

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI

DOKTORSKÁ DIZERTAČNÍ PRÁCE

**FOTODYNAMICKÁ TERAPIE A DIAGNOSTIKA
V DERMATOLOGII**

**PHOTODYNAMIC THERAPY AND
DIAGNOSTIC IN DERMATOLOGY**

Doktorand: MUDr. DENISA KACEROVSKÁ

Školitel: Prof. MUDr. KAREL PIZINGER, CSc. (2004-2006)
Prof. MUDr. VLADIMÍR RESL, CSc. (2002- 2004)

Plzeň, 2007

OBSAH:

1.	Přehled o současném stavu problematiky	
1.1.	Úvod	str. 4
1.2.	Historie	str. 4-5
1.3.	Princip fotodynamické terapie a diagnostiky	str. 5-7
1.4.	Zdroj světla	str. 7
1.5.	Kyslík	str. 8
1.6.	Fotosenzibilizátory	str. 8-16
1.6.1.	Úvod	str. 9
1.6.2.	Rozdělení fotosenzibilizátorů	str. 9
1.6.2.1.	Systémové fotosenzibilizátory I.generace	str. 9-10
1.6.2.2.	Systémové fotosenzibilizátory II.generace	str. 10-16
1.6.2.2a	<i>Sloučeniny odvozené od porfínů</i>	str. 10-13
1.6.2.2a.1.	<i>Chloriny (Chlorins)</i>	str. 10-11
1.6.2.2a.2.	<i>Ftalocyaniny (Phthalocyanines)</i>	str. 12
1.6.2.2a.3.	<i>Texafyriny (Texaphyrins)</i>	str. 12-13
1.6.2.2a.4.	<i>Bakteriochlorofyl a jiné deriváty</i>	str. 13
1.6.2.2b	<i>Sloučeniny neporfyrinického původu</i>	str. 13-16
1.6.2.2b.1.	<i>Chinony (Quinones)</i>	str. 13-14
1.6.2.2b.2.	<i>Xantény (Xanthenes)</i>	str. 14-15
1.6.2.2b.3.	<i>Cyaniny (Cyanines)</i>	str. 15
1.6.2.2b.4.	<i>Kationtová barviva (Cationic dyes)</i>	str. 16
1.7.	Kyselina 5-aminolevulová (5-ALA)	str. 16-19
1.7.1.	Syntéza hemu a její regulace	str. 17-18
1.7.2.	Následky exogenního podání 5-ALA	str. 18-19
1.7.3.	Absorpční a fluorescenční spektra PPIX	str. 19
1.8.	Hypericin	str. 20-24
1.8.1.	Buněčná smrt: apoptóza a nekróza	str. 21
1.8.2.	Hypericin jako fotosenzibilizátor ve fotodynamické terapii	str. 21-23
1.8.3.	Absorpční a fluorescenční spektra hypericinu	str. 23-24
1.9.	Indikační spektrum fotodynamické diagnostiky v dermatologii	str. 24-32
1.9.1.	PDT a aktinické keratózy	str. 25-27
1.9.2.	PDT a bazocelulární karcinom	str. 27-30
1.9.3.	PDT a morbus Bowen	str. 30-31
1.9.4.	PDT a zánětlivé dermatózy	str. 31-32
1.9.5.	PDT a fotorejuvenation	str. 32
1.9.6.	PDT jako prevence nemelanomových nádorů kůže u imunosuprimovaných nemocných	str. 32
1.10.	Využití fotodynamické diagnostiky v dermatologii	str. 32-33
1.11.	Uplatnění PDT a PDD v jiných lékařských oborech	str. 33
1.11.1.	Pneumologie	str. 33
1.11.2.	Gastroenterologie	str. 33
1.11.3.	Neurochirurgie	str. 33
1.11.4.	Gynekologie	str. 33
1.11.5.	Urologie	str. 33
1.11.6.	Oftalmologie	str. 33
1.11.7.	Otorinolaryngologie	str. 34
1.12.	Závěr	str. 34
2.	Cíle dizertace, předpoklady pro jejich splnění	
3.	Zvolené metody zpracování	

- 2.1. Cíle projektu**
- 2.2. Příprava hypericinu**
- 2.3. Aminolevulová kyselina**
- 2.4. Metodika práce**
- 2.5. Charakteristika souboru nemocných**
- 2.6. Aktinické keratózy (AK)**
- 2.7. Bazocelulární karcinom**
 - 2.7.1. Bazocelulární karcinom – superficiální typ (sBCC)
 - 2.7.2. Bazocelulární karcinom – modulární typ (nBCC)
- 2.8. Karcinom in situ typu morbus Bowen**
- 2.9. Vulgární veruka**
- 2.10. Psoriáza**
- 2.11. Příklad torpidních kondylomat akuminata úspěšně léčených ALA-PDT**
- 2.12. Příklad úspěšné terapie leishmaniózy s ALA-PDT a kryoterapií**
- 2.13. Remitenční (resp. reflexní) spektrofotometr – výstupy**
- 2.14. Závěrečný souhrn**

3. Grafy

4. Obrazová dokumentace

5. Užití statistické metody

6. Literatura

7. Seznam příloh + přílohy

1. PŘEHLED O SOUČASNÉM STAVU PROBLEMATIKY

1.1 ÚVOD

Fotodynamická diagnostika (PDD) a terapie (PDT) jsou dva procesy založené na stejném principu. Je jím **senzibilizace tkáně chemickými látkami - fotosenzibilizátory**, které jsou schopny fluorescence, tj. schopnost měnit určitou vlnovou délku dopadajícího světla na délku jinou, a dále po ozáření světlem příslušné vlnové délky způsobit uvolňování singletního kyslíku a jiných volných radikálů, které následně vedou k destrukci tkáně a to tím více, čím je světelný zdroj intenzivnější a koncentrace fotosenzibilizátoru ve tkáni vyšší. První schopnosti využívá fotodynamická diagnostika, druhé fotodynamická terapie.

Cílem těchto metod je dosažení vysoké koncentrace fotosenzibilizátoru v postižené tkáni a tím její odlišení od tkáně zdravé, s navozením selektivního destrukčního účinku intenzivního světla o vhodné vlnové délce na nemocnou tkáň bez poškození okolní tkáně.

1.2. HISTORIE

Počátky fotodynamické terapie sahají do doby přelomu minulého století. Jako základní práce shledávající možnost diagnostického či terapeutického použití některých fotosenzibilizujících sloučenin k vyvolání fotodynamické reakce jsou citovány sdělení Raaba a Tappeinera.

V roce 1900 publikoval profesor Hermann von Tappeiner, ředitel Farmakologického ústavu na Ludwig-Maximilianově Univerzitě v Mnichově, pozorování svého žáka Oscara Raaba, který zjistil, že akridinový roztok usmrcuje nálevníky typu paramecium (Paramecium caudatum), ale ve tmě je neúčinný (1). V tomto sdělení Tappeiner již předpokládal, že

fluoreskujících látek bude možno použít k léčbě pacientů s kožními chorobami. V témže roce také Raab publikoval svou práci, ve které přesně popsal podmínky zmíněného pokusu (2). V roce 1903 zveřejnil Tappeiner a Jesionek první zkušenosti léčby kožního bazaliomu, lupus vulgaris a kondylomat lata s lokálně aplikovaným 5% eosinem a následným ozářením (3). Pro nevelkou úspěšnost a těžké vedlejší účinky se v terapii nepokračovalo.

V roce 1904 Tappeiner a Jodelbauer dokázali, že v roztoku akridinu je k dosažení léčebného účinku nutná přítomnost kyslíku (4). Tappeiner začal pro fotosenzibilizaci za přítomnosti kyslíku používat označení „fotodynamický účinek“ („*photodynamische Wirkung*“).

První experimenty s hematoporfyrinem jako novým fotosenzibilizátorem popsal v roce 1911 Hausman (5). K zavedení hematoporfyrinů přispěl v roce 1912 také německý lékař Friedrich Meyer-Betz heroickým pokusem na sobě, kdy si sám intravenózně aplikoval 200 mg hematoporfyrinu, což vedlo ke kožní přecitlivělosti na světlo přetrvávající déle než 2 měsíce (6).

Přes použití nepříliš čistých substancí porfyrinových fotosenzibilizátorů přinesla čtyřicátá léta minulého století průkaz selektivní lokalizace v nádorové tkáni (7, 8).

Novodobou éru využití fotosenzibilizátorů v diagnostice a terapii zahájili Lipson a Schwartz na Mayo klinice v 60. letech minulého století. Pozorovali, že aplikace hematoporfyrinu vede k fluorescenci neoplastických lézí, což umožnilo jejich vizualizaci v průběhu operace. Lipson se snažil dosáhnout lepší selektivity akumulace hematoporfyrinu, tím že jej podrobil acetylaci pomocí acetanhydridu a kyseliny sírové. Tímto procesem získal směs porfyrinů, kterou dnes označujeme jako deriváty hematoporfyrinu (HPD). Tato směs byla použita k fluorescenční diagnostice nádorů, přičemž se ukázalo, že je mnohem účinnější než samotný hematoporfyrin (9). Deriváty hematoporfyrinu byly poté používány, někdy též pod označením Photofrin I, v experimentech i klinické medicíně.

Komerčně se HPD začaly vyrábět pod názvem Photofrin II, který byl chemicky čistší než Photophrin I díky odstranění méně aktivních monomérů porfyrinů. Tato látka byla prvním fotosenzibilizátorem povoleným k systémové aplikaci u člověka pro léčebné účely v rámci fotodynamické terapie.

Nejzávažnějším vedlejším účinkem HPD byla několik týdnů přetrvávající kožní fotosenzitivita. Lokální aplikace HPD však nebyla možná pro jejich poměrně velkou molekulu (tetrapyrrolový kruh), která nepronikla do kůže.

Rozhodujícím přelomem bylo následné použití kyseliny δ -aminolevulové (ALA) jako prekurzoru hematoporfyrinu v r. 1990 Kennedym a spol., jejíž relativně malá molekula snadněji pronikla pokožkou a akumulovala se v metabolicky aktivních buňkách (10). Fotodynamická terapie s lokálně aplikovaným fotosenzibilizátorem se přesunula z výzkumných labortoří do klinické praxe v roce 1999, kdy byla tato léčebná metoda s použitím přípravku obsahujícího ALA (Levulan®, DUSA Pharmaceuticals, Wilmington, Massachusetts, USA) schválena americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) k léčbě aktinických keratóz. Následně byl v mnoha evropských zemích a v Austrálii schválen metylester aminolevulové kyseliny (Metvix®, Galderma, Paříž, Francie) k léčbě aktinických keratóz a bazaliomů.

Dnes aminolevulová kyselina a její metylester představují jedny z nejčastěji používaných fotosenzibilizátorů v dermatologii.

Historie fotodynamické terapie a diagnostiky byla přehledně a detailně popsána v několika publikacích, kde je možné získat všechny reference o výše zmíněných pracích a experimentech (11, 12).

Také v České republice v 90. letech minulého století byla založena Společnost pro fotobiologii, v jejímž čele stál profesor Milan Jirsa, který propagoval použití fotosenzibilizátoru TPPS₄. Ten se však pro proklamovanou neurotoxicitu nerozšířil.

(Sacchini, 1987) Unikátně čištěný TPPS₄ byl zkoušen na několika dermatologických pracovištích ČR (Praha, Hradec Králové a Plzeň). (Jirsa, 1990; Jirásková, 1999, Jirásková a Jirsa, 1998) Studie však skončila zánikem firmy Lachema Brno, která byla dodavatelem tohoto přípravku. Prof. Jirsa v rámci hledání dalších možných fotosenzibilizátorů navrhl také metodu čištění a standardizace hypericinu jako potenciálně použitelného fotosenzibilizátoru, jehož účinnost byla ověřena v rámci grantového projektu IGA MZ ČR (NR 7901-3).

1.3. PRINCIP FOTODYNAMICKÉ DIAGNOSTIKY A TERAPIE

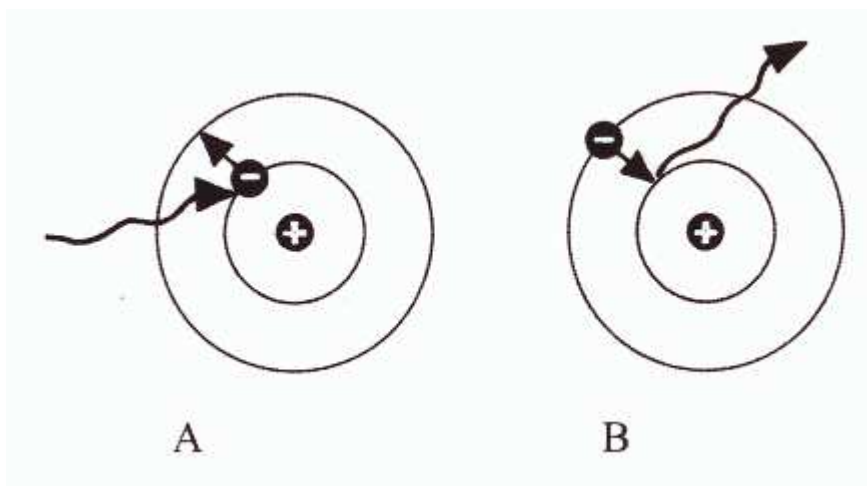
Fotodynamická terapie je léčebná metoda, která je založena na selektivní fotosenzibilizaci tkáně pomocí lokálně aplikovaného či celkově podaného fotosenzibilizátoru, který po ozáření světlem příslušné vlnové délky vyvolává na kyslíku závislou cytotoxickou reakci. Fotodynamická diagnostika pak představuje diagnostickou metodu využívající fluorescenci léčeného projevu k jeho vizualizaci.

Účinkem absorbovaného světla dochází ke vzniku excitovaného stavu molekul fotosenzibilizující látky. Na molekulární úrovni vzniká vzájemná interakce fotonu (základní „jednotky světla“) a molekuly fotosenzibilizátoru.

Foton je nositel různého množství energie, což se projeví určitou vlnovou délkou a tím i barvou světla. Vztah energie fotonu a vlnové délky je nepřímo úměrný, tj. se vzrůstající energií fotonu klesá vlnová délka světla.

Foton při styku s molekulou nebo atomem reaguje s jejich elektronovým obalem (obr. 1). Nejprve nastává fáze absorpce, kdy atom absorbuje energii fotonu, což jej přivede do elektronicky excitovaného stavu daného přesunem elektronu do perifernější orbity. Aby

mohlo k interakci dojít, musí energie fotonu odpovídat energetickému rozdílu mezi dvěma orbitami, který je specifický pro každý atom nebo molekulu (a tedy i pro každý fotosenzibilizátor).



Obr.1. Schéma interakce mezi světlem a elektronovým obalem atomu

A/ Během absorpce předává foton svou energii elektronu (-), který se dostává do excitovaného stavu a přesunuje se do perifernější orbity

B/ Elektron se rychle vrací do původního stavu, část energie je uvolněna vyzářením nového fotonu, což se projevuje fluorescencí

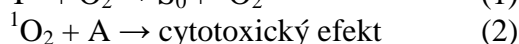
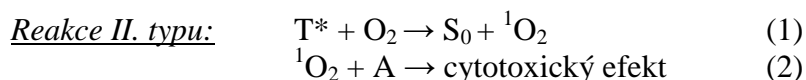
Po úspěšné absorpci je molekula v excitovaném stavu, z něhož se vrací zpět do základního stavu uvolněním absorbované energie. Toto uvolnění se děje několika způsoby:

- a) neradiačním uvolněním ve formě tepla
- b) radiačním vyzářením ve formě nově vzniklého fotonu (do této kategorie patří fluorescence)
- c) předáním energie jiné molekule (tohoto efektu využívá fotodynamická terapie)

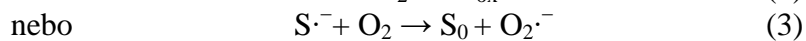
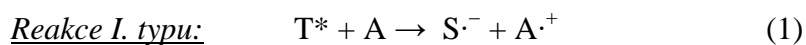
V případě fluorescence je energie vyzářeného fotonu vždy menší než energie fotonu vedoucího k excitaci. Příčinou je ztráta určité části energie neradiačním způsobem, případně skutečnost, že se molekula nevrací na nejnižší energetickou úroveň základního stavu. V praxi se taková situace projevuje tím, že fotosenzibilizátor absorbuje světlo v oblasti modré části spektra (kolem 400nm), ale fluoreskuje červeně. Jinými slovy fotosenzibilizující látka vyzařuje fotony o nižší energii a tedy s vyšší vlnovou délkou. Právě tohoto principu se

využívá u fotodynamické diagnostiky, kdy postižená tkáň červeně fluoreskuje po předchozí selektivní akumulaci fotosenzibilizátoru a ozáření modrofialovým excitačním světlem.

U fotodynamické terapie se naopak uplatňuje poslední uvedená možnost a to předání energie jiné molekule, nejčastěji kyslíku. Z toho vyplývá, že k dalšímu průběhu fotodynamické reakce je nezbytně nutná přítomnost kyslíku ve tkáni. K přenosu energie na molekulární kyslík je důležité, aby molekula fotosenzibilizátoru nejprve přešla z excitovaného stavu do metastabilního tzv. tripletního stavu (T^*), ve kterém může díky větší stabilitě setrvat delší dobu. Tento tripletní stav je následně schopen přenosu energie přímo na molekulární kyslík (O_2) za vzniku singletního (1O_2). Tento proces je označován jako reakce II. typu, kdy singletní kyslík rychle a bez rozdílu reaguje s okolním elektrofilním biomateriálem, jako např. nenasycené mastné kyseliny, proteiny, nukleové kyseliny atd., za vzniku cytotoxické reakce.



Kromě toho může proběhnout i reakce I. typu, kdy je energie přenášena na jiné molekuly (A) za vzniku toxických radikálů ($A^{\cdot+}$), které posléze reagují s kyslíkem za vzniku cytotoxických oxyproduktů ve tkáni (A_{ox}).



Oba typy reakcí probíhají současně. Poměr mezi reakcemi je závislý na použitém fotosenzibilizátoru, jeho subcelulární lokalizaci a nabídce substrátu či kyslíku v okolí aktivovaného fotosenzibilizátoru. Výsledkem obou typů reakcí je cytotoxické působení na buňky postižené tkáně a též na endoteliální buňky cévních stěn v místě léčeného projevu. Výsledkem je poškození buněk vedoucí k nekróze či apoptóze.

