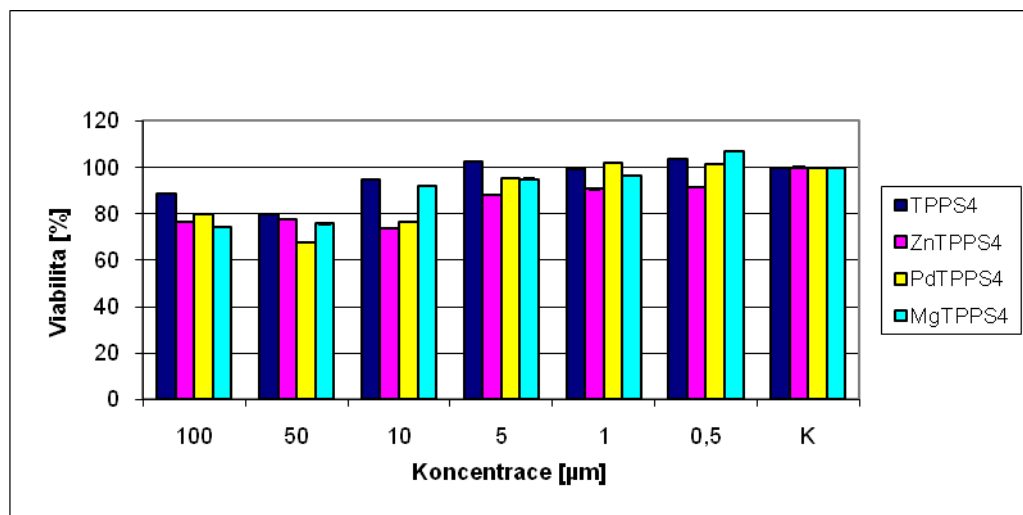
Graf 29: Závislost viability na koncentraci PdTPPS₄ při jednotlivých dávkách záření.



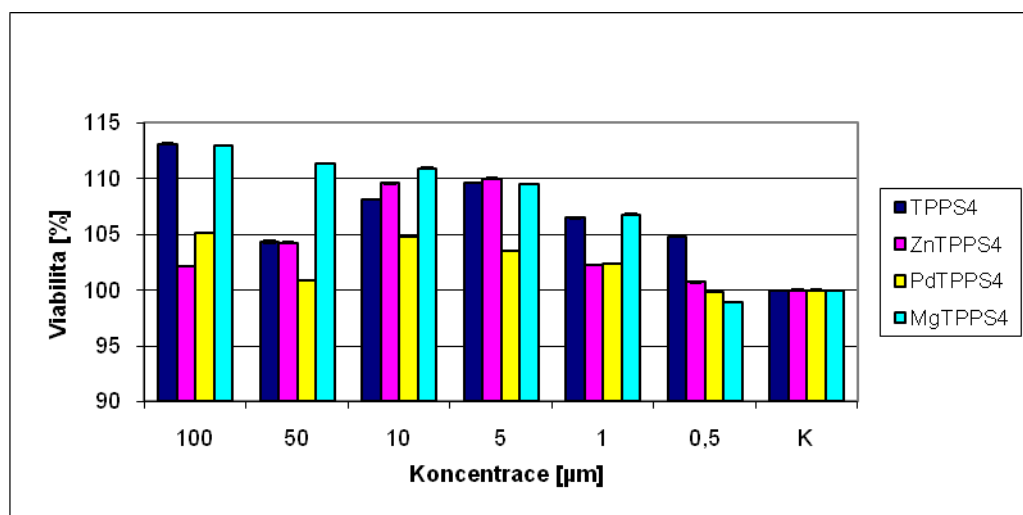
Graf 30: Závislost viability na koncentraci MgTPPS₄ při jednotlivých dávkách záření.

5.1.3 G361 A NIH3T3 BUŇKY BEZ OZÁŘENÍ

U buněk, které nebyly vystaveny záření, nedošlo k žádnému (Graf 32), případně pouze k mírnému (Graf 31) poklesu viability, který je způsoben vyšší koncentrací fotosensitizeru, čímž se zvyšuje cytotoxický účinek. Důvodem je minimální množství ROS (Graf 15. 16), které jsou nezbytné pro poškození buňky.



