

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Diplomová práce

Olomouc 2013

Lukáš Malina

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Studium fotodynamického vlivu
na buněčné linie užitím
fluorescenčních metod**

Diplomová práce

Lukáš Malina

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: prezenční

Olomouc 2013

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

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

V Olomouci 6. 5. 2013

.....

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

SOUHRN

Fotodynamická terapie patří mezi nové a stále se vyvíjející metody, které vedou k léčbě nádorů. Ve fotodynamické terapii jsou klíčové tři kroky, které vedou ke zničení nádorových buněk. Tyto kroky zahrnují aplikaci fotosensitivní látky (fotosensitizeru), světelné ozáření a tvorbu cytotoxických látek, které indukují buněčnou smrt.

Existuje mnoho fotosensitizerů s různými vlastnostmi a mohou být pacientovi aplikovány dvěma způsoby – lokálně nebo systémově. Po ozáření fotosensitizeru dochází k excitaci této látky do tripletového stavu. Tento stav může pak podlehnout dvěma odlišným reakcím. Během prvního typu dochází k reakci excitovaného fotosensitizeru se substrátem. Tento substrát umožňuje přenos energie na kyslík, čímž vznikají volné radikály a radikálové ionty. Druhý typ zahrnuje přenos energie z excitovaného fotosensitizeru přímo na kyslík. Touto reakcí vzniká velmi cytotoxický singletový kyslík. Vzniklé cytotoxické látky způsobují dva druhy buněčné smrti – apoptózu nebo nekrózu. Pro tělo je mnohem lepší apoptóza, protože se při ní netvoří zánět.

V této práci bylo testováno, jaký vliv mají různé fotosensitizery při různých dávkách záření na tvorbu reaktivních forem kyslíku, změnu membránového potenciálu, životnost a poměr nekrotických, apoptotických a přeživších buněk. Testování bylo provedeno na G361 (buněčná linie kožního melanomu) a NIH3T3 (buněčná linie myších fibroblastů). Jako fotosensitizery byly použity *meso*-tetrakis(4-sulfonatofenyl) porfyrin (TPPS₄) a jeho zinečnaté (ZnTPPS₄), paladnaté (PdTPPS₄) a hořečnaté (MgTPPS₄) deriváty. Jako zdroj světla byl použit LED diodový zářič. Velikost použitých světelných dávek byla 1 J/cm², 5 J/cm² a 10 J/cm².

Výsledky této práce prezentují účinnost fotodynamické terapie se závislostí na typu fotosensitizeru, jeho koncentraci a dávce záření u nádorových a nenádorových buněčných linií.

SUMMARY

Photodynamic therapy is a new and still developing method leads to tumours treatment. In photodynamic therapy, there are three crucial steps leads to destruction of tumour cells. These steps include application of a photosensitizing drug (photosensitizer), light illumination and generation of cytotoxic species which induce cell death.

There are many photosensitizers with various properties and they can be administered to patients by two different ways – topical or systemic way. After photosensitizer irradiation, the drug is excited to the triplet state. This state can then undergo two different reactions. During the first type, the reaction of excited photosensitizer with some substrate occurs. This substrate allows the transport of energy to oxygen. This process allows to form free radicals and radical ions. The second type involves transport of energy from excited photosensitizer directly to oxygen. By this reaction is generated very cytotoxic singlet oxygen. Generated cytotoxic species causing two types of cell death – apoptosis or necrosis. For body is much better, because there is no inflammation.

In this work was studied effect of various photosensitizers during different light intensity on the production of reactive oxygen species, viability and necrotic, apoptotic and living cells ratio. Testing was performed in G361 (human skin melanom) and NIH3T3 (mouse fibroblasts) cell lines. As photosensitizers were used *meso*-tetrakis(4-sulfonatophenyl) porphyrin (TPPS₄) and its zinc (ZnTPPS₄), palladium (PdTPPS₄) and magnesium (MgTPPS₄) derivatives. For irradiation was used LED (light emitting diodes) source. Intensities of used light doses were 1 J/cm², 5 J/cm² and 10 J/cm².

This work's results represent dependence of photodynamic therapy on photosensitizer type, its concentration and light doses on tumorous and non-tumorous lines.

OBSAH

1. CÍLE PRÁCE	9
2. ÚVOD	10
3. LITERÁRNÍ REŠERŠE	12
3.1 Historie	12
3.2 Fotosensitizéry (PS)	13
3.2.1 Rozdělení PS	13
3.2.1.1 PS první generace	14
3.2.1.2 PS druhé generace	15
3.2.2 Ideální PS	18
3.2.3 Distribuce PS	20
3.3 Zdroje záření	22
3.3.1 Typy zdrojů	23
3.3.2 Způsoby ozařování	27
3.4 Reaktivní formy kyslíku (ROS)	28
3.4.1 Vznik ROS ve PDT	30
3.5 Mechanismy poškození nádoru	32
3.5.1 Poškození na subcelulární úrovni	32
3.5.2 Změna v cévním zásobení	33
3.5.3 Imunitní reakce	34
3.5.4 Přímé usmrcení nádorových buněk	34
3.6 Typy buněčné smrti	35
3.6.1 Nekróza	36
3.6.2 Apoptóza	36
3.6.2.1 Vnější dráha	37
3.6.2.2 Vnitřní dráha	37
3.6.2.3 Kaspázy	39
3.7 Klinické využití PDT	40
4. MATERIÁL A METODY	43
4.1 Buněčné linie	43
4.2 Fotosensitizéry	43
4.3 Ostatní materiál	43
4.4 Laboratorní zařízení a použité programy	44

4.5 Příprava fotosensitizeru a jeho aplikace	44
4.6 Ozařování	45
4.7 Měření membránového potenciálu	46
4.8 Detekce apoptózy, nekrózy a přeživších buněk	47
4.9 MTT test	50
4.10 Detekce reaktivních forem kyslíku (ROS)	50
4.11 Detekce Ca ²⁺ iontů	51
5. VÝSLEDKY	52
5.1 Měření membránového potenciálu	52
5.1.1 G361 buněčné linie (kožní melanom)	52
5.1.2 NIH3T3 buněčné linie (myší fibroblasty)	55
5.2 Detekce apoptotických, nekrotických a přeživších buněk	57
5.2.1 G361 buněčné linie (kožní melanom)	57
5.2.2 NIH3T3 buněčné linie (myší fibroblasty)	60
5.3 MTT test	63
5.4 Detekce ROS	64
5.1.1 G361 buněčné linie (kožní melanom)	65
5.1.2 NIH3T3 buněčné linie (myší fibroblasty)	65
5.5 Detekce Ca ²⁺ iontů	66
6. DISKUSE	67
7. ZÁVĚR	69
8. LITERATURA	71
9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	75

1 CÍLE PRÁCE

Prvním cílem bylo vypracovat rešerši na zadané téma bakalářské práce. Druhým cílem bylo ověřit vliv fotodynamicky aktivních látek (TPPS₄, ZnTPPS₄, PdTPPS₄ a MgTPPS₄) na nádorových (G361) a nenádorových (NIH3T3) buněčných liniích, a to metodami detekce apoptózy, měřením reaktivních forem kyslíku, detekce změny mitochondriálního membránového potenciálu, detekcí intracelulárního vápníku a stanovením cytotoxicity. Toto testování provést celkem při třech dávkách záření (1 J/cm², 5 J/cm², 10 J/cm²) a pěti koncentracích (0,5 μM; 1 μM, 5 μM; 10 μM; 50 μM). Účinky fotosensitivních látek poté vyhodnotit s využitím základních statistických metod a jednotlivé fotosensitizéry vzájemně porovnat.

2 ÚVOD

Přestože fotodynamická terapie (PDT) je již do jisté míry známou metodou, tak se neustále vyvíjí. V moderním pojetí existuje PDT několik let, avšak samotné fotodynamické účinky jsou lidstvu známy již po tisíce let.

Abychom dosáhli úspěšného fotodynamického efektu, je potřeba interakce tří nezbytných složek – fotosensitizeru, světla a kyslíku. Tyto složky nejsou samy o sobě toxické. Jako fotosensitizer (PS) označujeme látku, která je selektivně vychytávána nádorovou tkání poté, co je aplikována do pacientova těla. Další nezbytnou složkou je světlo. K jeho získání je potřeba vhodný zdroj, který dané světelné záření poskytuje. Záření může mít různou vlnovou délku. Použití určité vlnové délky se odvíjí od toho, jak hluboko je potřeba, aby záření proniklo tkání. Všeobecně lze říci, že čím je vlnová délka větší, tím hlouběji je záření schopno proniknout. Lze tedy konstatovat, že pro léčbu nádorů v hlubších vrstvách tkáně se využívá spíše červené spektrum, zatímco pro povrchové léčení je vhodnější modré spektrum. Poslední složkou je kyslík. Jeho úloha spočívá ve vlastní přeměně v reaktivní formy kyslíku (ROS). Ty jsou cytotoxické a vzniklé volné radikály jsou tedy schopné pomocí různých mechanismů zprostředkovat destrukci nádorových buněk. Účinnost fotodynamické terapie je závislá na současném působení všech tří složek. V důsledku selektivního vychytávání se fotosensitizer hromadí v nádorech. Po ozáření místa s nahromaděným fotosensitizerem dojde k excitaci daného fotosensitizeru. Tím fotosensitizer získá větší energii, kterou je poté schopen předat kyslíku. Díky tomu mohou vzniknout jeho fototoxické reaktivní formy, které jsou schopné způsobit destrukci nádorových buněk.

I když existuje mnoho jiných metod, které se využívají při léčbě nádorů, tak je fotodynamická terapie v lékařském odvětví stále více populární. Je pro to hned několik důvodů, které vyzdvihují klady PDT oproti jiným způsobům léčby. Běžným způsobem odstranění nádorové tkáně je její resekce, což znamená chirurgické odstranění celé tkáně, případně pouze její části. Fotodynamická terapie má v tomto případě velkou výhodu, protože je neinvazivní. Tato vlastnost je umožněna tím, že hlavní složkou, která způsobuje destrukci nádorové tkáně, je světlo. Ne všechna energie je však využita pro vznik reaktivních forem kyslíku. Přebytkovou energii, která se uvolní z fotosensitivní látky po ozáření, jsme schopni zachytit v podobě fluorescence pod ultrafialovým světlem. Díky tomu umožňuje fotodynamická terapie snadnou lokalizaci místa, ve kterém dochází k nádorovému bujení. Kladem této metody je bezesporu také její bezbolestnost, což není u jiných metod léčby vždy pravidlem. Díky v podstatě velmi jednoduchému mechanismu a nenáročnosti fotodynamické terapie je pacientovi umožněna ambulantní léčba. Nelze však říci, že by tato metoda měla pouze klady a žádné zápory. Zřejmě nejproblematictější je tzv. fotosensitivita kůže. Je proto velmi důležité klást velký důraz na ochranu před slunečním zářením. Lze však předpokládat,

že s postupem času bude počet negativních vlastností této metody ubývat a výhod přibývat. Fotodynamická terapie se totiž neustále vyvíjí a látky, které se při ní používají, jsou stále dokonalejší, což vede k minimalizaci vedlejších účinků.

V klinické praxi se fotodynamická terapie používá v mnoha případech a s postupem času je využívána stále častěji. Například při léčbě rakoviny kůže, plic, močového měchýře, jícnu, mozkových nádorů, děložních nádorů a benigních onemocnění. Jiným způsobem využití této metody je tzv. paliativní léčení, při kterém nedochází ani tak k přímé záchraně života nebo jeho prodloužení, ale spíše k jeho výraznému zkvalitnění. Používá se také pro léčbu některých chronických onemocnění. Takovým onemocněním je například revmatická artritida, ateroskleróza či psoriáza. Fotodynamickou terapii lze také použít při chirurgickém zákroku jako tzv. adjuvantní léčbu. V tomto případě se využívá neagresivnosti metody. Chirurgicky lze odstranit velké části nádoru, nicméně mohou nastat situace, kdy je chirurgický zákrok velice riskantní. Jedná se nejčastěji o léčbu nádorů v oblasti krku, hlavy a velkých cév.

Zřejmě nejdůležitější na fotosensitivní látce je jeho struktura. Od ní se odvíjí zejména dvě věci. První je to, v jakém množství a jak rychle bude fotosensitizer nádorovou tkání vychytáván. Druhou pak efektivnost poskytování reaktivních forem kyslíku. Spousta na první pohled podobných fotosensitizerů má naprosto rozdílné vlastnosti. Stačí pouze přítomnost jiného kovu ve struktuře fotosensitizeru. I takto relativně malá změna může značně ovlivnit velikost koncentrace, při které bude fotosensitivní látka schopna efektivně zničit rakovinovou tkáň. Tato práce má za úkol porovnat dané fotosensitizery, vyhodnotit a určit jejich účinnost při destrukci nádorových buněk.

3 LITERÁRNÍ REŠERŠE

3.1 HISTORIE

Účinky fotodynamické terapie jsou lidstvu známy již tisíce let, a to prostřednictvím ozařování pomocí slunečních paprsků. Již před více než 3000 lety se v Egyptě, ve staré Číně nebo v Indii využívalo vlastností, které poskytovalo sluneční záření pro léčbu některých onemocnění. Staří Egypťané používali perorálně podávané rostliny obsahující psoraleny a sluneční světlo k léčbě vitiliga a později ve 12. století také k léčbě leukodermy (Zimčík a Miletín, 2004). Vliv světla na zdraví si uvědomoval i řecký lékař Hérodotos, který je také nazýván otcem helioterapie (léčba sluncem/slunečním zářením). Rozdíly v léčebných účincích jsou v porovnání s moderními metodami naprosto markantní, ale důležité je si uvědomit, že již v dávných dobách před naším letopočtem si lidé byli schopni uvědomit léčebné vlastnosti, které sluneční záření poskytuje.

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.

Jako počátek léčby pomocí moderních metod můžeme označit 19. století. Schopnost fotosensitizéru a světla způsobit fotosensitizovanou destrukci buněk objevil před více než 100 lety Oscar Raab. Zjistil, že prvoci rodu *Paramecium* mohou být zabiti vystavením kombinaci akridinové červeně a světla (Anstay, 2004). Zároveň zjistil, že akridin je ve tmě neúčinný a letální vlastnosti má pouze v přítomnosti daného záření. Usoudil tedy, že k léčbě pacientů s kožními chorobami bude možné použít i některé fluorescenční látky.

Hermann von Tappeiner spolu s dermatologem Albertem Jesionkem zveřejnili zprávu o léčbě kožních nádorů, která 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 v roce 1907 začal pro ošetření fotoaktivní látkou s následným ozařováním za přítomnosti kyslíku používat pojem „fotodynamický“ efekt (Mitton a Ackroyd, 2008).

V roce 1903 obdržel dánský lékař Niels Ryberg Finsen Nobelovu cenu za výzkum v oblasti fototerapie (Allison a kol., 2004). Finsen léčil *Lupus vulgaris* (kožní TBC onemocnění) pomocí ultrafialového světla a lze říci, že to byl právě on, kdo se zasloužil o velký rozvoj v této oblasti výzkumu.

V roce 1911 Hausamnn poprvé zkoumal fotodynamickou aktivitu u dosud nejstudovanějšího fotosensitizéru – porfyriu. Pozoroval kožní reakce u myši, kterým podal hematoporfyrin a následně je vystavil světlu. Zjistil také, že kombinace hematoporfyrinu a světla zabíjí prvoky rodu *Paramecium* a červené krvinky (Zimčík a Miletín, 2004).

Vliv porfyriu na člověka studoval v roce 1913 německý fyzik Friedrich Meyer-Betz. První pokusy prováděl na sobě samém. Vše spočívalo v aplikaci hematoporfyriu a v následném vystavení daného místa slunečním paprskům. Výsledkem byla tzv. fotosensitivita kůže. Tento pokus mu způsobil otok, šokovou reakci a nakonec ho málem připravil o život.

Vývoj fotodynamické terapie můžeme všeobecně rozdělit na dvě oblasti. První oblast studuje schopnosti, které zahrnují hromadění se některých porfyriu a jejich příbuzných tetrapyrolových sloučenin v nádorech po jejich aplikaci do krevního řečiště. Druhá oblast se naproti tomu týká tumoricidního účinku, při kterém dochází k po podání fotosensitizeru a k ozáření nádoru viditelným světlem (Castano a kol., 2005).

3.2 FOTOSENSITIZÉRY (PS)

Fotosensitizerem nazýváme látku, která je velmi citlivá na světlo. Je schopný absorbovat světlo o určité vlnové délce a transformovat jej na užitečnou energii. Úlohou fotosensitizeru ve fotodynamické terapii je, spolu se světlem a kyslíkem, destrukce nádorové tkáně. Klíčovou charakteristikou kteréhokoliv PS je jeho schopnost preferenční kumulace v nádorové tkáni s následnou produkcí cytotoxických produktů a indukci požadovaných biologických efektů (Zimčík a Miletín, 2004). Pro fotodynamickou terapii je velmi důležitá samotná struktura fotosensitizeru. Přidáním různých molekul a manipulací se strukturou dochází k výrazným změnám jeho vlastností. Rozlišujeme proto velké množství fotosensitizerů, které lze dělit mnoha způsoby.

3.2.1 ROZDĚLENÍ PS

Nejzákladnější dělení je na fotosensitizery první, druhé a třetí generace, přičemž třetí generace je tvořena fotosensitizery generace druhé, které jsou spojeny s některými biomolekulami, které umožňují jejich cílenější distribuci po těle. Další možností je rozdělení na základě způsobu aplikace – systémová (do krevního řečiště) a lokální. Systémové fotosensitizery se hromadí v každé lézi, zatímco lokální fotosensitizery je třeba aplikovat do každé léze zvlášť. V případě velkého množství lézí je proto snadnější použít systémový fotosensitizer (Allison a kol., 2006). Je však třeba zmínit, že systémovou aplikaci doprovází tzv. systémová fotosensitivita, což je značně nevýhodné.

Dalším způsobem je dělení podle jejich charakteru, a to na hydrofilní a hydrofobní. Hydrofilní fotosensitizery (např. TPPS₄) se hromadí převážně v endoplazmatickém retikulu, mitochondriích a lysozomech. Po ozáření pak různými mechanismy spouští kaskády dějů, které vyústí destrukcí buňky. V případě hydrofobních fotosensitizerů (např. ftalocyaniny,

naftalocyaniny) dochází k jejich vazbě přímo na membránu, kterou tak poškozují a také způsobují inaktivaci některých v ní vázaných enzymů.

3.2.1.1 PS PRVNÍ GENERACE

První generaci PS tvoří deriváty hematoporphyrinu (HpD – z angl. Hematoporphyrin derivative) a ostatní porfyriny (Obr. 1). HpD je směs produktů, vzniklých přípravou z hematoporphyrinu izolovaného nejprve z hemu (barevné části hemoglobinu, červeného krevního barviva). Hem se zbavuje centrálního atomu železa působením kyseliny bromovodíkové (HBr) v kyselině octové (CH_3COOH). Během tohoto procesu dochází k adici HBr na periferní dvojně vazby, avšak během dalšího kroku se bromid ve vodném prostředí hydrolyzuje za vzniku vlastního hematoporphyrinu (Zimčík a Miletín, 2004). Porfyriny a jejich fotosensitivní účinek popsali Schulz a Baumstark už roku 1874.

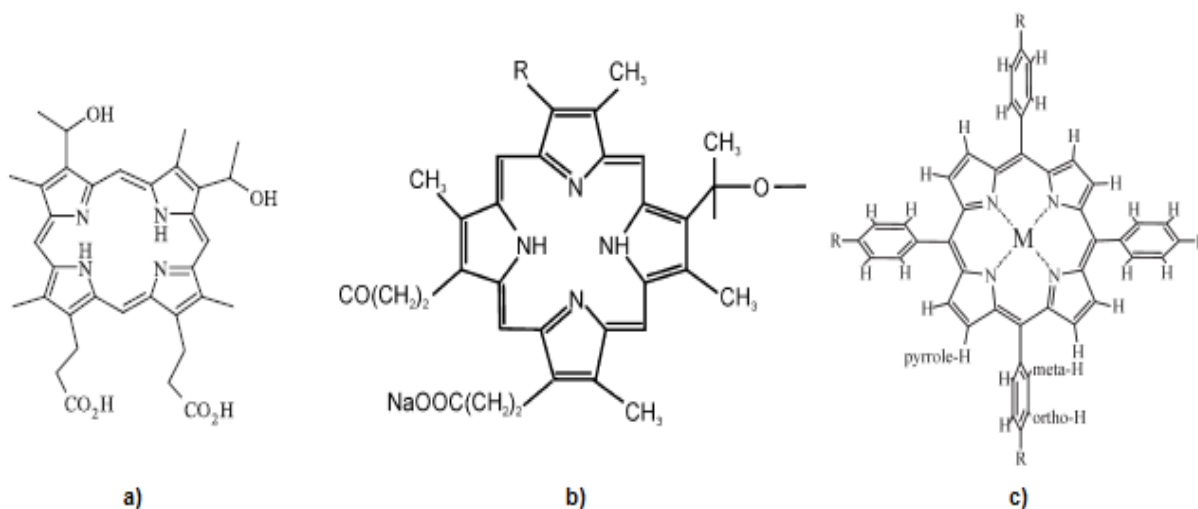
Z počátku se jako fotosensitizer používal i samotný hematoporphyrin, nicméně později se zjistilo, že za fotodynamický efekt není zodpovědný samotný hematoporphyrin, ale pouze jeho oligomerní frakce. Purifikací a manipulací s HpD tak vznikají jeho deriváty s různými komerčními názvy. Příkladem jsou Photofrin (USA), Photocarcinorin (Čína), Photosan (Německo), Photogem (Rusko) či Haematodrex (Bulharsko). Působením kyseliny sírové v prostředí kyseliny octové na hematoporphyrin a následnou neutralizací hydroxidem sodným vznikají složité směsi dimerů a oligomerů. Jejich jednotky jsou pospojovány buď esterovými, nebo éterovými vazbami. Částečným vyčištěním takovéto směsi pomocí gelové chromatografie vznikne základ Photofrinu (porfimer sodný).

Porfimer sodný byl jako první fotosensitizer schválen pro používání ve fotodynamické terapii. Tento hematoporphyrinový derivát je stále široce využíván a je stále jedním z nejběžnějších fotosensitizerů. Používá se zejména pro léčbu nedermatologických tumorů. Byl také schválen pro léčbu pokročilého i raného stádia rakoviny plic, superficiální rakoviny žaludku, adenokarcinomu jícnu, rakoviny děložního hrdla nebo močového měchýře. Všeobecně lze říci, že pomocí porfimeru sodného může být léčena především široká škála neoplazmat, pre-maligních a benigních lézí. Jedná se o spolehlivou, bezbolestnou a hlavně v podstatě bezpečnou a netoxickou látku (Allison a kol., 2004).

Jako hlavní výhody porfimeru sodného lze zmínit efektivní zničení tumorů, netoxicitu a lehká rozpustnost ve vodě, což umožňuje jeho intravenózní aplikaci. Porfimer sodný se pro léčbu využívá již více než 20 let. Je tedy dobře prozkoumaný a lze s jistotou říci, že ho lze používat pro fotodynamickou terapii opakovaně a bez omezení. To znamená, že pacient není omezen určitým počtem léčebných dávek jako v případě radioterapie (Brown a kol., 2004). Nevýhody jsou společné pro všechny fotosensitizery první generace. Prvním problémem je nižší absorpční maximum v oblasti viditelného světla, což znamená, že pro aktivaci je potřeba velmi nízká vlnová délka. Je proto potřeba vysokých dávek jak světla,

tak fotosensitizeru. Dalším problémem je, že i po vyčištění se stále skládají ze směsi asi 60 látek, a proto je velice složité reprodukovat přesně jejich složení, chemickou strukturu a identifikovat jednotlivé složky. Také vychytávání v nádorech není příliš selektivní a jejich vysoké koncentrace lze nalézt v játrech, ledvinách, slezině a zejména kůži, kde poté přetrvávají až 6 týdnů (Zimčík a Miletín, 2004). Při intravenózním podávání a po interakci se slunečním zářením často způsobují fotosensitivitu kůže. Po aplikaci je proto obvykle potřeba 2 - 3 dny omezit styk pacienta se světlem.

Další fotosensitizery můžeme získat přidáním, odebráním nebo substitucí struktur na porfyrinovém kruhu. Příkladem je *meso*-tetrakis(4-sulfonatofenyl) porfyrin (TPPS₄). Ten syntetizoval v roce 1962 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). Jedná se o látku, kterou lze vyrobit synteticky v libovolném množství a s menšími finančními náklady, než v případě Photofrinu. Výhodou TPPS₄ je jeho chemicky přesně definovaná struktura a výborná rozpustnost ve vodě umožňující parenterální (jinou než perorální) aplikaci (Babjuk a kol., 2000). V České republice je použití TPPS₄ pro lokální použití schváleno.



Obr. 1: Struktura a) hematoporphyrinu, b) porfyrinu sodného, c) TPPS₄ a jeho případných derivátů (M = Zn²⁺, Pd²⁺, Mg²⁺).

(převzato od Allison a kol., 2004, Mosinger a kol., 2002 a van Dongen a kol., 2004)

3.2.1.2 PS DRUHÉ GENERACE

Jelikož první generace oplývala určitými negativními vlastnostmi, došlo jejich odstraněním nebo vylepšením ke vzniku fotosensitizerů generace druhé. Jednou z vylepšených vlastností je vyšší absorpční maximum. Díky tomu je možné tyto fotosensitizery aktivovat světlem o takové vlnové délce, že je schopno pronikat hlouběji

do tkáně. Fotosensitizéry druhé generace jsou snadno charakterizovatelné, chemicky jednotné a znalost jejich struktury umožňuje minimalizaci nežádoucí fotosensitivity. Jsou snadněji a rychleji vylučovány z krevního oběhu a kůže. Díky tomu jsou pacienti nuceni být izolováni od světla pouze po krátký čas (Kessel, 2004). Mezi fotosensitizéry druhé generace řadíme například ftalocyaniny, naftalocyaniny, chloriny a bakteriochloriny, 5-aminolevulovou kyselinu (ALA), texafyriny, porfyceny, z chlorofylu izolované pyropheoforbidy a pheoforbidy nebo purpuriny (Obr. 2). Chloriny i bakteriochloriny jsou velice podobné porfyrinům. Rozdíl je v tom, že chloriny mají o jednu a bakteriochloriny o dvě konjugované vazby méně.