Ukazuje se, že právě vznik singletního kyslíku hraje hlavní roli ve fotodynamické terapii. Oxidací singletním kyslíkem dochází k poškození ve steroidních jádrech cholesterolu, v nenasycených mastných kyselinách a v proteinech (tryptofan, histidin, cystein, methionin) (13). Na subcelulární úrovni se objevuje destrukce buněčné membrány a membrán buněčných organel. Peroxidace lipidů a tzv. cross-linking bílkovin vedou k depolarizaci a inaktivaci membránových enzymů s následným zvýšením membránové permeability. Další postižení může být lokalizované i v lysozomech a mitochondriích.

Poškození buněčného jádra se nezdá být rozhodujícím momentem v PDT-indukovaném cytotoxickém účinku. Z tohoto důvodu je fotodynamická terapie považována za léčebnou metodu s nízkým potenciálem indukce mutací či karcinogeneze (14). Buněčná smrt způsobená nekrozou je indukována zejména poškozením organel způsobeným peroxidací membránových lipidů, disrupcí lysozomální membrány, inhibicí enzymů a poškození nukleárních komponent.

Naopak PDT-indukovaná apoptóza je způsobena fotosenzibilizátory, které se primárně vychytávají v mitochondriích, kde rychle navozují po své fotoaktivaci apoptotický proces. Vlivem singletního kyslíku dochází ke zničení mitochondriálně vázané cytochrom C-oxidázy, což je považováno za jeden z kritických signálů indukce apoptózy (15). Ztráta cytochrom C-oxidázy po PDT způsobuje strmý nárůst aktivity kaspázy 3, která hraje klíčovou roli při zahájení apoptózy (16, 17, 18).

Volné kyslíkové radikály přednostně poškozují neovaskulární a vaskulární elementy, což vede sekundárně ke zničení postižené tkáně způsobené nedostatkem kyslíku a živin. Postiženy jsou zejména buňky endotelu, což je příčinou aglomerace krevních destiček a vzniku trombů. Dochází k porušení rovnováhy mezi produkcí prostacyklínu endotelovými buňkami a v trombocytech vzniklém tromboxanu A₂ (19).

Během fotodynamické terapie dochází i k uvolňování zánětlivých mediátorů v důsledku degradace fosfolipidů (např. proteiny akutní fáze, proteináza, peroxidáza, faktory komplementu, cytokiny). Ty následně působí jako signál pro vcestování makrofágů a neutrofilních granulocytů do postižené oblasti (14).

Na závěr lze shrnout, že vlivem reakcí I. a II. typu dochází k poškození těch buněčných struktur, které mají největší afinitu pro fotoaktivní sloučeninu. Poškození jedné části buňky nebo tkáně vyvolává řetězovou reakci, která vede k destrukci celé léze nebo té části, kterou ještě zasáhlo záření použitého zdroje světla. Zda bude smrt buňky vyvolána apoptózou či nekrotózou závisí na souhře různých faktorů včetně typu buňky, koncentraci fotosenzibilizátoru, jeho subcelulární lokalizaci a snad i na dávce záření (J/cm^2). Nejdůležitější se však zdá být subcelulární lokalizace fotosenzibilizující látky (20).

1.4. ZDROJ SVĚTLA

Jako zdroj světla pro fotodynamickou terapii mohou být použity lasery emitující jednotlivé vlnové délky nebo zdroje nekoherentního světla.

Ze skupiny laserů jsou nejvhodnější barvivové, laditelné, argonovým světlem buzené lasery, eventuálně diodové lasery. Nespornou výhodou koherentního záření je možnost jeho zavádění flexibilními světlovody do tělních dutin a působit tak velmi cíleně na malé ložiska.

V dermatologii lze však použít i zdroje nekoherentního světla jako jsou rtuťové či xenonové lampy s předřazeným filtrem propustným pro červené světlo, resp. oranžové světlo (630 nm). Zdají se být stejně tak účinné jako lasery a navíc mají výhody v možnosti ozáření větší plochy a v nižší ceně (21). Jejich nevýhodou je fakt, že energie jejich paprsku se snižuje směrem k periférii ozařovaného pole a dále nemožnost využití v endoskopii, neboť ve světlovodech dochází k velkým světelným ztrátám.

Hlavním směrem dalšího rozvoje PDT zářičů v dermatologii se zdají být zdroje vybavené LED prvky (light emission diode), jejichž výhoda spočívá v jejich stabilitě, dlouhé životnosti a možnosti zvětšení velikosti ozařovaného pole.

Většina lamp využívá „červeného“ absorpčního maxima pro PPIX při vlnové délce 635nm k dosažení maximálního průniku tkání, ačkoliv některá zařízení vyzařují i světlo, které vede k aktivaci v nižších oblastech vlnové délky, a to při 510, 545 a 580nm. Existují i zářivky zaměřená na maximum v oblasti „modrého světla“ s vlnovou délkou 410nm, které však vykazují menší hloubku penetrace. Tato hodnota se ale zdá být dostatečnou pro aktinické keratózy (22).

Světlo s vlnovou délkou 635nm může pronikat až do hloubky 6mm, zatímco světlo s vlnovou délkou v rozmezí od 400 do 500nm proniká jen do hloubky 1-2mm. Nicméně v kůži dochází k vysokému rozptylu absorbovaného světla, takže terapeuticky účinná hloubka působení při ALA-PDT je značně snížena, tj. 1-3mm při vlnové délce 630nm (23, 24).

1.5. KYSLÍK

K toxickému poškození tkáně při fotodynamické terapii je nezbytná přítomnost kyslíku. V pokusech *in vitro* bylo prokázáno, že při poklesu obsahu kyslíku v systému pod 2% jsou buňky rezistentní na fotodynamickou terapii (25, 26). Studiemi bylo také ověřeno, že produkce singletního kyslíku je úměrná absorpčnímu koeficientu fotosenzibilizátoru a závisí na koncentraci kyslíku ve tkáni (27).

V preklinických studiích bylo prokázáno, že v hyperbarickém prostředí, kde dochází ke zvyšování tkáňové koncentrace kyslíku, stoupá i účinnost fotodynamické terapie (28, 29).

Důležitá je skutečnost, že singletní kyslík má velmi krátký poločas (0,01 - 0,04 μ s) a rovněž velmi malý akční rádius (0,01 - 0,02 μ m) (30, 31). Na subcelulární úrovni proto působí pouze v bezprostředním okolí svého vzniku. Konkrétní cíl jeho působení a mechanismus usmrcení buňky závisí na intracelulární lokalizaci fotosenzibilizátoru (20).

1.6. FOTSENZIBILIZÁTORY

1.6.1. Úvod

Fotosenzibilizátor je látka, která je schopna absorbovat světelnou energii a následně ji předávat molekulám jiným nebo ji vyzařovat. Látek s těmito vlastnostmi existuje velké množství, avšak pro potřeby klinické aplikace by měl fotosenzibilizátor splňovat řadu dalších podmínek.

Mezi požadavky ideálního fotosenzibilizátoru patří: chemická čistota, jeho schopnost vycílení se v cílových buněčných strukturách, krátký časový interval mezi jeho aplikací a maximální akumulací v postižené tkáni, krátký poločas rozpadu, aktivace vlnovými délkami s optimální penetrací, vysoká účinnost při tvorbě singletního kyslíku, nízká toxicita (tzv. „lack of dark toxicity“) (32, 33). Dostatečné množství fotosenzibilizátoru v postižené tkáni je základním předpokladem optimální terapeutické odpovědi. Aplikace fotosenzibilizátoru je buď celková (i.v.) nebo lokální (intralezionální, vtíráním či pod okluzi ve formě masti, krému, gelu a nebo roztoku).

Většina fotosenzibilizátorů je náchylných k jejich modifikaci a destrukci během světelné expozice. Jde o tzv. „photobleaching effect“. Klinicky je tak označována situace, při které dochází k vymizení fluorescence v průběhu osvitů. Podkladem tohoto jevu je fotodegradace

dané látky. Příčina je nepochybně komplexní. Jedním z mechanismů je destrukce fotosenzibilizátoru vlastním singletním kyslíkem, který vzniká v průběhu osvitů.

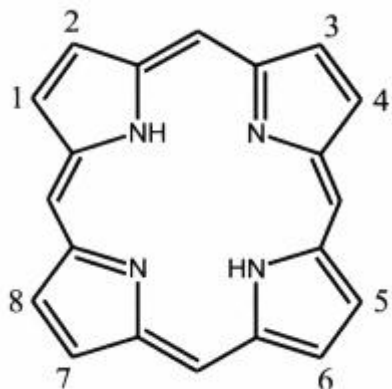
1.6.2. Rozdělení fotosenzibilizátorů

Fotosenzibilizátory jsou rozděleny do dvou velkých skupin, a to na systémové a lokální. Systémové fotosenzibilizátory (tab. 1) se dále klasifikují podle přítomnosti tetrapyrolového kruhu na látky 1. generace zahrnující přirozené a polosyntetické purifikované deriváty hematoporfyrinu, a dále na látky 2. generace, kam se zařazují syntetické fotosenzibilizátory neporfyrinického původu (12).

Mezi lokální fotosenzibilizátory patří přirozený prekurzor porfyrinů, a to 5-aminolevulová kyselina a její metylester forma, kdy ani u jednoho z případů se nejedná o vlastní fotosenzibilizátor, ale o prekurzor fotoaktivní substance protoporfyrinu IX.

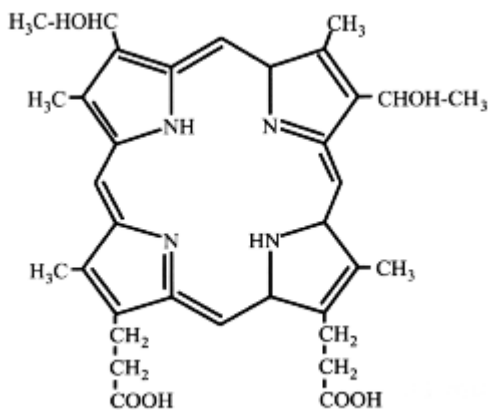
1.6.2.1. Systémové fotosenzibilizátory 1. generace

Porfyriny jsou organické, cyklické sloučeniny odvozené od tetrapyrolu porfinu, což je látka tvořená čtyřmi pyrolovými kruhy spojenými pomocí methylenových můstků (obr. 2). Porfyriny mají schopnost tvořit komplexy s kovovými ionty za vzniku metaloporfyrinů, které mají nezastupitelnou úlohu v mnoha metabolických procesech. Nejvýznamnějším metaloporfyrinem je hem vznikající vazbou se železem, který se nachází v mnoha životně důležitých enzymech, jako např. hemoglobin, myoglobin, cytochrom či kataláza.



Obr. 2. Struktura porfyrinů

Hematoporfyrinové deriváty (HpD) jsou získávány acetylací hematoporfyrinu pomocí acetanhydridu a kyseliny sírové (obr. 3). Chemicky dochází během přípravy ke vzniku éterických nebo esterických vazeb mezi molekulami hematoporfyrinu, takže výsledná směs obsahuje monoméry, diméry i oligoméry. První klinické zkoušky s deriváty hematoporfyrinu určené k léčbě karcinomu plic byly popsány Hayatem a kol. v r. 1982 (34).



Obr. 3. Hematoporfyrinové deriváty (HPD)

Porfimer sodný (Photofrin[®], Axcan Pharma Inc., Birmingham, AL, USA) je chemicky čistší sloučenina než deriváty hematoporfyrinu, ze kterého byly odstraněny méně aktivní monoméry.

HpD a porfimer sodný představují první fotosenzibilizátory povolené k systémové aplikaci u člověka pro terapeutické účely v rámci fotodynamické terapie. Jejich indikační spektrum zahrnuje časná stádia karcinomu plic, Kaposiho sarkom, Barrettův jícn (35).

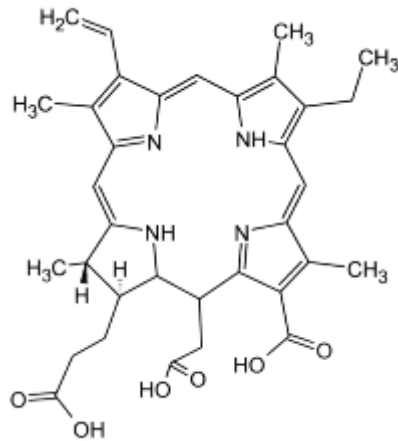
1.6.2.2. Systémové fotosenzibilizátory 2.generace (35)

1.6.2.2a Sloučeniny odvozené od porfinů

1.6.2.2a.1. Chloriny (Chlorins)

Chloriny, nebo-li deriváty chlorofylu, silně absorbující světlo v červené oblasti v rozmezí vlnových délek 640-700nm mohou být získány modifikací chlorofylu a nebo cestou jejich chemické syntézy. Mezi nejznámější patří chlorin e_6 a jeho deriváty, dále purpuriny, deriváty benzoporfyrinu a metahydroxyferylchlorin.

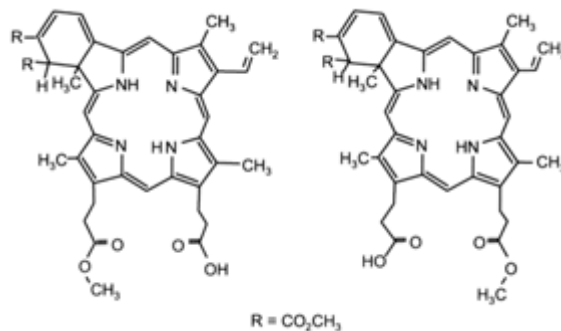
Chlorin e_6 (Ce6), někdy také označovaný jako fytochlorin, je získáván modifikací chlorofylu (obr. 4). Tato hydrofilní látka má Soretův pás (absorpční maximum) při vlnové délce 402nm, další jeho absorpční pás se nachází v oblasti červeného světla při 654nm. Po jeho průniku do buňky se lokalizuje v lysozomech, kde po ozáření způsobuje poškození. Jeho deriváty (např. mono-L-aspartyl chlorin e_6 [Ace6], diaspartyl Ce6, monoseryl Ce6) jsou více lipofilní a jsou lépe vychytávány v tumorózní tkáni s následnou účinnější destrukcí postižených buněk.



Obr. 4. Chlorin e₆

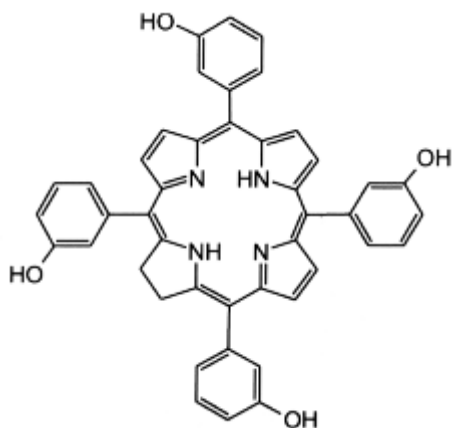
Purpuriny se silným absorpčním spektrem v červené oblasti v rozmezí vlnových délek 630-715 nm mohou tvořit komplexy s kovy (zinek, cín). Právě tyto komplexy jsou účinné při fotodynamickém procesu.

Benzoporfyrinové deriváty se silným absorpčním vrcholem při vlnové délce 690nm jsou syntetizovány z protoporfyrinu (obr. 5). Preparát verteporfin (Visudine[®], Novartis AG, Basel, Switzerland) je používán v oftalmologii k léčbě senilní makulární degenerace.



Obr.5. Benzoporfyrinové deriváty (Verteporfin, Visudine[®])

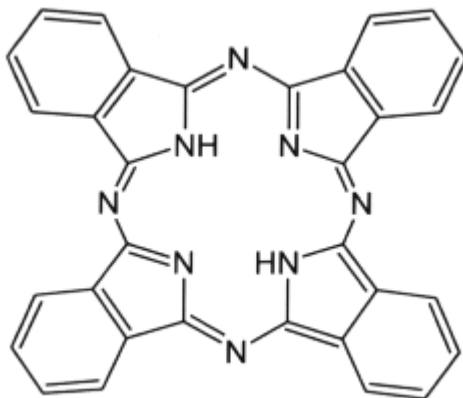
Meso(tetra)hydroxyfenylchlorin (m-THPC) (Temoporfin, Foscan[®]; Biolitec Pharma, Edinburgh, Scotland, UK) patří mezi jedny z nejvíce aktivních fotosenzibilizátorů, pro jejichž fotodynamický účinek je dostačující malé množství a nízká dávká ozáření (obr. 6). Absorpční vrchol je při vlnové délce 652nm. Nevýhodou je nerozpustnost molekuly m-THPC ve vodě.



Obr.6. Meso(tetra)hydroxyfenylchlorin (m-THPC)

1.6.2.a.2. Ftalocyaniny (*Phthalocyanines*)

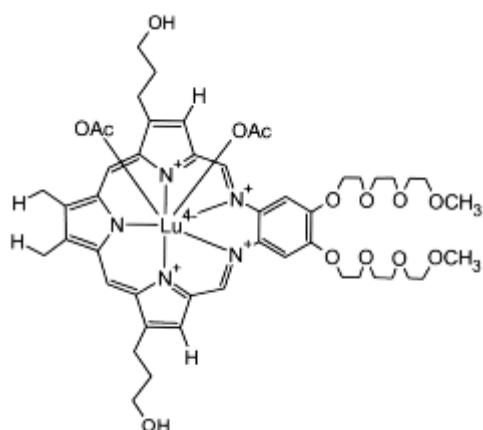
Ftalocyaniny jsou syntetické porfyriny, ve kterých byly vyměněny pyrolové skupiny benzenovými a methylenové můstky dusíkovými (obr. 7). Jejich absorpční vrchol se pohybuje mezi 675-700nm.