Graf 31: Závislost viability na koncentraci jednotlivých fotosensitizerů bez ozáření u G361 buněčných linií.



Graf 32: Závislost viability na koncentraci jednotlivých fotosensitizerů bez ozáření u NIH3T3 buněčných linií.

Závěrem můžeme poznamenat, že s rostoucí koncentrací fotosensitizeru a vyšší dávkou záření se zvyšuje také tvorba a množství ROS. Čím více ROS je v buňkách přítomno, tím více jsou buňky poškozovány a klesá tak viabilita. Fotosensitizer ZnTPPS₄, který prokázal

největší produkci ROS, se ukázal být neúčinnější při vyšších koncentracích, a také nejdříve dosáhl téměř nulové viability. Fotosensitizerů TPPS₄ a PdTPPS₄ vykazovaly sice vyšší účinnost při nižší koncentraci, ale viabilita buněk byla stále vysoká.

Vzájemné porovnání G361 a NIH3T3 buněk prokázalo selektivní vychytávání fotosensitizeru nádorovými buňkami. Důkazem je tvorba většího množství ROS a nižší viabilita i při nízkých koncentracích fotosensitizeru u G361 buněčných linií.

6 DISKUSE

Fotodynamická terapie je metoda, která při léčbě využívá fotosensitivní látku (fotosensitizer) a záření. Díky ozáření fotosensitizeru se spouští řada reakcí, které vyústí v poškození a následně v usmrcení buňky.

Výhoda této metody spočívá v selektivním vychytávání fotosensitizeru nádorovou tkání, kde se hromadí. Díky tomu dochází k usmrcení buněk hlavně v postižené tkáni, zatímco okolní zdravá tkáň je zasažena jen minimálně. Záření způsobí excitaci fotosensitizeru. Tato energie může být poté dvěma mechanismy převedena na kyslík. Při prvním typu je energie přenesena na kyslík přes substrát a vznikají různé ROS. Během druhého typu reakce je energie převedena přímo na kyslík, čímž vzniká velice cytotoxický singletový kyslík. Vzniklé reaktivní formy kyslíku poté poškozují buňky a spouští jejich apoptózu nebo nekrózu. Čím více molekul fotosensitizeru se tedy v buňkách nahromadí, tím více energie je převedeno na kyslík a vzniká více ROS, které jsou schopny poškodit velké množství buněk.

Podle Robertsona a kol. (2009) je používání fotodynamické terapie tak atraktivní kvůli její specifitě a selektivitě. Po aplikaci fotosensitizeru dochází k jeho specifickému hromadění v maligní tkáni, kde se podílí na tvorbě velkého množství ROS, které následně způsobí destrukci buněk. Tento fakt se potvrdil i v naší práci. Porovnáním G361 buněk (Graf 1 - 3) a NIH3T3 buněk (Graf 8 – 10) zjistíme, že v případě G361 buněk došlo k vyšší tvorbě množství ROS. Z toho lze usoudit, že právě zde docházelo k většímu vychytávání a hromadění molekul fotosensitizeru, který byl po ozáření schopen předat energii kyslíku.

Castano a kol. (2005) uvádí, že důležitými faktory, které mají vliv na rozsah poškození buněk a na jejich následném zániku, je koncentrace fotosensitizeru a intenzita záření. Tento fakt byl potvrzen i námi (Graf 17 – 19, Graf 24 – 26). Z výzkumu je patrné, že s rostoucí koncentrací fotosensitizeru viabilita klesá. Tento fakt je ještě více umocněn přítomností vyšších dávek záření.

Plaetzer a kol. (2003) tvrdí, že takové koncentrace fotosensitizerů, které se při fotodynamické terapii používají, jsou sami o sobě v podstatě neškodné. Až absorpcí fotonů dochází k tvorbě velkého množství ROS, které mají schopnost poškodit buňky. Pro ověření neškodnosti samotného fotosensitizeru jsme do naší práce zařadili měření buněk, u kterých nedošlo k žádnému ozáření (Graf 31, 32). V takových podmínkách jsme nepozorovali žádné, případně pouze minimální snížení viability buněk v závislosti na koncentraci fotosensitizeru.