Velmi nadějnou a perspektivní skupinou fotosensitizérů jsou ftalocyaniny (Pc) a jim příbuzné naftalocyaniny. Jedná se o syntetické porfyriny, jejichž maximální absorpční vlnová délka se pohybuje v červené oblasti spektra (670 - 700 nm). Důležité pro vlastní účinek fotodynamické terapie je přítomnost nechelatovaných centrálních kovů a polokovů, z nichž některé prodlužují trvání tripletového stavu fotosensitizéru, a tím i zvyšují jeho účinnost v PDT (např. Zn, Al, Si). Nevýhodou ftalocyaninů je jejich velice špatná rozpustnost. Proto se kromě s centrálně umístěným atomem kovu často připravují i se skupinami sulfonové kyseliny, které umožňují jejich rozpustnost ve vodě (Castano a kol., 2004). Důvodem těchto různých modifikací je zvýšení celkové fototoxicity. Pokusy se zjistilo, že kladný vliv na fotosensitivní vlastnosti mají pouze diamagnetické kovy (Zn, Pd, In). Paramagnetické kovy (Fe nebo Cu) takovou schopnost nemají. Ftalocyaniny a jejich aza analogy, azaftalocyaniny (AzaPc), jsou charakterizovány jednak silnou absorpcí, dobrou chemickou stabilitou a dostatečným množstvím vyzařované fluorescence a dostatečným množstvím tvořeného singletového kyslíku. Produkce singletového kyslíku po excitaci fotosensitizéru je ve fotodynamické terapii nezbytná pro fototoxický efekt (Nováková a kol., 2011).

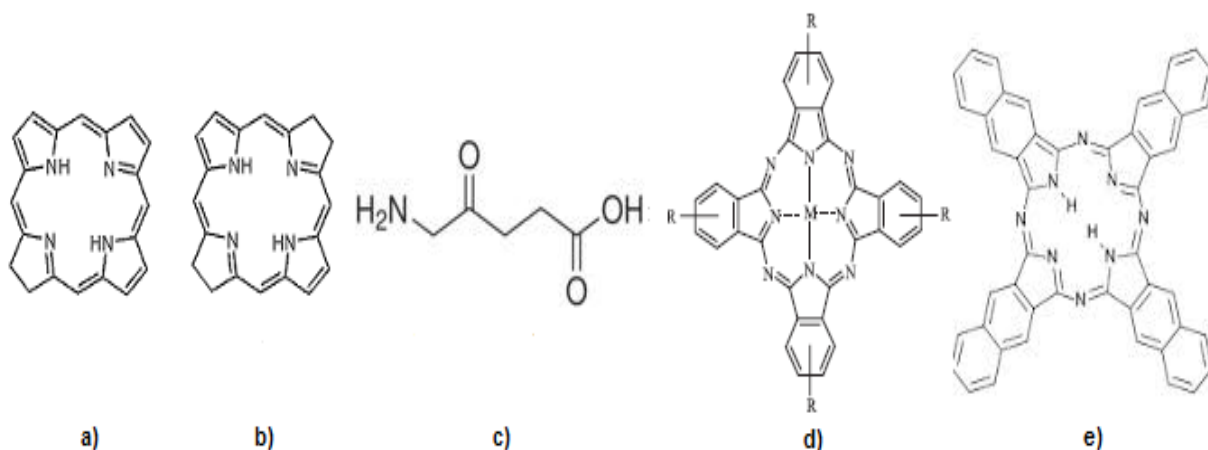
Naftalocyaniny jsou příbuznou skupinou ftalocyaninů, od kterých se liší přítomností dalšího benzenového jádra na periferii. Jejich velkou výhodou je schopnost absorpce při velmi dlouhých vlnových délkách (až 770 nm). To umožňuje dosáhnout vyšší terapeutické hloubky. Díky tomu je možné používat tyto látky i pro vysoce pigmentované nádory – jakým je například melanom.

Nejnámějším příkladem z kategorie chlorinů je Temoporfin (tetra(*meta*-hydroxyfenyl)chlorin, *m*THPC, FOSCAN), který byl syntetizován v roce 1989. Vznikl jako součást série porfyrinů, ze které se později ukázal jako nejúčinnější. Absorpční maximum Temoporfinu sice není blízké červené oblasti, ale jeho absorpční (extinkční) koeficient může být až 10× vyšší než má Photofrin. Z tohoto důvodu můžeme o Temoporfinu říct, že je jeden z nejvíce fototoxických fotosensitizérů. To znamená, že i při malé dávce světla i fotosensitizéru má Temoporfin dostatečný fototoxický účinek – v porovnání s Photofrinem může být až 100× účinnější. Důvodem je pravděpodobně to, že Temoporfin má mnohem lepší produkci singletového kyslíku. Od října 2001 byl Temoporfin používán k léčbě rakoviny

hlavy a krku rezistentní k jiným terapiím. Dále je využíván v klinických zkouškách pro léčbu rakoviny jícnu a dysplazie u Barrettova jícnu. Připravují se i klinické zkoušky u karcinomu žaludku, prostaty, kůže, hyperplazie prostaty, sterilizace okolí zásahu po chirurgické léčbě nádoru nebo proti bakteriím rezistentním na antibiotika (Zimčík a Miletín, 2004).

Využití kyseliny 5-aminolevulinové (ALA) ve fotodynamické terapii je poněkud odlišné od ostatních fotosensitizerů. ALA je endogenní látka, která je součástí biosyntetické cesty hemu. Za normálních okolností je syntéza ALA přísně regulována zpětnovazebnou inhibicí enzymu ALA-S (aminolevulinic acid synthase). Pokud však dodáme ALA do buněk exogenně lokální aplikací a obejdeme tak kontrolní mechanismus enzymu ALA-S, dojde k syntéze a akumulaci protoporfyrinu IX (PpIX) (Lang a kol., 2001). Právě tento protoporfyrin IX funguje jako fotosensitizer. Pokud by došlo k inkorporaci atomu železa prostřednictvím enzymu ferrochelatázy, vznikl by přirozenou cestou z protoporfyrinu IX hem, který je fotodynamicky neaktivní. Kyselina 5-aminolevulinová byla ve fotodynamické terapii poprvé použita v roce 1990 při léčbě kožních onemocnění. Hlavní výhodou této léčby byla absence kožní fotosensitivity. Dosud není úplně pochopen důvod, proč je ALA vychytávána maligními buňkami a proč se zde hromadí. Jedním z hlavních důvodů syntézy protoporfyrinu IX a selektivního vychytávání ALA nádorovou tkání však může být to, že keratinové vrstvy v nádorových epitelech mají zvýšenou permeabilitu. Jisté omezení vykazuje ALA v aktivační hloubce. Například již 1,5 mm široké léze vyžadují několik ošetření, aby se dosáhlo úplné klinické odpovědi. Studie také naznačují, že ALA je účinnější při systémovém podání než při lokálním (Quon a kol., 2011). Kyselina 5-aminolevulinová se používá k léčbě karcinomu skvamózních buněk kůže, karcinomu bazálních buněk kůže a akné, aktinoidní keratózy. Dalším způsobem využití je fotodetekce rakoviny močového měchýře, rakoviny cervixu či rakoviny jícnu.

Kromě výše zmíněných hlavních fotosensitizerů existují i další látky přírodního či syntetického charakteru, které se testují pro použití ve fotodynamické terapii. Často dochází k jejich modifikacím, aby se co nejvíce přiblížili ideálnímu fotosensitizeru. Příkladem je methylenová modř, kterou však enzymy v buňce redukují *in vivo* na fotodynamicky inaktivní leukoformu. Dalším příkladem jsou rhodaminy, jejichž bromovaný analog byl úspěšně použit v testech pro autotransplantační léčbu myeloidní leukémie. Při tomto procesu dochází ke zničení nemocných buněk kostní dřeně, zatímco zdravé buňky přežijí a mohou být použity k autotransplantaci. Porfyceny zase patří mezi nejrychleji vychytávané fotosensitizery v *in vitro* studiích vůbec. Umožňuje léčbu kožních nemocí jako je psoriáza či nemelanotický karcinom kůže. Dále tu řadíme hypericin (využívá se pro fluorescenční detekci buněk nádoru močového měchýře v moči), photoclór (je vysoce selektivní k nádorové tkáni) nebo safyryny (při pokusech vykazovaly vysoký poměr rozdělení fotosensitizeru mezi nádorovou a okolní svalovou tkání) (Zimčík a Miletín, 2004).



Obr. 2: Struktura a) chlorinu, b) bakteriochlorinu, c) ALA, d) ftalocyaninu a e) naftalocyaninu.
 (převzato od van Dongen a kol., 2004, Zimčík a Miletín, 2004)

3.2.2 IDEÁLNÍ PS

Obecně lze říci, že každý fotosensitizer má velký počet vedlejších účinků a vlastností, které jsou ve fotodynamické terapii nežádoucí. Proto je v současnosti výzkum zaměřen na vývoj nových typů fotosensitizerů s takovými vlastnostmi, které by umožnily zvýšit jejich účinnost. Tato účinnost je závislá na několika faktorech:

- na vlnové délce dopadajícího světla
- na hloubce průniku (penetrace) světla do tkáně
- na rozsahu absorpce fotosensitizeru
- na produkci singletového kyslíku

Testováním a pokusy byly určeny důležité vlastnosti, které by měl mít ideální fotosensitizer. I když je zřejmé, že žádná látka nebude schopna splnit všechny podmínky, nejnovější fotosensitizer se tomu ideálnímu alespoň velice blíží. I přes velké debaty o podobě ideálního fotosensitizeru existuje několik základních vlastností, které by měl splňovat:

- CHEMICKÁ ČISTOTA:
 - Fotosensitizer by měl být chemický čistý a známého složení.
- TOXICITA:
 - Látka by neměla být sama o sobě toxická a jejím metabolismem by neměly vznikat nové toxické produkty.
- MUTAGENICITA/KARCINOGENICITA
 - Fotosensitizer by neměl být použit k léčbě onemocnění, pokud sám způsobí vznik nového onemocnění.

- SELEKTIVNÍ KUMULACE:
 - Je velice prospěšné, pokud je fotosensitizer směřován a akumulován do místa potřeby. Zvýšená kumulace v nádorové tkáni oproti ostatním tkáním zvyšuje fotodynamický efekt v oblasti nádoru a snižuje fotosensitivitu kůže. Zacielení lze dosáhnout například konjugací fotosensitizeru s určitými nosiči.
- RYCHLÁ EXKRECE:
 - Zbylý fotosensitizer, jež zůstává v krevním řečišti po kumulaci v cílové tkáni, může způsobovat systémovou toxicitu, a proto je žádoucí jeho rychlá exkrece z těla.
- KVALITNÍ FOTOCHEMICKÉ VLASTNOSTI:
 - Pro fotosensitizer je žádoucí vysoký tzv. „triplet state quantum yield“ a dlouhý tzv. „triplet state lifetime“, umožňující následně vysokou produkci cytotoxického singletového kyslíku.
- DOBRÉ SPEKTRÁLNÍ VLASTNOSTI:
 - Živé tkáně jsou pro elektromagnetické záření prostupné pouze v omezené míře, přičemž hloubka dostupnosti se zvyšuje se zvyšující se vlnovou délkou. Proto je potřebná silná absorpce s vysokými absorpčními (extinkčními) koeficienty při delších vlnových délkách (600 – 800 nm), kde jsou penetrační schopnosti světla maximální a energie je pořád dostačující pro účinnou produkci singletového kyslíku. Pokud dojde k absorpci vlnové délky nižší než 600 nm, kdy má intenzita záření maximální hodnotu, může dojít k poškození kůže. Naproti tomu při absorpci vlnové délky větší než 800 nm, může dojít k tomu, že nebudou mít fotony dostatek energie pro převedení kyslíku na ROS. Dlouhých vlnových délek není potřeba v případě *in vitro* metod. Záření v tomto případě totiž neprostupuje složitou tkání, a proto nehrozí takový rozptyl, jako když prostupuje tkání. Pro pokusy *in vitro* proto dostačuje záření v modré oblasti spektra (400 nm).
- PODÁVÁNÍ:
 - V závislosti na situaci je potřeba, aby bylo možno podávat fotosensitizer více způsoby - lokálně, inhalací, orálně nebo intravenózně.
- BEZPEČNOST:
 - Fotosensitizer nesmí vést k úmrtí – nesmí vyvolávat tvorbu sraženin, mozkovou mrtvici či zástavu srdce.
- CENA, DOSTUPNOST a MODIFIKOVATELNOST:
 - I když ne nejdůležitějším, avšak stále důležitým faktorem je cena a dostupnost. Jednoduchá možnost modifikace umožňuje zlepšení farmakokinetických parametrů. (Zimčík a Miletín, 2004) a (Allison a kol., 2004).

Krátký interval mezi podáním fotosensitizeru, ozáření a vyloučením z těla umožňuje ambulantní léčbu, což je spolu s cenovými nároky pro pacienty velkou výhodou (Castano a kol., 2004).

3.2.3 DISTRIBUCE PS

Důležitou součástí fotodynamické terapie je distribuce aplikovaného fotosensitizeru k nádorové tkáni. Při lokální aplikaci problém s distribucí v podstatě odpadá, protože je fotosensitizer aplikován přímo do nádorové tkáně. Problém nastává při systémovém podávání, kdy je potřeba fotosensitizer dopravit krevním řečištěm k cílové oblasti. K tomu se využívá několika přenašečů. Kombinace fotosensitizerů (nejčastěji druhé generace) a přenašečů se také označují jako fotosensitizer generace třetí. Nejvýznamnějšími jsou LDL (Low Density Lipoprotein) a albumin. Méně často se používá HDL (High Density Lipoprotein) a ve vzácných případech dochází ke vzájemnému spojení molekul fotosensitizeru a k vytvoření intramolekulárních agregátů, které svou velikostí odpovídají bílkovinným přenašečům.

Albumin je nejčastěji se vyskytujícím lidským sérovým proteinem. Jeho koncentrace je minimálně 10x větší než celková koncentrace všech lipoproteinů a váží se na něj spíše hydrofilní fotosensitizer (TPPS₄).

Lipoprotein se skládá z hydrofobních lipidů tvořící centrální jádro. To je obklopeno polárními hydrofilními lipidy a apoproteiny, které tvoří jakousi schránku. Tyto sérové částice mají dvě důležité biologické funkce. Rozpouští vysoce hydrofobní lipidy a umožňují jejich transport po těle. Zároveň také obsahují určité signály, které regulují pohyb těchto lipidových částic dovnitř a ven ze specifických buněk či tkání (Sharman a kol., 2004). Nejdůležitějším lipoproteinem pro transport fotosensitizeru je LDL, který na rozdíl od albuminu váže spíše hydrofobní fotosensitizer.

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. Díky receptor-zprostředkované endocytóze tak dochází k intracelulární akumulaci látek (Sharman a kol., 2004).

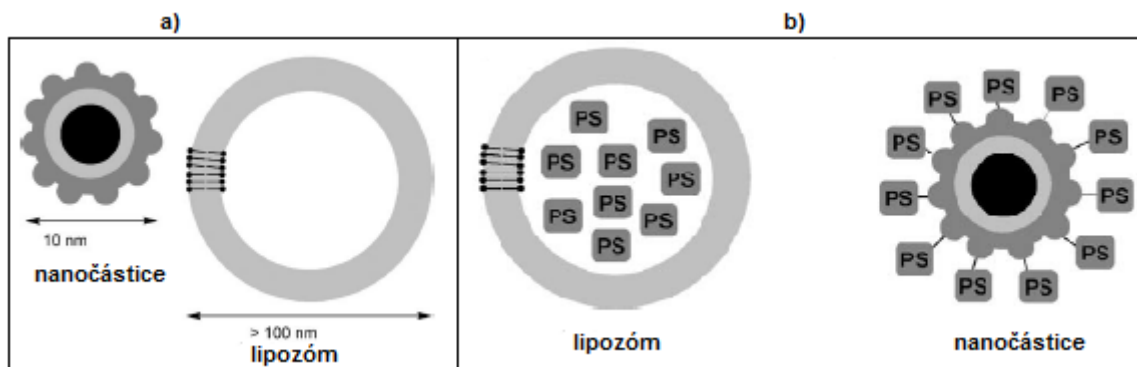
V současnosti se výzkum věnuje i řadě metod, které se pokouší o přímé navedení molekul fotosensitizeru do nádorové tkáně. Novějším přístupem je tzv. fotoimunoterapie. Jedná se o metodu, která umožňuje několikanásobně zvýšit koncentraci fotosensitizeru v nádoru a zároveň omezit jeho množství ve zdravé tkáni. Tato léčba kombinuje cytotoxické vlastnosti fotosensitizeru a selektivitu monoklonálních protilátek, růstových faktorů nebo peptidů, které se váží na receptory růstových faktorů. Protilátka je spojená s fotosensitizerem takovým způsobem, že jak biologické vlastnosti protilátky, tak fototoxické vlastnosti

fotosensitizeru jsou zachovány (Nowis a kol., 2005). Příjem monoklonálních protilátek do tumorů závisí jak na vzájemném rozpoznání antigenu a protilátky, tak na velikosti imunoglobulinové molekuly, která může být až 150 kDa. Takto velká molekula má omezenou schopnost průniku do tumoru. V takovém případě je více těchto protilátek obsaženo v normální tkáni než v tumoru. Proto je výhodnější používat menší fragmenty monoklonálních protilátek, které mohou být velké 25 – 100 kDa a proniknou tak snadněji do tumoru (van Dongen a kol., 2004). Ačkoliv se první zmínky o možnosti této metody objevili již v roce 1983, využití monoklonálních protilátek bylo možné až nedávno, kdy byly objeveny tumor-specifické antigeny. Problémem však je fakt, že tyto tumor-specifické antigeny nebyly nalezené v tzv. spontánních nádorech, ale pouze v experimentálně vytvořených nádorech. Většina identifikovaných antigenů v lidských tumorech představuje tzv. tumor-asociované antigeny. Ty jsou sice přítomné na nádorech, ale lze je také najít na zdravé tkáni (van Dongen a kol., 2004).

Pro lepší a efektivnější dosažení větší koncentrace fotosensitizeru v nádorové tkáni, vznikla tzv. elektro-fotodynamická terapie (EPDT). Jedná se o metodu, která vznikla spojením elektrochemoterapie a fotodynamické terapie. Elektrochemoterapie využívá faktu, že při použití elektrických impulzů na plazmatickou membránu se výrazně zvýší transport látky do buněk. Může tím tak zintenzivnit přenos fotosensitizeru do nádorových 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 podlehly elektroporaci, vykazovat 300 – 700 násobně zvýšenou intracelulární koncentraci aplikované látky. Elektrochemoterapie byla nejvíce využívána zejména při léčbě melanomu či rakoviny jiných vnějších orgánů. Ačkoliv je léčba vnitřních orgánů dosud pouze ve stádiu výzkumu, má velmi vysoký potenciál. Vývoj moderního endoskopu opět přiblížil aplikaci této metody pro léčbu rakoviny plic, jícnu, tračnicku, močového měchýře, žaludku, ledvin, jater, pankreatu a dalších vnitřních orgánů. Endoskop zahrnuje elektrody a aplikátory dané látky (např. fotosensitizeru) a pro použití ve fotodynamické terapii také světelný zdroj. Elektro-fotodynamická terapie se může v budoucnu stát důvodem pro omezení operativního zásahu, nebude-li avšak tento zásah nezbytný (Saczko a kol. 2010).

Relativně novým způsobem je spojení fotosensitizerů s nanočásticemi. Tato metoda vykazuje nadějně výsledky a může hrát důležitou roli pro zvýšení účinnosti PDT. Nanomateriál umožňuje zvýšit rozpustnost málo rozpustných látek, prodloužit čas, po který je látka schopna cirkulovat v krvi, minimalizovat degradaci látky a vykazuje také vysokou schopnost specificky rozpoznat a navázat se na určitý povrch prostřednictvím specifického ligandu (Paszko a kol., 2011). Nanočástice tak představuje určitou náhradu za lipozóm. Ten

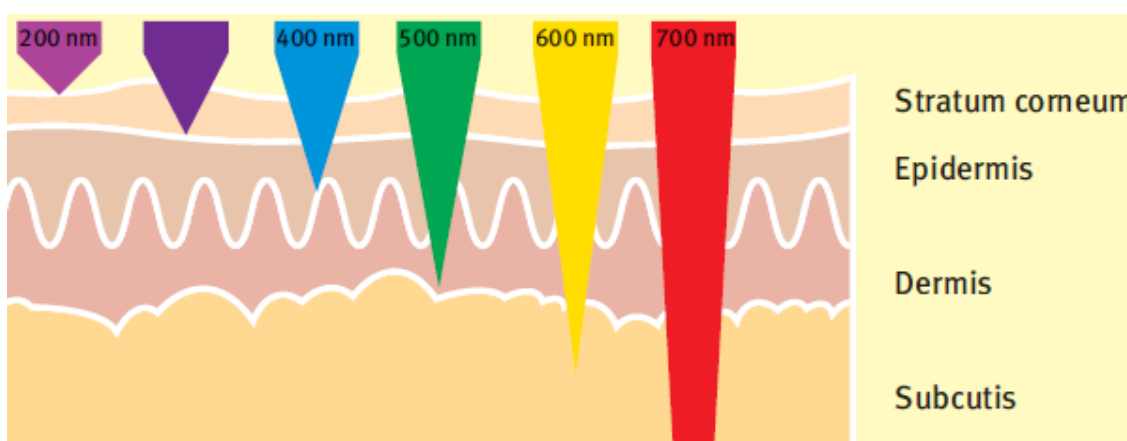
sice také představuje možnost pro distribuci PS, ale je podstatně větší, a proto méně vhodný (Obr. 3).



Obr. 3: Porovnání velikosti nanočástice a lipozómu (a) a jejich využití pro distribuci PS (b).
(převzato od Paszko a kol., 2011)

3.3 ZDROJE ZÁŘENÍ

Pro úspěšnou aplikaci fotodynamické terapie *in vivo* je potřeba dostatečně výkonného zdroje světla, který by byl schopen dosáhnout veškeré postižené tkáně. Je proto potřeba také pochopit, jak světlo prochází skrz rozličnou tkáň, a že zároveň dochází i k určité absorpci a rozptylu. Pokud bychom neměli dostatečně výkonný zdroj, nebylo by světlo schopno proniknout hluboko do tkáně, tedy ani pod kůži. Jelikož se světlo po vstupu do tkáně může rozptýlit nebo absorbovat, je potřeba předvídat prostorovou distribuci světla uvnitř cílové tkáně. Rozsah těchto dvou procesů závisí na typu tkáně a použité vlnové délce (Obr. 4) (Robertson a kol., 2009).



Obr. 4: Znázornění vlnových délek a jejich hloubky penetrace do tkáně.
(převzato Anstey, 2004)

Biologická tkáň je nehomogenní a obsahuje velké množství nehomogenních částí. Přítomnost struktur jako jsou například buněčné orgány, různé makromolekuly nebo organizované buněčné struktury dělají tkáň zakalenou. 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. Absorpce světla fotosensitizerem může samo o sobě omezovat penetraci světla tkání. Tento fenomén se označuje jako tzv. „self-shielding“ a je zvláště výrazný u fotosensitizerů, které při vystavení vlnové délce (používané při léčbě) absorbují světlo příliš silně. Spousta fotosensitizerů je po dobu vystavení světelnému záření náchylná k tzv. „fotodestrukci“. Tento proces se také jinak nazývá „fotobleaching“ (Castano a kol., 2004).

Fotobleaching neboli vyblednutí je jednou z obecných vlastností barviv, a tudíž i fotosensitizerů. Ve fotobiologii a fotochemii je fotobleaching definován jako ztráta intenzity absorpce či emise způsobená světlem. U barviv dochází působením světla k chemickým změnám (fotoadici, fotocyklizací, ireverzibilní fotoredukcí a nejčastěji oxidací), v jejichž důsledku dochází k narušení chromoforu. Jsou známy dva typy ireverzibilních chemických změn – fotomodifikace a tzv. pravý fotobleaching (Zimčík a Miletín, 2004).

V případě fotomodifikace ke ztrátě fluorescence či absorpce dochází při určité vlnové délce. Chromofor je však zachován v modifikované formě. Ovšem při pravém fotobleachingu je chemický zásah velmi hluboký, a proto dochází k rozpadu chromoforu na menší fragmenty, které sami o sobě nemají nijak zvlášť významnou absorpci ve viditelné oblasti. Při fotodynamické terapii dochází převážně k pravému fotobleachingu. Výsledkem pak je, že fotosensitizer poté již není schopen absorbovat světlo. Toto světlo pak může pronikat do hlubší vrstvy tkáně. Nevýhodné však na fotobleachingu je to, že rozložený fotosensitizer je neaktivní a nevykazuje tak žádné cytotoxické vlastnosti.

Pro dosažení co největšího cytotoxického účinku, je potřeba dostatečného množství ROS. Toho dosáhneme v případě, že světelný zdroj bude vykazovat takové spektrální vlastnosti, které se budou shodovat s vlnovou délkou, při které fotosensitizer maximálně absorbuje.

3.3.1 TYPY ZDROJŮ

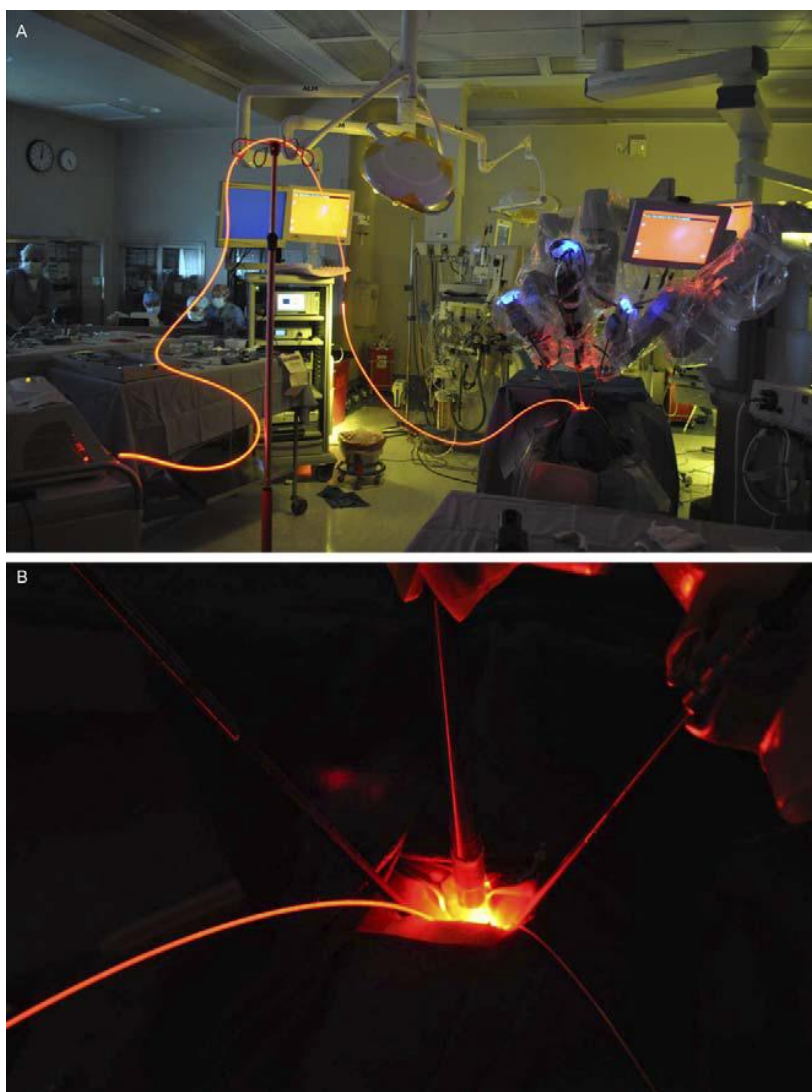
Jednou z hlavních překážek k širokému používání fotodynamické terapie je kromě ceny i složitost a dostupnost zdrojů záření, které se používají pro excitaci různých fotosensitizerů. Nedostatečný pokrok v technologii laserů byl jednou z významných překážek ve vývoji PDT. Světelný zdroj a způsob dodávání záření jsou dva nezbytné aspekty fotodynamické terapie. Výběr určitého zdroje záření se může odvíjet od umístění tumoru, potřebné dávky záření nebo druhu fotosensitizeru (Brancaleon a Moseley, 2002).