Obr.7. Ftalocyaniny

1.6.2.a.3. Texafyriny (*Texaphyrins*)

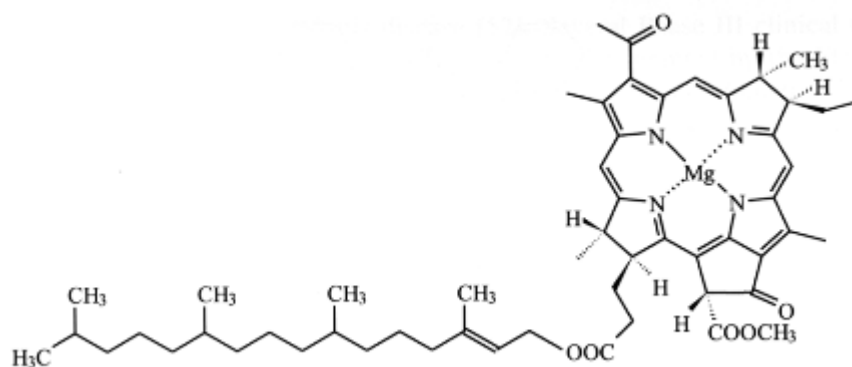
Texafyriny patří mezi syntetické porfyriny, kdy mezi nejznámější fotosenzibilizátor z této skupiny patří lutetium texafyrin (Lu-tex, Lutryn[®], Pharmacyclics Inc., CA, USA) s absorpčním vrcholem při 732nm (obr. 8).



Obr. 8. Lutetium texafyrin (Lu-Tex)

1.6.2.2a.4. Bakteriochlorofyl a jiné deriváty (bakteriochlorophyll)

Bakteriochlorofyl je přirozený pigment s absorpčním pásmem okolo 780nm (obr. 9). Jeho deriváty (např. WST09, Tookad[®], Toussus le Noble, France) jsou syntetizovány bakteriemi.



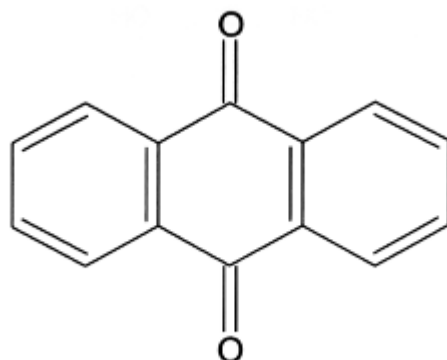
Obr. 9. Bakteriochlorofyl

1.6.2.2b Sloučeniny neporfyrinického původu

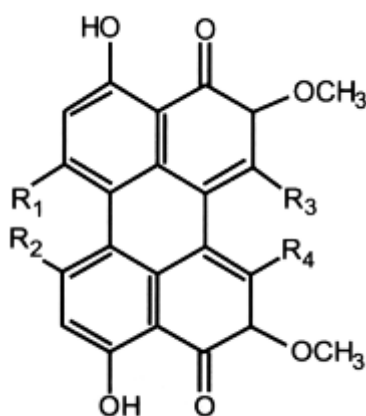
1.6.2.2b.1. Chinony (Quinones)

Mezi chinony patří antrachinony, perylenchinony a hypericin (obr. 10, 11).

Fotosenzibilizující schopnosti hypericinu jsou známy řadu let, avšak jeho antitumorózní a antivirová aktivita je detailně zkoumána až v posledních letech.



Obr. 10. Antrachinon



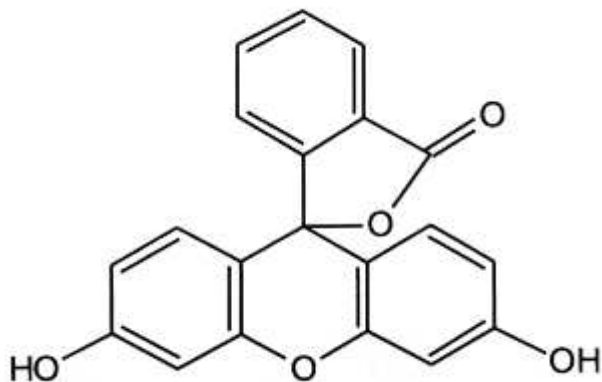
Obr. 11. Perylenchinon

1.6.2.2b.2. Xantény (Xanthenes)

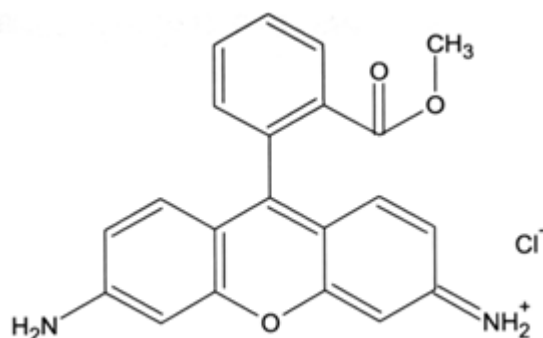
Xantény jsou organická barviva rozdělená do dvou skupin, a to na tzv. bifenylnímetanové deriváty (pyroniny) a na trifenylnímetanové deriváty (ftaleiny). Mezi nejznámější ftaleiny patří fluorescein se svými deriváty (eosin, erythrosin) a rhodamin (obr. 12, 13).

Rhodamin je využíván zejména v oblasti laserů. Uvažuje se o něm také jako o potenciálním fotosenzibilizátoru. Nejvýznamnější z jeho skupiny je rhodamin 123 se silným absorpčním vrcholem při vlnové délce 500nm. Jeho maximální fluorescenční spektrum se nachází

v oblasti kolem 530nm. Jedná se o lipofilní molekulu, která se akumuluje především v mitochondriích.



Obr. 12. Flurescein

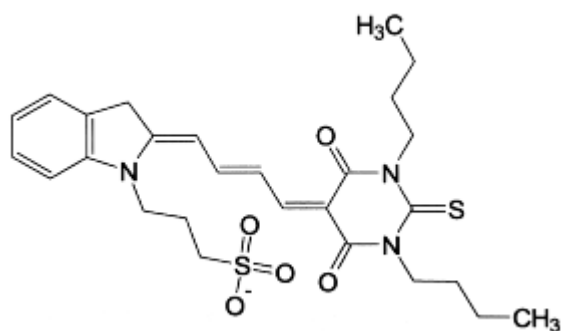


Obr.13. Rhodamin 123

1.6.2.2b.3. Cyaniny (Cyanines)

Cyaniny byly původně vyvinuty pro fotografickou emulzi, následně po zjištění jejich afinity k nádorovým buňkám byla pozornost soustředěna i na jejich možné využití ve fotodynamické terapii nádorů.

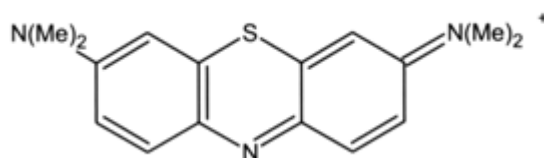
Jedním z cyaninů je merocyanin 540 (MC540), u kterého byla prokázána afinita s následným selektivním fototoxickým účinkem pro různé typy nádorových buněk a viry (obr. 14). Nicméně jeho využití je limitováno pro superficiální formy tumorů vzhledem k jeho absorpčnímu vrcholu při krátkých vlnových délkách.



Obr. 14. Merocyanin 540 (MC540)

1.6.2.2b.4. Kationtová barviva (Cationic dyes)

Několik dalších barviv s fotosenzibilizujícím účinkem byla popsána včetně fenothiazinů (methylenová modř) a akridinové oranži (obr. 15). Thiazinová barviva a akridin byly prvními sloučeninami, které byly použity ve fotodynamické terapii s antivirovým účinkem.



Obr. 15. Methylenová modř

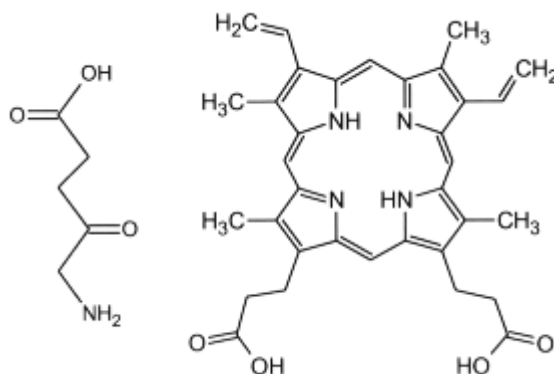
Tab. 1 Hlavní fotochemické a fotobiologické vlastnosti vybraných fotosenzibilizátorů určených k systémové (intravenózní) aplikaci

	absorpční vrchol (nm)	dávka (mg/kg)	dávka záření (J/cm ²)	délka inkubace před ozářením (h)	délka foto- senzibilizace
Hematoporfyrinové deriváty	630	2,0-5,0	75-200	24-48	2-3 měsíce
Porfimer sodný	630	2,5-3,0	75-200	24-48	1-2 měsíce
Benzoporfyrinové deriváty	690	0,15-0,5	100-200	0,5-2,5	4-7 dní
Mono-L-aspartyl-chlorin e ₆	654	0,5-3,5	25-100	0,5-2,5	3-7 dní
Meso(tetra)hydroxyfenylchlorin	652	0,1-0,3	8-12	24-48	do 6-ti týdnů
Lutetium texafyrin	732	0,6-7,2	150	3-5	do 7 dní
Naftalocyaniny	760	0,3-0,5	200-450	24	3 dny
Cín-ethyl-etiopurpurin	660	1,0-2,0	100-300	24	do 1 měsíce
Zinek(II)-ftalocyaniny	675	0,5-2,0	70-150	24-72	8-10 dní

1.7. KYSELINA 5-AMINOLEVULOVÁ (5-ALA)

Kyselina 5-aminolevulová (5-ALA) ($C_5H_{10}ClNO_3$, mol.hmotnost 167,59g/mol) je přirozeně se vyskytující látka, která je významným prekurzorem biosyntézy hemu a buněčných cytochromů (obr.16). Lidský organismus vyrobí denně cca 0,5g této látky, a pokud není využita pro syntézu, je vylučována močí.

5-ALA nemá sama o sobě schopnost fluoreskovat, avšak stojí na počátku syntetického řetězce, jehož předposledním produktem je protoporfyrin IX (PPIX), který při osvitě světlem určitých vlnových délek intenzivně červeně fluoreskuje. Posledním produktem celého řetězce je hem vznikající chelací protoporfyrinu IX se železem, který rovněž nemá schopnost fluorescence. Inkorporace železa do molekuly PPIX se odehrává v mitochondriích za účasti enzymu ferochelatázy. Vznikající hem se následně váže na různé proteiny za vzniku klíčových biomolekul (jako např. hemoglobin, cytochromy, peroxidáza), které přenosem kyslíku umožňují buněčné oxidační pochody. Neboť je přítomnost těchto látek v organismu životně důležitá, jsou všechny buňky lidského těla, s výjimkou zralých erytrocytů, vybaveny enzymy nezbytnými pro syntézu hemu.



Obr. 16. 5-aminolevulová kyselina (vlevo) a protoporfyrin IX (vpravo)

Při fotodynamické diagnostice využíváme skutečnosti, že po aplikaci 5-ALA dochází k hromadění fluoreskujícího PPIX. Tato akumulace je navíc mnohem intenzivnější v nádorových buňkách než-li ve zdravých, čímž je zajištěna významná nádorová selektivita. Příčinou zvýšené akumulace protoporfyrinu IX v nádorové tkáni po podání 5-ALA je zejména snížená aktivita ferochelatázy v tumorózní tkáni (36, 37).

Jako první akumulaci endogenních porfyrinů po aplikaci 5-ALA popsali Kennedy a Pottier, kteří použili 5-ALA rozpuštěnou ve vodné fázi olejové emulze na povrchové kožní bazocelulární karcinomy. Po několikahodinové inkubaci pozorovali při ozáření modrým světlem o vlnové délce okolo 400nm červenou fluorescenci, která byla přítomna jen v oblasti nádorového bujení (38).

1.7.1. Syntéza hemu a její regulace

K pochopení příčin selektivní akumulace endogenních porfyrinů po aplikaci 5-ALA je nutno detailních znalostí průběhu syntézy hemu a jeho regulačních mechanismů (obr. 17).

Prvním krokem syntézy hemu je tvorba **5-ALA** z glycinu a succinyl koenzymu A za účasti enzymu *ALA-syntetázy*. Tento enzym je lokalizován na vnitřní straně mitochondriální membrány a významně se podílí na regulaci celého procesu.

V další fázi dochází ke kondenzaci dvou molekul 5-ALA za vzniku **porfobilinogenu**. Tento krok je regulován v cytoplazmě uloženým enzymem *ALA-dehydratázou*.

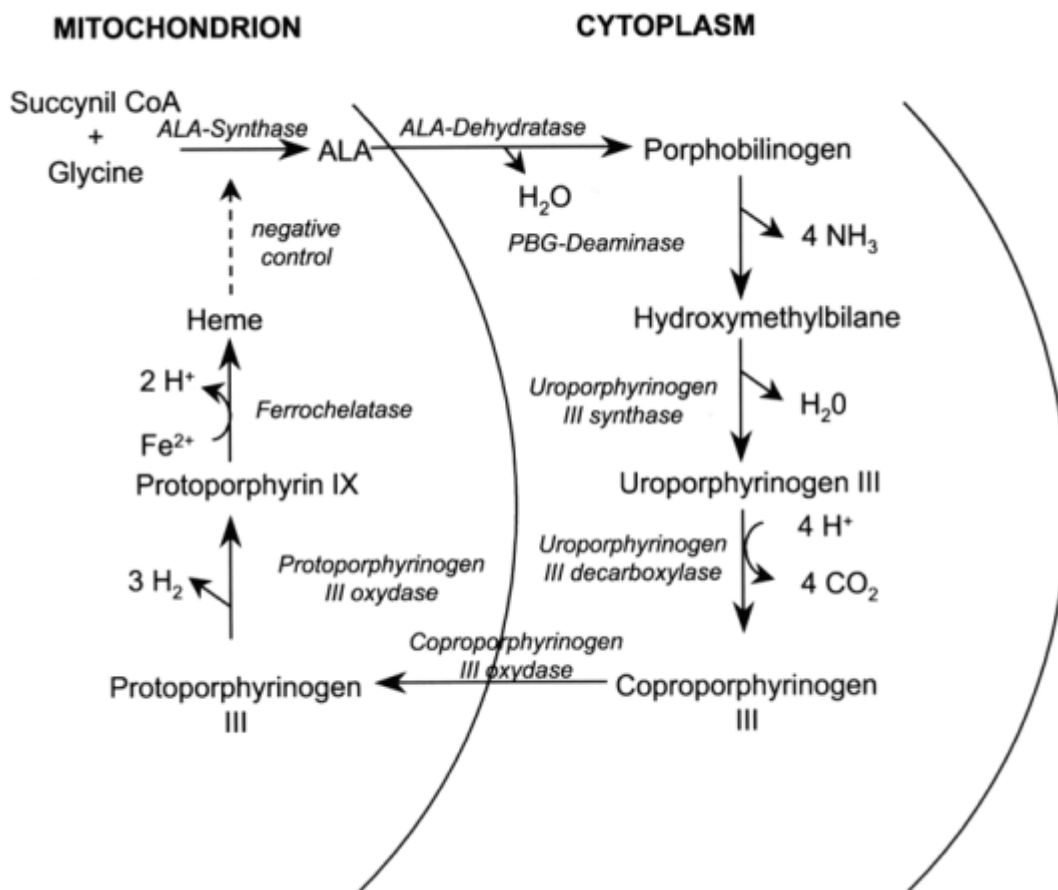
Následující proces je indukován dvěma cytoplazmatickými enzymy, *porfobilinogen deaminázou (PBGD)* a *uroporfyrinogen III kosyntetázou*, kdy dochází ke kondenzaci čtyř molekul porfobilinogenu a tvorbě tetrapyrrolového jádra za vzniku osmikarboxylového **uroporfyrinogenu III**.

Následně cytoplazmatickým enzymem *uroporfyrinogen dekarboxylázou* jsou odstraněny čtyři karboxylové skupiny za vzniku **koproporfyrinogenu III**.

Další proces se přesunuje z cytoplazmy zpět do mitochondrií. Enzym koproporfyrinogen oxydáza, který se podílí na dalším kroku, je totiž lokalizován v prostoru mezi membránami mitochondrií. Tento enzym dekarboxyluje a oxiduje postranní řetězce propionových kyselin v kruhu A a B na vinylové skupiny za vzniku **protoporfyrinogenu IX**.

Následně již dochází k syntéze **protoporfyrin IX (PPIX)** oxidací tetrapyrrolového jádra odstraněním šesti vodíků z molekuly protoporfyrinogenu IX. Enzym zodpovědný za tento krok, *protoporfyrinogenoxydáza*, se nachází na vnitřní straně mitochondriální membrány a vykazuje vysokou substrátovou specifitu. PPIX je jediným oxidovaným porfyrinem v buňce, což vysvětluje jeho schopnost fluorescence. Ostatní porfyriny jsou za normálních podmínek přítomny pouze v redukované formě jako porfyrinogeny, které nefluoreskují (39).

Posledním krokem celého procesu je inkorporace železa do molekuly PPIX za účasti enzymu *ferochelatázy*. Výsledným produktem je **hem**.



Obr. 17. Biosyntéza hemu

Všechny enzymy zúčastňující se syntézy hemu působí ireverzibilně. Nejnižší aktivitu z nich má *ALA-syntetáza* a *PBGD*, zatímco ostatní enzymy mají aktivitu podstatně vyšší (39).

Celý proces je regulován kromě dostupnosti substrátů zpětnovazebnou inhibicí *ALA-syntetázy*. Tato zpětná vazba je realizována hlavně přítomností hemu v buňce. Přítomný hem je schopen *ALA-syntetázu* inhibovat přímo, případně blokovat transkripci, translaci a transport proteinu do mitochondrií. Přímá inhibice má zřejmě menší význam, protože se uplatňuje až při koncentraci 10^{-5} M, zatímco tvorba *ALA syntetázy* je kontrolována již při koncentraci 10^{-7} M (39).

Podstatné je, že v praxi postihuje zpětnovazebný účinek hemu pouze syntézu prvního meziproduktu, a to 5-ALA, ale nikoliv další kroky syntetického řetězce. Za přirozených

podmínek proto nedochází k akumulaci žádného z porfyrinogenních meziproductů schopných dát vznik fluoreskující substanci.

1.7.2. Následky exogenního podání 5-ALA

Po inkubaci buněk s 5-ALA lze zachytit její přítomnost v cytoplazmě, což za normálních podmínek není díky zpětnovazebným mechanismům možné. Přesný způsob vstupu 5-ALA do eukaryotických buněk není znám, předpokládá se však některý z mechanismů aktivního transportu.