Kolářová a kol. (2007) ve své studii porovnávali množství vytvořených ROS v přítomnosti tří fotosensitizerů (TPPS₄, ZnTPPS₄, PdTPPS₄). Test probíhal na G361 buněčných liniích při dávce záření 1 J/cm². Největší množství ROS naměřili v přítomnosti ZnTPPS₄, mnohem méně pak u PdTPPS₄ a TPPS₄. Rozdíl mezi PdTPPS₄ a TPPS₄ nebyl příliš výrazný. Při pohledu na výsledky naší studie (Graf 1) lze říct, že jsme dospěli k podobným výsledkům.

Kolářová a kol. (2007) měřili také účinnost stejných fotosensitizerů při studiu poškození buněk. Z jejich výzkumu se při dávce záření 1 J/cm^2 a 5 J/cm^2 ukázal jako nejúčinnější fotosensitizer ZnTPPS_4 . Porovnáním daných fotosensitizerů za stejných podmínek s naší prací jsou patrné mírné odchylky. Zatímco v práci Kolářové a kol. (2007) byl fotosensitizer ZnTPPS_4 účinnější i při nižších koncentracích, v naší studii byl ZnTPPS_4 nejúčinnější zejména při vyšších koncentracích.

Lze tedy říci, že výsledky naší studie se v hlavních bodech shodují i se studii jiných výzkumných pracovníků. Mírné odchylky v námi naměřených hodnotách můžeme přisoudit nepřesnému pipetování jednotlivých látek, jiným pracovním podmínkám než u ostatních autorů a případnému vystavení citlivého fotosensitizeru i běžnému světlu, které mohlo celkové výsledky mírně ovlivnit.

7 ZÁVĚR

K cílům této práce patřilo ověření účinnosti fotosensitizerů při různých dávkách záření a různých koncentracích u G361 a NIH3T3 buněčných linií pomocí měření ROS a MTT testu viability. Z výsledku je patrné, že buňky každé linie reagovali na dané podmínky stejně, i když v různé míře.

Výsledky měření reaktivních forem kyslíku v závislosti na koncentraci fotosensitizeru ukázaly, že čím je koncentrace vyšší, tím k větší tvorbě ROS dochází. Děje se tak proto, že se větší množství fotosensitizeru dostane do více buněk. V nich je pak po ozáření schopen reagovat s více molekulami kyslíku. Dalším důležitým poznatkem, který z měření vyplývá, je pozitivní vliv dávky záření na tvorbu ROS. S rostoucí silou dávky záření rostla i produkce reaktivních forem kyslíku. Nejvyšších hodnot ROS tak bylo dosaženo při koncentraci 100 μM a při dávce 10 J/cm^2 . Vliv faktorů koncentrace a dávky záření byl stejný pro obě buněčné linie. Rozdíl však byl v míře tohoto účinku. Díky selektivnímu vychytávání fotosensitizeru nádorovými buňkami bylo množství ROS za stejných podmínek vyšší u G361 buněčné linie.

MTT test viability v podstatě potvrdil výsledky ROS měření. Viabilita úměrně klesala s rostoucí koncentrací fotosensitizeru. Vyšší dávka záření tento fakt jen umocnila a k výraznému poklesu viability docházelo už při nižších koncentracích. Rozdíl mezi buněčnými liniemi v tomto případě spočíval v tom, že u G361 buněk viabilita výrazněji poklesla už při nižších koncentracích fotosensitizerů (5 μM při 1 J/cm^2 ; 0,5 μM při 5 a 10 J/cm^2), zatímco viabilita NIH3T3 buněk výrazně klesla až při vyšších koncentracích a dávkách záření (10 μM při 1 J/cm^2 ; 5 μM při 5 a 10 J/cm^2).

Provedení testu viability bez ozáření obou buněčných linií neukázalo žádný, případně pouze mírný pokles viability. Potvrdilo se tak, jak je důležitá úloha světla ve fotodynamické terapii, a že samotný fotosensitizer je pro buňky v podstatě neškodný.