Všeobecně lze rozdělit zdroje světla pro fotodynamickou terapii do čtyř hlavních skupin:

1. Xenonové výbojky v kombinaci s filtry pro určité vlnové délky
2. Lasery
 - barvivové - laditelné ve viditelné oblasti spektra
 - argonovým laserem stimulovaný barvivový laser (Ag-dye laser)
 - lasery kovových par
 - diodové
3. Lampy
4. Luminiscenční diody – LED (light emitting diodes)

Xenonové výbojky jsou často jako zdroje světla doplněné barevnými či tepelnými filtry. Tyto filtry pak umožňují odstranit nežádoucí složky světelného záření. Tento zdroj záření má však jednu velkou nevýhodu, kterou je nedostatečný zářivý výkon v aktivačních vlnových délkách. Tento fakt má za důsledek, že v celém objemu nádoru nedochází k dostatečnému fotodynamickému efektu.

Výhodou laserů (Obr. 5) je, že nám jednak ve svém výstupu poskytují dostatečný výkon, a také intenzivní, monochromatické a koherentní záření. Jelikož je fotodynamická terapie v podstatě závislá na světle, je léčba nádorů pomocí této metody limitována tím, kam se světlo dostane. Lidská tkáň je velice rozličná a i velice výkonný laser není schopen dodat dostatečné záření např. k vnitřním orgánům či k jiným hluboko položeným místům. Řešení zde poskytuje optické vlákno, které se připojí k laseru. I když po připojení optického vlákna dochází k určitému poklesu zářivého toku, možnost dopravit světelný paprsek k nádoru, který se vyskytuje v hlubších vrstvách tkáně, znamenal ve fotodynamické terapii výrazný krok kupředu. V současnosti jsou však již běžně dostupné polovodičové lasery, které mají výstupní výkon kolem 400 mW. Takto vysoký zářivý tok je naprosto dostačující a převyšuje potřebu pro fotodynamickou terapii i poté, co připojíme optické vlákno. Tím, že lasery poskytují velkou intenzitu záření na relativně malých plochách, a to v co nejkratším čase, jsou ve fotodynamické terapii nejvhodnějším zdrojem záření pro léčbu hlouběji umístěných nádorů.



Obr. 5: A) Uspořádání robotického ramena, laserového zdroje záření, kabelu při operaci.
 B) Detail robotického ramena, zdroje záření s příslušným filtrem a kamerou.
 (převzato od Quon a kol., 2011)

V minulosti se více používaly lasery barviové (laditelné ve viditelné oblasti spektra). Avšak především kvůli pořizovacím nákladům, provozním nákladům a menším rozměrům se dnes dává přednost diodovým laserům. Barviové lasery jsou velmi flexibilní ohledně změny vlnové délky – všeobecně v rozmezí 500 nm až 750 nm. Vyžadují ovšem výraznou technickou podporu. Naopak diodové lasery jsou extrémně kompaktní polovodičová zařízení, která se velmi snadno používají. Jejich výhodou v porovnání s ne-laserovými zdroji záření je, že mohou být použity pro léčbu jak rakoviny v hlubších vrstvách tkáně, tak i povrchových kožních lézí (Ibbotson a kol., 2004).

Zvláštním, avšak hojně používaným zdrojem záření je argonovým laserem stimulovaný barviový laser (Ag-dye laser), který emituje paprsky o volitelné vlnové délce v oblasti 610 – 675 nm. Argonový laser produkuje sílu v rozmezí 15-20 W. Tato síla je

dostatečná pro to, aby konverzí skrze barvivový laser došlo k produkci 7W. Takového množství energie je významné proto, že umožňuje rozdělení paprsku prostřednictvím optických vláken do většího množství paprsků. Toto by nebylo možné bez počátečního velkého množství energie, které nám poskytl argonový laser. Díky tomu jsme schopni zasáhnout paprskem větší množství menších oblastí (Mang, 2004). Ag-dye lasery se používají často v kombinaci s optickým vláknem a difusorem, který umožňuje jednotné ozáření dutiny či nádoru. Ag-dye lasery byly spolu s optickým vláknem použity například při léčbě karcinomu plic, jícnu či močového měchýře. Rozšířený a oslabený paprsek byl použit také pro léčbu rakoviny kůže (Brancaleon a Moseley, 2002).

Jiným laserovým systémem, který se používá, je laser kovových par (zlatých nebo měděných). Jedná se o určitou variaci Ag-dye laseru. Tyto lasery nabízí určité výhody v porovnání s Ag-dye lasery. Například nevyžaduje spojení s barvivovými lasery pro dosažení dostatečné síly, nabízí také určitý stupeň přenosnosti, nepotřebuje speciální dodávání energie a ani vodní chlazení. Nicméně pravidelné poplatky za zlato, které je nezbytné pro udržení výstupního výkonu, činí tento systém vcelku drahou záležitostí. Méně nákladnou verzi nabízí laser využívající měď, ale ten neposkytuje tak velký výkon. Jako hlavní nevýhoda těchto laserů byla zjištěna dlouhá zahřívací a ochlazovací doba, což je nečiní příliš praktickými v klinickém prostředí (Mang, 2004). Tyto lasery se ve spojení s optickým vláknem však používají pro léčbu karcinomu hlavy, krku, jícnu či močového měchýře (Brancaleon a Moseley, 2002).

Diodové lasery mají nové funkce, které vnáší do oblasti medicíny a fotodynamické terapie pozoruhodný pokrok v technologii. Jedná se o polovodičový světelný zdroj. Jde o velmi kompaktní systém, který má výkonné vzduchové chlazení. Velikostně se může podobat běžné tiskárně a je proto snadno přenosný (Mang, 2004). Diodové lasery byly již použity pro léčbu různých kožních lézí, adenomu hypofýzy nebo věkem podmíněné okulární degenerace. V současnosti nabízí diodové lasery pouze jednu výstupní vlnovou délku, což omezuje jejich univerzálnost. Nicméně se vyvíjejí systémy s vyměnitelnými moduly o různých vlnových délkách. Dá se předpokládat, že v budoucnosti budou právě tyto lasery ve fotodynamické terapii široce používané (Brancaleon a Moseley, 2002).

Lasery nejsou jedinou možností ve fotodynamické terapii. Svě zastoupení zde mají lampy, které jsou velmi jednoduché a nenákladné na údržbu. Ve srovnání s lasery nabízí lampy mnohem širší spektrální výstup. Jelikož lampy emitují rozsáhlé spektrum, je nutné je kombinovat spolu s různými filtry. Příkladem je xenonová oblouková lampa, fosfor-sodná lampa nebo fluorescenční lampa.

Při porovnání laserů a lamp zjistíme, že lasery poskytují monochromatické a velmi silné záření, čímž se tak redukuje celkový čas, který je potřeba pro dosažení požadované dávky záření. Jelikož se jedná o monochromatické záření, je klíčové vybrat takovou vlnovou

délku, při které bude mít fotosensitizer maximální absorpci. To znamená, že současně může být jeden laser použit pouze s jedním fotosensitizerem (nebo velmi limitovaným počtem PS). Naproti tomu lampy poskytují širokou škálu vlnových délek. Díky tomu mohou být lampy kombinovány s několika fotosensitizerými, které mají různé absorpční maxima (Brancaleon a Moseley, 2002).

Zvláštním typem světelného zdroje jsou tzv. LED diody (Obr. 6). Světlo je v tomto případě vytvářeno procesem zvaným elektroluminiscence. Ty jsou velice kompaktní, lehké a vyžadují mnohem méně energie k dosažení požadované vlnové délky (Mang, 2004). Pomocí LED diod můžeme dosáhnout maximálního výkonu 150 mW, což je v porovnání s jinými zdroji a lasery mnohem méně. Z tohoto důvodu se používají zejména při lokální aplikaci fotosensitizeru, kde není hloubka penetrace záření klíčová. I když může být výstupní výkon limitujícím faktorem pro jejich široké využití ve fotodynamické terapii, má i výhodné vlastnosti jako je cena a univerzálnost. Díky jejich velmi nízké ceně (v porovnání se všemi ostatními zdroji záření) mohou být uspořádány ve větších souborech a ozařovat tak velké plochy (Brancaleon a Moseley, 2002).



Obr. 6: LED diodový zdroj záření.
(převzato od Anstey, 2004)

3.3.2 ZPŮSOBY OZAŘOVÁNÍ

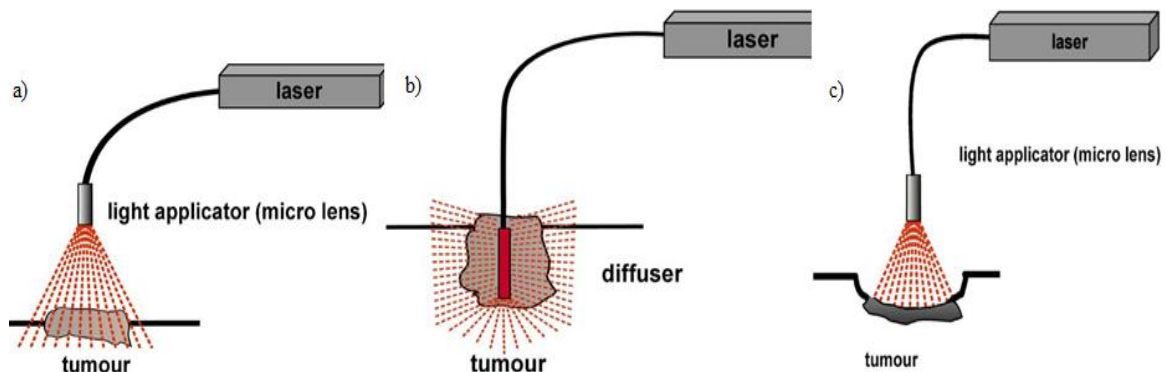
Existuje několik různých technik, jakými lze nádor ozářit, respektive aktivovat fotosensitizer. Na základě způsobu ozáření lze fotodynamickou terapii rozdělit na superficiální PDT, intersticiální PDT a intra-operativní PDT (Obr. 7).

Superficiální přístup se využívá pro snadně přístupné nádory, které jsou převážně na povrchu kůže nebo na ústní sliznici. Nádor v takovém případě však nesmí být silnější, než

je maximální hloubka průniku světla (v závislosti na aplikované vlnové délce). Záření se dodává přes mikročočku, která se nachází na konci vlákna vedoucího ze zdroje. Stejně jako při operativním zákroku zahrnuje léčená oblast i tzv. bezpečnostní rezervu. Jedná se o zdravou tkáň, která je ve velké blízkosti (0,5-1 cm) nádorové tkáně.

V případě nádoru, který je silnější více než 1 cm, se k léčbě používá intersticiální ozařovací technika. Součástí ozařovacího aparátu je i tzv. difuzor. Jedná se o jakýsi rozptylovač, který umožňuje rozdělení jednoho paprsku. Tento difuzor se vloží do tenké jehly, a poté se společně vloží do nádorové tkáně. V případě větších nádorů se může umístit několik těchto jehel blízko sebe (1-2 cm od sebe), čímž dosáhneme ozáření celého objemu nádoru. Intersticiální způsob ozáření umožňuje použít fotodynamickou terapii při léčbě velkých nádorů. Je také vhodný pro léčbu těch nádorů, jejichž operace by znamenala rozsáhlou resekci, nebo které nejsou vhodné pro operaci. Vzhledem k obtížné a nepřesné dozimetrii světla v nádoru se intersticiální PDT používá především pro paliativní léčení.

Další možností je intra-operativní metoda. Při ní je pacientovi podán fotosensitizer několik dní před operací (v závislosti na době trvání jeho akumulace v nádoru). Během zákroku dochází nejprve k resekci většiny nádorové tkáně, a až poté k samotné intra-operativní fotodynamické terapii. (Kübler, 2005). Ta v tomto případě plní tzv. adjuvantní léčbu. Nejčastěji se používá během operací v oblasti hlavy a krku. Je však třeba dbát jedné věci. Jelikož byl pacientovi podán fotosensitizer, je potřeba během operace světla v sále filtrovat tak, abychom odstranili ty vlnové délky, které by mohly aktivovat fotosensitizer.



Obr. 7: Superficiální (a), intersticiální (b) a intra-operativní (c) způsob ozařování. (převzato od Kübler, 2005)

3.4 REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU (ROS)

Třetí nedílnou součástí fotodynamické terapie jsou, mimo fotosensitizeru a zdroje záření, reaktivní formy kyslíku (ROS). Tyto velmi reaktivní molekuly jsou součástí mnoha fyziologických a patologických procesů. ROS se v intracelulárních signálních kaskádách buňky chovají jako druzí poslové. Jsou také zapojeny v imunologické odpovědi na různé

škodliviny. Nicméně takto vysoká produkce ROS může způsobit i výrazné oxidativní poškození buněčných biomolekul – lipidů, proteinů a nukleových kyselin. Škodlivý účinek těchto reaktivních forem kyslíku může vést až k buněčné smrti. Zda k tomu dojde, závisí především na opravných mechanismech buňky a antioxidační obraně. Na druhou stranu lze tento fakt využít při léčbě maligních a některých jiných nenádorových onemocnění (Kolářová a kol., 2007). Z tohoto důvodu se staly ROS předmětem rozsáhlého výzkumu.

Fotosensitizéry jsou v podstatě chemicky nehomogenní skupinou látek, jejichž efektivita je závislá na tvorbě cytotoxických reaktivních forem kyslíku. Ty můžeme obecně rozdělit do dvou skupin – skupiny volných radikálů a skupiny látek, které nejsou volnými radikály. Volné radikály jsou látky, které velmi pohotově reagují s různými biologickými strukturami, jako jsou například proteiny, lipidy, mastné kyseliny, aminokyseliny nebo nukleové kyseliny. Díky tomu fungují ROS jako významné prostředníky pro přenos energie. Příkladem volných radikálů je například hydroxylový radikál (OH), superoxid ($\cdot\text{O}_2^-$), peroxy ($\cdot\text{ROO}$), hydroperoxy ($\cdot\text{HO}_2$) nebo alkoxy ($\cdot\text{RO}$). Do druhé skupiny neradikálových látek řadíme například singletový kyslík ($^1\text{O}_2$), peroxid vodíku (H_2O_2), ozón (O_3) nebo kyselina chlorná (HOCl).

Fotosensitizéry jsou v podstatě chemicky nehomogenní skupinou látek, jejichž efektivita je závislá na tvorbě cytotoxických reaktivních forem kyslíku. Velká reaktivita ROS je způsobena jejich velkou nestabilitou. Ta je způsobena přítomností nepárového elektronu. Dá se tedy říci, že principem jejich reaktivity je snaha o vlastní stabilizaci. K té může dojít dvěma způsoby – poskytnutím nebo odebráním elektronu jiným molekulám.

Existuje několik způsobů, kterými tyto reaktivní formy kyslíku vznikají. Příkladem je přijmutí (redukce) nebo ztráta (oxidace) jednoho elektronu.

Další možností je homolytické štěpení. Při něm dochází v molekule ke štěpení kovalentní vazby. Vznikají tak fragmenty, přičemž si každý z nich ponechá jeden nepárový elektron.

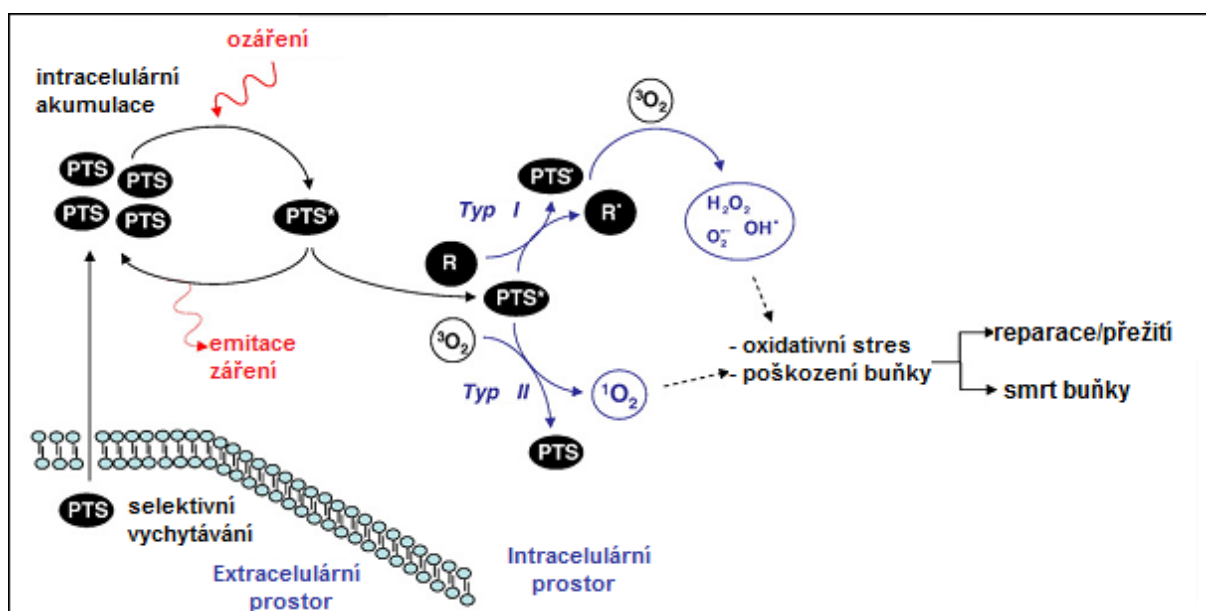
Existuje také několik dobře známých reakcí, které zahrnují tvorbu jednoho typu ROS z jiného. Příkladem je Fentonova reakce (Jamil a kol., 2002). Při ní dochází k přeměně hydrogen peroxidu na hydroxylový radikál. Jako redukční činidlo v této reakci působí superoxid, který dodává pro redukci iontu kovu (např. Fe^{3+}) jeden elektron. Tento iont kovu zde funguje jako katalyzátor pro přeměnu hydrogen peroxidu (H_2O_2) na hydroxylový radikál ($\cdot\text{OH}$) (Castano a kol., 2004).

Obranným mechanismem organismu proti ROS jsou tzv. antioxidanty. Jedná se o látky, jejichž molekuly brání tvorbě řetězových radikálových reakcí, případně přerušují již probíhající reakce, nebo vzniklé radikály převádí do méně reaktivních a nereaktivních stavů. Za normálních okolností je vzájemný poměr ROS a antioxidantů v rovnováze. Během fotodynamické terapie dochází v určitých místech (nádorové tkáni) k úmyslnému narušení

této rovnováhy, čímž se indukuje vznik ROS. Takto vzniklá převaha ROS oproti antioxidantům vyústí v silný cytotoxický účinek, který je nezbytný pro poškození cílových nádorových buněk.

3.4.1 VZNIK ROS VE PDT

Aby byla fotodynamická terapie úspěšná, je nezbytná jak absorpce světla fotosensitizerem, tak následný přenos energie. Ve PDT může fotosensitizer podlehnout dvěma typům reakcí (reakce I. a II. typu) (Obr. 8), přičemž může probíhat jak pouze jedna reakce, tak i obě reakce současně (Lemp a kol., 2008). To, která reakce bude probíhat častěji, závisí na několika faktorech - na typu fotosensitizeru, koncentraci v substrátu a množství kyslíku.

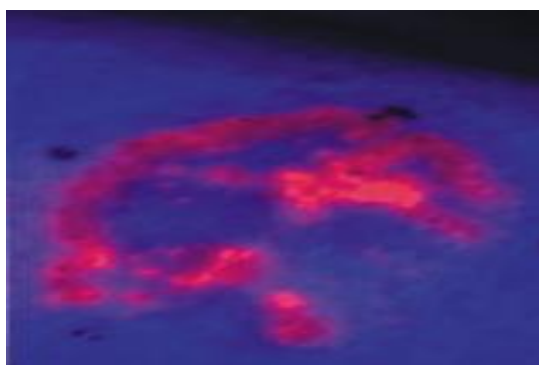


Obr. 8: Znárodnění reakce I. a II. typu (PTS* - excitovaný fotosensitizer, PTS – fotosensitizer v základním stavu, R* - excitovaný substrát, R - substrát v základním stavu).
(převzato od Buytaert a kol., 2007)

V I. typu reakce jsou radikály tvořeny přenosem náboje, který vznikne po excitaci fotosensitizeru světelným zářením. V základním stavu má fotosensitizer v nízkoenergetických orbitalech dva elektrony s opačným spinem. Tento stav se označuje jako singletový. Poté, co fotosensitizer absorbuje záření (fotony), dojde k vybuzení elektronu do orbitalu s vysokou energií, přičemž si však neustále udržuje svůj původní spin. Dále může dojít k tomu, že molekula s vyšší elektronegativitou zachytí elektron z excitované molekuly fotosensitizeru, čímž dojde k přenosu energie (Jamil a kol., 2002). Tento mechanismus zahrnuje transfer elektronu mezi excitovaným fotosensitizerem a substrátem (Lemp a kol.,

2008). Nereaguje tedy ihned přímo s molekulou kyslíku. Substrátem kromě molekuly však může být například i buněčná membrána. Předáním energie tedy nejprve dochází ke vzniku radikálového aniontu nebo kationtu. Teprve reakcí těchto radikálů s kyslíkem vznikají reaktivní formy kyslíku (Castano a kol., 2004).

Důležitým faktem reakce I. typu je, že je fotosensitizer excitovaný po velmi krátkou dobu (nanosekundy) a získanou energii může ztratit buď emitováním světla (fluorescencí), nebo vnitřní konverzí přeměnou na teplo) (Castano a kol., 2004). Faktu, že většina fotosensitizerů vykazuje fluorescenci, se využívá pro určení přítomnosti fotosensitizeru v buňkách a tkáních. Díky tomu jsme schopni *in vivo* zachytit a zobrazit i jeho distribuci po těle (Obr. 9).



Obr. 9: Fotosensitizer nahromaděný v nádorové tkáni a emitující světlo pod UV zářením.
(převzato od Brown a kol., 2004)

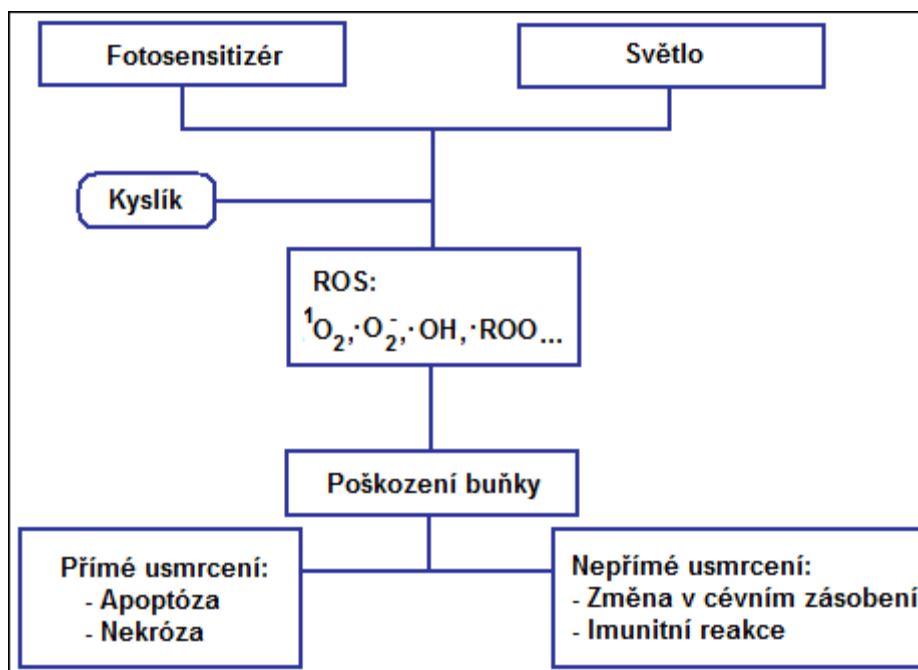
Součástí reakce I. typu je často také produkce superoxidového aniontu. Ten sice není sám o sobě nijak zvlášť reaktivní, ani nezpůsobuje velké oxidační poškození, může však reagovat s jiným superoxidovým aniontem. Výsledkem této reakce, známé jako dismutace, je hydrogen peroxid a kyslík. Enzym, který tuto reakci katalyzuje, se nazývá superoxid dismutáza (SOD). Hydrogen peroxid má v biologických systémech velmi důležitou roli. Snadno totiž prochází buněčnou membránou, přičemž však nemůže být vyloučen z buňky ven. Zároveň je také nezbytný pro funkčnost mnoha enzymů. Je proto velmi důležitý pro zdraví (Castano a kol., 2004). Superoxidový anion je možno využít i při Fentonově reakci (viz výše).

Zcela odlišným procesem je II. typu reakce, kdy se vytváří singletový kyslík kolizí excitovaného fotosensitizeru s kyslíkem v tripletovém stavu (Lemp a kol., 2008). V tomto případě podléhá excitovaný fotosensitizer zvláštnímu procesu, který se nazývá mezisystémový přechod. Dochází při něm k přeměně excitovaného fotosensitizeru do relativně dlouhotrvajícího (mikrosekundy) stavu. V tomto stavu má však paralelní elektronový spin (Castano a kol., 2004).