U většiny studovaných buněčných linií byla prokázána významná akumulace PPIX po předchozí inkubaci s 5-ALA (39). Tento jev je vysvětlován limitovaným množstvím a aktivitou enzymu *ferochelatázy*. Jak již bylo uvedeno výše, je prokázáno, že aktivita tohoto enzymu je u řady nádorových buněk velmi nízká, což podporuje intracelulární akumulaci PPIX (36, 37).

Bylo zjištěno, že intenzita syntézy porfyrinů je v podmínkách *in vitro* signifikantně vyšší u maligních nádorových linií než u kultur derivovaných z nemaligní tkáně (39). Existuje několik vysvětlení, proč po aplikaci 5-ALA dochází k selektivní akumulaci PPIX v nádorových buňkách:

1. Předpokládá se, že nádorové tkáně mají méně vyjádřenou bariéru, která by bránila penetraci a intersticiální distribuci 5-ALA (40).
2. Vstup 5-ALA do buňky je převážně zajištěn aktivním transportem, jehož výkonnost může být u nádorových buněk vystupňována.
3. Aktivita *PBGD* je v nádorových buňkách zvýšena (39).
4. Aktivita *ferochelatázy* je naopak u nádorových buněk snížena. Tuto skutečnost považuje většina autorů za zásadní pro selektivní akumulaci PPIX (36, 39, 40).

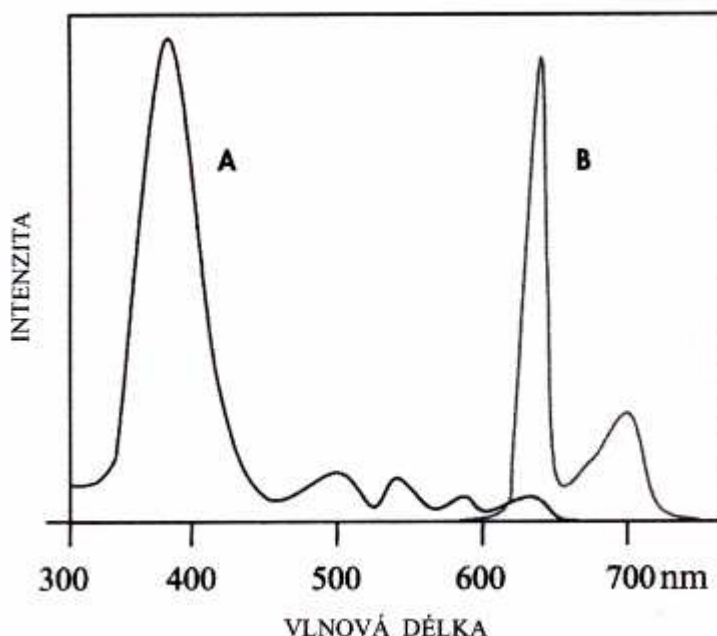
1.7.3. Absorpční a fluorescenční spektra PPIX

Dokonalá znalost absorpčního a fluorescenčního spektra PPIX je nezbytná pro správnou volbu optimálních vlnových délek excitačního světla (obr. 18). Tvary křivek vysvětlují, proč je nutno k excitaci PPIX použít modrého světla a proč dochází k fluorescenci červené barvy.

Nejúčinnější absorpce u PPIX je dosaženo při použití světla vlnové délky 400nm. Toto absorpční maximum se označuje jako tzv. Soretův pás („Soret band“). Z hlediska fotodynamické diagnostiky je významné, že při excitaci světlem této vlnové délky, která leží ve fialové části spektra, je dosaženo nejintenzivnější fluorescence.

Po Soretově pásu následují 4 podstatně méně vyjádřené Q pásy („Q bands“) ve vlnových délkách mezi 500-630nm. Poslední z těchto Q pásů je využíván k excitaci při fotodynamické terapii.

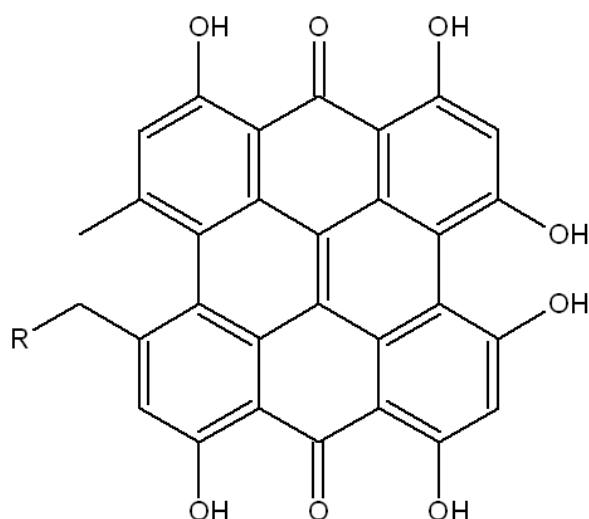
Fluorescenční emisní spektrum má dva pásy s maximy v oblasti vlnových délek 630 a 700nm, tj. v červené části spektra.



Obr. 18. Absorpční(A) a fluorescenční emisní (B) spektrum protoporfyrinu IX

1.8. HYPERICIN

Hypericin ($C_{30}H_{16}O_8$, mol. hmotnost 504,43g/mol) je látka izolovaná z třezalky tečkované (*Hypericum perforatum*) a jiných rostlin této třídy (obr. 19). Vyskytuje se spolu s pseudohypericinem jako tmavé granule v drobných žlázkách lokalizovaných např. ve stoncích, listech, okvětních lístcích a tyčince čerstvých rostlin.



Obr. 19. *Hypericum perforatum* a chemická struktura hypericinu

Třezalka byla využívána v lidové medicíně k hojení ran, jizev a k léčbě neuralgií (41). Později bylo prokázáno, že extrakt z třezalky tečkované může být účinný i při systémové terapii depresivní choroby (42). Třezalka může vyvolat fotodynamickou reakci s možnou kožní odezvou označovanou jako tzv. hypericismus (43, 44). **Bielický**

Hypericin, jedna z fotoaktivních komponent produkovaných třezalkou, je polycyklická, aromatická sloučenina patřící do skupiny fenantroperylenchinonů. Fotodestrukce buněk vyvolána hypericinem je závislá na přítomnosti kyslíku a světla příslušné vlnové délky.

Následná smrt buněk je způsobena vznikajícími fototoxickými produkty jako je singletní kyslík, semichinonové radikály a superoxidový anion (45, 46). Ačkoliv mechanismus cytotoxického působení hypericinu po ozáření není detailně znám, dochází v takto postižených buňkách k oxidativnímu stresu a apoptóze (47, 48).

1.8.1. Buněčná smrt – apoptóza a nekróza

Rovnováha mezi proliferací a smrtí buněk je základním předpokladem udržení dynamické rovnováhy mezi počtem buněk u mnohobuněčných organismů.

Buněčná smrt může být navozena jedním ze dvou mechanismů: apoptózou či nekrózou.

Apoptóza, nebo-li naprogramovaná smrt buňky, je autoregulační děj postupné smrti zmutované buňky (DNA poškození), která tak neohrozí celý organismus. Umírající buňka se typicky scvrkne, dochází ke kondenzaci chromatinu a DNA fragmentaci. Buňky se rozkládají do membránou uzavřených vezikul nazývaných jako apoptotická tělíška („apoptotic bodies“), která jsou rychle pohlcována sousedními buňkami a fagocyty. Během apoptózy nedochází k aktivaci imunitního systému, takže zde nejsou přítomny žádné známky zánětu. To je v zásadním kontrastu s buněčnou smrtí způsobenou nekrózou, ke které dochází v rámci odpovědi na chemický či fyzikální inzult. Během nekrózy dojde ke zduření buňky vedoucí k následnému porušení integrity buněčné membrány s uvolněním intracelulárního obsahu do extracelulárního prostředí a s navozením zánětlivé reakce.

Apoptóza kriticky kontroluje mnoho fyziologických procesů včetně embryonálního vývoje, tkáňové homeostázy a regulace imunitního systému. Pokud se vyskytne porucha v naprogramované smrti buňky, která je výsledkem buď selhání aktivace apoptotického procesu nebo přemrštěné odpovědi tímto procesem, je tak vytvořen základ pro mnoho

závažných lidských chorob včetně neurodegenerativních onemocnění, nádorového bujení a AIDS.

Na druhé straně, je v chemoterapii některých tumorů s nízkým apoptotickým indexem využíváno látek indukujících apoptózu směřující k větší agresivitě a ke zničení takto léčeného nádoru.

Ačkoliv jsou dobře známy morfologické změny vyvolané apoptózou, stále ne zcela jasně jsou objasněny mechanismy genové regulace tohoto procesu a jednotlivé kroky vedoucí k buněčné smrti, které jsou stále předmětem intenzivního výzkumu.

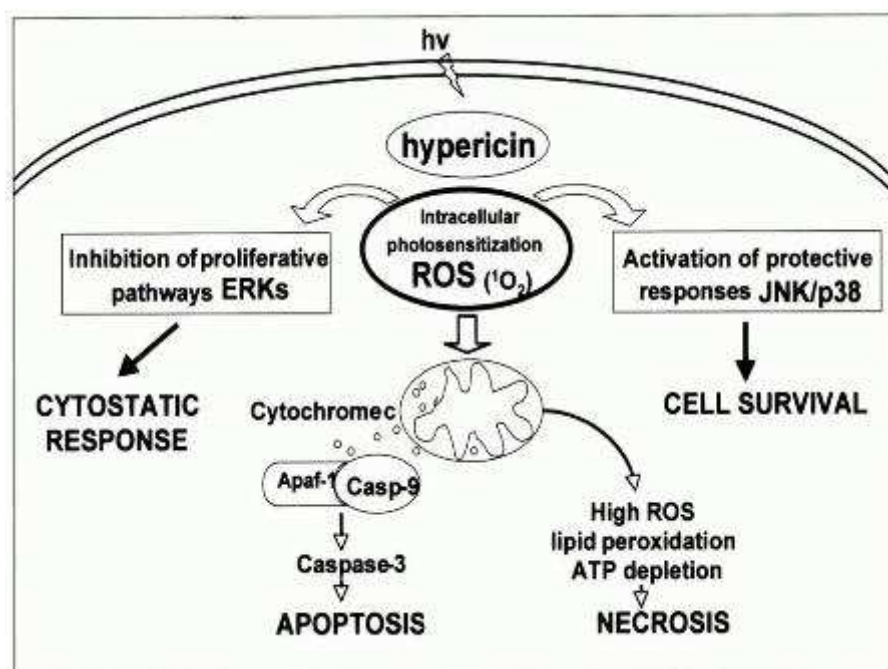
Bylo zjištěno, že velkou roli v regulaci apoptózy má aktivace velké rodiny proteáz, tzv. kaspáz (cysteinylyl *aspartate*-specific proteinases, tzv. „*the caspase signaling system*“) a proteinkináz MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase, tzv. „*the MAPK-signaling pathways in the control of cell death*“). Tři odlišné MAPK dráhy byly popsány u savčích buněk: ERK (the Extracellular signal-Regulated Kinase), JNK („*the c-Jun N-terminal Kinase*“, někdy též označována jako „*the Stress-Activated Protein Kinase*“) a p38 MAP kináza (48).

1.8.2. Hypericin jako fotosenzibilizátor ve fotodynamické terapii

Hypericin, jedna z fotoaktivních komponent produkovaných třezalkou, je polycyklická aromatická sloučenina patřící do třídy fenantroperylenchinonů. V posledních letech byl obnoven zájem o tuto sloučeninu pro její popsané antivirové a antineoplastické vlastnosti.

Byla popsána úspěšná léčba lidských tumorózních xenotransplantátů u myší za použití hypericinu po jeho fotoaktivaci (49). Důležité je i sdělení o léčbě bazocelulárních a spinocelulárních karcinomů fotodynamickou terapií s hypericinem jako účinným fotosenzibilizátorem (50).

inkubací ve tmě po dobu 72 hodin. Po této době byl hodnocen typ buněčné smrti na základě světelné mikroskopie, barvení jádra a analýzy DNA fragmentace. Se zvyšováním koncentrace hypericinu docházelo k převládání nekrózy nad apoptózou. Při koncentraci od 80 do 250 nM převažovala v navození zániku buňky apoptóza. Se stoupající koncentrací hypericinu převládla po následném ozáření naopak nekróza (47). Dále bylo pozorováno, že konverze z apoptózy k nekróze může být docíleno i zvýšením světelné dávky v kombinaci s nanomolární koncentrací hypericinu.



Obr. 21.

Obrázek převzat : Agostinis P, Assefa Z., Vantieghem A., Vandenhede J.R., Merlevede W., de Witte P.: Apoptotic and anti-apoptotic signaling pathways induced by photodynamic therapy with hypericin. *Advan. Enzyme Regul.*, 2000; 40: 157-182.

Zajímavé bylo pozorování, kdy po 15-minutové léčbě hypericinem v koncentraci 1 μM a 3 μM s následným UVA ozářením v dávce 1 J/cm^2 bylo zaznamenáno vzrůstající procento usmrcení buněk v závislosti na jejich pigmentaci. (tab. 2) (nepublikované pozorování; Davids L.M., Kacerovská D., Klemann B.)

Tab. 2 Procento usmrcení vybraných buněk po 15-ti minutové léčbě hypericinem s následným UVA ozářením (1 J/cm^2) in vitro

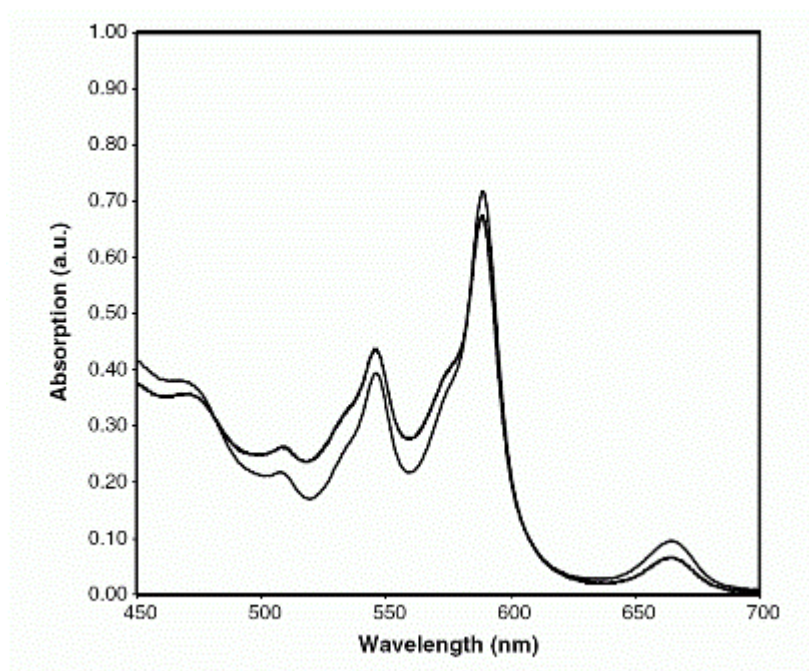
	1 μ M HYP	3 μ M HYP
keratinocyty	21%	25%
melanocyty	7%	19%
l'melanocyty	35%	64%
pigment. melanom	12%	39%
amelanot. melanom	6%	24%

1.8.3. Absorpční a fluorescenční spektra hypericinu

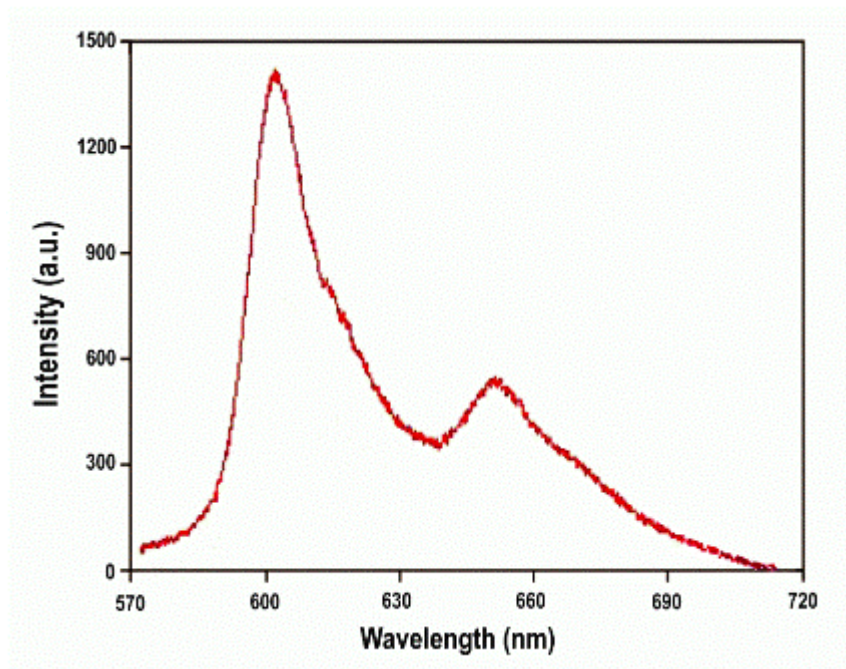
Jak již bylo uvedeno shora, znalost absorpčního a fluorescenčního spektra příslušného fotosenzibilizátoru je základním předpokladem úspěšně provedené PDT a PDD.

V případě hypericinu je absorpčního maxima dosaženo ve dvou pásmech, 548 nm a 590 nm. Malý vrchol je zachycen i při vlnové délce 660nm, jehož přítomnost je přičítána chlorofylu, který se v extraktu může vyskytovat.

Fluorescenční emisní spektrum hypericinu je charakteristické pro dva pásy s maximy v oblasti 595nm a 640nm (obr. 22, 23).



Obr. 22 Absorpční spektrum hypericinu



Obr. 23 Fluorescenční spektrum hypericinu

1.9. INDIKAČNÍ SPEKTRUM FOTODYNAMICKÉ TERAPIE V DERMATOLOGII

Doporučení (guidelines), která vydala „British Photodermatology Group“, posoudila důkazy ohledně účinnosti lokální fotodynamické terapie v dermatologii, které byly k dispozici do listopadu 2000 (23). Důkazy minimálně jedné randomizované kontrolované klinické studie hovoří ve prospěch použití této metody u nehyperkeratotických aktinických keratóz na obličeji a ve kštici, u povrchových bazocelulárních karcinomů a u morbus Bowen (spinaliom in situ). V lednu 2007 uveřejnila Americká Akademie Dermatologie (AAD) mezinárodní konsensus pro léčbu nemelanových kožních nádorů lokální PDT (55). Tato doporučení byla vypracována během setkání Mezinárodní společnosti pro fotodynamickou terapii v dermatologii („International Society for Photodynamic Therapy in Dermatology“) v lednu 2005 a hovoří o vysoké účinnosti lokální PDT u aktinických keratóz, morbus Bowen, superficiálních a tenkých nodulárních bazocelulárních karcinomů s lepším kosmetickým výsledkem než je dosaženo při použití některé z metod standardních terapeutických postupů.