Další úlohou bylo porovnat účinek jednotlivých fotosensitizerů při destrukci nádorových buněk ve fotodynamické terapii. V naší studii byl zaznamenán největší nárůst produkce ROS v přítomnosti fotosensitizeru ZnTPPS₄. Produkce ROS zbylých fotosensitizerů se vzájemně příliš nelišily a bylo tedy obtížné rozhodnout o jejich přesném pořadí. Pomocí MTT testu byla v koncentraci 0,5 – 5 μM při záření 1 J/cm^2 a koncentraci 0,5 – 1 μM při záření 5 a 10 J/cm^2 naměřena nejmenší viabilita v přítomnosti fotosensitizerů TPPS₄ a PdTPPS₄, poté MgTPPS₄ a největší viabilitu vykazoval fotosensitizer ZnTPPS₄. V koncentracích vyšších než 5 μM byla ovšem viabilita nejnižší v přítomnosti ZnTPPS₄, zatímco u PdTPPS₄ byla viabilita nejvyšší.

Jako nejúčinnější se označuje takový fotosensitizer, který dokáže usmrtit 100 % nádorových buněk při co nejnižší koncentraci. Podle našich výsledků se ze zkoumaných fotosensitizerů ukázal být nejlepší ZnTPPS₄. Ostatní fotosensitizery byly sice při nejnižších koncentracích účinnější, celková viabilita buněk však byla stále velmi vysoká. Pro dosažení

téměř 100% usmrcení buněk (nejnižší viability) vyžadoval právě ZnTPPS₄ nejnižší koncentraci (5 μM při 10 J/cm²). Zbylé fotosensitizéry dosáhly téměř 100% usmrcení buněk až při vyšších koncentracích (50 μM při 10 J/cm²). Z tohoto důvodu lze označit za nejúčinnější fotosensitizér ZnTPPS₄.

Důvodem, proč žádný fotosensitizér nedosáhl nulové viability ani při nejvyšší koncentraci a největší dávce záření je to, že se jedná v podstatě o buňky druhé generace, které vznikly (narostly) až po ukončení terapie.

Naše studie tedy prokázala úspěšné poškození nádorových buněk pomocí fotodynamické terapie. Zároveň potvrdila, že jsou fotosensitizéry selektivně vychytávány nádorovými buňkami, bez ozáření nejsou cytotoxické a nenádorové buňky poškozují během fotodynamické terapie pouze minimálně.

8 LITERATURA

Allison, R.R., Downie, G.H., Cuenca, R., Hu, X.H., Childs, C.J.H., Sibata, C.H. (2004): Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 1: 27 – 42.

Allison, R.R., Sibata, C.H. (2010): Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 7: 61 – 75.

Allison, R.R., Sibata, C.H., Downie, G.H., Cuenca, R.E. (2006): A clinical review of PDT for cutaneous malignancies. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 3: 214 – 226.

Almeida, R.D., Manadas, B.J., Carvalho, A.P., Duarte, C.B. (2004): Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta* 1704: 59 – 86.

Anstey, A. (2004): Photodynamic therapy. *Medicine* 32: 24 – 25.

Ayaru, L., Bown, S.G., Pereira, S.P. (2004): Photodynamic therapy for pancreatic carcinoma: experimental and clinical studies. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 1: 145 – 155.

Aziz, F., Telara, S., Moseley, H., Goodman, C., Manthri, P., Eljamel, M.S. (2009): Photodynamic therapy adjuvant to surgery in metastatic carcinoma in brain. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 6: 227 – 230.

Babjuk, M., Stepp, H., Jirsa, M., Hofstetter, A., Dvořáček, J. (2000): Hodnocení fotodynamického účinku syntetického porfyrinu TPPS₄ [meso-tetra(4-sulfonatophenyl) porphyrine] na buňky lidského nádoru močového měchýře in vitro. *Česká urologie* 4: 11 – 16.

Brown, S.B., Brown, E.A., Walker, I. (2004): The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *The Lancet Oncology* 5: 497 – 508.

Buytaert, E., Dewaele, M., Agostinis, P. (2007): Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta* 1776: 86 – 107.

Castano, A.P., Demidova, T.N., Hamblin, M.R. (2004): Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 1: 279 – 293.

Castano, A.P., Demidova, T.N., Hamblin, M.R. (2005): Mechanisms in photodynamic therapy: part two – cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2: 1 – 23.

Castano, A.P., Demidova, T.N., Hamblin, M.R. (2005): Mechanisms in photodynamic therapy: Part three – Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2: 91 – 106.

Gray, J., Fullarton, G. (2007): The current role of photodynamic therapy in oesophageal dysplasia and cancer. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 4: 151 – 159.