3.5 MECHANISMY POŠKOZENÍ NÁDORU

Hlavním účelem fotodynamické terapie je zničení cílových (nádorových) buněk. Nedávný výzkum objasnil mnoho procesů, které vedou k zániku savčích buněk, a také některé dráhy, kterými může PDT tyto procesy spustit (Castano a kol., 2005). Způsob a rozsah buněčné smrti může ovlivnit koncentrace, fyzikálně-chemické vlastnosti a subcelulární lokalizace fotosensitizeru, koncentrace kyslíku, vhodná vlnová délka či intenzita záření (Robertson a kol., 2009). Lee a kolektiv zjistili, že existuje výrazná variabilita v koncentraci fotosensitizeru v závislosti na typu tumoru, typu fotosensitizeru a způsobu podání fotosensitizeru. Jelikož je účinnost v podstatě všech fotosensitivních látek závislá na kyslíku, není PDT obvykle účinná v hypoxické části tkáně (Castano a kol., 2005).

Hlavní úlohou fotodynamické terapie je destrukce cílových buněk. K tomu může dojít dvěma hlavními cestami – přímou a nepřímou. V prvním případě dochází k přímému zničení nádorových buněk, což vede k apoptóze a/nebo nekróze. Druhá možnost, nepřímá cesta, zahrnuje zničení cévního zásobení a imunitní reakci (Piette a kol., 2003) (Obr. 10). I když jsou tyto procesy vzájemně nezávislé, ke zničení tumoru dochází často jejich kombinací. Na subcelulární úrovni se poškození týká především proteinů, DNA a lipidů.



Obr. 10: Mechanismy vedoucí k usmrcení buněk.

3.5.1 POŠKOZENÍ NA SUBCELULÁRNÍ ÚROVNI

Mezi hlavní biomolekuly, které jsou během fotodynamické terapie poškozeny cytotoxickými ROS, řadíme proteiny, lipidy a nukleové kyseliny.

U proteinů a peptidů způsobují ROS modifikaci některých aminokyselin (např. tryptofan nebo tyrosin). Tato modifikace má pak za výsledek několik změn, které výrazně ovlivní vlastnosti buňky. Příkladem je změna aktivity různých enzymů, transportních vlastností nebo vstup vápenatých iontů do cytosolu. Kromě toho také dochází k agregaci a zesíťování proteinů. Díky působení volných radikálů jsou proteiny také mnohem náchylnější k proteolytickému rozkladu.

V případě lipidů působí reaktivní formy kyslíku na nenasycené mastné kyseliny tak, že ruší dvojně vazby. Díky ztrátě těchto vazeb je narušena jak propustnost membrány, tak i její fluidita. Dále ROS také ovlivňují enzymy vázané v membráně, nebo tvoří reaktivní metabolity (peroxydace). Výsledkem této tzv. peroxidace lipidů jsou kratší radikály a jiné sloučeniny, které jsou schopny indukovat zánětlivý proces. Podstatná je také inhibice určitých buněčných funkcí, jako je například syntéza DNA a RNA, mitochondriální funkce (respirace) nebo anaerobní glykolýza.

Sluneční světlo poškozuje DNA dvěma mechanismy. První spočívá v absorpci světla, což vede ke vzniku charakteristických fotoproduktů, zejména tvorbě pyrimidinových dimerů. Druhý mechanismus se dá aplikovat i při PDT, kdy hlavní roli hrají určité buněčné složky, pravděpodobně porfyrinového a flavonoidového typu, které působí jako endogenní fotosensitizer. Ty reagují přímo s DNA nebo vedou k tvorbě reaktivních forem kyslíku. Tyto reakce vyústí v oxidační poškození DNA (Castano a kol., 2005). Poškození DNA, způsobené fotodynamickou terapií, však není závislé pouze na jednotlivých složkách PDT, ale i na opravných mechanismech buňky (Robertson a kol., 2009). Singletový kyslík se může snadno tvořit uvnitř buněk, reagovat tak účinně s DNA a působit jednovláknové zlomy. Kromě těchto zlomů spočívá poškození DNA ještě například ve štěpení deoxyribózy či v poškození bází (např. modifikace pyrimidinových a purinových bází). Singletový kyslík však přednostně reaguje s guaninovou částí DNA, což vede k delecí jednoho guaninu v sekvenci DNA (Castano a kol., 2005). Ve výsledku může taková změna DNA vyústit v mutaci, chybu při translaci nebo inhibici proteosyntézy. Ačkoliv syntéza DNA a RNA je po PDT určitým způsobem ovlivněná, nemusí být takové poškození vždy letální (Robertson a kol., 2009).

3.5.2 ZMĚNA V CÉVNÍM ZÁSOBENÍ

Jedním z dalších mechanismů podílejícím se na destrukci nádoru, který byl po použití fotodynamické terapie prokázán, je změna v cévním zásobení. Přežití nádorových buněk je závislé na dostatečném krevním zásobení. Fotodynamickou terapií způsobené poškození krevních cév vede k vážné a trvalé nádorové hypoxii (Ayar a kol., 2004). Celý proces spočívá v tom, že v ozářené oblasti dojde ke zúžení cév a vytvoření trombu. Přímé poškození buněk spojené se zúžením cév vede k odkrytí bazální membrány a větší

propustnosti cév, což následně vede ke vzniku otoku, hromadění krevních destiček, uvolnění tromboxanu a tvorbě trombu. PDT navíc inhibuje uvolňování oxidu dusnatého (NO) z endoteliálních buněk, což také přispívá ke zúžení cév (Nowis a kol., 2005). Následkem toho dochází jak k hypoxii nádorové tkáně, tak i k přerušení transportu živin. Ve špatně okysličeném prostředí poté dochází ke konverzi xantin dehydrogenázy na xantin oxidázu, která je schopna konvertovat hypoxantin na xantin v procesu, který je doprovázen uvolněním velkého množství reaktivních forem kyslíku. Oxidativní stres podporuje aktivaci komplementu (soubor bílkovin, které jsou součástí nespecifické imunity) a pronikání neutrofilů a jiných zánětlivých buněk do ischemické oblasti. Z těchto důvodů ischemie i po krátkém časovém období značně přispívá k PDT indukované buněčné smrti (Nowis a kol., 2005).

3.5.3 IMUNITNÍ REAKCE

Způsob buněčné smrti indukovaný fotodynamickou terapií má výrazný vliv na imunitní reakci, která může zvýšit protinádorovou účinnost léčby. Zánětlivá reakce způsobená nekrózou při PDT je totiž zodpovědná za přítomnost imunitních buněk v oblasti nádoru. Tuto myšlenku podporuje fakt, že makrofágy reagují zvýšenou protinádorovou aktivitou na nekrotické, ale ne na apoptotické nádorové buňky. Navíc tzv. heat shock proteiny (HSPs), které jsou uvolňovány nekrotickými (ne však apoptotickými) nádorovými buňkami, představují stimulační a/nebo maturační signály pro makrofágy a dendritické buňky (Plaetzer a kol., 2003). Dendritické buňky vyvolávají specifickou a velmi efektivní imunitní odpověď, ale také monitorují přítomnost infekčních mikroorganismů, určitá poškození a transformace. Diferenciaci prekurzorů dendritických buněk spouští tzv. signály nebezpečí. Příkladem jsou mikrobiální produkty, heat shock proteiny nebo nádorové antigeny. Poté dochází k jejich konečné maturaci a migraci do lymfoidní tkáně (např. lymfatické uzliny nebo slezina).

Zánětlivé signály, které vzniknou po PDT, spouští masivní a regulovaný průnik neutrofilů, mastocytů a makrofágů do tumoru. Jedná se o velmi rychlou reakci, která poté může vyústit ve více precizní imunitní reakci. Ta spočívá v aktivaci specifických T-lymfocytů, které se zdají být klíčové pro finální kontrolu zbylých nádorových buněk (Nowis a kol., 2005). Neutrofilové mají schopnost vylučovat řadu enzymů, které jsou schopny zničit nádorové buňky. Jejich migrace směrem k tumoru je regulována fotodynamickou reakcí indukovanou expresí E-selektinu, chemokinů a dalších mediátorů. Poté, co dojde ke zničení nádorových buněk, jsou jejich zbytky fagocytovány přítomnými makrofágy.

3.5.4 PŘÍMÉ USMRCENÍ NÁDOROVÝCH BUNĚK

Přímé usmrcení nádorových buněk při fotodynamické terapii způsobuje ireversibilní foto-poškození subcelulárních cílů, jako jsou například plazmatická membrána, intracelulární

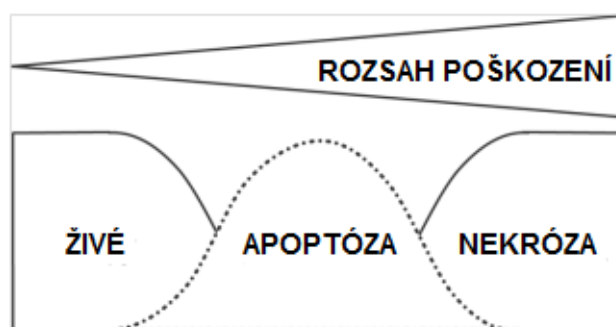
membrána mitochondrií a lysozómů, Golgiho aparát nebo endoplazmatické retikulum (Buytaert a kol., 2007). Při poškození buněčné membrány (případně při inaktivaci enzymů vázaných v membráně) dochází k tvorbě ROS prostřednictvím reakce I. typu. Při ní reaguje excitovaná molekula fotosensitizeru s buněčnou membránou (substrátem). Dojde tak k tvorbě radikálových iontů, které reakcí s kyslíkem vytváří cytotoxické molekuly kyslíku (Gray a Fullarton, 2007). V případě destrukce lysozómů dochází k vylití hydrolytických enzymů. Ty následně spustí kaskádu dějů, které vyvrcholí usmrcením buňky.

Fotodynamická terapie může způsobit i autofagii. Při foto-poškození dochází k vyslání signálu, jehož účelem je ochrana klíčových organel. V určitých případech však může dojít k tomu, že se tento signál změní v signál buněčné smrti.

Všeobecně lze říci, že přímé usmrcení nádorových buněk má dvě hlavní cesty – apoptotickou a nekrotickou (viz níže).

3.6 TYPY BUNĚČNÉ SMRTI

K přímému úmrtí buňky po aplikaci fotodynamické terapie může dojít dvěma způsoby – apoptózou a nekrózou. To, zda smrt buňky bude způsobena apoptózou či nekrózou, záleží na intracelulární lokalizaci fotosensitizeru, buněčném genotypu a dávce PDT (Almeida a kol., 2004). Prvním, kdo dokázal, že buňky mohou podlehnout dvěma různým způsobům smrti, byl J. F. Kerr (Castano a kol., 2005). Všeobecně se předpokládá, že nižší dávky PDT vedou převážně k apoptóze, zatímco vyšší dávky spíše k nekróze (Robertson a kol., 2009). Po aplikaci fotodynamické terapie dochází k nekróze převážně v povrchových vrstvách tkáně. Právě zde je totiž dávka záření nejvyšší a dochází tu k největšímu poškození (Obr. 11). Naopak k apoptóze dochází spíše v hlubších vrstvách, kde vlivem průchodu tkání je dávka záření mnohem nižší.



Obr. 11: Závislost buněčné odpovědi na rozsahu poškození způsobené PDT. (převzato od Plaetzer a kol., 2003)

Kvantifikace přesného rozsahu apoptózy a nekrózy po působení PDT lze zjistit například pomocí průtokové cytometrie s použitím propidium jodidu, který se váže na DNA a fluorescenčního imuno-značení (imunolabelingu) Anxinem, který se selektivně váže na fosfatidyl serin (Piette a kol., 2003).

3.6.1 NEKRÓZA

Nekróza neboli pasivní buněčná smrt, může nastat jako důsledek extrémní vnější fyzikální síly (např. extrémní teplota, tlak, osmolarita, pH). Jinou možností je těžké poškození buňky, které je vyvolané chemickými procesy (např. letální dávky ionizujícího záření, metabolických inhibitorů a jiných druhů toxických látek) (Plaetzer a kol., 2003). V případě fotodynamické terapie může k nekróze dojít v důsledku vysoké dávky záření nebo vysoké koncentrace fotosensitizeru. Jedná se o náhlou a velmi rychlou formu degenerace, která postihuje rozsáhlé buněčné populace. Jakmile tato reakce jednou započne, je již nevratná.

Projevy nekrózy lze rozdělit na změny v buňce a na změny v okolí buňky. V prvním případě dochází ke svraštění a ztmavnutí jádra (tzv. pyknóze). Dalším rysem je tzv. nástěnná hyperchromatóza, kdy se chromatin hromadí na vnitřní straně jaderné membrány a dochází k rozpadu jádra na malé fragmenty. Cytoplazma nabývá na svém objemu, dochází k destrukci organel, hlavně lysozómů, čímž se uvolňují trávicí enzymy. Posledním krokem je prasknutí plasmatické membrány a vylití intracelulárního obsahu buňky do okolí. Tato dekompozice buňky je převážně zprostředkována proteolytickou aktivitou, ale konkrétní identita proteáz a jejich substrátů není dosud příliš známa (Castano a kol., 2005).

Druhý případ nastává v okamžiku, kdy se vylitím obsahu buňky do okolí vytvoří zánět. V tomto momentě jsou chemotaxi přitahovány k místu zánětu makrocyty. Nekrotické buňky jsou pak makrocyty fagocytovány a časem nahrazeny zdravými buňkami.

3.6.2 APOPTÓZA

Apoptóza, jinak také aktivní buněčná smrt, představuje řízenou sebevraždu buňky, která je kontrolována jak intracelulárními, tak extracelulárními faktory a zakončenou charakteristickým sledem morfologických, biochemických a energetických změn (Plaetzer a kol., 2003). Jedná se o bezesporu nejvíce prostudovaný způsob smrti buňky po aplikaci fotodynamické terapie. Defektní regulace nebo průběh apoptózy narušuje rovnováhu mezi proliferací a smrtí buňky, což může zapříčinit spuštění řady nemocí včetně rakoviny (Buytaert a kol., 2007).

Hlavními znaky tohoto procesu jsou smršťování buňky, bobtnání plasmatické membrány, kondenzace chromatinu, fragmentace jádra a fakt, že většina organel a plasmatická membrána si udržují svoji integritu po dlouhou dobu. *In vitro* se apoptotické

buňky nakonec rozpadnou na mnoho membránou obklopených vezikul. *In vivo* jsou tato apoptotická tělíška vyhledána a odstraněna fagocyty (Castano a kol., 2005). Makrofágové a další příbuzné typy buněk jsou naváděny díky přítomnosti specifických markerů na povrchu vezikul. Na rozdíl od nekrózy, je proces fagocytózy schopný zabránit zánětlivým reakcím. Nedochozí tak k prasknutí buňky a uvolnění DNA, lysozomálních proteáz a celé řady dalších produktů do okolí.

Apoptóza vyžaduje transkripční aktivaci specifických genů, endonukleáz a kaspáz a degradaci DNA na malé fragmenty (Robertson a kol., 2009). Spuštěna může být skrze dvě hlavní dráhy – vnější a vnitřní (Obr. 12).

Vzhledem k tomu, že ROS vzniklé během fotodynamické terapie mohou přímo poškozovat mitochondrie, klíčové regulátory aktivní buněčné smrti, je PDT schopna iniciovat apoptotickou kaskádu i u takových buněk, které se ukázaly být rezistentní vůči apoptóze při aplikaci chemoterapie nebo ionizujícího záření (Plaetzer a kol., 2003).

3.6.2.1 VNĚJŠÍ DRÁHA

Vnější dráha se spouští prostřednictvím tzv. death receptorů. Principem je v tomto případě vazba ligandů (např. FasL, TNF α - Tumor Necrosis Factor α) na povrchové receptory (např. Fas, TNF). Tím dochází přes adaptor k aktivaci iniciační kaspázy 8 (Almeida a kol., 2004). Další kaskáda dějů poté vede k aktivaci apoptózy.

3.6.2.2 VNITŘNÍ DRÁHA:

Vnitřní dráha je poněkud složitější proces, kde má hlavní úlohu mitochondrie, ale také ceramid.

a) Mitochondriální dráha:

Mitochondrie fungují jako hlavní orgány pro většinu apoptotických drah. Apoptóza může být iniciována vnějšími i vnitřními spouštěcími signály, které směřují právě do mitochondrie. Tyto orgány mají schopnost vnímat stresové signály a spouští, je-li to potřeba, tzv. vykonávací fázi apoptózy. Během ní dochází k uvolnění proteinů z mezimembránového prostoru do cytoplazmy, a to otevřením pórů ve vnitřní a vnější mitochondriální membráně. Hlavními proteiny, které hrají během apoptózy velmi důležitou roli, jsou cytochrom c (včetně apoptozomálního komplexu, jehož je součástí) a apoptózu indukujícího faktoru (AIF) (Plaetzer a kol., 2003).

Bcl-2 proteiny:

Členové Bcl-2 rodiny proteinů regulují apoptózu mnoha způsoby, zejména však prostřednictvím mitochondrií. Podle jejich role při apoptotickém usmrcení buňky je lze je rozdělit na dvě skupiny. Do první, anti-apoptotické skupiny, řadíme například Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1 a A 1. Druhá, pro-apoptotická skupina, se skládá z proteinů, jako jsou například Bax, Bak, Bok, Bid, Bim a další (Almeida a kol., 2004). Hlavní funkcí anti-apoptotického Bcl-2 proteinu je stabilizace pro-apoptotického proteinu Bax. Dojde-li k fotodestrukci proteinu Bcl-2, je pak nadbytek Bax schopný iniciovat interakci s mitochondriální membránou, což vede k uvolnění cytochromu c – tzv. spouštěče apoptózy (Kessel, 2006). Důležitou roli zde hraje i další pro-apoptotický protein Bid. V cytoplazmě je štěpen kaspázou 8, přičemž vznikají jeho zkrácené formy (tBid). Ty jsou schopné změnit konformaci proteinu Bax. Stejně tak svou konformaci mění i Bak protein (Bax v cytozolu, Bak na mitochondriální membráně) (Buytaert a kol., 2007). Díky této změně jsou tyto proteiny schopné vytvořit komplex s mitochondriálními poriny, kterými poté může dojít k uvolnění cytochromu c. Navíc spousta z pro-apoptotických proteinů může reagovat s anti-apoptotickými proteiny, a tím je tak inhibovat. Stejný princip je však uplatňován i v opačném případě. Právě vzájemný poměr pro-apoptotických a anti-apoptotických proteinů rozhoduje o tom, zda buňka podlehe apoptóze, či ne.

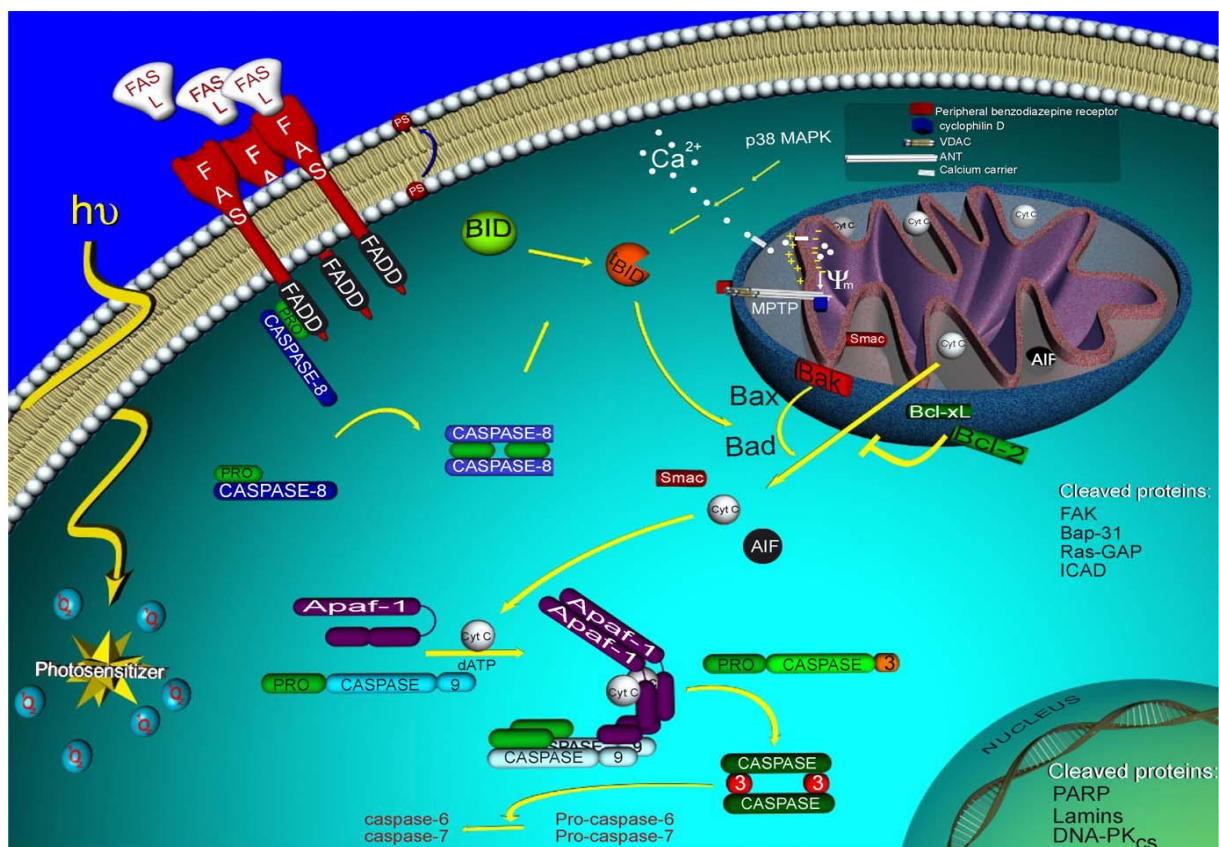
Ca²⁺ a lysozomy:

Svou roli v apoptóze hrají i Ca²⁺ ionty. Studie ukazují, že v důsledku fotopoškození endoplazmatického retikula (zásobárny Ca²⁺ iontů) dochází k intracelulárnímu nárůstu Ca²⁺ iontů. Ty zde plní úlohu druhých poslů, kteří interakcí s mitochondriální matrix spouští apoptózu.

Apoptóza se může spustit i prostřednictvím fotopoškození lysozómů. V takovém případě dochází k uvolnění lysozomálních proteolytických enzymů do cytosolu. Tyto proteolyzy jsou schopny poté štěpit pro-apoptotický protein Bid na jeho kratší formy – tBid. Ty pak reagují s mitochondrií, což zapříčiní uvolnění cytochromu c a následnou aktivací kaspázy 9 a 3 se spustí apoptóza (Kessel, 2006).

b) Ceramidová dráha

Ceramid je stresem indukovaný druhý posel, který vzniká pomocí sfingomyelinázy. Tento enzym štěpí sfingofosfolipidy (součásti buněčné membrány), jako je například sfingomyelin, za vzniku ceramidu a fosforylcholinu. Ceramid může vzniknout také *de novo* pomocí ceramidsyntházy. Bylo vědecky prokázáno, že ceramid, jako sekundární posel, je schopen regulovat různé buněčné procesy, jako je například apoptóza, buněčný cyklus nebo buněčná diferenciací (Castano a kol., 2005).



Obr. 12: Zjednodušené znázornění vnější a vnitřní dráhy vedoucí k apoptóze (převzato od Almeida a kol., 2004)

3.6.2.3 KASPÁZY

Kaspázy (CASPASE = Cysteinylní **ASP**artát specifická prote**ASE**) jsou intracelulární endopeptidázy, které mají ve svém aktivním místě cystein. Místo, kde specificky štěpí peptidickou vazbu, se nachází za aspartátem. Kaspázy apoptotické kaskády lze rozdělit na iniciační a efektorové. Iniciační kaspázy (např. číslo 2, 8, 9, 10) se nachází na počátku kaskády, efektorové kaspázy (číslo 3, 6, 7) jsou mimo jiné zodpovědné i za samotnou aktivaci apoptózy.

Kaspázy jsou syntetizovány jako zymogeny (prokaspázy), které se aktivují vnějším a vnitřním způsobem, přičemž často jedna kaspáza aktivuje další - tzv. kaskádovitá aktivace. Vnější způsob aktivace je způsoben vazbou externích ligandů, zatímco k vnitřnímu způsobu dochází v důsledku buněčného stresu. Vnější dráha se často spouští skrz Fas receptor. Za normálních okolností je receptor aktivován například Fas ligandem, který je obsažen v membráně T-lymfocytů a NK-buněk. Poté dojde k aktivaci prokaspázy-8 na kaspázu-8, která aktivuje prokaspázu-3 na kaspázu-3, která následně spouští apoptózu. Kaspáza-8 může také štěpit Bid protein, čímž se spustí uvolňování cytochromu c a další mechanismus se shoduje s vnitřní dráhou (viz níže).

Poškozením buňky dochází k aktivaci vnitřní dráhy, kdy se uvolní *cytochrom c* z mitochondrie do cytozolu. *Cytochrom c* spolu s dATP (2'-deoxyadenozin trifosfát) a aktivačním faktorem APAF-1 (apoptosis protease activation factor-1) vytváří enzymový komplex – tzv. apoptozóm. Ten na sebe naváže prokaspázu-9 a aktivuje ji na kaspázu-9. Ta poté aktivuje prokaspázu-3 na kaspázu-3, která spouští apoptózu.

Cílem kaspáz jsou proteiny různých buněčných složek. Štěpí například inhibitor CAD (kaspázou aktivovaná DNAáza), což způsobí fragmentaci DNA. Dále štěpí například cytoskeletální aktin, laminy jaderné membrány, regulační proteiny nebo transkripční faktory. Společným dopadem takovýchto proteolytických štěpení je, že buňka začne ztrácet svou integritu a rozpadne se na velké množství uzavřených, kulovitých vezikul, které jsou poté fagocytovány (Castano a kol., 2005).

3.7 KLINICKÉ VYUŽITÍ PDT:

Využití fotodynamické terapie v praxi je velmi široké. Nepoužívá se pouze jako hlavní metoda při léčbě nádoru, ale také pro adjuvantní nebo paliativní léčbu. V současnosti se PDT používá zejména při léčbě rakoviny kůže, plic, močového měchýře, mozkových nádorů, děložních nádorů. Neustále se však objevují nové studie, které poskytují nadějně výsledky i při léčbě jiných onemocnění, což jen potvrzuje, že se fotodynamická terapie neustále vyvíjí a je velkým příslibem do budoucna.

BOWENOVA CHOROBA:

Při tomto onemocnění napadá nádor povrchové části kůže (Obr. 13). Během studie byla pacientům lokálně aplikována 20% ALA. Po 4 hodinách bylo dané místo ozářeno červeným světlem (125 J/cm^2). Po prvním kole léčby se takto podařilo odstranit 75 % lézí. Po proběhnutí druhého kola PDT vykazovaly kompletní odpověď na léčbu už všechny léze. Při srovnání PDT a kryoterapie zjistíme, že zatímco léčba fotodynamickou terapií vykazovala po druhém kole léčby kompletní odpověď u všech lézí, v případě kryoterapie mělo kompletní odpověď na léčbu pouze 50 % lézí (Allison a kol., 2006).