V současné literatuře mnoho autorů uvádí další indikace, ve kterých se PDT osvědčila (např. mycosis fungoides, kondylomata acuminata, vulgární veruky, psoriáza, cirkumskriptní sklerodermie, akné, granulomatózní onemocnění, kožní forma leishmaniózy, kožní sarkoidóza, hypertrichóza, keratoakantom).

V České Republice je registrován methylester 5-ALA (MAL) (Metvix® creme, Galderma, France), který byl kategorizován od 1.7.2005 a je určen k léčbě aktinických keratóz, povrchových bazocelulárních karcinomů a karcinomů in situ typu morbus Bowen.

1.9.1. PDT a aktinické keratózy

Aktinické keratózy (AK) patří mezi nejčastější kožní prekancerózy s typickou lokalizací na hřbetech rukou, obličeji, kštici a na jiných slunečnímu záření vystavených místech těla („field cancerization“). Jejich mnohočetný nález u jedné osoby je velmi častý a typický. Uvádí se, že cca 5-20% lézí se může během několikaletého (10-25 let) trvání přeměnit v spinocelulární karcinom (56, 57).

Jelikož AK představují proliferaci keratinocytů omezenou na epidermis, je některými autory navrhován termín keratinocytární intraepidermální neoplazie (KIN; keratinocytic intraepidermal neoplasia) pro jejich označení (58, 59). Označení je obdobné jako u cervikální intraepiteliální neoplazie (CIN), které je běžně užíváno v gynekologické patologii pro neoplastické léze děložního čípku. Kritéria ke stanovení gradu keratinocytární intraepidermální neoplazie jsou shrnuta v tabulce 3.

Tab. 3 Klinická a histologická kritéria ke stanovení stupně (grading) keratinocytární intraepidermální neoplazie (KIN)

	Klinická	Histologická
KIN- grade I	plochá, růžová makula na kůži poškozené slunečním	fokální atypie bazálních keratinocytů v dolní třetině

	zářením; žádná drsnost nebo hyperkeratóza	epidermis
KIN- grade II	růžová či červená papule nebo ložisko s drsným, hyperkeratotickým povrchem	fokální atypie keratinocytů v nejméně dvou třetinách dolní epidermis; fokální hyperkeratóza; střídající se orto- a parakeratóza; prominující akantóza
KIN- grade III	červené, olupující se, indurované ložisko v oblasti solárního poškození kůže; může být i pigmentace	difúzní proliferace atypických keratinocytů zasahující difúzně epidermis v celé její šířce; parakeratóza; akantóza; papilomatóza

Konsensus Mezinárodní společnosti pro fotodynamickou terapii v dermatologii označuje PDT s MAL či ALA jako vysoce účinnou léčebnou metodu pro AK s výborným kosmetickým výsledkem (hodnocení: intenzita doporučení - A, kvalita důkazu - I), která by tudíž mohla být považována za léčbu první linie, a to zejména u mnohočetných lézí v oblastech poškozených slunečním zářením (55). Studiemi byl prokázán jasně lepší kosmetický výsledek u MAL-PDT ve srovnání s kryoterapií (55). V guidelines Mezinárodní společnosti pro fotodynamickou terapii v dermatologii není v doporučení zohlednění, zda se jedná o nehyperkeratotické či hyperkeratotické léze. V guidelines Britské fotodermatologické skupiny je ALA a MAL-PDT je vysoce účinnou léčebnou metodou pro nehyperkeratotické AK na obličeji a skalpu (hodnocení: intenzita doporučení - A, kvalita důkazu – I) (23).

Nejdůležitější klinické studie lokální PDT aktinických keratóz jsou uvedeny v tabulce 4.

Tab. 4 Přehled hlavních klinických studií lokální PDT u aktinických keratóz

Studie	Design studie	Velikost studie	Počet léč. sezení	Výsledky	Ref.
MAL					
1x MAL-PDT vs 2x kryoterapie	randomizovaná, multicentr. studie	202 pacientů 732 lézí (367x MAL-PDT) Follow-up: 3M.	1x MAL-PDT 2x kryoterapie	CR: 69% MAL-PDT 75% kryoterapie Výborný či dobrý kosmetický efekt:	(60)
Studie	Design studie	Velikost studie	Počet léč. sezení	Výsledky	Ref.
				96% MAL-PDT	

				81% kryoterapie	
2x MAL-PDT vs placebo PDT	randomizovaná, placebo-kontrolovaná, dvojitě slepá, multicentr. studie	80 pacientů 502 lézí (260x MAL-PDT Follow-up: 3M.	2x MAL-PDT (7 dní pauza) 2x placebo PDT (7 dní pauza)	CR: 89% MAL-PDT 38% placebo	(61)
2x MAL-PDT vs 1x kryoterapie vs placebo	randomizovaná, placebo-kontrolovaná, multicentr. studie	200 pacientů 855 lézí (295x MAL-PDT Follow-up: 3M.	2x MAL-PDT (7 dní pauza) 1x kryoterapie 2x placebo-PDT	CR: 91% MAL-PDT 68% kryoterapie 30% placebo Výborný či dobrý kosmetický efekt: 84% MAL-PDT 51% kryoterapie	(62)
MAL-PDT u transplant. pacientů	randomizovaná, placebo-kontrolovaná, dvojitě slepá studie	17 pacientů Follow-up: 4M.	2x MAL-PDT (7 dní pauza) 2x placebo-PDT (7 dní pauza)	CR: 13 ze 17 pacientů	(63)
Srovnání MAL-PDT ve 2 schématech	randomizovaná, multicentr. studie	211 pacientů 400 lézí Follow-up: 3M.	schéma 1: 1x MAL-PDT, v případě potřeby další terapie za 3M. schéma 2: 2x MAL-PDT (7 dní pauza)	CR: 92% schéma 1 87% schéma 2 Výborný kosmetický výsledek u > 80% lézí	(64)
ALA ALA-PDT různých kožních malignit	otevřená studie	50 AK	1x ALA-PDT, laser, opakováno každý druhý den do vymizení klin. nálezu	CR: 100% (za 1M.)	(65)
ALA-PDT vs 5-FU AK na ruku	randomizovaná studie	17 pacientů	1x ALA-PDT 5-FU	CR: 73% ALA-PDT 70% 5-FU (za 6 M.)	(66)
2x ALA-PDT vs placebo-PDT	randomizovaná, placebo-kontrolovaná, vyšetřujícím slepá, multicentr. studie	243 pacientů (181x ALA-PDT) Follow-up: 3 M.	1x ALA-PDT, v případě potřeby další terapie za 8 T. placebo-PDT	CR: > 75% u 89% pacientů léčených ALA-PDT a z 13% pacientů léčených placebem Výborný či dobrý kosmetický efekt: 92% ALA-PDT	(67)

AK, aktinické keratózy; PDT, fotodynamická terapie; ALA, 5-aminolevulová kyselina; MAL, methylester aminolevulové kyseliny; 5-FU, 5-fluorouracil; M., měsíc; T., týden; CR, kompletní odpověď („complete response“)

1.9.2. PDT a bazocelulární karcinom

Bazocelulární karcinom (BCC) je nejčastější maligní kožní nádor prezentující se jako superficiální, nodulární, infiltrující či morfeiformní léze. Jedná se o lokálně agresivní tumor, avšak s malou tendencí k metastazování. Guidelines v léčbě BCC doporučují při volbě terapie

tohoto nádoru zvážit různé faktory a vybrat tak léčbu neoptimálnější a nevhodnější pro konkrétní nález (histologický typ bazaliomu, lokalizace, počet lézí, recidiva) (68). Chirurgické odstranění bazaliomu představuje tradičně zlatý standard v jeho terapii. Nicméně určité situace (velikost a počet nádorů, nevhodná lokalizace pro invazivní terapii, snížená hojivost rány, chudá vaskularizace, imunosuprese, diabetes) nejsou vhodné pro chirurgické řešení.

V guidelines Mezinárodní společnosti pro fotodynamickou terapii v dermatologii patří lokální PDT mezi efektivní a spolehlivou léčebnou metodu pro superficiální typy BCC (sBCC) s výborným nebo dobrým kosmetickým výsledkem. Tato léčba nabízí výhody zejména v léčbě velkých a mnohočetných nádorů (55). (hodnocení: intenzita doporučení - A, kvalita důkazu – I)

Nejdůležitější klinické studie lokální PDT sBCC jsou uvedeny v tabulce 5.

Tab. 5 Přehled hlavních klinických studií lokální PDT u superfic. bazocelulárních karcinomů

Studie	Design	Velikost	Počet léč. sezení	Výsledek	Ref.
MAL					
MAL-PDT	retrospektivní studie	147 lézí Follow-up: 24-48M.	1x MAL-PDT	CR za 3M: 91% Recidiva za 35M: 9% Výborný kosmetický efekt: 79% pacientů	(69)
MAL-PDT („difficult-to-treat“ BCC)	otevřená multicentr. studie	38 sBCC (40 nBCC) Follow-up: 60M.	2x MAL-PDT, v případě potřeby opakováno za 3M.	CR za 3M.: 80% (histol.) Recidiva za 60M: 38% Výborný či dobrý kosmetický efekt: 94% pacientů (sBCC+nBCC)	(70)
MAL-PDT („high risk“ BCC)	otevřená multicentr. studie	80 sBCC (49 nBCC) Follow-up: 48M.	2x MAL-PDT, v případě potřeby opakováno za 3M.	CR za 3M.: 93% Recidiva za 48M.: 18% Výborný či dobrý kosmetický efekt: 86% pacientů za 24M. (sBCC+nBCC)	(71)
MAL-PDT vs kryoterapie	randomizovaná multicentr. studie	118 pacientů 219 lézí (102x MAL-PDT) Follow-up: 48M.	1x MAL-PDT (v případě potřeby opakováno za 7 dní) 2x kryoterapie (v případě potřeby opakováno za 3m)	CR za 3M.: 97% MAL-PDT 95% kryoterapie Recidiva za 48M.: 22% PDT 19% kryotp. Výborný či dobrý kosmetický efekt: 89% PDT 50% kryotp.	(72)

ALA

ALA-PDT	otevřená, jednocentr. studie	80 lézí Follow-up: 2-3M.	1xALA-PDT	CR za 2-3M.: 90%	(73)
ALA-PDT	otevřená studie	55 lézí Follow-up: 3T.	1x ALA-PDT (laser)	CR za 3T.: 100% Velmi dobrý kosmetický efekt: 91%	(74)
ALA-PDT různých kožních malignit	otevřená studie	23 sBCC Follow-up: 24-36M.	ALA-PDT (laser), opakováno každý druhý den do vymizení nálezu	CR za 1M.: 91% (+histol.) Recidiva v průměru za 29M.: 17%	(65)
ALA-PDT	otevřená studie	32 pacientů 34 lézí	1x ALA-PDT, v případě potřeby	CR: 88% po první léčbě, procento CR zvýšeno	(75)
Studie	Design	Velikost	Počet léč. sezení	Výsledky	Ref.
		Follow-up: 20M.	opakováno za 3-6M.	na 97% po druhé léčbě	
ALA-PDT	otevřená, jednocentr. studie	37 pacientů 190 lézí Follow-up: 6M.	1x ALA-PDT	CR za 6M.: 92%	(76)
ALA-PDT	retrospektivní studie	47 pacientů 95 lézí	1x ALA-PDT	CR: 86% Recidiva v průměru za 19M.: 44% Výborný kosmetický efekt	(77)
ALA-PDT	otevřená, jednocentr. studie	6 pacientů 26 lézí	2x ALA-PDT (7 dní pauza)	CR za 1-2M.: 100% 1 recidiva za 16M. Výborný kosmetický efekt	(78)
ALA-PDT vs kryoterapie	randomizovaná, otevřená studie	39 sBCC (22x ALA-PDT) (49 nBCC, 25x ALA-PDT) Follow-up: 12M.	1x ALA-PDT 2x kryoterapie (v případě potřeby opakováno za 3M.)	Recidiva za 12m.: 38% ALA-PDT 7% kryoterapie Výborná či dobrý kosmetický efekt: (sBCC+nBCC) 93% ALA-PDT 54% kryoterapie	(79)

BCC, bazocelulární karcinom; sBCC, superficiální bazocelulární karcinom; nBCC, nodulární bazocelulární karcinom; PDT, fotodynamická terapie; ALA, 5-aminolevulová kyselina; MAL, methylester aminolevulové kyseliny; M., měsíc; T., týden; CR, kompletní odpověď („complete response“)

U nodulárních BCC (nBCC) je jednou z efektivních terapeutických metod MAL-PDT, a to zejména pro tenké léze tohoto typu nádoru (55). (hodnocení: intenzita doporučení - A, kvalita důkazu – I) Bylo dokázáno, že MAL proniká hlouběji do tkáně než ALA, a to díky jeho sníženému náboji a zvýšené lipofilicitě (80). Před provedení PDT nBCC větších než 2mm by mělo být provedeno jejich seřiznutí (tzv. „debulking“) a v případě potřeby by měla být léčba opakována.

Nejdůležitější klinické studie lokální PDT nBCC jsou uvedeny v tabulce 6.

Tab. 6 Přehled hlavních klinických studií lokální PDT u nodul. bazocelulárních karcinomů

Studie	Design	Velikost	Počet léč. sezení	Výsledky	Ref.
MAL					
MAL-PDT	retrospektivní studie	189 lézí Follow-up: 24-48M.	1x MAL-PDT (příprava nádoru před terapií *)	CR za 3M.: 89% Recidiva za 35M.: 7% u tenkých nBCC 14% u silných nBCC	(69)
MAL-PDT („difficult-to-treat“ BCC)	otevřená studie	40 nBCC (38 sBCC) Follow-up: 60M.	2x MAL-PDT (v případě potřeby opakováno za 3M.; příprava nádoru před terapií *)	CR za 3M.: 87% Recidiva za 60M.: 18%	(70)
MAL-PDT vs chirurgie	randomizovaná, multicentr., otevřená studie	101 pacientů 110 lézí (56x MAL-PDT) Follow-up: 60M.	2x MAL-PDT (7 dní pauza) chirurgická excize	CR za 3M.: 91% PDT 98% excize Recidiva za 60M.: 14% MAL-PDT 4% chirurg. excize	(81)
Studie	Design	Velikost	Počet léč. sezení	Výsledky	Ref.
				Výborný či dobrý kosmetický efekt: 82% MAL-PDT 33% chirurg. excize	
MAL-PDT vs placebo-PDT	randomizovaná, placebo kontrolovaná, dvojitě slepá studie	65 pacientů 80 lézí (41x MAL-PDT) Follow-up: 6M.	2x MAL-PDT (7 dní pauza, v případě potřeby opakováno za 3M.) placebo-PDT (příprava nádoru před terapií *)	CR za 6M. (klin. + histol.): 79% MAL-PDT 35% placebo-PDT Výborný či dobrý kosmetický efekt: 92% pacientů s MAL-PDT	(82)
MAL-PDT vs placebo-PDT	randomizovaná, placebo kontrolovaná, dvojitě slepá studie	66 pacientů 70 lézí (34x MAL-PDT) Follow-up: 6M.	2x MAL-PDT (7 dní pauza, v případě potřeby opakováno za 3M.) placebo-PDT (příprava nádoru před terapií *)	CR za 6M. (histol.): 73% MAL-PDT 21% placebo-PDT Výborný či dobrý kosmetický efekt: 95% MAL-PDT	(83)
MAL-PDT („high risk“ BCC)	otevřená studie	49 nBCC (80 sBCC) Follow-up: 48M.	2x MAL-PDT (opakováno za 3M. v případě potřeby; příprava nádoru před terapií *)	CR za 3M.: 94% Recidiva za 4M.: 30%	(71)
ALA					
ALA-PDT různých kožních malignit	otevřená studie	25 lézí Follow-up: 3T.	1x ALA-PDT (laser; žádná speciální příprava nádoru před terapií)	CR za 3T.: 64% Dobrý kosmetický efekt: 60% pacientů	(74)

ALA-PDT	otevřená studie	32 pacientů 22 lézí Follow-up: 3-20M.	1x ALA-PDT v případě potřeby opakováno za 3-6M.	CR po 1.terapii: 32% CR po 2. terapii: 59%	(75)
ALA-PDT různých kožních malignit	otevřená studie	30 lézí	ALA-PDT (laser; opakováno každý druhý den do vymizení nálezu)	CR po 1m.(histol.): 61% Recidiva v průměru za 29M.: 33%	(65)
ALA-PDT	otevřená studie	48 pacientů 119 lézí Follow-up: 17M.	ALA-PDT (+DMSO; příprava nádoru před terapií *)	CR za 3-6M.: 92% Recidiva v průměru za 17M.: 5% Výborný či dobrý kosmetický efekt: 91% pacientů	(84)
ALA-PDT (malé nBCC)	otevřená studie	23 pacientů 24 lézí Follow-up: 3M.	1x ALA-PDT (kyretáž před PDT)	CR za 3m. (histol.): 92% Výborný či dobrý kosmetický efekt: 95%	(85)
ALA-PDT vs kryoterapie	randomizovaná, otevřená studie	49 nBCC (25x ALA-PDT) (39 sBCC, 22x ALA-PDT)	1x ALA-PDT 2x kryoterapie (v případě potřeby opakováno za 3M.;	Recidiva za 12M.: 13% ALA-PDT 21% kryoterapie	(79)
Studie	Design	Velikost Follow-up: 12M.	Počet léč. sezení seříznutí léze skalpelem před terapií)	Výsledky	Ref.

BCC, bazocelulární karcinom; sBCC, superficiální bazocelulární karcinom; nBCC, nodulární bazocelulární karcinom; PDT, fotodynamická terapie; ALA, 5-aminolevulová kyselina; MAL, methylester aminolevulové kyseliny; M., měsíc; T., týden; CR, kompletní odpověď („complete response“); DMSO, dimethyl sulfoxid.
* příprava projevu před léčbou závisela na tloušťce tumoru, mohlo se jednat buď o jemné očištění povrchu či o seříznutí (tzv. debulking) tumoru.