Ibbotson, S.H., Moseley, H., Brancalion, L., Padgett, M., O'Dwyer, M., Woods, J.A., Lesar, A., Goodman, C., Ferguson, J. (2004): Photodynamic therapy in dermatology: Dundee clinical and research experience. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 1: 211 – 223.

Jamil, B., Algermissen, B., Osterloh, D., Philipp, C.M., Berlien, H.P. (2002): Qualitative Differences in the Generation of Activated Oxygen Species by Photosensitizers Used in PDT. *Medical laser application* 17: 49 – 54.

Kessel, D. (2004): Photodynamic therapy: from the beginning. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 1: 3 – 7.

Kessel, D. (2006): Death pathways associated with photodynamic therapy. *Medical laser application* 21: 219 – 224.

Kolářová, H., Bajgar, R., Tománková, K., Nevřelová, P., Mosinger, J. (2007): Comparison of sensitizers by detecting reactive oxygen species after photodynamic reaction in vitro. *Toxicology in Vitro* 21: 1287 – 1291.

Kolářová, H., Nevřelová, P., Bajgar, R., Jirová, D., Kejlová, K., Strnad, M. (2007): In vitro photodynamic therapy on melanoma cell lines with phthalocyanine. *Toxicology in Vitro* 21: 249 – 253.

Kübler, A.C. (2005): Photodynamic therapy. *Medical laser application* 20: 37 – 45.

Lemp, E., Cañete, A., Günther, G., Pizarro, N., Zanocco, A.L (2008): Photosensitized generation of singlet molecular oxygen by aryloxazinones. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 199: 345 – 352.

Mtttang, T.S. (2004): Lasers and light sources for PDT: past, present and future. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 1: 43 – 48.

Mitton, D., Ackroyd, R. (2008): A brief overview of photodynamic therapy in Europe. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 5: 103 – 111.

Moghissi, K., Dixon, K., Thorpe, J.A.C., Oxtoby, C., Stringer, M.R. (2004): Photodynamic therapy (PDT) for lung cancer: the Yorkshire Laser Centre experience. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 1: 253 – 262.

Mosinger, J., Kliment Jr., V., Sejbál, J., Kubát, P., Lang, K. (2002): Host-guest complexes of anionic porphyrin sensitizers with cyclodextrins. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* 6: 514 – 526.

Nowis, D., Stokłosa, T., Legat, M., Issat, T., Jakóbiśiak, M., Gołąb, J. (2005): The influence of photodynamic therapy on the immune response. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2: 283 – 298.

Piette, J., Volanti, C., Vantieghem, A., Matroule, J.Y., Habraken, Y., Agostinis, P. (2003): Cell death and growth arrest in response to photodynamic therapy with membrane-bound photosensitizers. *Biochemical Pharmacology* 66: 1651 – 1659.

Plaetzer, K., Kiesslich, T., Verwanger, T., Krammer, B. (2003): The Modes of Cell Death Induced by PDT: An Overview. *Medical laser application* 18: 7 – 19.

Robertson, C.A., Evans, D.H., Abrahamse, H. (2009): Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 96: 1 – 8.

Saczko, J., Nowak, M., Skolucka, N., Kulbacka, J., Kotulska, M. (2010): The effects of the electro-photodynamic in vitro treatment on human lung adenocarcinoma cells. *Bioelectrochemistry* 79: 90 – 94.

Sharman, W.M., van Lier, J.E., Allen, C.M. (2004): Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56: 53 – 76.

van Dongen, G.A.M.S., Visser, G.W.M., Vrouenraets, M.B. (2004): Photosensitizer-antibody conjugates for detection and therapy of cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56: 31 – 52.

www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB2146542.htm

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

NIH3T3	buněčné linie myších fibroblastů
G361	buněčné linie kožního melanomu
MgTPPS ₄	hořečnatý derivát TPPS ₄
MTT	thiazolyl blue tetrazolium bromide
nm	nanometr
PDT	fotodynamická terapie
PdTPPS ₄	paladnatý derivát TPPS ₄
PS	fotosensitizer
ROS	reaktivní formy kyslíku
TPPS ₄	4-zinc-5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porfyrine
ZnTPPS ₄	zinečnatý derivát TPPS ₄