Obr. 13: A) Pacient s Bowenovou nemocí, B) Pacient po 2 měsících léčby pomocí PDT
(převzato od Brown a kol., 2004)

TĚŽKÁ DYSPLAZIE + RANÝ T1 INVAZIVNÍ KARCINOM HRTANU A DUTINY ÚSTNÍ:

Při studii byl jako fotosensitizer použit porfimer sodný, který byl poté ozářen dávkou 50 J/cm^2 (dysplazie) a 75 J/cm^2 (karcinom). Za zhruba 15 měsíců vykazovalo 24 z 26 pacientů kompletní odpověď na léčbu. V rámci dysplazie vykazovalo všech 12 pacientů kompletní odpověď, i když u 3 z 9 pacientů s dysplazií dutiny ústní nastala recidiva. Ta mohla nastat v důsledku keratinové vrstvy, která tak mohla omezit penetraci záření. Celkem 12 pacientů ze 14 vykazovalo kompletní odpověď při léčbě raného karcinomu hrtanu a dutiny ústní (Quon a kol., 2011).

PSORIÁZA:

Collins a kol. provedli rozsáhlou studii 22 pacientů s chronickou psoriázou. Každý pacient měl pět čtvercových oblastí na postižené kůži. Do každé této oblasti byla aplikována dvacetiprocentní ALA. Čtyři tyto oblasti byly poté ozářeny světelnou dávkou v rozmezí $2-6 \text{ J/cm}^2$. Pátá oblast ozářena nebyla a fungovala jako kontrola. Výsledkem byla úspěšná léčba 18 % oblastí, částečná odpověď na léčbu v 8 % oblastí a žádná odpověď v 74 % oblastí (Mitra a Stables, 2006). Avšak jak ukazuje fotka (Obr. 14), která znázorňuje průběh léčby, při použití vhodné dávky záření může být tato metoda velmi účinná. Při porovnání neléčené části (NT) a oblasti ozářené dávkou 8 J/cm^2 zjistíme, že došlo k výraznému zlepšení.



Obr. 14: Čtvercové plochy s dávkou záření 8 J/cm², 16 J/cm² a NT (not treated) jako kontrolou (převzato od Mitra a Stables, 2006)

HAILEY-HAILEY CHOROBA:

Toto onemocnění je charakterizováno výskytem vyrážek a puchýřů obvykle v záhybech kůže, ale i na velkých plochách těla. Tyto puchýře jsou velmi bolestivé a po jejich prasknutí často dochází k nakažení zdravé části těla, což způsobuje v podstatě nekonečný počet ohnisek.

Při léčbě byla pacientům aplikována 20% ALA. Po 4 hodinách bylo postižené místo ozařováno světlem (590-700 nm) po 30 minut. Již po prvním kole PDT odezněla bolest, která je s touto chorobou spojená. Po druhém kole došlo k odstranění vyrážky a puchýřů, což potvrdila i následná biopsie (Mitra a Stables, 2006).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 BUNĚČNÉ LINIE

- G361 buněčné linie
- NIH3T3 buněčné linie

Při studiu fotodynamické terapie byly použity dvě buněčné linie, které byly předpřipraveny do 96-ti jamkových mikrotitračních destiček. Pro studium vlivu PDT na nádorovou linii byly použity buňky kožního melanomu (G361 buněčná linie). Pro zjištění účinků PDT na nenádorovou linii byly použity buňky myších fibroblastů (NIH3T3 buněčná linie).

4.2 FOTOSENSITIZÉRY

- TPPS₄ (*meso*-tetrakis(4-sulfonatophenyl) porphyrin)
- ZnTPPS₄ (zinečnatý derivát TPPS₄)
- PdTPPS₄ (paladnatý derivát TPPS₄)
- MgTPPS₄ (hořečnatý derivát TPPS₄)

4.3 OSTATNÍ MATERIÁL

1) ROZTOKY A MÉDIA

- PBS 10× (Phosphate Buffered Saline), pH 7,4
= 2 g KCl; 80 g NaCl; 2,4 g KH₂PO₄; 14,4 g Na₂HPO₄; destilovaná voda do 1 litru + HCl pro úpravu 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

- ANNEXIN V-FITC – (A 9210, Sigma)
- PROPIDIUM JODID – (P 2667, Sigma)
- 10x BINDING PUFR – (B 9796, Sigma)
- JC-1 (5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-Tetraethyl-benzimidazolocarboxyanine Iodide) – (T4069, Sigma)
- MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) – (M 5655, Sigma)
- FURA 2-AM – (47989, Sigma)

- DCF (5-(α -6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát, acetyl ester (CM-H₂DCFDA)) - (C 6827, Invitrogen)

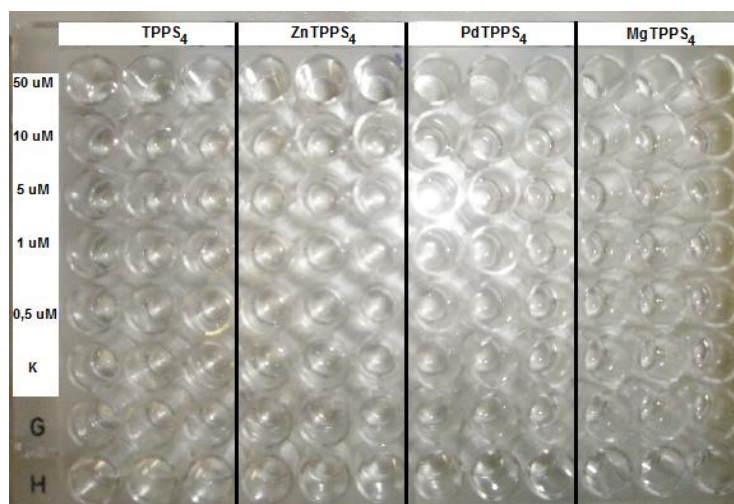
4.4 LABORATORNÍ ZAŘÍZENÍ A POUŽITÉ PROGRAMY

- Laboratorní váhy
- Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (BioTek, USA)
- Infinite M200 Pro Multi-Mode Microplate Reader (Tecan, SUI)
- Fluorescenční mikroskop Olympus IX81
- CO₂ inkubátor (BioTek, USA)
- LED diody (Kingbright Corporation, Taiwan)
- Program 3T3 NRU PT Phototox 2.0 (BfR, Berlín)
- Microsoft Excel

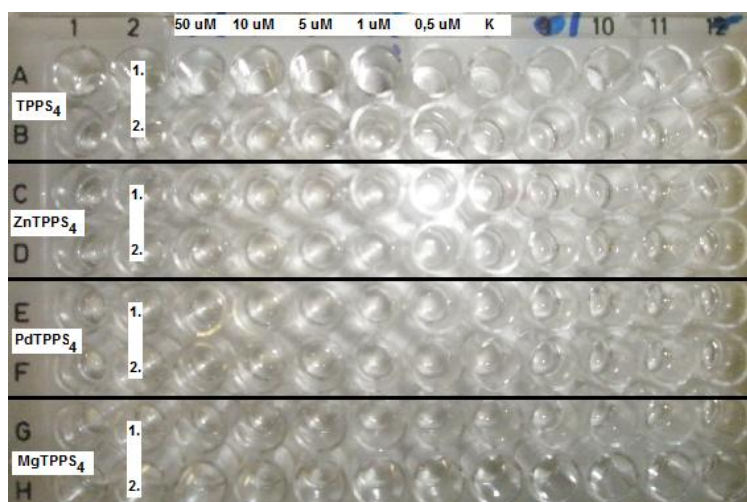
4.5 PŘÍPRAVA FOTOSENSITIZÉRU A JEHO APLIKACE

Dodané fotosensitizéry je potřeba před samotnou aplikací nejprve převést z pevného stavu do roztoku, a to pomocí kultivačního DMEM média. Ze vzniklého zásobního roztoku fotosensitizéru jsou poté naředěním získány potřebné koncentrace - 0,5 μ M; 1 μ M, 5 μ M; 10 μ M; 50 μ M.

Připravené fotosensitizéry v daných koncentracích jsou poté pomocí multikanálové pipety aplikovány na předem připravené mikrotitrační destičky pro detekci apoptózy a membránového potenciálu (Obr. 15) a na mikrotitrační destičky pro MTT test, detekci ROS a detekci Ca²⁺ iontů (Obr. 16), které obsahují nádorové (G361) a nenádorové (NIH3T3) buněčné linie. Následně jsou buňky vloženy do inkubátoru a nechají se inkubovat po 24 hodin při 37 °C a 5 % CO₂.



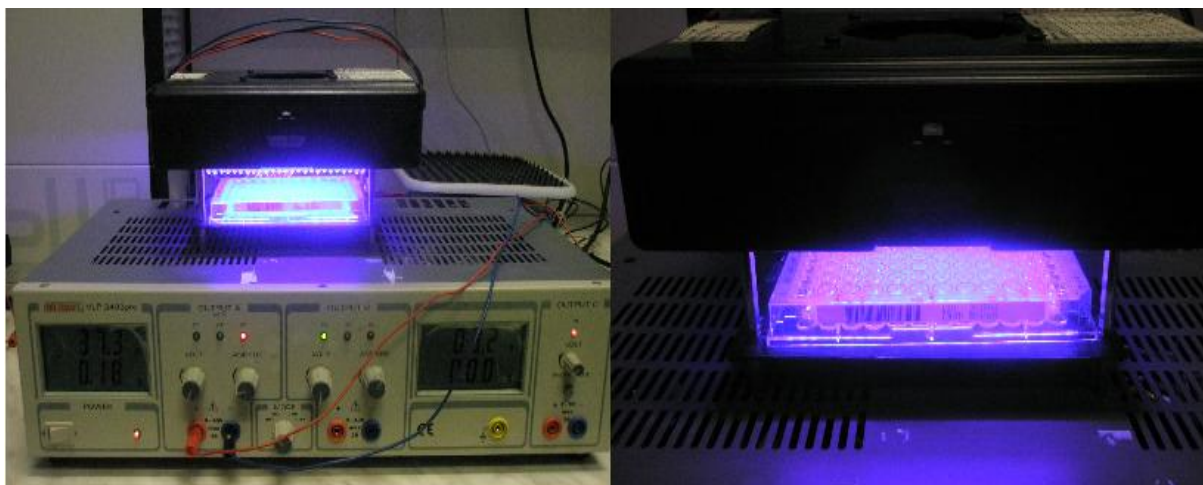
Obr. 15: Rozdělení mikrotitrační destičky pro detekci apoptózy a membránového potenciálu.



Obr. 16: Rozdělení mikrotitrační destičky pro MTT test a detekci ROS a Ca^{2+} iontů.

4.6 OZAŘOVÁNÍ

Po uplynutí 24 hodin inkubace došlo k ozařování mikrotitračních destiček. Pro ozařování byl použit LED diodový zdroj (Obr. 17), který poskytuje záření o vlnové délce 414 nm, hustotou výkonu 20 mW/cm^2 a velikostí proudu 0,18 A. Díky rozdílné době vystavení mikrotitračních destiček tomuto záření bylo dosaženo tří různých dávek záření – 1 J/cm^2 , 5 J/cm^2 a 10 J/cm^2 (Tab. 1).



Obr. 17: LED diodový zdroj záření.

Tab. 1: Znázornění potřebné doby záření pro dosažení požadované dávky záření

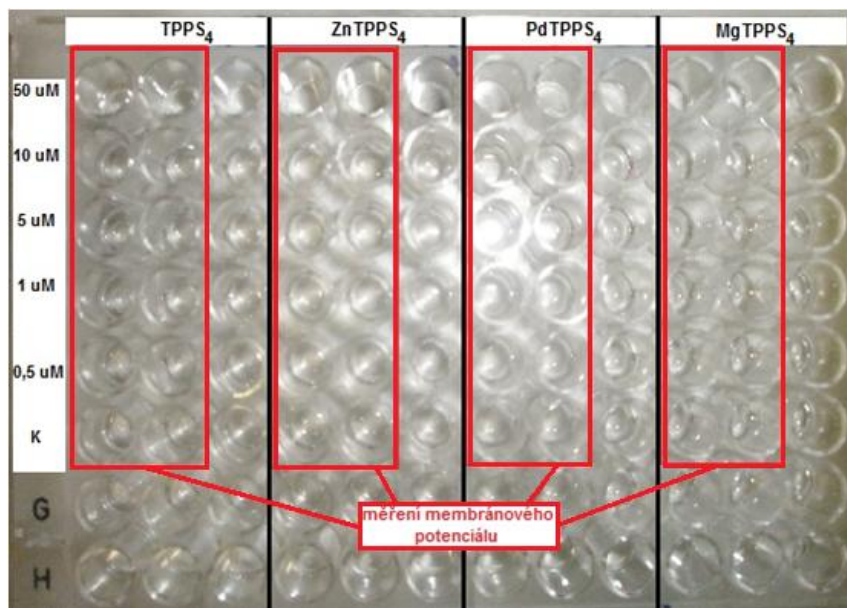
číslo destičky	doba záření [s]	Dávka záření [J/cm ²]
1.	50	1
2.	250	5
3.	500	10

Od každé buněčné linie (nádorové i nenádorové) byly připraveny tři mikrotitrační destičky, z nichž na každou byla aplikována jiná dávka záření. Po ozáření bylo do každé jamky mikrotitrační destičky odstraněno PBS a přidáno 100 μ l kultivačního DMEM média. Tyto destičky pak byly opět 24 hodin inkubovány při 37 °C a 5 % CO₂. Pro detekci apoptózy, nekrózy a přeživších buněk byly připraveny také destičky, které byly inkubovány pouze 6 hodin. Výjimkou byly destičky určeny pro detekci ROS, u kterých bylo provedeno měření ihned po ozáření.

4.7 MĚŘENÍ MEMBRÁNOVÉHO POTENCIÁLU

Ztráta mitochondriálního (membránového) elektrochemického potenciálu je charakteristická pro ranou fázi apoptózy. Tohoto faktu využívá JC-1 (5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-Tetraethyl-benzimidazolocarboxyanine Iodide), který umožňuje rychlou detekci změny membránového elektrochemického potenciálu. V nepoškozených buňkách se vlivem elektrochemického potenciálu látka koncentruje v mitochondriální matrix. Zde poté vytváří červené fluorescenční agregáty. Pokud dojde ke ztrátě elektrochemického potenciálu, dojde také k rozptýlení fluorescenční sondy po celé buňce a k přeměně z červeně fluorescenčních agregátů na zeleně fluoreskující monomery. Tento fakt umožňuje určit rozdíly mezi nepoškozenou a narušenou (poškozenou) buňkou.

Po skončení inkubace byly využity první dva sloupce každého fotosenzitizéru pro měření membránového potenciálu (Obr. 18). Pipetou z nich bylo opatrně odstraněno DMEM médium. Po následném propláchnutí 100 μ l PBS 1 \times bylo do každé jamky sloupců přidáno 50 μ l připraveného roztoku. Tento roztok se skládal ze 400 μ l DMSO, 36 μ l JC-1 a PBS 1 \times , který byl doplněn do 2,5 ml. Mikrotitrační destička se poté nechala 20 minut inkubovat při 37 °C a 5 % CO₂. Po inkubaci byly jamky 2 \times propláchnuty 100 μ l PBS 1 \times . Po propláchnutí bylo nakonec do každé jamky přidáno 100 μ l PBS 1 \times a destička byla vložena do Synergy HT fluorescenčního readeru (Obr. 19), který měřil hodnotu fluorescence. Poměrem mediánu zelené a červené fluorescence (zelená/červená) byla následně určena změna membránového potenciálu.



Obr. 18: Sloupce destičky využité pro měření membránového potenciálu.



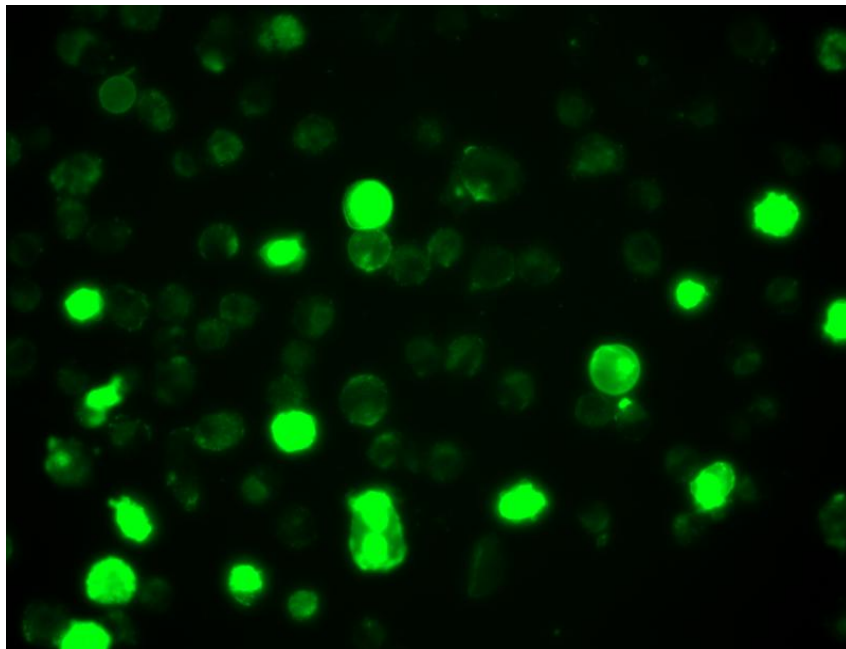
Obr. 19: Synergy HT reader s vloženou mikrotitrační destičkou.

4.8 DETEKCE APOPTÓZY, NEKRÓZY A PŘEŽIVŠÍCH BUNĚK

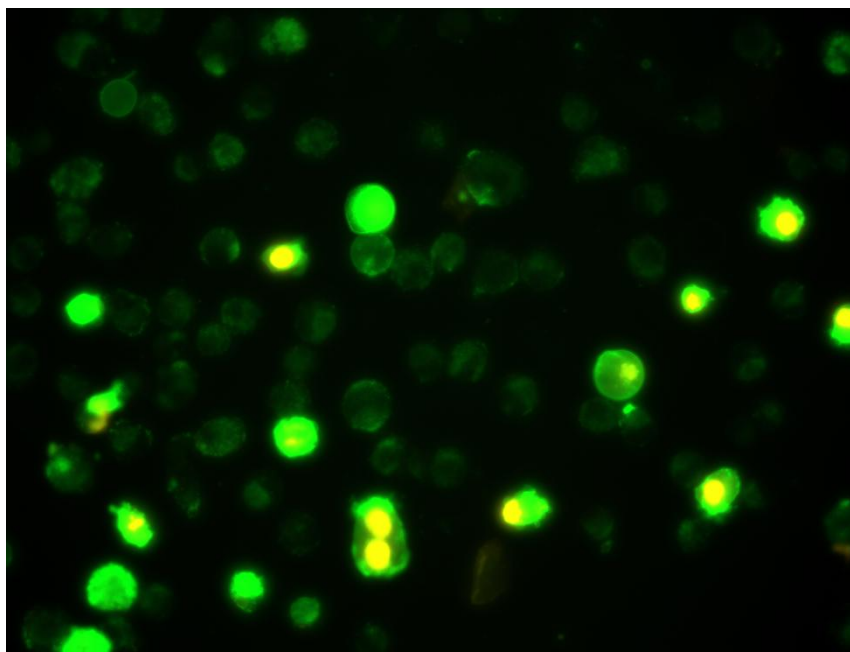
Anexin V-FITC je fluorescenční sonda, která váže fosfolipidy (fosfatidylserin) v přítomnosti vápníku. Fosfatidylserin je za normálních okolností součástí vnitřní části lipidové dvojvrstvy. Po propuknutí apoptózy je však přesunut na její vnější část a je tak přístupný pro Anexin V-FITC. Jejich vazba je pak detekovatelná jako zelená fluorescence.

Pokud dojde k úplnému rozrušení buněčné membrány, jako tomu je u nekrózy, váže se propidium jodid na buněčnou DNA. Takto navázaný propidium jodid lze detekovat jako červenou fluorescenci.

Díky tomu lze rozlišit buňky, které podlehly apoptóze (zelená fluorescence) (Obr. 20), nekróze (červená fluorescence + zelená fluorescence) (Obr. 21) a které přežily (bez fluorescence).

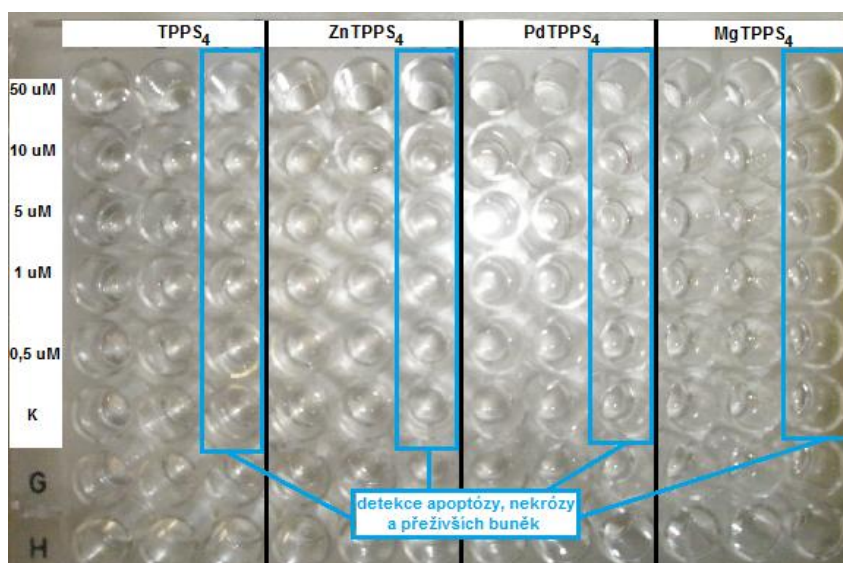


Obr. 20: Zelená fluorescence buněk způsobená vazbou Anexinu V-FITC na fosfatidylserin.



Obr. 21: Kombinace červené a zelené fluorescence buněk způsobená vazbou propidium jodidu na DNA a Anexinu V-FITC na fosfatidylserin.

Po určení membránového potenciálu pomocí Synergy HT readeru je do každé jamky třetího sloupce (Obr. 22) všech fotosensitizerů přidáno 50 μ l roztoku, který se skládá ze 12 μ l Anexinu V-FITC, 24 μ l propidium jodidu, 120 μ l 10 \times binding pufru a 1080 μ l destilované vody. Poté se opět vloží na 10 minut do inkubátoru při 37 $^{\circ}$ C a 5 % CO₂. Po inkubaci je mikrotitrační destička vložena do fluorescenčního mikroskopu (Obr. 23) a snímána. Ze dvou různých míst každé jamky třetího sloupce poté vzniknou fotografie ze zeleného, červeného a viditelného spektra. Z těchto fotografií se později odvodí počet apoptotických, nekrotických a přeživších buněk.



Obr. 22: Sloupce destičky využité pro detekci apoptózy, nekrózy a živých buněk.

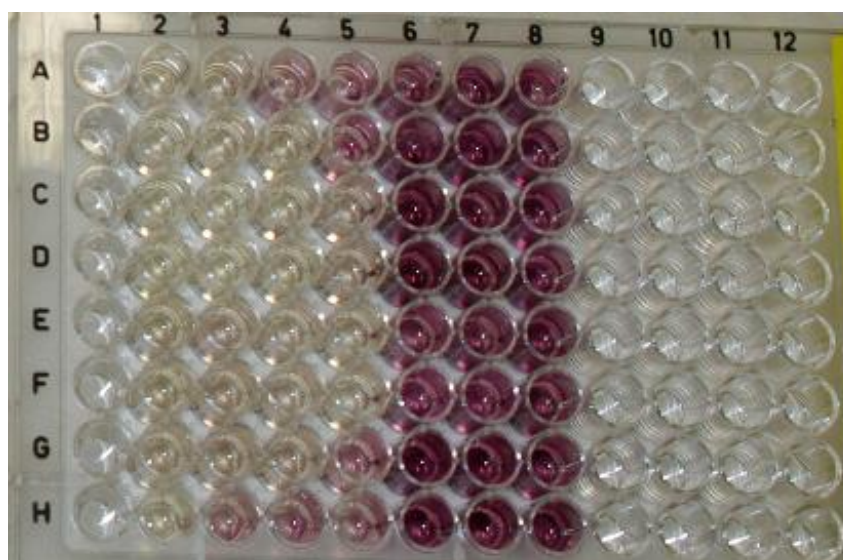


Obr. 23: Fluorescenční mikroskop Olympus IX81.

4.9 MTT TEST

Pro MTT test se využívá látka Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide. Ta umožňuje fialovým zbarvením zviditelnit živé buňky. Pouze v nich totiž dochází ke změně ve vodě rozpustného 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromidu na nerozpustný formazan, který má fialové zbarvení. Díky tomuto faktu lze konstatovat, že intenzita zbarvení je přímo úměrná počtu přeživších buněk.

Za 24 hodin po terapii bylo do každé jamky napipetováno 50 μ l připraveného roztoku MTT. Ten byl připraven přidáním 20 mg MTT do 4 ml PBS 1 \times . Jakmile došlo k rozpuštění krystalů MTT bylo přidáno dalších 32 ml PBS 1 \times . Poté, co byly destičky opět 3 hodiny inkubovány při 5 % CO₂ a 37 °C, došlo k fialovému zbarvení přeživších buněk (Obr. 24). Po odstranění roztoku z destiček bylo přidáno 100 μ l DMSO. Destičky byly poté vloženy do Synergy HT readeru, který měřil absorbanci při 570 a 690 nm.



Obr. 24: Fialové zbarvení přeživších buněk po přidání Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromidu.

4.10 DETEKCE REAKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU (ROS)

Detekce ROS je umožněna díky fluorescenční značce DCF. Poté, co vstoupí (5-(a-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát, acetyl ester (CM-H₂DCFDA) do buňky, dojde k jeho přeměně na nerozpustný CM-H₂DCF. Ten následně reaguje s ROS, které se generují vlivem ozáření. Tím dojde ke změně CM-H₂DCF na fluorescenční CM-DCF.

Po aplikaci fotosensitizeru a uplynutí inkubační doby je fotosensitizer z destičky řádně odstraněn (vypláchnutím pomocí PBS 1 \times). Do každé jamky bylo poté přidáno 50 μ l roztoku DCF a PBS 1 \times . Tento roztok byl připraven v poměru 10 μ l DCF na 1 ml PBS 1 \times . Následně byla fluorescenční značka inkubována 20 minut při 37 °C a 5 % CO₂. Ihned po ozáření je destička podrobena kinetickému měření na Synergy HT readeru při 480 nm.