1.9.3. PDT a morbus Bowen

Morbus Bowen (MB) představuje spinocelulární karcinom in situ, který ve 3% může přejít v invazivně rostoucí karcinom a asi v jedné třetině může zakládat metastázy (86, 87). Jeho nejčastější lokalizací jsou dolní končetiny u starších lidí, ale prakticky může vzniknout kdekoliv na kůži.

Podle doporučení konsensu Mezinárodní společnosti pro fotodynamickou terapii v dermatologii je lokální PDT efektivní v léčbě MB s dobrým kosmetickým výsledkem. (hodnocení: intenzita doporučení - A, kvalita důkazu – I) Její účinnost je srovnatelná s kryoterapií či s léčbou 5-fluorouracilem (5-FU). Lokální PDT by měla být zvažována jako

léčba první linie pro toto onemocnění. Po opakovaných neúspěšných PDT by mělo přijít na řadu chirurgické řešení (55).

Tab. 7 Přehled hlavních klinických studií lokální PDT u morbus Bowen

Studie	Design	Velikost	Počet léč. sezení	Výsledky	Ref.
MAL					
MAL-PDT vs kryoterapie 5-FU	randomizovaná, placebo kontrol., multicentr. studie	225 pacientů 275 lézí (111x MAL-PDT)	2x MAL-PDT 2x MAL-PDT 1x kryoterapie 1x 5-FU (v případě potřeby opakováno za 3M.)	CR – 3M.: 93% MAL-PDT CR za 3M.: 93% MAL 86% kryotp. 83% 5-FU Recidiva za 24M.: 18% MAL-PDT 23% kryoterapie 21% 5-FU	(88)
ALA					
ALA-PDT vs kryoterapie	randomizovaná, jednocentr. studie	19 pacientů 40 lézí (20x MAL-PDT) Follow-up: 12M.	1x ALA-PDT 1x kryoterapie (v případě potřeby opakováno každé 2 M.)	CR po 1. léčbě: 75% ALA-PDT 50% kryoterapie CR po 2 terapiích: 100% ALA-PDT CR po 3 terapiích: 100% kryoterapie 12m. follow-up: žádná recidiva u PDT 2 recidivy u kryoterapie Ulcerace: žádná u ALA-PDT 5 případů u kryoterapie Jizvení: žádné u ALA-PDT 4 případy u kryoterapie	(89)
ALA-PDT vs 5-FU	randomizovaná, multicentr. studie	40 pacientů 66 lézí (33x ALA-PDT) Follow-up: 12M.	1x ALA-PDT 5-FU (v případě potřeby opakováno za 6 T.)	CR za 6T.: 88% ALA-PDT 67% 5-FU 12M. follow-up: 2 recidivy ALA-PDT 6 recidiv u 5-FU	(90)
ALA-PDT Studie	randomizovaná, jednocentr. studie	16 pacientů 61 lézí follow-up: 12M.	1x ALA+ červené světlo (630±15nm; 125 J/cm ²) vs 1x ALA+ zelené světlo (540±15nm; 62,5 J/cm ²)	„Počínající“ léze CR: 94% červené světlo 72% zelené světlo 12m. follow-up: 88% červené světlo 48% zelené světlo	(91)

MB, morbus Bowen; PDT, fotodynamická terapie; ALA, 5-aminolevulová kyselina; M., měsíc; T., týden; CR, kompletní odpověď („complete response“)

1.9.4. PDT a zánětlivé dermatózy

PDT může ovlivnit celou řadu zánětlivých dermatóz (92). Většina studií se soustředila na akné, psoriázu a virové bradavice. V těchto indikacích došlo ke změně postupu, kdy se

upřednostňují opakované cykly s nižším dávkováním a nižší intenzitou světla na rozdíl od léčebných protokolů určených pro nádorová onemocnění kůže.

ALA-PDT u akné se jeví jako účinná léčebná metoda redukující počet zánětlivých lézí u mírné až středně těžké formy (93, 94). Často je však léčba provázena řadou nežádoucích účinků, jako je bolestivost, tvorba krust, erytém či hyperpigmentace.

Ve studii porovnávací účinnost mezi 20% hydrochlorid 5-aminolevulové kyseliny a methylester formou této kyseliny v léčbě akné nebyl zjištěn žádný statisticky signifikantní rozdíl v terapeutickém efektu obou fotosenzibilizátorů, avšak u ALA-PDT byly pozorovány déle trvající a závažnější nežádoucí účinky (95).

V PDT lupénky proběhlo několik studií s rozdílnými závěry na základě odlišných koncentracích 5-ALA. V r. 2005 byly publikovány výsledky studie hodnotící jak klinický tak i imunohistochemický nález před a po léčbě PDT ložiskovité formy psoriázy za použití 20% 5-ALA. Klinicky bylo hodnoceno zašupení, erytém a infiltrace ložisek pomocí tzv. SEI index (the scale, erythema, induration index, max. skóre 9 bodů) a dále pacienti hodnotili bolestivost během léčby pomocí číselné škály od 0 do 10, kdy nula znamenala bezbolestivé provedení léčby a deset naopak nesnesitelnou bolest během ozařování. Před léčbou, po druhé a po poslední PDT byla provedena biopsie s následným imunochemickým barvením protilátkami proti faktoru VIII a endotelinu. V průměru došlo ke snížení SEI indexu z 7 (rozpětí 5-9) na 1,5 (rozpětí 0-3), bolestivost v době ozařování dosáhla bodu 7. Dále bylo zjištěno, že v průběhu PDT je indukována neovaskularizace v dermis, kdy byl počet cév v subpapilárním plexu zvyšován (96).

Výsledky jiné studie byly naopak méně úspěšné. Jednalo se o 12 nemocných s chronickou lupénkou ložiskovitěho typu léčenou PDT, kdy u každého pacienta byla použita na 3 psoriatická ložiska jiná koncentrace 5-ALA (0,1%, 1%, 5%). Klinicky byl hodnocen tzv. PSI

index daný součtem jednotlivých skóre pro zašupení, erytém a infiltraci. Průměrné procento zlepšení bylo 37,5%, 45,6% a 51,2% pro koncentraci 0,1%, 1% a 5% 5-ALA (97).

Efekt PDT u virových bradavic je stále diskutabilní. Byly však provedeny studie srovnávající účinek ALA-PDT s placebo-PDT s výrazně lepším výsledkem pro ALA-PDT (98, 99).

Dále se PDT zkouší i u jiných chronicky zánětlivých dermatóz jako např. lichen ruber, cirkumskriptní neurodermatitis, numulární ekzém, prurigo nodularis. Objevují se i zprávy o úspěšné PDT kondylomat akuminata (100, 101).

1.9.5. PDT a fotorejuvenation

Několika studii bylo prokázáno efekt PDT s použitím intenzivního pulzního světla (intense pulse light, IPL) o vlnových délkách 550 až 1200 nm na zmírnění projevů fotopoškozené kůže s navozením fotoomlazení (photorejuvenation) na obličeji a ve křtici (102, 103).

1.9.6. PDT jako prevence nemelanomových nádorů kůže u imunosuprimovaných pacientů

Transplantovaní pacienti mají 10x zvýšené riziko vzniku BCC a 40-150x větší riziko vzniku spinocelulárního karcinomu (104, 105). Bylo prokázáno, že transplantovaní pacienti s historií některého z nemelanomových nádorů kůže před transplantací mají vyšší riziko vzniku těchto nádorů po transplantaci než pacienti, u kterých se před transplantací nevyskytl žádný z těchto tumorů (106). Incidence se různí i podle typu transplantovaného orgánu (109). Podle výsledků několika studií by PDT mohla představovat prevenci proti vzniku AK u imunosuprimovaných pacientů (107, 108). K potvrzení tohoto tvrzení je však zapotřebí dalších studií s dlouhodobým sledováním těchto pacientů (55).

1.10. VYUŽITÍ FOTODYNAMICKÉ DIAGNOSTIKY V DERMATOLOGII

Fotodynamická diagnostika (někdy označovaná také jako fluorescenční) může být v dermatologii využita pro vymezení povrchových hranic léčeného projevu a k rozpoznání jeho časné recidivy.

Bylo zjištěno, že nejsilnější fluorescence po lokální aplikaci 5-ALA je dosaženo u aktinických keratóz a epitelových nádorů (bazocelulární a spinocelulární karcinom, morbus Bowen, Pagetova choroba) (109). Tyto léze vykazují za 4-6 hodin od nanesení fotosenzibilizátoru intenzivní, silnou a ostře ohraničenou červenou fluorescenci ve Woodově lampě. Takto intenzivní fluorescence může být daná porušením rohové vrstvy pokožky a vystupňovanou buněčnou proliferací v těchto tkání vzhledem k neoplastickému a zánětlivému procesu.

Také u lupénky byla pozorována intenzivní, silná fluorescence srovnatelná s výše zmíněnými nádory, která však nebyla vždy homogenní, což může představovat určitou limitaci použití PDT pro toto onemocnění. Heterogenita fluorescence byla u ložisek psoriázy zjištěna i navzdory předchozí léčbě keratolytiky (110).

Středně intenzivní fluorescence byla pozorována u lézí lupus erythematosus, v ložiscích mycosis fungoides (109).

Naopak žádná fluorescence nebyla zjištěna u melanocytárních névů a nepatrná fluorescence byla detekována u maligního melanomu. Vysvětlení je několik. Povrch většiny melanomů limituje penetraci 5-ALA ve srovnání např. s bazaliomem, jehož povrch je často ulcerovaný. Porušený kožní povrch může být právě jedním z klíčových faktorů zvýšené penetrace fotosenzibilizátorů u epitelových kožních tumorů. Fyzikální faktory mohou také sehrát určitou roli u melanomů, kde se předpokládá na melaninu závislé snížení stimulace a emise porfyrinové fluorescence. Podobné vysvětlení může být i u Kaposiho sarkomu, kde byla pozorována též velmi nízká fluorescence (109).

Nepřítomnost fluorescence u běžných bradavic může být vysvětlena příliš silnou rohovou vrstvou. Proto by každá veruka měla být před nanesením fotosenzibilizátoru ošetřována keratolytiky, které by vedly ke snížení rohové vrstvy a k podpoření dobré penetrace fotosenzibilizující látky.

1.11. UPLATNĚNÍ FOTODYNAMICKÉ TERAPIE A DIAGNOSTIKY V JINÝCH LÉKAŘSKÝCH OBORECH

1.11.1. Pneumologie

V pneumologii je možné využití fluorescenční bronchoskopie k časně detekci rakoviny plic.

1.11.2. Gastroenterologie

V gastroenterologii je fluorescenční diagnostika vyhrazena zejména pro detekci Barretova jícnu.

1.11.3. Neurochirurgie

Klinické studie PDT v neurochirurgii se soustředí na léčbu primárního a recidivujícího glioblastomu, astrocytomu, maligního meningiomu, nádoru hypofýzy a metastáz maligního melanomu.

1.11.4. Gynekologie

PDT se zkouší v léčbě kondylomat acuminata, lichen sclerosus et atrophicus a intraepiteliálních neoplazií vulvy (VIN).

1.11.5. Urologie

V urologii již své uplatnění našla fluorescenční diagnostika sloužící k vizualizaci povrchových nádorů močového měchýře, jejichž typickým znakem je vysoké riziko recidivy a multifokální charakter.

1.11.6. Oftalmologie

V oftalmologii jsou využívány benzoporphyrinové deriváty (Verteporfin, Visudyne®) jako účinné fotosenzibilizátory ze skupiny chlorinů pro léčbu senilní makulární degenerace.

1.11.7. Otorinolaryngologie

V otorinolaryngologii může být fotodynamická diagnostika a terapie využita k detekci a léčbě prekanceróz a/nebo tumorů hlavy a krku. Probíhají klinické studie léčby perzistujících a recidivujících nasofaryngeálních karcinomů za použití fotosenzibilizátoru meta(tetra)hydroxyfenylchlorinu (Foscan®).

1.12. ZÁVĚR

Z toho, co bylo uvedeno vyplývá, že fotodynamická terapie nabízí možnost poměrně selektivního zásahu s dobrým kosmetickým účinkem. Může dokonce zmírnit i některé projevy aktinického stárnutí kůže. Další výhodou je i její lokální aplikace, která je neinvazivní, a možnost léčby rozsáhlých plošných lézí.

Mezi její nevýhody patří složitost jejího provedení v podmínkách ordinace s časovou náročností, bolestivost a další nepříjemné pocity doprovázející ozařování a dále i její finanční náročnost a to jak ze strany fotosenzibilizátorů tak i kvalitních ozařovacích přístrojů různé provenience.

Pro koho může být tato metoda v dermatologii nejpřínosnější? Studie ukazují, že PDT je bezpečnou a účinnou metodou pro pacienty s mnohočetnými nehyperkeratotickými aktinickými keratózami nebo s povrchovými či tenčími nodulárními bazocelulárními karcinomy, s ložisky morbus Bowen, u kterých jejich lokalizace, velikost či počet představují omezení pro použití některé metody z klasické terapie.

Zdá se, že původní názor o PDT jako o metodě hledající své uplatnění, byl již vyvrácen.

2. CÍLE DIZERTACE, PŘEDPOKLADY PRO JEJICH SPLNĚNÍ

Náplní tohoto postgraduálního studia v oboru dermatovenerologie byla fotodynamická terapie a diagnostika (PDT, PDD) u nemelanomových kožních nádorů a některých nenádorových nemocí.

Cílem vlastní dizertační práce bylo ověření účinku hypericinu v extraktu z třezalkové nati jako nového fotosenzibilizátoru ve fotodynamické terapii a diagnostice kožních prekanceróz a epitelových nádorů (aktinické keratózy, bazocelulární karcinom, karcinom in situ typu morbus Bowen). Dalším úkolem bylo porovnání terapeutického efektu této látky v léčbě nemelanomových kožních nádorů a některých vybraných nenádorových onemocnění kůže (psoriáza, vulgární veruka apod.) s jedním z nejrozšířenějších lokálních fotosenzibilizátorů využívaných ve fotodynamické léčbě, a to s 20% 5-aminolevulovou kyselinou v gelu. Vedlejším cílem této práce bylo vyhodnocení nasnímaných spektrofotometrických křivek během fotodynamické léčby kožních nálezů se zaměřením se na možnou detekci vstřebaného fotosenzibilizátoru v léčeném projevu a jeho fotobleaching efektu po ozáření pomocí remitenčního spektrofotometru.

Zvolený cíl dizertace byl součástí výzkumného projektu podpořeného grantem IGA MZ ČR (NR 7901-3).

Dermatovenerologická klinika FN v Plzni měla k dispozici lampu Rebeca RBC 051 (firma Precioza Turnov, Česká Republika), která byla od dubna 2004 nahrazena lampou Medeikonos PDT (lampa Medeikonos PDT, Model 200, Medeikonos AB, Gothenburg, Švédsko). Tato lampa byla stejně jako Rebeca RBC 051 zdrojem nekoherentního červeného světla v rozmezí vlnových délek 580-680 nm. Jejimi výhodami oproti předcházejícímu zdroji bylo snadné nastavení dávky v rozmezí 10-150 J/cm² a možnost ozáření větší plochy (100x100mm) spojené s rovnoměrnou distribucí světelné energie v takto ozařovaném místě. Vzhledem

k malému množství pacientů ošetřených lampou Rebeca (12 osob) nebylo možno statisticky porovnat úspěšnost terapie při použití obou lamp. Podle našich zkušeností se však terapeutický efekt lampy české provenience zdál být srovnatelný s účinkem lampy Medeikonos PDT.

Oba fotosenzibilizátory byly v pravidelných intervalech dodávány na Dermatovenerologickou kliniku FN v Plzni, takže byla zajištěna pravidelná léčba osob zavzatých do studie. Extrakt hypericinu z třezalkové nati byl připravován na Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. Lékařské Fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Fotosenzibilizátor 20% 5-aminolevulová kyselina v gelu byla dodávána společností Science for Life v rámci klinické studie povolené Státním úřadem pro kontrolu léčiv.

Provedení probatorních excizí léčených projevů před a po fotodynamické léčbě včetně histopatologického vyšetření bylo zajištěno na Dermatovenerologické klinice FN v Plzni, která je vybavena k provádění chirurgických výkonů na kůži v lokální anestézii a zajišťuje histopatologické vyhodnocení všech excidovaných projevů.

3. ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ

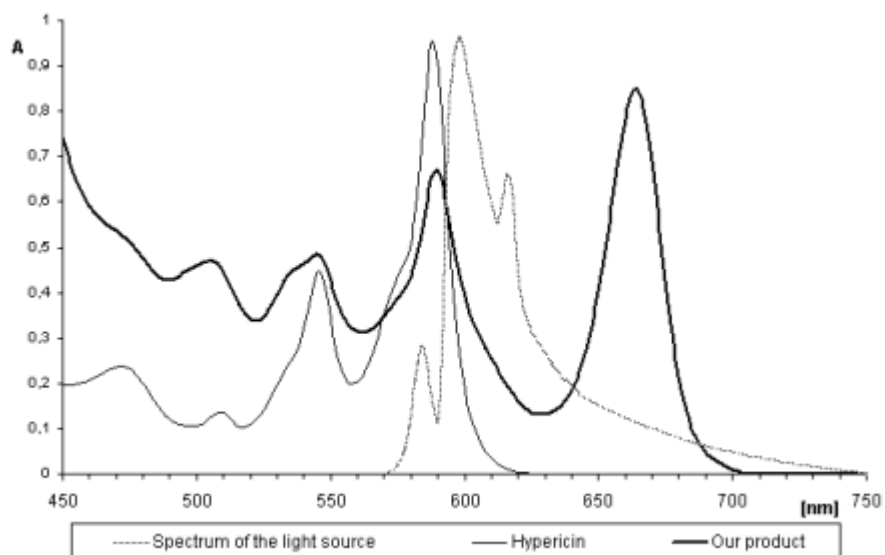
3.1. PŘÍPRAVA HYPERICINU

Produkt hypericinu byl získán extrakcí 25g nati suché drogy (*Hypericum perforatum*, *Hyperici Herba* sc., MEGAFYT, Česká republika) 95% etanolem (Penta, Česká republika) v Soxhletově přístroji s následným přidáním glycerolu. Po 4 hodinách extrakce byl roztok koncentrován do 50 ml vakuovou destilací. Surový koncentrát byl hrubě přečištěn chromatograficky (Kieselguhr Hyflo-Super Cel, John Mansville Co., New York, USA) s následným přidáním 3ml glycerolu a odstraněním 95% etanolu rotačním odpařovacím přístrojem. Následně byl horký produkt přendán zkumavky, ve které byl uskladněn.