4.11 DETEKCE Ca²⁺ IONTŮ

FURA 2-AM je fluorescenční značka, která se váže na Ca²⁺ ionty. Díky tomu jsme schopni sledovat nárůst nebo pokles volného vápníku v buňce.

Pro detekci vápníku byly použity destičky s G361 buněčnými liniemi, které byly vystaveny pouze jedné dávce záření, a to 5 J/cm². Po 24 hodinové inkubaci při 37 °C a 5 % CO₂ bylo do každé jamky přidáno 0,5 µl FURA 2-AM. Následně byla destička 20 minut opět inkubována při 37 °C a 5 % CO₂. Po této inkubaci byla destička vložena do Infinite M200 Pro readeru (Obr. 25), kde byla následně měřena fluorescence při 380 nm. Výsledky byly poté zpracovány do grafu.



Obr. 25: Infinite M200 Pro reader

(<http://www.tecan.com/platform/apps/product/index.asp?MenuID=2252&ID=4015&Menu=1&Item=21.2.10.7>)

5 VÝSLEDKY

Postupy zmíněné výše byly aplikovány na nádorové i nenádorové linie, přičemž od každé linie byly připraveny destičky se třemi různými dávkami záření (1 J/cm^2 , 5 J/cm^2 a 10 J/cm^2). Celkem byla takto provedena tři na sobě nezávislá měření, ze kterých se nakonec vytvořily průměrné hodnoty.

Výjimkou byla detekce vápníku. Při tomto pokusu byly použity pouze G361 buněčné linie a destička byla ozářena pouze dávkou záření 5 J/cm^2 .

Kromě pěti koncentrací ($50 \text{ }\mu\text{M}$, $10 \text{ }\mu\text{M}$, $5 \text{ }\mu\text{M}$, $1 \text{ }\mu\text{M}$ a $0,5 \text{ }\mu\text{M}$) je v mikrotitrační destičce přítomna i kontrola. Tato kontrola obsahuje veškeré látky jako ostatní jamky kromě fotosensitizeru. Charakterizuje tak buňky, u kterých neproběhla fotodynamická reakce. Díky tomu lze lépe porovnat účinky fotodynamické terapie.

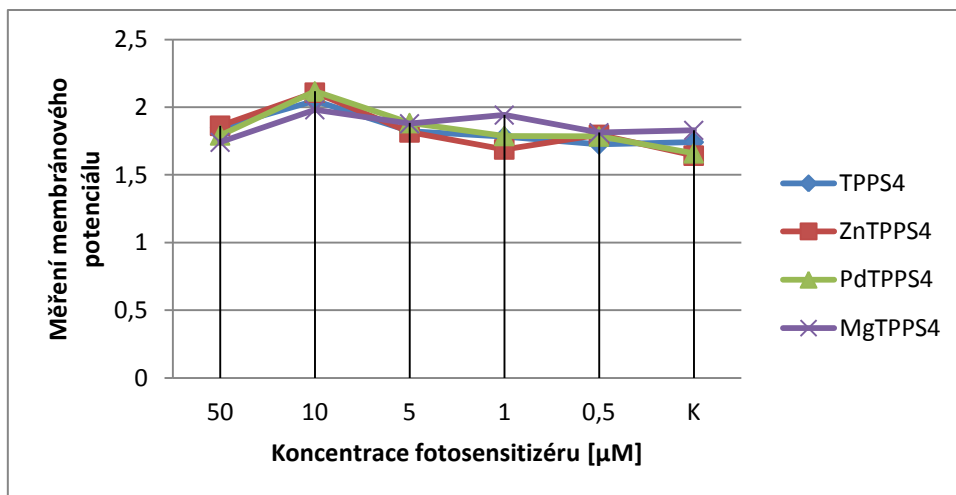
5.1 MĚŘENÍ MEMBRÁNOVÉHO POTENCIÁLU

Po vložení destičky do Synergy HT fluorescenčního readeru došlo k detekci zelené a červené fluorescence. Jejich vzájemným poměrem došlo k získání hodnot, které vyjadřují změnu membránového potenciálu. Čím větší tato hodnota je, tím více buněk je pravděpodobně v rané fázi apoptózy. Pro porovnání probíhalo testování na destičkách s buněčnými liniemi, které byly inkubovány 24 hodin a 6 hodin po ozáření. Díky tomu jsme získali přehled o tom, jaké děje probíhají v buňce v závislosti na čase. Získaná data byla poté pro větší přehlednost zpracována do grafů.

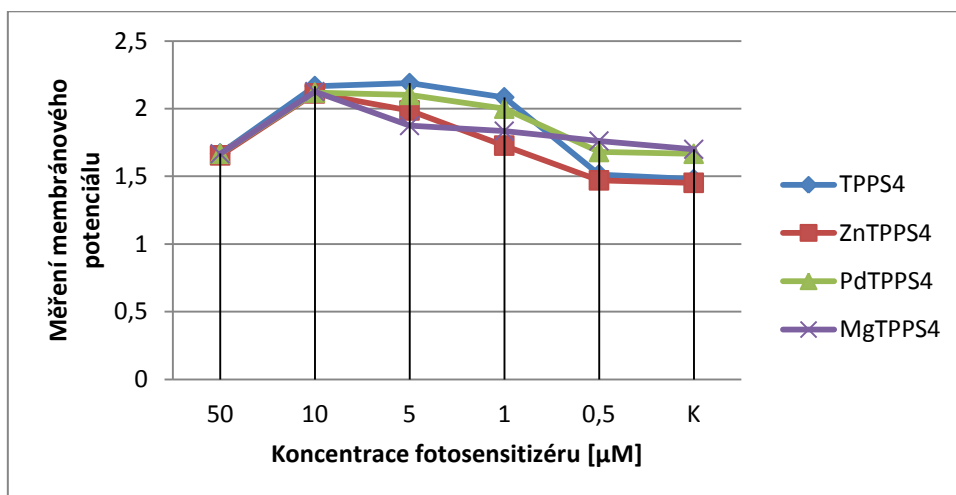
5.1.1 G361 BUNĚČNÉ LINIE (KOŽNÍ MELANOM)

Na základě grafů (Graf 1 – 6) lze konstatovat, že ve většině případů je nejvíce buněk v rané fázi apoptózy při koncentraci fotosensitizerů $10 \text{ }\mu\text{M}$. Pouze TPPS₄ a PdTPPS₄ v některých případech vykazovaly více buněk v rané fázi apoptózy při koncentraci $1 \text{ }\mu\text{M}$ a $5 \mu\text{M}$. Lze tedy říci, že právě v těchto koncentracích má daný fotosensitizer největší fotodynamický efekt a je tedy nejúčinnější.

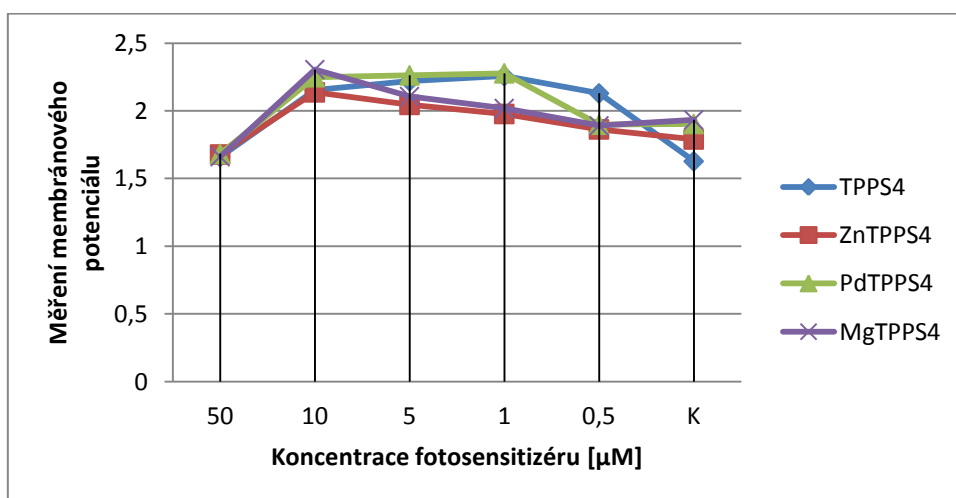
Porovnáním mikrotitračních destiček s buněčnými liniemi, které byly inkubovány 6 hodin a 24 hodin po ozáření zjistíme určitý rozdíl v počtu buněk v rané fázi apoptózy. Z toho lze odvodit, že u většiny nádorových buněk nastává apoptóza během prvních šesti hodin. Daný rozdíl však také zároveň naznačuje, že k apoptóze může docházet v delším časovém rozmezí.



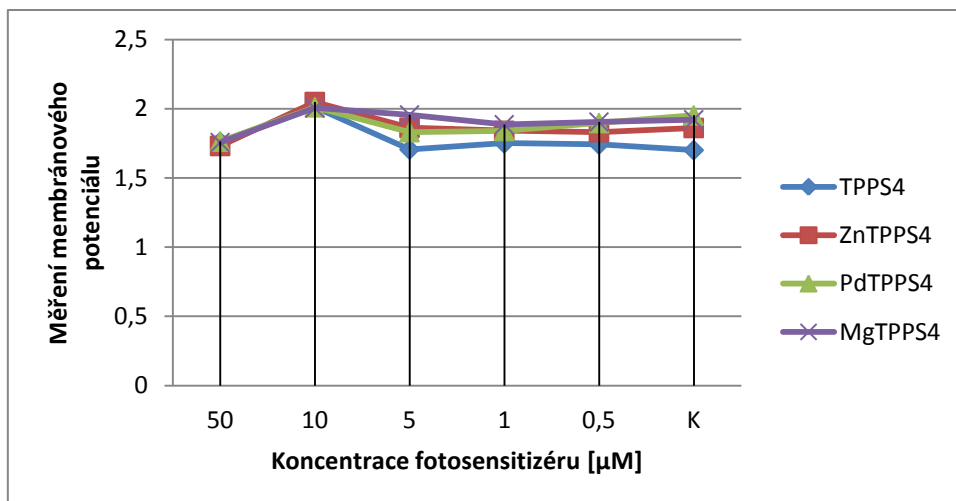
Graf 1: Závislost změny membránového potenciálu na koncentraci fotosenzitizérů při dávce záření 1 J/cm² (24 hod.).



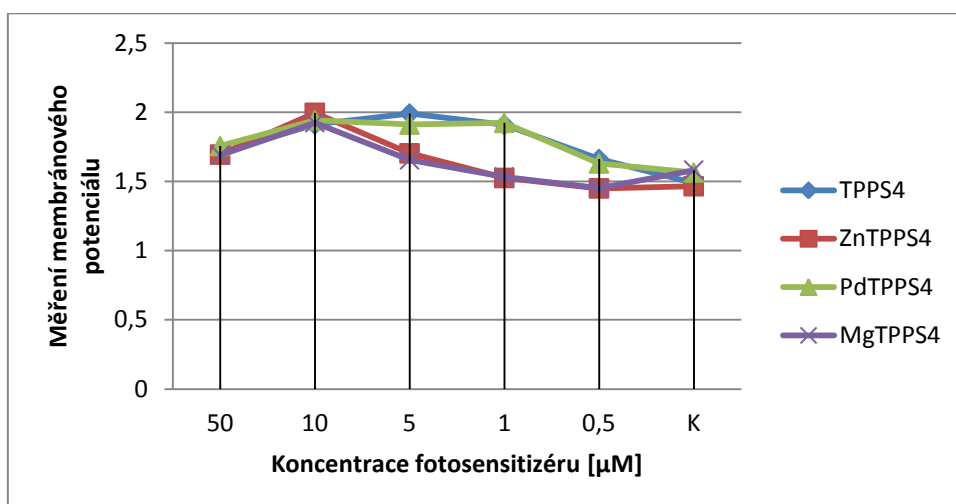
Graf 2: Závislost změny membránového potenciálu na koncentraci fotosenzitizérů při dávce záření 5 J/cm² (24 hod.).



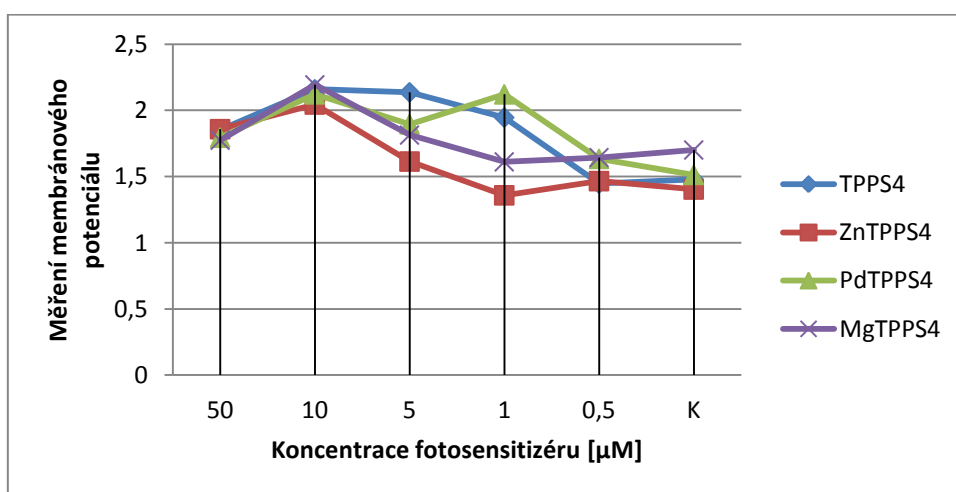
Graf 3: Závislost změny membránového potenciálu na koncentraci fotosenzitizérů při dávce záření 10 J/cm² (24 hod.).



Graf 4: Závislost změny membránového potenciálu na koncentraci fotosenzitizérů při dávce záření 1 J/cm^2 (6 hod.).



Graf 5: Závislost změny membránového potenciálu na koncentraci fotosenzitizérů při dávce záření 5 J/cm^2 (6 hod.).

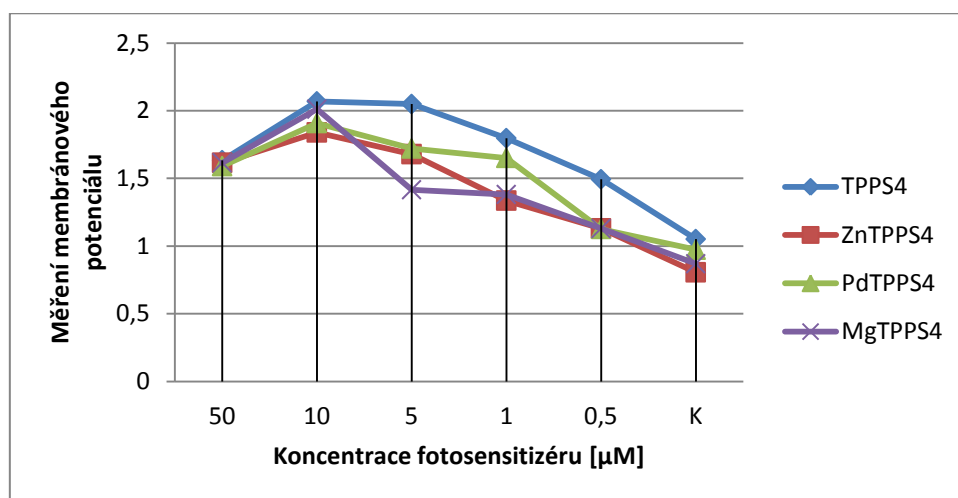


Graf 6: Závislost změny membránového potenciálu na koncentraci fotosenzitizérů při dávce záření 10 J/cm^2 (6 hod.).

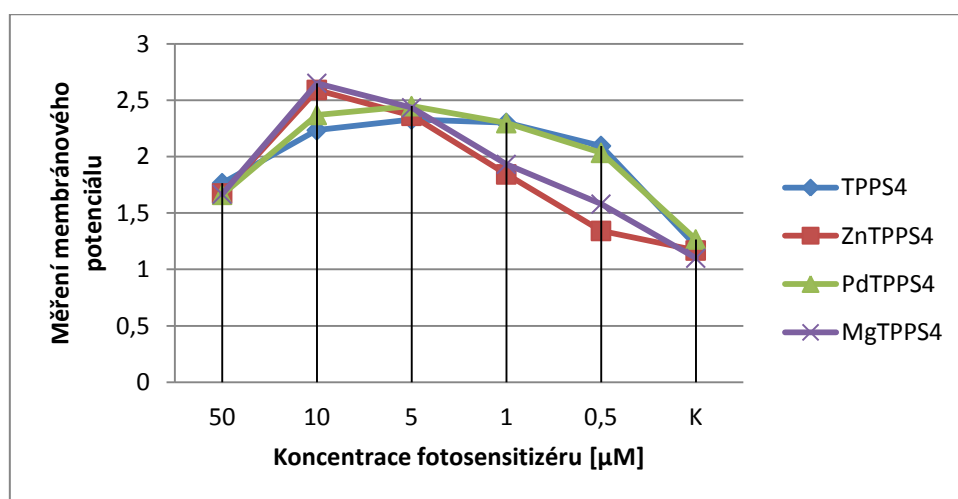
5.1.2 NIH3T3 BUNĚČNÉ LINIE (MYŠÍ FIBROBLASTY)

Stejně jako v případě G361 buněčných linií, i u NIH3T3 buněk nastává raná fáze apoptózy buněk nejvíce při koncentraci fotosensitizerů 10 μM . Pouze při dávce 10 J/cm^2 (24 hod.) a 1 J/cm^2 (6 hod.) byla nejúčinnější koncentrace odlišná.

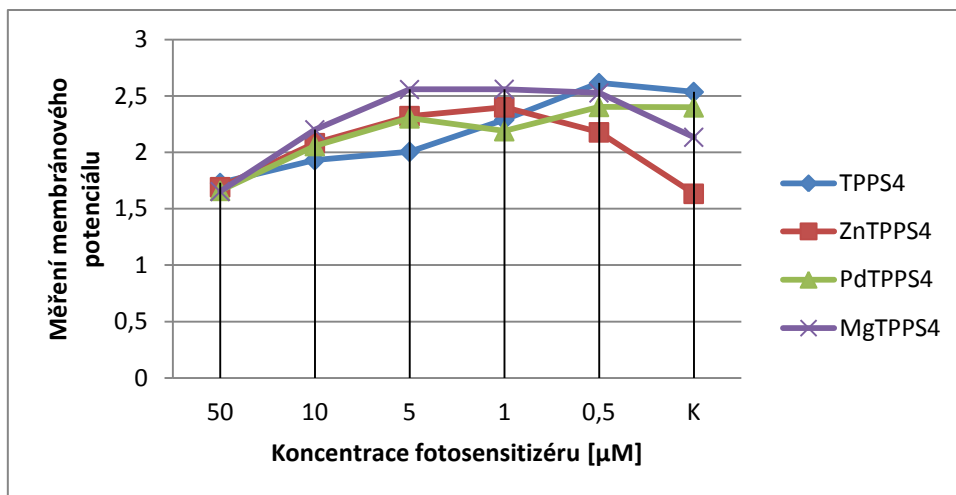
Při porovnání grafů (Graf 7 – 12) buněčných linií, které byly inkubovány 6 hodin a 24 hodin po ozáření dojdeme opět ke zjištění, že se hodnoty buněk, u kterých započala apoptóza, příliš neliší. I v tomto případě tedy apoptóza nastává během prvních šesti hodin inkubace.



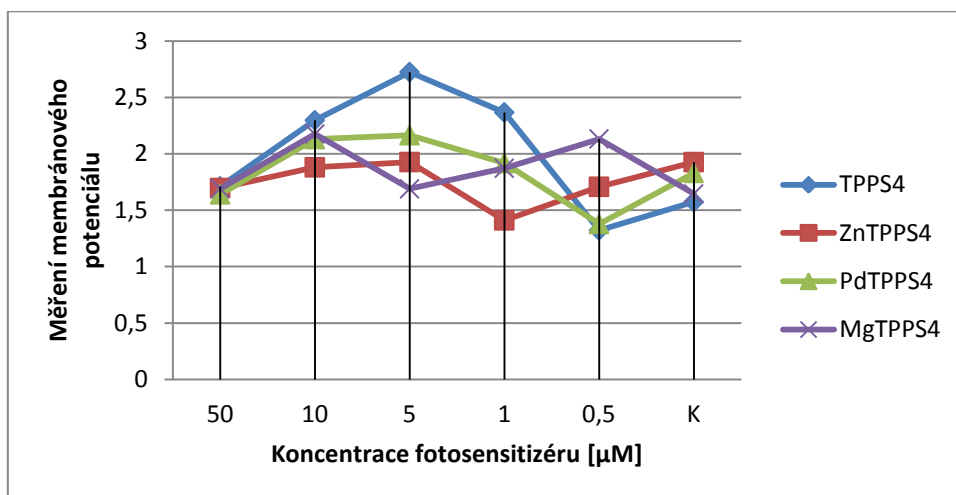
Graf 7: Graf závislosti změny membránového potenciálu na koncentraci fotosensitizerů při dávce záření 1 J/cm^2 (24 hod.).



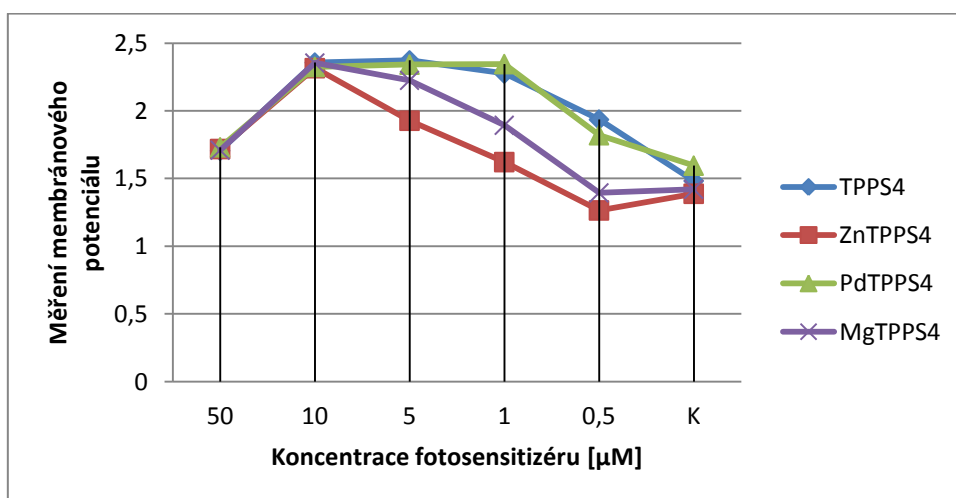
Graf 8: Graf závislosti změny membránového potenciálu na koncentraci fotosensitizerů při dávce záření 5 J/cm^2 (24 hod.).



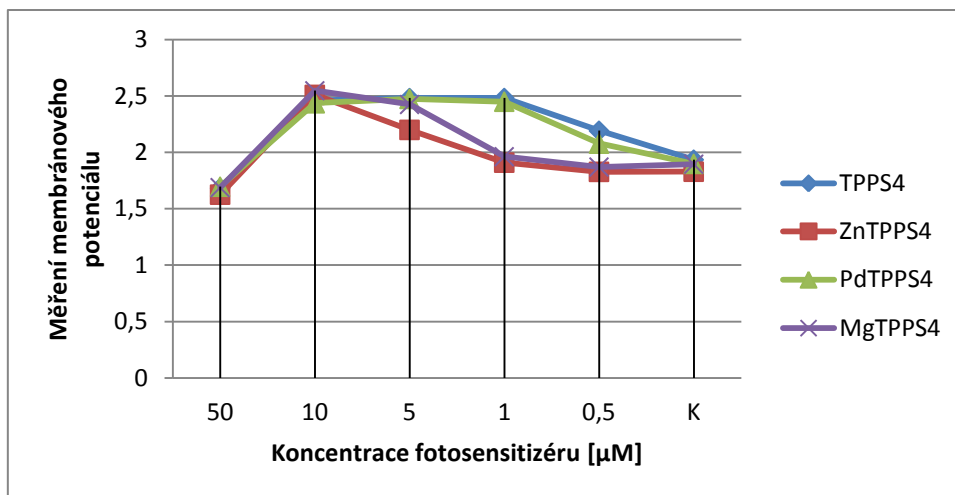
Graf 9: Graf závislosti změny membránového potenciálu na koncentraci fotosenzitizérů při dávce záření 10 J/cm² (24 hod.).



Graf 10: Graf závislosti změny membránového potenciálu na koncentraci fotosenzitizérů při dávce záření 1 J/cm² (6 hod.).



Graf 11: Graf závislosti změny membránového potenciálu na koncentraci fotosenzitizérů při dávce záření 5 J/cm² (6 hod.).



Graf 12: Graf závislosti změny membránového potenciálu na koncentraci fotosensitizerů při dávce záření 10 J/cm^2 (6 hod.).

5.2 DETEKCE APOPTÓZY, NEKRÓZY A PŘEŽIVŠÍCH BUNĚK

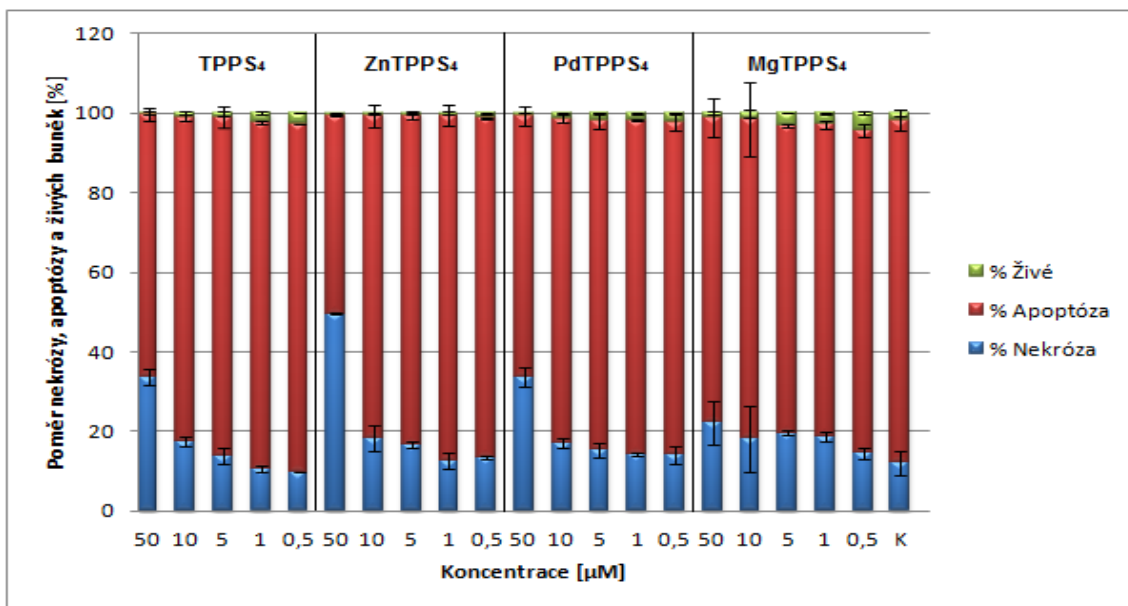
Po vložení destičky do fluorescenčního mikroskopu byla vybrána dvě náhodná místa v každé jamce, která pak byla vyfocena v červeném, zeleném a viditelném spektru. Na základě těchto fotografií byl spočítán počet apoptotických, nekrotických a přeživších buněk. Výsledky ze dvou míst jedné jamky byly poté zprůměrovány a převedeny na procenta (z celkového počtu buněk). Pro porovnání byly testovány destičky s buněčnými liniemi, které byly inkubovány 6 hodin a 24 hodin po ozáření. Pro lepší orientaci byly výsledky poté převedeny do grafu.

5.2.1 G361 BUNĚČNÉ LINIE (KOŽNÍ MELANOM)

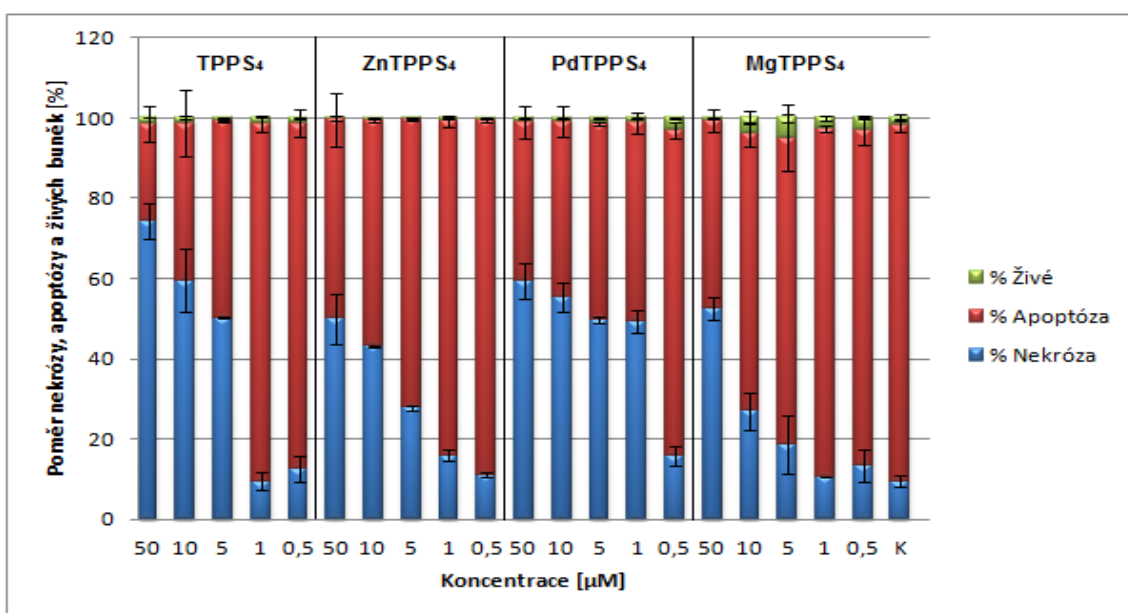
Z grafů (Graf 13 – 18) jsou patrné určité tendence. Lze pozorovat, že s klesající koncentrací fotosensitizeru klesá počet nekrotických buněk a zároveň roste počet apoptotických a přeživších buněk. Daný trend je patrný i v případě ZnTPPS_4 a MgTPPS_4 po dávce záření 10 J/cm^2 a 6 hodinách inkubace (Graf 18), kdy došlo i k určitému nárůstu počtu buněk, u kterých nastala nekróza.

Dále lze sledovat, že s rostoucí dávkou záření roste i počet buněk, u kterých nastala nekróza, a také klesá počet buněk, které podlehly apoptóze. Porovnáním buněčných linií, které byly inkubované 24 hodin s liniemi inkubovanými 6 hodin, můžeme pozorovat fakt, že po šesti hodinách je patrné větší množství živých buněk, než po 24 hodinách inkubace.

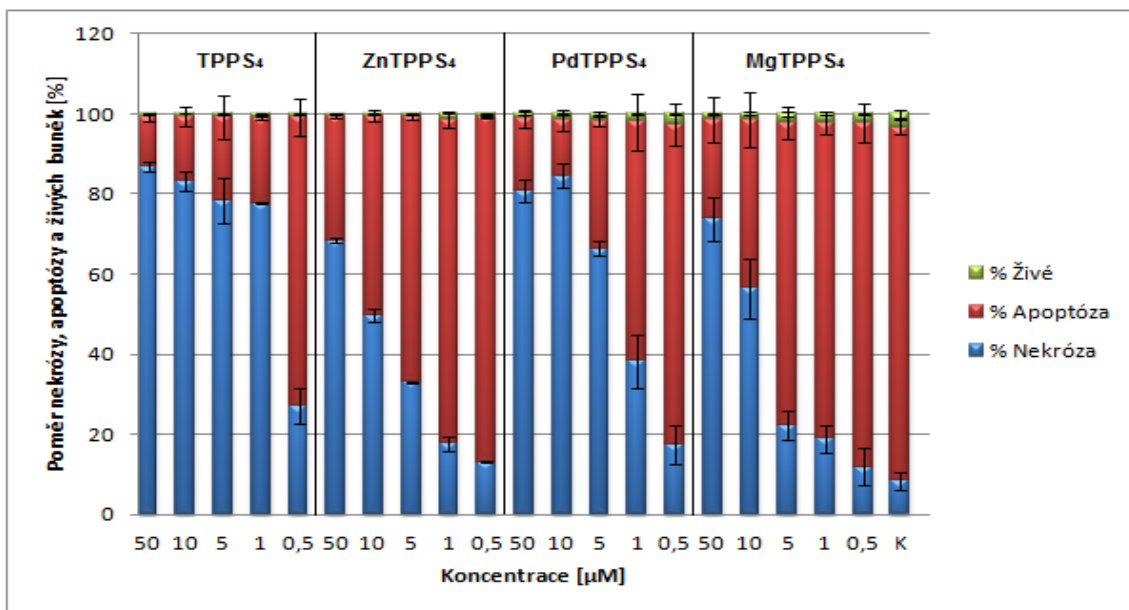
Jako neúčinnější fotosensitizer se jeví ZnTPPS_4 . Při jeho použití přežilo v porovnání s ostatními fotosensitizerými pouze minimum nádorových buněk.



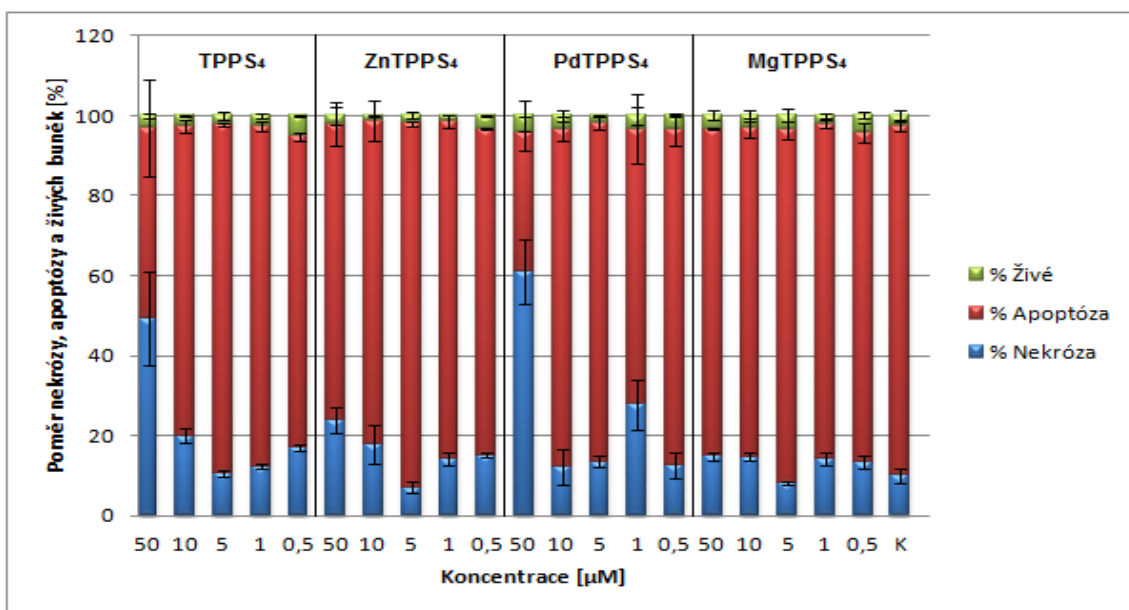
Graf 13: Poměr nekrózy, apoptózy a přeživších buněk v závislosti na koncentraci fotosensitizeru při dávce záření 1 J/cm² (24 hod.).



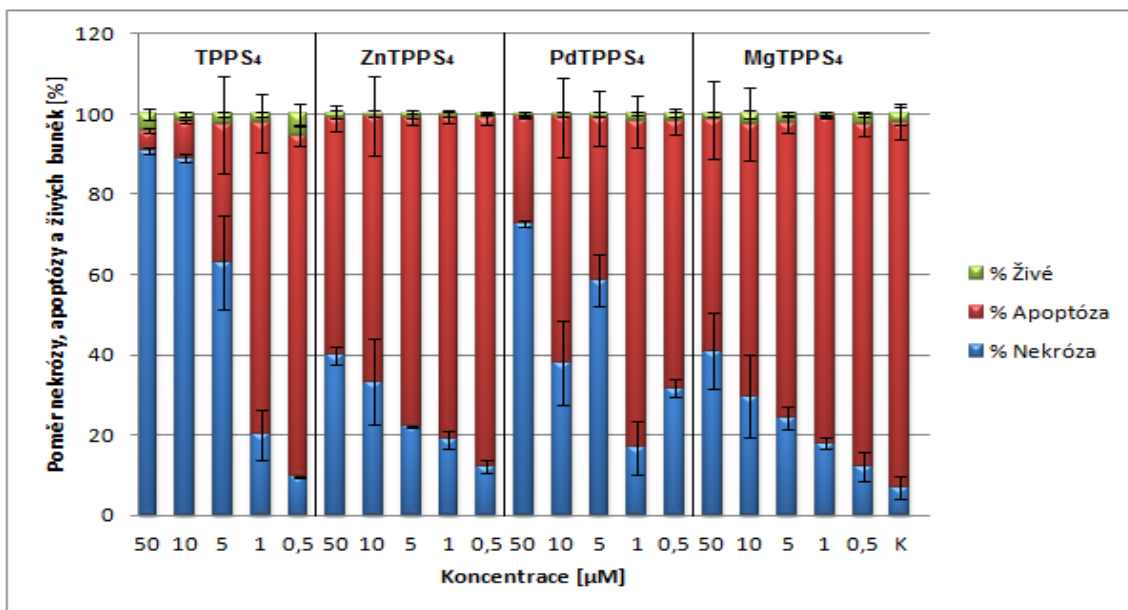
Graf 14: Poměr nekrózy, apoptózy a přeživších buněk v závislosti na koncentraci fotosensitizeru při dávce záření 5 J/cm² (24 hod.).



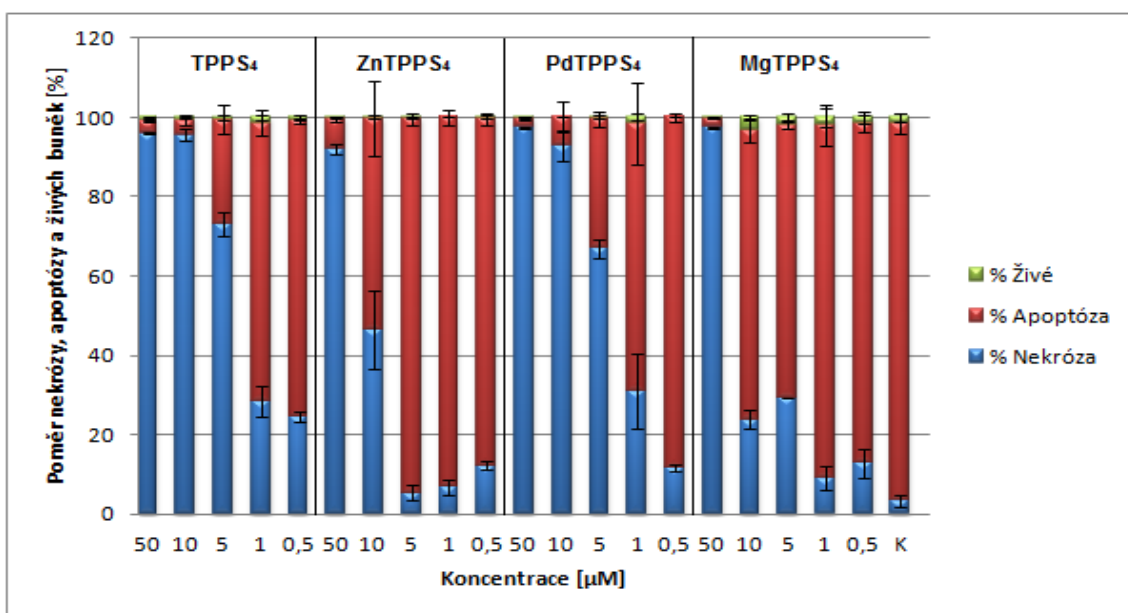
Graf 15: Poměr nekrózy, apoptózy a přeživších buněk v závislosti na koncentraci fotosensitizéru při dávce záření 10 J/cm² (24 hod.).



Graf 16: Poměr nekrózy, apoptózy a přeživších buněk v závislosti na koncentraci fotosensitizéru při dávce záření 1 J/cm² (6 hod.).



Graf 17: Poměr nekrózy, apoptózy a přeživších buněk v závislosti na koncentraci fotosensitizeru při dávce záření 5 J/cm² (6 hod.).



Graf 18: Poměr nekrózy, apoptózy a přeživších buněk v závislosti na koncentraci fotosensitizeru při dávce záření 10 J/cm² (6 hod.).

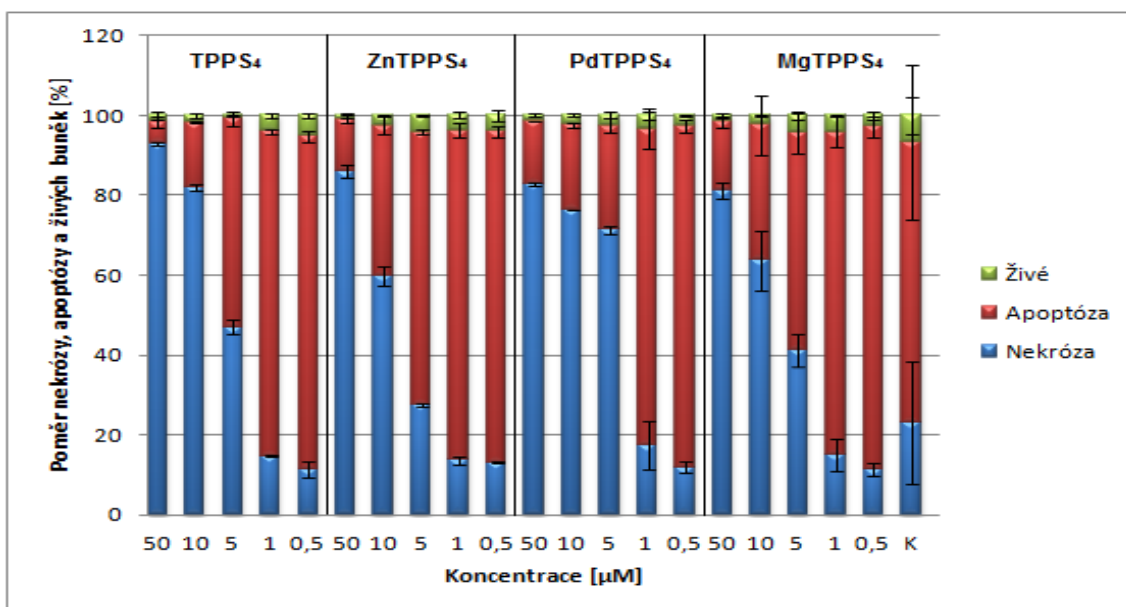
5.2.2 NIH3T3 BUNĚČNÉ LINIE (MYŠÍ FIBROBLASTY)

Při pohledu na grafy (Graf 19 – 24) lze pozorovat stejný trend jako v případě G361 buněčných linií. Počet apoptotických a přeživších buněk roste s klesající koncentrací fotosensitizeru.

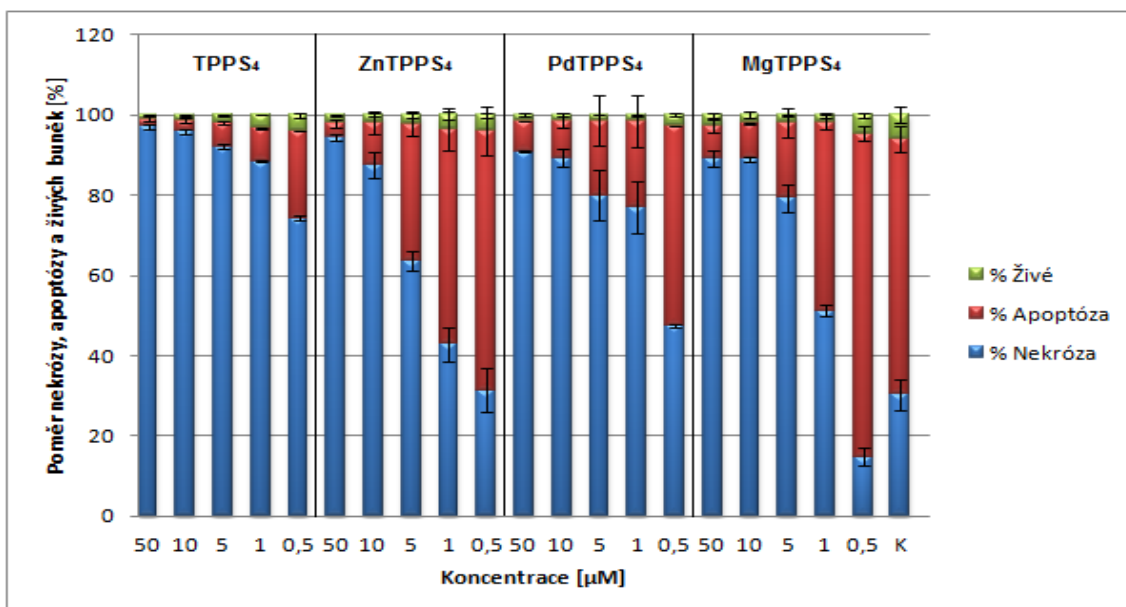
S rostoucí dávkou záření je také patrný nárůst počtu nekrotických buněk na úkor apoptotických. Při porovnání grafů buněčných linií inkubovaných 6 hodin a 24 hodin zjistíme,

že po 6 hodinách je přítomno více buněk usmrcených nekrózou. S postupem času se tedy výrazněji mění počet apoptotických buněk než nekrotických.

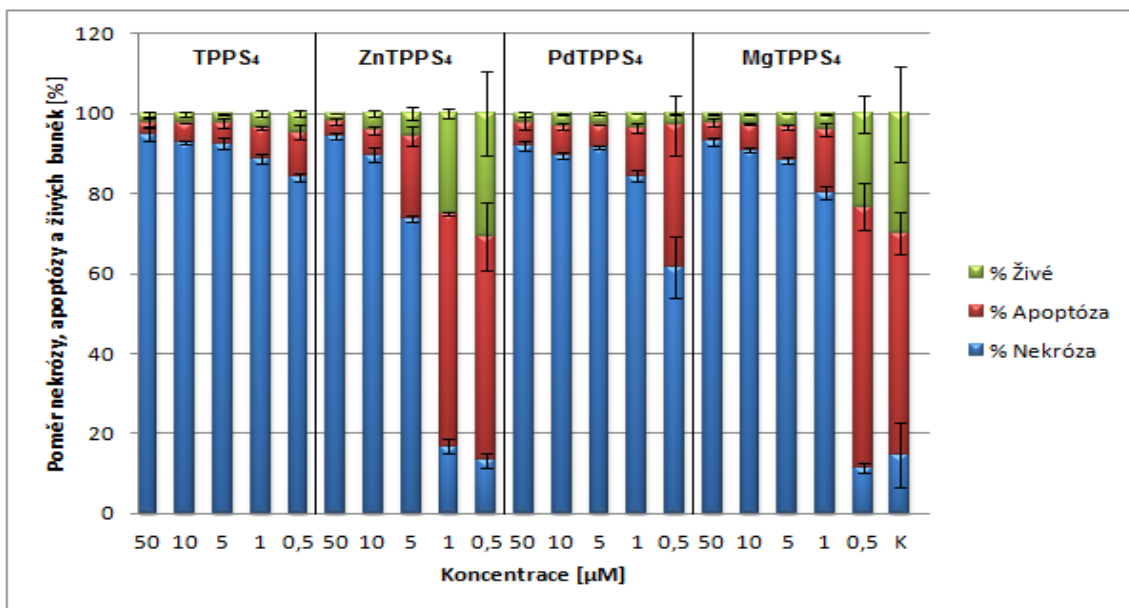
Nejúčinnějšími fotosensitizéry byly ZnTPPS₄ a MgTPPS₄. Při jejich použití přežilo nejvíce nenádorových buněk. Srovnáním počtu přeživších buněk G361 a NIH3T3 buněčných linií je patrné, že fotodynamická terapie měla více ničivý účinek na nádorové buňky G361 buněčné linie.



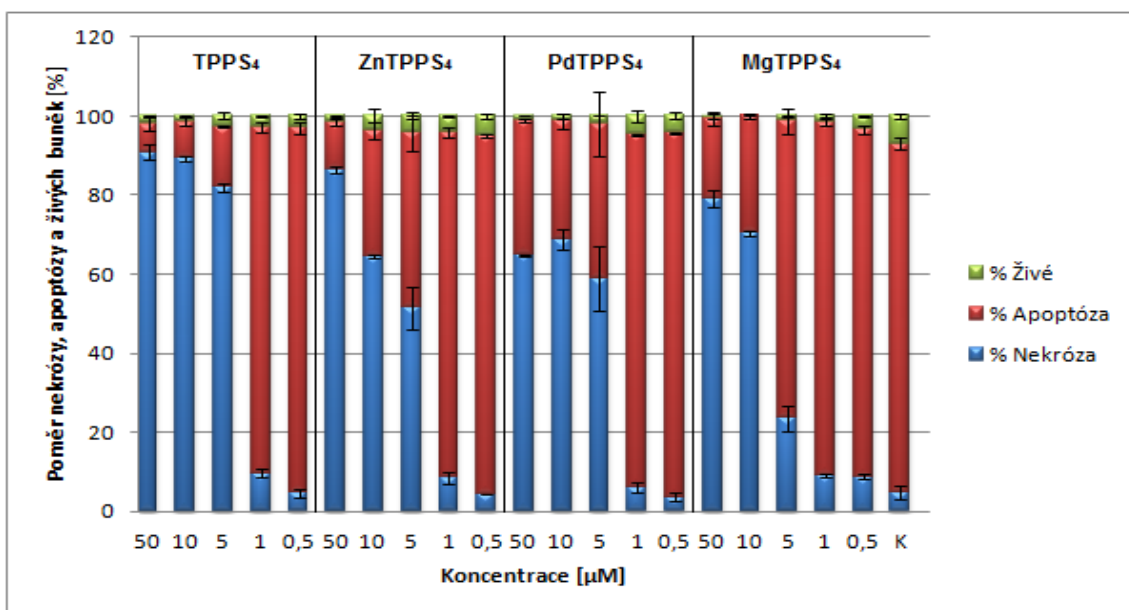
Graf 19: Graf znázorňující poměr nekrózy, apoptózy a přeživších buněk v závislosti na koncentraci fotosensitizéru při dávce záření 1 J/cm² (24 hod.).



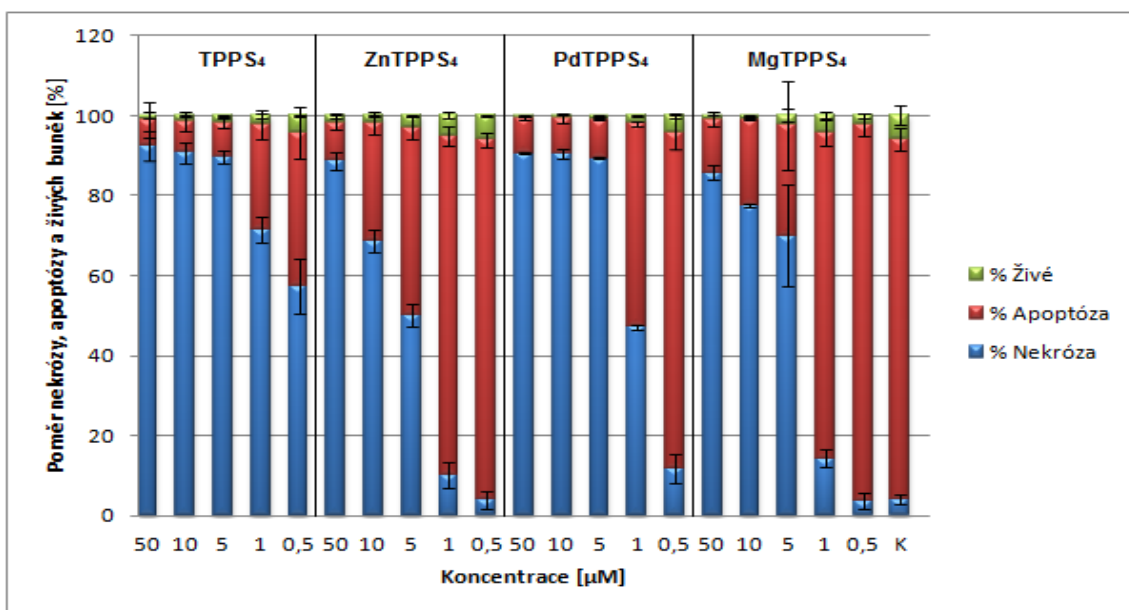
Graf 20: Graf znázorňující poměr nekrózy, apoptózy a přeživších buněk v závislosti na koncentraci fotosensitizéru při dávce záření 5 J/cm² (24 hod.).