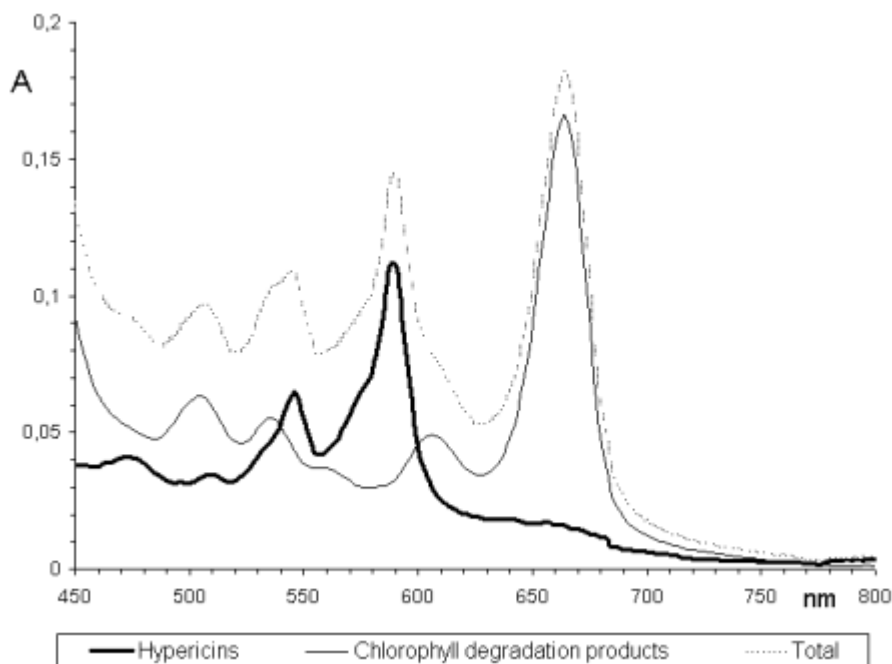
Vzniklý produkt byl hnědo černé barvy, homogenní, husté konzistence a vysoce viskózní. Obsahoval 36% glycerolu, 17% vody a 47% pevných látek. Jeho hustota byla 1,2 g/ml. K přeměna z protohypericinu a protopseudohypericinu na hypericin a pseudohypericin došlo po vystavení produktu dennímu světlu. Koncentrace hypericinu byla zjišťována spektrofotometricky při vlnové délce 590 nm (resp. v rozmezí 450-800 nm) v metanolu. (fig. 2). Hlavními absorpčními látkami v takto připraveném extraktu byl hypericin a rozpadové produkty chlorofylu. (Fig. 3) Fluorescence hypericinu a pseudohypericinu se pohybovala v rozmezí vlnových délek 590-670 nm. TLC analýzou bylo zjištěno, že 1,5-2,5 mg/ml výsledného produktu obsahuje 32,5% hypericinu a 67,5% pseudohypericinu. Tento produkt byl připraven do finální koncentrace 2 mg/ml. Průměrný výtěžek hypericinu byl 17mg (0,07%) z 25g suché drogy.

Takto získaný produkt byl chráněn před odpařením, světlem a byl skladován při pokojové teplotě. Při kontrole za 12 měsíců produkt vykazoval stejná spektra jako po jeho přípravě. Tím byla ověřena jeho stabilita.

Metodiku přípravy extraktu hypericinu v glycerinovém roztoku navrhl a propracoval prof. MUDr. Milan Jirsa, DrSc., jeden ze spoluřešitelů grantového projektu IGA MZ ČR (NR 7901-3).



The emission spectrum of the lamp and absorption spectrum of hypericin (10µg/ml) in methanol and our product 1:160 in methanol.



Absorption spectrum of hypericin and chlorophyll degradation products (the main color components in our product) after separation by TLC and extraction with methanol

3.2. AMINOLEVULOVÁ KYSELINA

Fotosenzibilizátor 20% hydrochlorid 5-aminolevulová kyselina v gelu byla dodávána po celou dobu společností Science for Life v rámci klinické studie povolené Státním úřadem pro kontrolu léčiv. Přípravek byl skladován v chladničce v neprůhledných tubách, měl gelovou konzistenci, žluto oranžovou barvu a byl průsvitný.

3.3. METODIKA PRÁCE

Při samotné fotodynamické terapii byl vždy dodržován stejný postup. Léčené kožní léze byly zbaveny a očištěny od krust a šupin před samotným nanesením fotosenzibilizátoru na jejich povrch projevu a do jejich bezprostředního okolí pod okluzi (Tegaderm, 3M Health Care). Doba latence u hypericinu byla 2 hodiny, u 5-aminolevulové kyseliny byla ALA 3 hodiny. Po této době byla snesena okluze a event. byl povrch léze očištěn tampónem navlhčeným fyziologickým roztokem od nevstřebaných zbytků fotosenzibilizátoru. Vychytání fotosenzibilizující látky v léčeném projevu bylo ověřeno pomocí diagnostické nebo Woodovy lampy. Následně byl projev ozářen lampou emitující nekoherentní červené světlo v rozmezí 580-680 nm v dávce 75 J/cm^2 (v případě vulgárních veruk byla dávka zvýšena na 120 J/cm^2). Po ozáření bylo ověřeno, zda došlo k fotobleaching efektu a to opět pomocí diagnostické nebo Woodovy lampy. Léčený projev byl překryt (Cicaplaie Sterile, Smith+Nephew), nemocný byl poučen o nutnosti fotoprotekce v následujících 2-3 dnech. Počet terapií se řídil se řídil klinickým nálezem a přetrvávající fluorescencí při fotodynamické diagnostice a byl v průměru 6x.

U většiny léčených projevů byly snímány křivky remitenčním spektrofotometrem před nanesením fotosenzibilizátoru, po jeho aplikaci (před samotným ozářením) a po ozáření.

Klinický nález byl v průběhu terapie dokumentován fotograficky. Před samotným zahájením fotodynamické terapie byl nemocný informován o principu této metody a o jeho zařazení do studie, podepsal informovaný souhlas.

Nález po ukončené fotodynamické terapii byl hodnocen klinicky a u vybraných diagnóz i histologicky (bazocelulární karcinom, morbus Bowen). Klinické hodnocení zahrnovalo kompletní, částečné či žádné klinickému zhojení. „Kompletní klinická odpověď“ odpovídala klinickému zhojení, kdy léčený projev zcela vymizel, v místě původního ložiska nebyla hmatná žádná infiltrace, povrch byl zcela hladký. „Částečná klinická odpověď“ představovala jen částečné zlepšení nálezu, kdy se projev zmenšil, vybledl, oploštil, ubylo infiltrace. Při hodnocení „žádná klinická odpověď“ nedošlo vůbec ke zlepšení.

Histopatologický nález byl hodnocen jako zhojený, kdy nebyla zjištěna žádná známka nádoru, a nebo jako nezhojený s přetrvávajícím nálezem tumoru.



3.4. REMITENČNÍ SPEKTROFOTOMETR

Pro kožní měření byl používán kožní spektrofotometr s kontinuálním spektrem umožňující přenos informace v blízkém infračerveném, viditelném i ultrafialovém spektru optickými vlákny. Přístroj využíval komponent firmy Ocean Optics (USA) a umožňoval grafické i matematické zpracování naměřených dat. Jeho základem byl monolytický spektrofotometr firmy Ocean Optics (USA) doplněný o software stejnojmenné společnosti a světlovodiče.^{45, 46}

V praxi byla kůže osvětlována pomocí flexibilních světelných vláken. Reflektované rozptýlené světlo od kožního povrchu i z různých epidermálních a dermálních vrstev bylo snímáno integrovaným světelným systémem. Podobným světlovodičem byl veden odražený paprsek zpět do detektoru. Kombinovaný signál vlnových délek se signálem ze snímacího zařízení byl konvertován na signál elektrický, který byl následně převeden na soustavu číslic dále zpracovávanou počítačem.

Cílem měření bylo zachytit při jaké vlnové délce je dosaženo nejvyšší absorpance po nanesení fotosenzibilizátoru na léčený projev. Dále jsme ověřovali, zda se mění absorpance po ozáření viditelným světlem. V praxi jsme tedy chtěli zjistit, zda je možné využít remitenční spektrofotometr k detekci vstřebaného fotosenzibilizátoru do kůže a k ověření tzv. „photobleaching efektu“ po provedené PDT.

3.5. UŽITÉ STATISTICKÉ METODY

Statistická analýza byla provedena s užitím software S.A.S. (Statistical Analysis Software) release 8.02 a programu STATISTICA 98 Edition.

Pro měřené parametry v celém souboru a v jednotlivých skupinách a podskupinách byly počítány základní statistické údaje jako průměr, směrodatná odchylka, rozptyl, medián, mezikvartilové rozpětí, minimum, maximum. Vybrané statistické údaje byly též zpracovány graficky do tzv. Box & Whisker plot diagramů a histogramů. Na porovnání distribucí jednotlivých parametrů v různých skupinách a podskupinách, vzhledem k distribucím těchto

proměnných, byly použity neparametrické testy, a to Kruskal-Wallisův test a Wilcoxonův test. V zásadě byly používány dvouvýběrové varianty těchto testů. Pro zjištění závislosti zkoumaných znaků, vzhledem k negausovskému rozdělení těchto proměnných, byl použit Spearmanův koeficient korelace. U kategorických proměnných byla ověřována závislost daných znaků užitím Chi-square testu a Fisherova exaktního testu.

U některých testů nebyly vždy plně splněny podmínky pro jejich užití (chí-kvadrát test) vzhledem k příliš malému počtu osob v jednotlivých podskupinách.

4. VÝSLEDKY DIZERTACE

3.4. CHARAKTERISTIKA SOUBORU NEMOCNÝCH

Pacienti, kteří vstoupili do studie, byli rozděleni podle použitého fotosenzibilizátoru a podle diagnózy. Ve skupině s ALA bylo zahrnuto celkem 48 osob, ve skupině s hypericinem 46 osob. Celkově se jednalo 16x o aktinické keratózy, 43x o bazocelulární karcinom, 11x o karcinom in situ typu morbus Bowen, 18x o vulgární veruky a 6x lupénku. V žádné skupině rozdělené podle fotosenzibilizátoru nebyla určitá diagnóza zastoupena častěji (statisticky významný rozdíl nebyl prokázán, Chi-Square: 0.9994), tak aby získané výstupy nebylo možné spolu porovnávat. Stejně tak nebylo prokázáno, že by se stáří pacientů u jednotlivých diagnóz lišilo v rámci použitého fotosenzibilizátoru (Wilcoxon Two-Sample Test: 0.8767).

Počet terapeutických sezení se statisticky významně nelišil v rámci léčby jedné diagnózy odlišným fotosenzibilizátorem (Wilcoxon Two-Sample Test: 0.4668), počet terapií byl průměrně 6x.

	ALA-PDT (n=48; 52%)	HYP-PDT (n=45; 48%)	Celkem (n=93; 100%)
Pohlaví			
muž	28 (58%)	28 (61%)	56 (59%)
žena	20 (42%)	18 (39%)	38 (41%)
Věk (roky)			
průměr ± SD	59,8 ± 19,6	58,7 ± 21,0	59,3 ± 20,3
medián	66,0	68,5	68
maximum	84	84	84
minimum	15	13	13
Diagnóza			
keratosis actinica	8 (9%)	8 (9%)	16 (17%)
basalioma superf.	17 (40%)	18 (42%)	35 (81%)
basalioma nodulare	5 (12%)	3 (7%)	8 (19%)
morbus Bowen	6 (6%)	5 (5%)	11 (12%)
psoriasis	3 (3%)	3 (3%)	6 (6%)
verruca vulgaris	9 (10%)	9 (10%)	18 (19%)
Rasa			
kavkazská	48 (51%)	46 (49%)	94 (100%)

Dg: keratosis actinica	ALA-PDT (n=8)	HYP-PDT (n=8)	Celkem (n=16)
Pohlaví			
muž	6 (75%)	5 (63%)	11 (69%)
žena	2 (25%)	3 (37%)	5 (31%)
Věk (roky)			
průměr ± SD	75,4 ± 6,6	75,0 ± 6,7	
medián	74,5	74,5	
maximum	84	84	
minimum	68	63	
Lokalizace			
kštice –skalp	5	5	10
obličej	3	3	6

Dg: basalioma superficiale (sBCC) nodulare (nBCC)	ALA-PDT (n=17) (n=5)	HYP-PDT (n=18) (n=3)	Celkem (n=35) (n=8)
Pohlaví			
muž – sBCC	9 (53%)	9 (50%)	26 (60%)
– nBCC	5 (100%)	3 (100%)	
žena– sBCC	8 (47%)	9 (50%)	17 (40%)
Věk (roky)			
průměr ± SD – sBCC	64,1±14,1	64,8 ± 14,0	
– nBCC	73,8± 8,4	73,7 ± 4,7	
medián – sBCC	69,0	70,0	
– nBCC	77,0	72,0	
maximum – sBCC	84	82	
– nBCC	82	79	
minimum – sBCC	34	32	
– nBCC	61	70	
Lokalizace – sBCC			
kštice	0	0	0
obličej	2	1	3
DK	1	0	1
HK	0	2	2
trup	14	15	29
Lokalizace – nBCC			
obličej	3	2	5
kštice	0	1	1
trup	2	0	2

Dg: morbus Bowen	ALA-PDT (n=6)	HYP-PDT (n=5)	Celkem (n=11)
Pohlaví			
muž	4 (67%)	3 (60%)	7 (64%)
žena	2 (33%)	2 (40%)	4 (36%)
Věk (roky)			
průměr ± SD	66,2 ± 7,8	67,2 ± 7,3	
medián	67,5	67,0	
maximum	74	76	
minimum	53	57	
Lokalizace			
obličej	3	1	4
kštice	0	1	1

DK	2	1	3
HK	1	1	2
trup	0	1	1

Dg: verruca vulgaris	ALA-PDT (n=9)	HYP-PDT (n=9)	Celkem (n=18)
Pohlaví			
muž	3 (33%)	6 (67%)	9 (50%)
žena	6 (67%)	3 (33%)	9 (50%)
Věk (roky)			
průměr ± SD	35,4 ± 16,5	28,1 ± 17,5	
medián 36,0		20,0	
maximum	61	61	
minimum	15	13	
Lokalizace			
DK	7	7	14
HK	2	2	4

Dg: psoriasis	ALA-PDT (n=3)	HYP-PDT (n=3)	Celkem (n=6)
Pohlaví			
muž	1 (33%)	2 (67%)	3 (50%)
žena	2 (67%)	1 (33%)	3 (50%)
Věk (roky)			
průměr ± SD	30,7 ± 18,9	41,3 ± 14,4	
medián 24,0		33,0	
maximum	52	58	
minimum	16	33	
Lokalizace			
DK	1	1	2
HK	1	0	1
trup	1	2	3

2.8. AKTINICKÉ KERATÓZY (AK)

Ve skupině s HYP i ALA bylo léčeno 8 osob. Počet terapií byl průměrně u HYP 6x, u ALA 5x. (viz. tab.)

	Průměr ± směrod.odchylka	Median
HYP-PDT	6,13 ± 2,70	6,50
ALA-PDT	5,25 ± 1,98	6,00

Průměrný počet terapií u PDT aktinických keratóz

Fotosenzibilizátor HYP: (graf 1)

V případě HYP došlo po léčbě ke **kompletní klinické odpovědi** u 4 osob, k **částečné klinické odpovědi** u zbývajících 4 pacientů, u kterých v místě původního nálezu přetrvávala stále hmatná infiltrace.

Při **kontrole za 3 měsíce** přetrvávalo zhojení u všech 4 osob, u nichž došlo ke kompletní klinické odpovědi na léčbu. U zbývajících 4 osob, u kterých byl výsledek po léčbě hodnocen jako zlepšený, došlo ke zhoršení kožního nálezu.

Ke **kontrole za 6 měsíců** se dostavili jen 3 pacienti ze skupiny, kde došlo ke kompletnímu klinickému zhojení. U 2 z nich přetrvávalo zhojení, u jedné osoby došlo k recidivě.

Ve vztahu klinický nálezn po léčbě versus kontrola za 3 měsíce byla zjištěna statisticky významná pozitivní korelace (Spearman Correlation Coefficient: 1.00000, p-value: <0.0001).



Před HYP-PDT

Po HYP-PDT, klinicky zhojeno



Před HYP-PDT

Po HYP-PDT, klinicky zhojeno

Fotosenzibilizátor ALA: (graf 1)

V případě **ALA** došlo po léčbě ke **kompletní klinické odpovědi** u **5** osob, k **částečné klinické odpovědi** u **2** pacientů, u kterých v místě léčeného projevu přetrvávala lehká infiltrace. U **1** osoby musela být terapie přerušena pro sekundární impetiginizaci (viz. obrazová dokumentace). Po jejím zhojení si pacient nepřál dále v léčbě PDT pokračovat.

Při **kontrole za 3 měsíce** byla zjištěna recidiva u jedné osoby, u které došlo po léčbě ke kompletnímu zhojení. U dalšího pacienta, u kterého byl nálezn po PDT hodnocen jako zlepšený, došlo ke zhoršení. Nálezn při této kontrole byl uzavřen jako nezhojený.

Ke **kontrole za 6 měsíců** se dostavilo jen 6 pacientů. U 4 z nich přetrvával nálezn stále zhojený. U 2 nemocných, u kterých byl nálezn nezhojen, byla zahájena jiná terapie.

Ve vztahu klinický nálezn po léčbě versus kontroly po 3 a 6 měsících nebyla zjištěna statisticky významná korelace.



Před ALA-PDT

Po ALA-PDT, klinicky zhojeno



Před ALA-PDT

Po ALA-PDT, klinicky zhojeno

Závěr:

Nebyl zjištěn statisticky signifikantní rozdíl v účinku použitých fotosenzibilizátorů v léčbě aktinických keratóz fotodynamickou terapií (Fisher's Exact Test: 0.6084). Stejně tomu bylo i při kontrole za 3 měsíce, kdy ani u jednoho z fotosenzibilizátorů nedošlo k častějším recidivám ve srovnání s druhým fotosenzibilizátorem (Chi-Square: 0.4477).