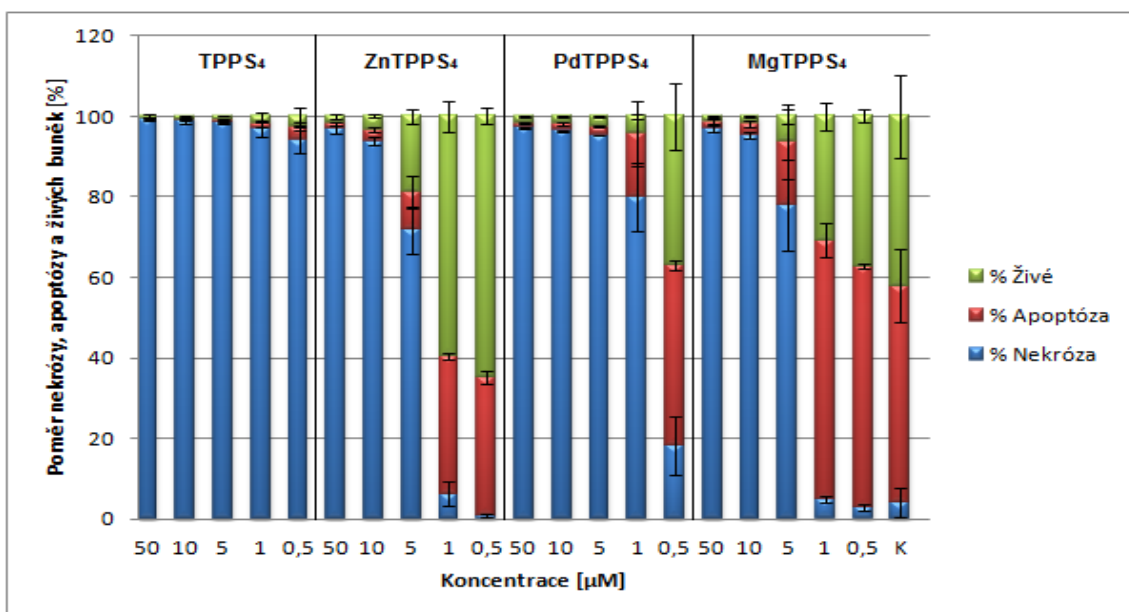
Graf 21: Graf znázorňující poměr nekrózy, apoptózy a přeživších buněk v závislosti na koncentraci fotosenzitizéru při dávce záření 10 J/cm² (24 hod.).



Graf 22: Graf znázorňující poměr nekrózy, apoptózy a přeživších buněk v závislosti na koncentraci fotosenzitizéru při dávce záření 1 J/cm² (6 hod.).



Graf 23: Graf znázorňující poměr nekrózy, apoptózy a přeživších buněk v závislosti na koncentraci fotosenzitizéru při dávce záření 5 J/cm² (6 hod.).



Graf 24: Graf znázorňující poměr nekrózy, apoptózy a přeživších buněk v závislosti na koncentraci fotosenzitizéru při dávce záření 10 J/cm² (6 hod.).

5.3 MTT TEST

Po vložení destičky s buněčnými liniemi do Synergy HT readeru byly získány hodnoty fluorescence. Z těchto hodnot byly poté pomocí programu Phototox 2.0 získány jednotlivé LC 50 (letální koncentrace) každého fotosenzitizéru při určité dávce záření.

Hodnoty LC 50 v tabulce (Tab. 2 a Tab. 3) charakterizují koncentraci fotosenzitizéru, která je potřeba pro zničení 50 % všech buněk. Z výsledků je patrné, že pro zničení 50 %

všech nádorových buněk je potřeba méně koncentrovaného fotosensitizeru než pro zničení 50 % všech nenádorových buněk. Jako nejúčinnější se jeví fotosensitizer ZnTPPS₄, kterého je při všech dávkách záření potřeba nejmenší koncentrace pro zničení 50 % všech nádorových buněk a naopak největší pro zničení 50 % všech nenádorových buněk.

Tab. 2: LC 50 [μM] jednotlivých fotosensitizerů při dávce záření 1 J/cm², 5 J/cm² a 10 J/cm² (G361 buněčné linie)

	1 J/cm ²	5 J/cm ²	10 J/cm ²
TPPS₄	4,239	1,209	0,667
ZnTPPS₄	2,467	0,617	0,253
PdTPPS₄	5,641	1,995	1,196
MgTPPS₄	4,122	1,021	0,257

Tab. 3: LC 50 [μM] jednotlivých fotosensitizerů při dávce záření 1 J/cm², 5 J/cm² a 10 J/cm² (NIH3T3 buněčné linie)

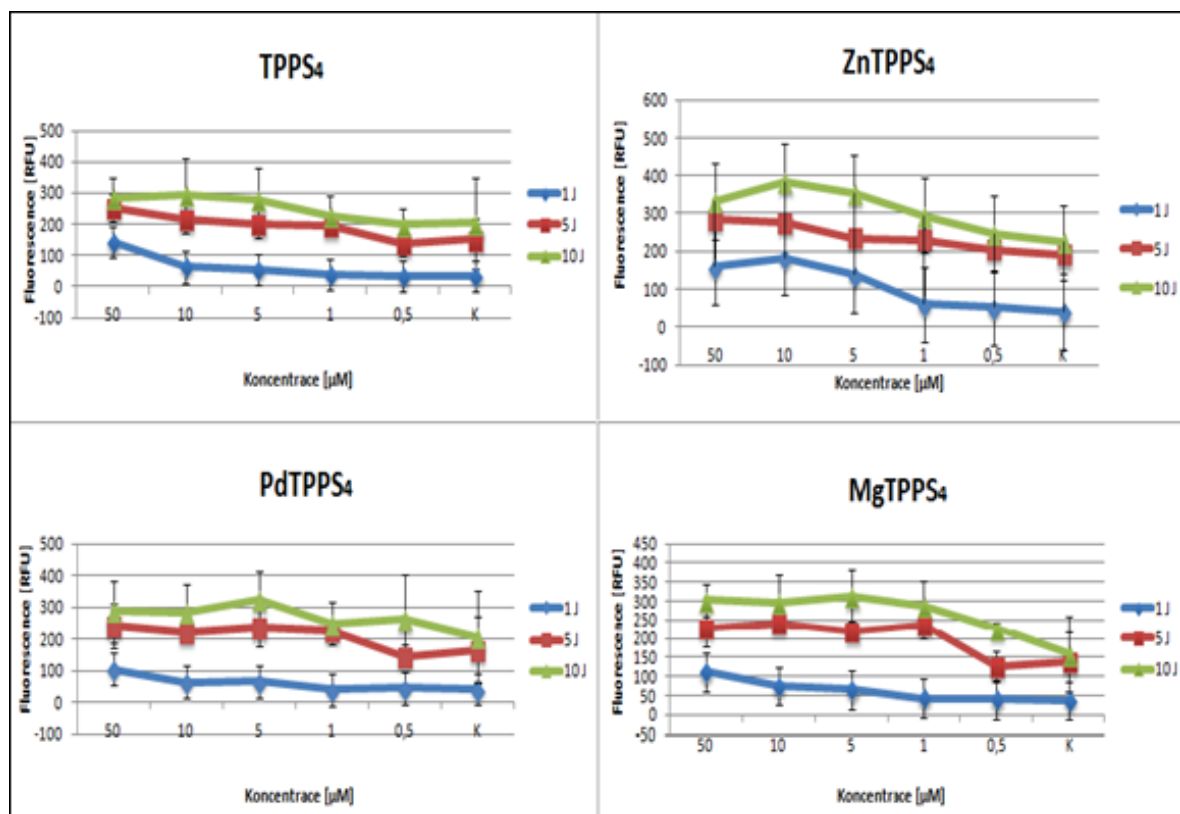
	1 J/cm ²	5 J/cm ²	10 J/cm ²
TPPS₄	6,194	2,170	0,795
ZnTPPS₄	15,737	3,089	2,312
PdTPPS₄	8,236	2,797	2,047
MgTPPS₄	8,03	2,939	2,086

5.4 DETEKCE ROS

Fluorescenční reader podrobí buňky kinetické analýze. Při ní dochází každou minutu k měření intenzity fluorescence, a tím tedy i k detekci množství ROS. Analýza trvala deset minut. Kinetické měření se provádí proto, že přesněji ukazuje nárůst ROS než měření pouze v jednom časovém bodě. Na konci analýzy jsou výsledky zpracovány do tabulek. Pro větší přehlednost byly tyto tabulky zpracovány do grafů.

5.4.1 G361 BUNĚČNÉ LINIE (KOŽNÍ MELANOM)

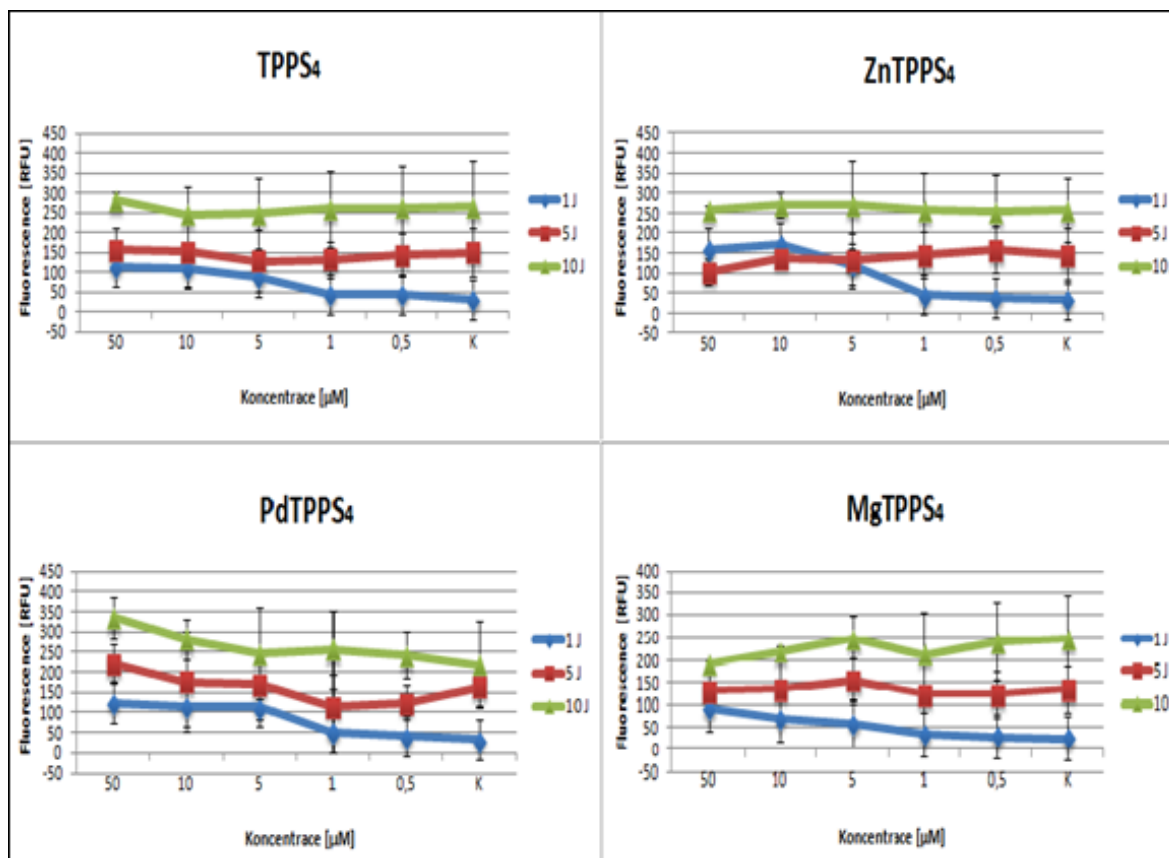
Hodnota fluorescence v tomto případě odpovídá i množství přítomného ROS. Výsledky (Graf 25) naznačují, že s rostoucí dávkou záření roste i množství ROS. Zároveň je také vidět, že se množství ROS zvětšuje s rostoucí koncentrací fotosensitizeru.



Graf 25: Minutový přírůstek fluorescence v závislosti na koncentraci fotosensitizerů při jednotlivých dávkách záření.

5.4.1 NIH3T3 BUNĚČNÉ LINIE (MYŠÍ FIBROBLASTY)

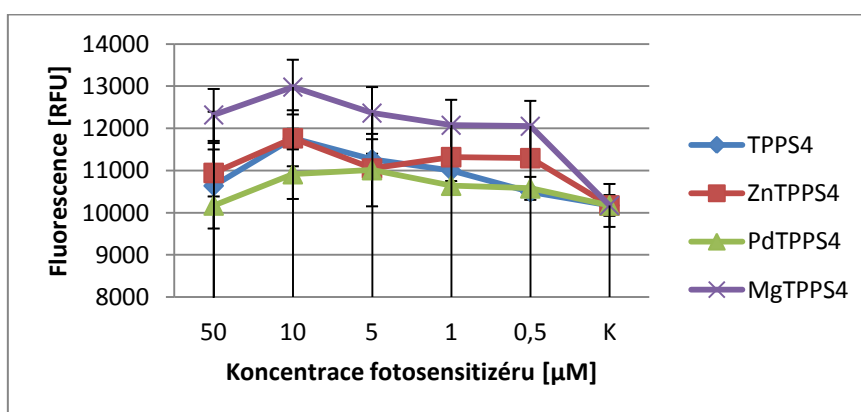
Stejně jako v případě G361 buněčných linií, i zde je patrné, že s vyšší dávkou záření roste i množství ROS (Graf 26). V tomto případě však nedochází k nárůstu množství ROS se zvyšující se množstvím fotosensitizeru, ale je spíše lineární. Důvodem je, že zde nedochází k selektivnímu vychytávání fotosensitizeru, jako tomu bylo u G361 buněk. Díky tomu není fotodynamická terapie tak účinná a nedochází k tolika reakcím, které vedou k tvorbě ROS.



Graf 26: Minutový přírůstek fluorescence v závislosti na koncentraci fotosenzitizérů při jednotlivých dávkách záření.

5.5 DETEKCE Ca^{2+} IONTŮ

Po vložení do Infinite M200 Pro readeru byla změřena hodnota fluorescence, která korespondovala s množstvím přítomných Ca^{2+} iontů. V grafu (Graf 27) lze pozorovat, že se fluorescence (množství Ca^{2+} iontů) zvyšuje s rostoucí koncentrací fotosenzitizéru, a to až do 10 μM . Z toho lze usoudit, že právě při koncentraci 10 μM byla fotodynamická terapie nejúčinnější.



Graf 27: Graf závislosti fluorescence na koncentraci fotosenzitizéru.

6 DISKUZE

Fotodynamická terapie je neinvazivní léčebná metoda, která využívá při léčbě fotosensitivní látku a záření. Ozáření fotosenzitizeru spustí kaskádu reakcí, která prostřednictvím cytotoxických látek zapříčiní poškození a destrukci nádorových buněk.

Podle Allisona a kol. (2006) se fotosenzitizer hromadí převážně v nádorové tkáni. Naše studie tento fakt potvrzuje. Při pohledu na nádorové G361 buněčné linie (Graf 25) a nenádorové NIH3T3 buněčné linie (Graf 26) je vidět, že v případě nádorových buněk došlo ke vzniku většího množství ROS. Stejný výsledek je patrný i z hodnot LC 50 (Tab. 2 a Tab. 3). Pro zničení 50 % všech nenádorových buněk NIH3T3 buněčné linie je potřeba větší koncentrace fotosenzitizeru, než pro zničení 50 % všech nádorových buněk G361 buněčné linie. Důvodem je právě větší afinita fotosenzitizerů k nádorovým buňkám. Díky tomu může během fotodynamické terapie vznikat více cytotoxických ROS, které se podílí na destrukci buňky.

Plaetzer a kol. (2003) ve své práci popisuje nekrózu jako velmi rychlý proces, který je zapříčiněn extrémními vnějšími podmínkami, jako je například teplota či tlak. Ve fotodynamické terapii tyto extrémní podmínky představuje záření, které je potřebné pro aktivaci fotosenzitizeru a zejména pak vysoká koncentrace samotného fotosenzitizeru. Při porovnání G361 buněčných linií, které byly inkubovány 6 hodin po ozáření (Graf 16 – 18) a 24 hodin po ozáření (Graf 13 – 15), lze pozorovat, že pouhá delší doba inkubace po ozáření nemá vliv na nárůst počtu nekrotických buněk, ale pouze apoptotických buněk. Z toho vyplývá, že buňky G361 buněčné linie podlely nekróze v prvních šesti hodinách inkubace (respektive ihned po ozáření), a to v důsledku extrémních vnějších vlivů – záření a koncentrace fotosenzitizeru. Stejný trend lze pozorovat i v případě NIH3T3 buněčných linií (Graf 19 – 24).

Čím silnější (extrémnější) vnější podmínky působící na buňky jsou, tím více buněk bude nekróze podléhat. Tuto závislost se podařilo potvrdit i v naší práci (Graf 13 – 15). V grafech je patrné, že s rostoucí dávkou záření a fotosenzitizeru roste i množství nekrotických buněk.

Castano a kol. (2005) definují apoptózu jako velmi složitý proces, který zahrnuje mnoho kroků vedoucích k buněčné smrti. Právě nutnost splnit určité podmínky, které spustí apoptózu, může způsobit, že k apoptóze dojde až za delší dobu. Srovnáme-li grafy G361 buněčné linie po 6 hodinové inkubaci (Graf 4 – 6) s grafy po 24 hodinové inkubaci (Graf 1 – 3), můžeme pozorovat, že došlo k nárůstu počtu apoptotických buněk.

Kolářová a kol. (2007) se ve své studii zabývali porovnáváním fotosenzitizerů. Pro výzkum používala TPPS₄, PdTPPS₄ a ZnTPPS₄. Z jejich výsledků vyplývá, že životnost buněk kožního melanomu klesá s rostoucí koncentrací fotosenzitizerů. Naše práce tyto

výsledky potvrdila. Při pohledu na grafy G361 buněčných linií (Graf 13 – 15) lze tento pokles životnosti s rostoucí koncentrací jasně vidět.

Kolářová a kol. (2007) také zkoumali vliv dávky záření na životnost G361 buněčné linie. Z pokusu, který prováděli při dávkách záření 1 J/cm² a 5 J/cm², je patrné, že životnost buněk klesá s rostoucí dávkou záření. Výsledky (Graf 13 – 15) naší práce, které zahrnovaly i dávku záření 10 J/cm², jejich pokus potvrdily.

Vápenaté ionty jsou druzí poslové, kteří se podílí na spouštění apoptózy. Ding a kol. (2004) ve své studii prokázali, že během fotodynamické terapie dochází k nárůstu množství Ca²⁺ iontů, které se poté mohou podílet na spuštění apoptózy. V naší studii se nám podařilo tyto výsledky potvrdit. Přestože jsme naši práci z časových důvodů a kvůli optimalizaci podmínek nestihli dokončit, je i z částečných výsledků (Graf 27) patrné rostoucí množství vápenatých iontů se zvyšující se koncentrací fotosensitizeru.

Můžeme tedy konstatovat, že se výsledky naší práce shodují s výsledky jiných výzkumných pracovníků. Určité odchylky v získaných hodnotách lze přisoudit specifickým pracovním podmínkám různých laboratoří. Dalším důvodem může být nechtěné vystavení citlivého fotosensitizeru běžnému světlu, které mohlo celkové výsledky mírně ovlivnit.

7 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo ověřit, jaký vliv mají fotosensitivní látky (TPPS₄, ZnTPPS₄, PdTPPS₄ a MgTPPS₄) na G361 buněčné linie (buňky kožního melanomu) a NIH3T3 buněčné linie (myší fibroblasty). Toto ověření bylo prováděno při různých dávkách záření (1 J/cm², 5 J/cm² a 10 J/cm²), a to detekcí apoptózy, měřením reaktivních forem kyslíku, detekcí změn mitochondriálního membránového potenciálu, detekcí intracelulárního vápníku a stanovením cytotoxicity.

Výsledky měření membránového potenciálu naznačují, že u buněk nastala raná fáze apoptózy nejvíce při koncentraci fotosensitizeru 10 μM. Jelikož je cílem fotodynamické reakce navodit u buněk programovanou buněčnou smrt (apoptózu), lze konstatovat, že dané fotosensitizery byly nejaktivnější a zároveň tedy i neúčinnější při koncentraci 10 μM. Pouze TPPS₄ a PdTPPS₄ v některých případech vykazovaly větší účinnost při 1 μM a 5 μM.

Mnohem více odhalily výsledky, které detekovaly apoptózu, nekrózu a přeživší buňky. Z grafů G361 buněčné linie jsou s rostoucí dávkou záření patrné dvě věci. V prvním případě lze vidět nárůst počtu buněk, které podlely nekróze. V druhém případě lze pozorovat počet buněk, které přežily. Z výsledků je patrná tendence, kdy s klesající koncentrací fotosensitizerů klesá jak počet buněk, které podlely apoptóze, tak i počet přeživších buněk.

Přehled o tom, k jakým změnám dochází v určitém časovém úseku, poskytují výsledky G361 buněčných linií, které byly inkubovány 6 hodin a 24 hodin. Srovnáním grafů můžeme dojít k závěru, že buňky podléhají nekróze v prvních 6 hodinách, respektive ihned po ozáření, a s postupem času nedochází k významnému nárůstu. Apoptóze buňky podléhají převážně také v prvních 6 hodinách, avšak i po 24 hodinách lze vidět určitý nárůst apoptotických a pokles živých buněk.

Z práce lze také vyvodit, jaký vliv mají fotosensitizery na nenádorové buňky (myší fibroblasty) v porovnání s nádorovými buňkami (kožní melanom). Fotosensitizer by se měl přednostně hromadit v nádorových buňkách. Z toho vyplývá, že podléhat apoptóze by měli spíše nádorové buňky a přežít nenádorové buňky. Při porovnání G361 buněčných linií a NIH3T3 buněčných linií je patrné, že větší počet buněk, které podlely apoptóze se nachází ve G361 buněčných liniích. Naopak počet buněk, které přežily, byl větší v případě NIH3T3 buněčných liniích.

Hodnoty LC 50 představují koncentraci fotosensitizeru, při které je zničeno 50 % všech buněk. Z tabulek je patrné, že pro zničení 50 % všech nádorových buněk G361 buněčné linie je potřeba méně koncentrovaný fotosensitizer, než pro zničení 50 % všech nenádorových buněk NIH3T3 buněčné linie. Tento fakt opět potvrzuje větší afinitu fotosensitizeru k nádorovým buňkám.

Dosažené výsledky při detekci vápenatých iontů naznačují, že fotodynamická terapie ovlivňuje i množství Ca^{2+} iontů, které se jako druzí poslové podílejí na spuštění apoptózy.

Mezi cíle práce patřilo porovnání fotosensitizerů na základě provedených metod. Jako nejúčinnější fotosensitizer se označuje ten, který zničí 100 % nádorových buněk a poškodí nenádorové buňky pouze minimálně. V porovnání s ostatními fotosensitizéry zničil nejvíce nádorových buněk fotosensitizer ZnTPPS_4 , a to při všech dávkách záření. Zároveň vykazoval velkou účinnost i při velmi nízkých koncentracích. Spolu s MgTPPS_4 měl také nejmenší vliv na nenádorové buňky, proto jich při použití těchto dvou fotosensitizerů přežilo nejvíce. Podle výsledků LC 50 to je právě ZnTPPS_4 , kterého je potřeba nejméně pro zničení 50 % všech nádorových buněk a naopak nejvíce pro zničení 50 % všech nenádorových buněk. Jako nejúčinnější fotosensitizer v porovnání s ostatními lze tedy na základě výsledků označit ZnTPPS_4 .

Naše studie prokázala účinnost fotodynamické terapie na nádorové buňky, její závislost na koncentraci fotosensitizeru a dávce záření, vliv na množství intracelulárního vápníku, a také potvrdila větší afinitu fotosensitizeru k nádorovým buňkám.

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., 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.

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

Brancaleon, L., Moseley, H. (2002): Laser and non light sources for photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 17: 173 – 186.

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.

Ding, X., Xu, Q., Liu, F., Zhou, P., Gu, Y., Zeng, J., An, J., Dai, W., Li, X. (2004): Hematoporphyrin monomethyl ether photodynamic damage on HeLa cells by means of reactive oxygen species production and cytosolic free calcium concentration elevation. *Cancer Letters* 216: 43 – 54.

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.

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

Lang, K., Schulte, K.-W., Ruzicka, T., Fritsch, C. (2001): Aminolevulinic acid (Levulan) in photodynamic therapy of actinic keratoses. *Skin Therapy Letter* 6: 1 – 2.

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.

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

Mitra, A., Stables, G.I. (2006): Topical photodynamic therapy for non-cancerous skin conditions. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 3: 116 – 127.

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

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.

Nováková, V., Miletín, M., Kopecký, K., Zimčík, P. (2011): Red emitting dyes with photophysical and photochemical properties controlled by pH. *Chemistry, A European Journal* 17: 14273 – 14282.

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

Paszko, E., Ehrhardt, C., Senge, M.O., Kelleher, D.P., Reynolds, J.V. (2011): Nanodrug applications in photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 8: 14 – 29.

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.

Quon, H., Grossman, C.E., Finlay, J.C., Zhu, T.C., Clemmens, C.S., Malloy, K.M., Busch, T.M. (2011): Photodynamic therapy in the management of pre-malignant head and neck mucosal dysplasia and microinvasive carcinoma. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 8: 75 – 85.

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.

Zimčák, P., Miletín, M. (2004): Fotodynamická terapie jako nová perspektivní metoda léčby nádorových onemocnění – I. Historie, základní princip. *Česká a slovenská farmacie* 5: 219 – 224.

Zimčák, P., Miletín, M. (2004): Fotodynamická terapie jako nová perspektivní metoda léčby nádorových onemocnění – I. Přehled fotosensitizerů. *Česká a slovenská farmacie* 6: 271 – 279.

<http://www.tecan.com/platform/apps/product/index.asp?MenuID=2252&ID=4015&Menu=1&Item=21.2.10.7>

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

Ag-dye laser	argonovým laserem stimulovaný barevný laser
ALA	kyselina 5-aminolevulinová
G361	buněčné linie kožního melanomu
HBr	kys bromovodíková
HDL	lipoproteiny o nízké hustotě
HpD	derivát hematoporphyrinu
LED	světlo emitující diody
LDL	lipoproteiny o vysoké hustotě
MgTPPS ₄	hořečnatý derivát TPPS ₄
MTT	thiazolyl blue tetrazolium bromid
NIH3T3	buněčné linie myších fibroblastů
nm	nanometr
PDT	fotodynamická terapie
PdTPPS ₄	paladnatý derivát TPPS ₄
PS	fotosensitizer
ROS	reaktivní formy kyslíku
TPPS ₄	<i>meso</i> -tetrakis(4-sulfonatofenyl) porfyrin
ZnTPPS ₄	zinečnatý derivát TPPS ₄