2.9. BAZOCELULÁRNÍ KARCINOM (BCC)

2.9.1. Bazocelulární karcinom – superficiálního typu (sBCC)

Ve skupině superficiálních bazocelulárních karcinomů bylo léčeno 18 osob s HYP a 17 s ALA. Počet terapií byl průměrně u HYP i ALA 7x. (viz. tab.)

	Průměr ± směrod.odchylka	Median
HYP-PDT	7,22 ± 2,69	6,00
ALA-PDT	6,88 ± 1,93	6,50

Průměrný počet terapií u PDT superf. bazocelulárních karcinomů

Fotosenzibilizátor HYP: (graf 2, 3)

V případě **HYP** došlo po léčbě ke **kompletní klinické odpovědi** u **5** osob, k **částečné klinické odpovědi** u **7** osob a u zbývajících **6** nález neragoval na terapii. **Histologicky** přetrvával nález bazocelulárního karcinomu u **15** osob a jen u **2** pacientů došlo ke kompletnímu histologickému a klinickému zhojení.

Jeden pacient s klinicky zhojeným nálezem po léčbě odmítl kontrolní biopsii. Při jeho kontrole za 3, 6 a 12 měsíců byl nález stále nezměněn, bez známek recidivy.

Ke **kontrole za 3 měsíce** se dostavilo 15 osob. Tři nemocní se nedostavili z důvodu zahájení jiné terapie nádoru po neúspěšné léčbě PDT (histologicky s přetrváváním bazocelulárního karcinomu). Klinicky byl nález zhojený jen u 4 osob, u 11 přetrvával nález nádoru.

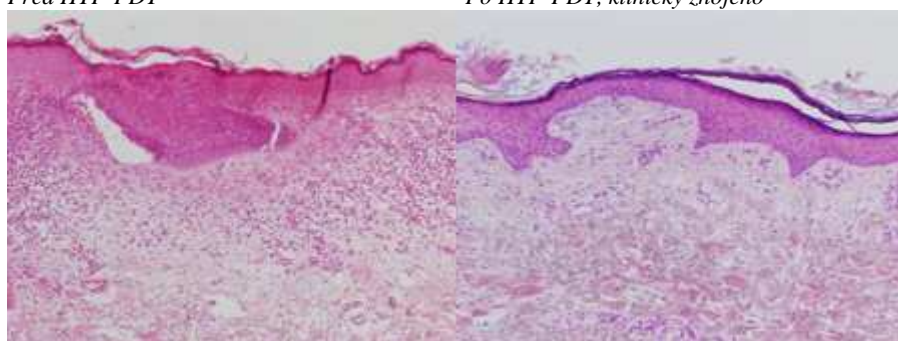
Ke **kontrole za 6 měsíců** se dostavilo 7 osob, z toho u 4 přetrvával zhojený nález, u 3 byl nález nezhojen. Žádná recidiva nebyla zjištěna.

Ve vztahu klinický nález po léčbě vs histologický nález po léčbě a ve vztahu klinický nález po léčbě vs kontrola po 3 měsících byla v obou případech zjištěna statisticky významná pozitivní korelace (Spearman Correlation Coefficient - klinický stav po léčbě vs histologický nález po léčbě: 0.51757, p-value: 0.0333; Spearman Correlation Coefficient – klinický stav po léčbě vs kontrola za 3 měsíce: 0.73855, p-value: 0.0017). Ve vztahu klinický nález po léčbě vs kontrola po 6 měsících nebyla zjištěna statisticky významná korelace pro malý počet nemocných, kteří se ke kontrole dostavili.



Před HYP-PDT

Po HYP-PDT, klinicky zhojeno



Před HYP-PDT

Po HYP-PDT, histologicky zhojeno

Fotosenzibilizátor ALA: (graf 2, 3)

V případě **ALA** došlo po léčbě ke **kompletní klinické odpovědi** u **9** osob, k **částečné klinické odpovědi** u **7** osob a u **1** osoby nález neragoval na terapii. U pacientů se zlepšeným klinickým nálezem došlo k úbytku infiltrace nádoru a k jeho vyblednutí. Dle histologického vyšetření korespondoval nález s klinikou. K **histologickému zhojení** došlo u **9** osob, u kterých byl nález po léčbě klinicky hodnocen jako zhojený. U pacienta, u kterého nedošlo ke zhojení a u dalších **4** osob s částečným klinickým zlepšením přetrvával histologicky nález bazocelulárního karcinomu. Tři nemocní, u nichž došlo jen k částečné klinické odpovědi na léčbu, odmítli provedení kontrolní biopsie po ukončení PDT.

Ke **kontrole za 3 měsíce** se dostavilo 13 osob. U zbývajících 2 pacientů je kontrola plánovaná, u 2 osob s histologicky přetrvávajícím nálezem nádoru byla provedena totální

excize, a proto u nich kontrola za 3 měsíce nebyla provedena. Z dostavených 13 osob byl klinicky zhojený nález u 11, u 2 přetrvával nález nezhojený.

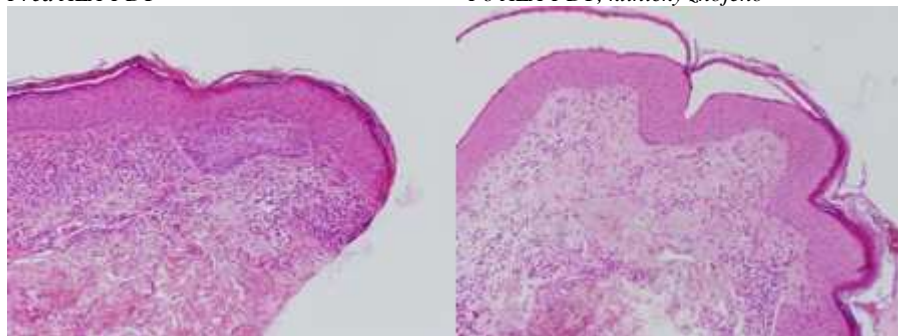
Ke **kontrole za 6 měsíců** se dostavilo 12 pacientů, z toho u 2 z nich přetrvával klinicky stále nezhojený nález, u 9 osob byl nález klinicky kompletně zhojený, u 1 osoby došlo k recidivě.

Ve vztahu klinický nález po léčbě versus histologický nález po léčbě a ve vztahu klinický nález po léčbě vs kontroly po 3 a 6 měsících byla ve všech případech vždy zjištěna statisticky významná pozitivní korelace (Spearman Correlation Coefficient - klinický stav po léčbě vs histologický nález po léčbě: 0.76488, p-value: 0.0014; Spearman Correlation Coefficient – klinický stav po léčbě vs kontrola za 3 měsíce: 0.70173, p-value: 0.0075; Spearman Correlation Coefficient – klinický stav po léčbě vs kontrola za 6 měsíců: 0.62361, p-value: 0.0403)



Před ALA-PDT

Po ALA-PDT, klinicky zhojeno



Před ALA-PDT

Po ALA-PDT, histologicky zhojeno

Závěr:

Byl zjištěn statisticky signifikantní rozdíl v účinnosti fotosenzibilizátorů v léčbě superficiálního bazocelulárního karcinomu fotodynamickou terapií ve prospěch 5-ALA fotosenzibilizátoru (Fisher's Exact Test pro histologické hodnocení: **0.0068**). Při kontrole za 3 měsíce byl opět potvrzen statisticky signifikantní rozdíl v účinnosti obou fotosenzibilizátorů ve prospěch 5-ALA fotosenzibilizátoru (Fisher's Exact Test: **0.0038**)

2.9.2. Bazocelulární karcinom – nodulárního typu (nBCC)

Ve skupině nodulárních bazaliomů byli léčeni 3 pacienti s HYP a 5 s ALA . Počet terapií byl průměrně u HYP 6x a ALA 7x. (viz. tab.)

	Průměr ± směrod.odchylka	Median
HYP-PDT	6,33 ± 3,10	7,00

ALA-PDT	7,40 ± 4,34	6,00
----------------	-------------	------

Průměrný počet terapií u PDT nodul. bazocelulárních karcinomů

Fotosenzibilizátor HYP: (graf 4, 5)

V případě **HYP** nedošlo ke **kompletní klinické odpovědi** na léčbu u žádné osoby. U **2** osob došlo k **částečné klinické odpovědi** na léčbu, u nichž se nádor oploštil. U zbývajících **1** pacienta nereagoval nádor na terapii. **Histologicky** přetrvával nález bazocelulárního karcinomu u všech **3** osob.

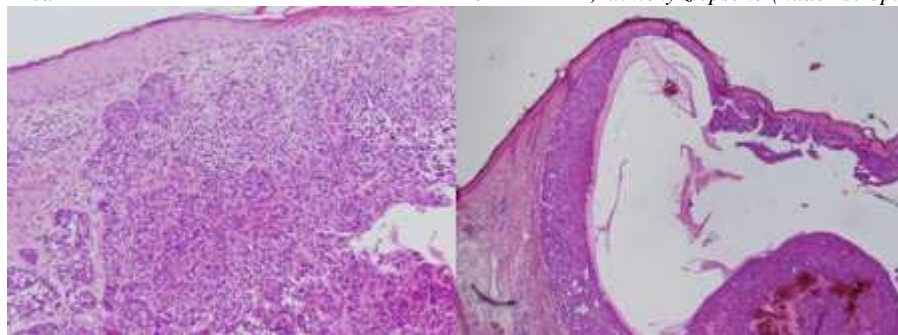
Ke **kontrole za 3 měsíce** se dostavil jen jeden nemocný s nezhojeným nálezem, u které došlo během terapie k částečnému zlepšení klinického obrazu. Ostatní pacienti se nedostavili, neboť u nich v této době byla zahájena jiná terapie nádoru.

Ve vztahu klinický nález po léčbě vs kontrola po 3 měsících byla korelace statisticky nevýznamná pro malý počet nemocných. Korelace klinického a histologického nálezu po léčbě byla statisticky nevýznamná.



Před HYP-PDT

Po HYP-PDT, klinicky zlepšeno (nádor se oploštil)



Před HYP-PDT

Po HYP-PDT, histologicky nezhojeno

Fotosenzibilizátor ALA: (graf 4, 5)

V případě **ALA** nedošlo ke **kompletní klinické odpovědi** na léčbu u žádné osoby. U **3** osob došlo k **částečné klinické odpovědi** na léčbu, u zbývajících **2** nemocných nález nereagoval na terapii. V případě částečného klinického zlepšení se nádor oploštil a zmenšil, nedošlo však k jeho úplnému vymizení. **Histologicky** přetrvával nález bazocelulárního karcinomu u všech **5** osob.

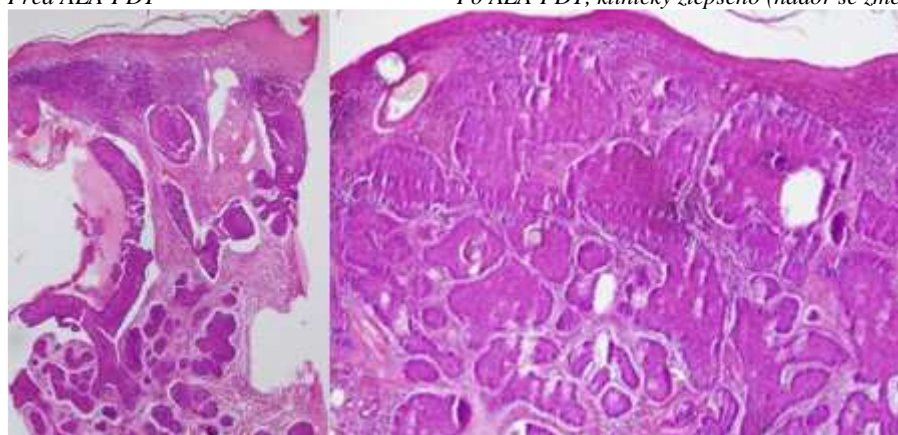
Ke **kontrole za 3 měsíce** se dostavili jen 2 pacienti, neboť u zbývajících 3 byla již v této době zahájena jiná terapie. V obou případech se jednalo u osoby, u kterých došlo ke klinickému zlepšení po léčbě. U jedné osoby byl nález zcela zhojen, přetrvávala jen hypopigmentovaná ploška, bez hmatné infiltrace. Při kontrole za 6 měsíců byl tento nález totožný, bez známek recidivy. U druhého nemocného byl nález nezhojený.

Ve vztahu klinický nález po léčbě vs kontrola po 3 měsících byla korelace statisticky nevýznamná pro malý počet nemocných. Korelace klinického a histologického nálezu po léčbě byla statisticky nevýznamná.



Před ALA-PDT

Po ALA-PDT, klinicky zlepšeno (nádor se zmenšil, oploštil)



Před ALA-PDT

Po ALA-PDT, histologicky nezhojeno

Závěr:

Statisticky nebyl zjištěn rozdíl v účinku použitých fotosenzibilizátorů v léčbě nodulárního bazocelulárního karcinomu fotodynamickou terapií, a to jak při klinickém tak histologickém hodnocení (Fisher's Exact Test pro klinické hodnocení: 1.0000, Fisher's Exact Test pro histologické hodnocení: 1.0000). Stejně tomu bylo i při kontrole za 3 měsíce, kdy u žádného z fotosenzibilizátorů nebyla zaznamenána vyšší frekvence recidiv. (Fisher's Exact Test: 1.0000)

2.10. KARCINOM IN SITU TYPU MORBUS BOWEN

Ve skupině pacientů s morbus Bowen bylo léčeno 5 osob s HYP a 6 s ALA. Počet terapií byl průměrně u HYP i u ALA 6x. (viz. tab.)

	Průměr ± směrod.odchylka	Median
HYP-PDT	6,20 ± 0,45	6,00
ALA-PDT	5,80 ± 0,45	6,00

Průměrný počet terapií u PDT morbus Bowen

Fotosenzibilizátor HYP: (graf 6, 7)

V případě **HYP** došlo po léčbě ke **kompletní klinické odpovědi** u **2** osob, k **částečné klinické odpovědi** u **3** osob. K **histologickému zhojení** došlo u **4** pacientů. Z toho se jednalo o 2 nemocné, u kterých byl nález po léčbě hodnocen jako zlepšený. U zbývajících **1** osoby přetrvával histologicky nález nádoru.

Ke **kontrole za 3 měsíce** se dostavili všichni pacienti, kdy u 2 z nich přetrvávalo klinické zhojení, u 2 osob, u kterých byl projev po léčbě klinicky zlepšen, došlo ke zhoršení kožního nálezu a u 1 pacienta přetrvával stejný kožní nález jako po léčbě, kdy byl zhodnocen jako zlepšený.

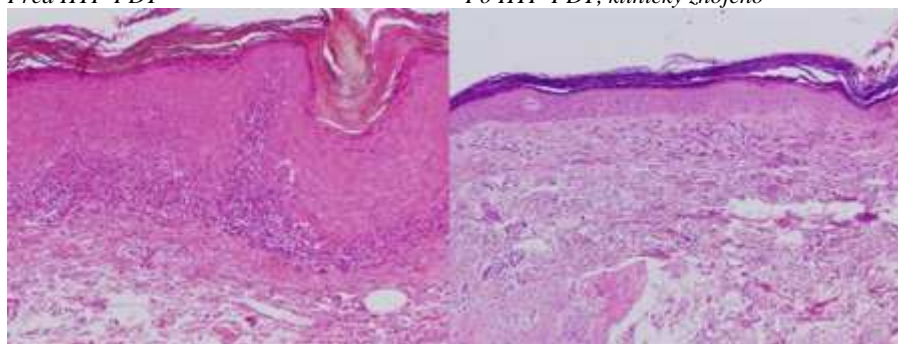
Ke **kontrole za 6 měsíců** se dostavili 3 pacienti. U 2 z nich přetrvávalo zhojení. U 1 nemocného, kde byl nález po léčbě a za 3 měsíce klasifikován jako zlepšený, došlo ke zhoršení. U této osoby byla zahájena kryoterapie.

Ve vztahu klinický nález po léčbě vs kontroly po 3 a 6 měsících byla zjištěna v obou případech statisticky významná pozitivní korelace (Spearman Correlation Coefficient – klinický stav po léčbě vs kontrola za 3 měsíce: 0.91287, p-value: 0.0305; Spearman Correlation Coefficient – klinický stav po léčbě vs kontrola za 6 měsíců: 1.00000, p-value: <0.0001). Korelace klinického a histologického nálezu po léčbě byla statisticky nevýznamná.



Před HYP-PDT

Po HYP-PDT, klinicky zhojeno



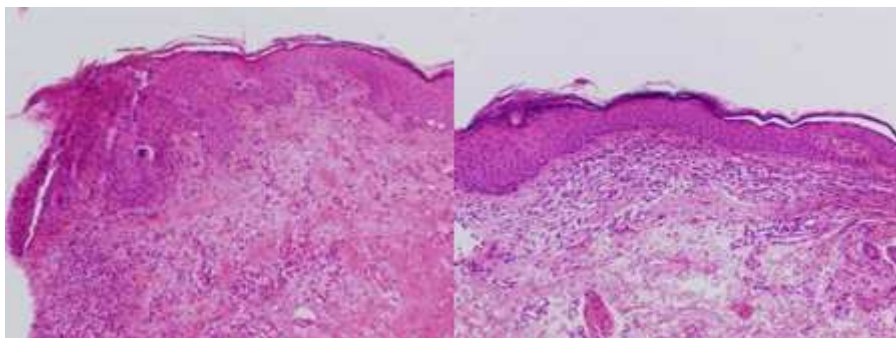
Před HYP-PDT

Po HYP-PDT, histologicky zhojeno



Před HYP-PDT

Po HYP-PDT, klinicky zhojeno



Před HYP-PDT

Po HYP-PDT, histologicky zhojeno

Fotosenzibilizátor ALA: (graf 6, 7)

V případě **ALA** došlo po léčbě ke **kompletní klinické odpovědi** u **4** osob, k **částečné klinické odpovědi** u **2** pacientů, u kterých nález vybledl a ubylo výrazně infiltrace. Dle histologického vyšetření korespondoval nález s klinikou. K **histologickému zhojení** došlo u **4** osob, u kterých byl projev po léčbě klinicky zhojen. U zbývajících **2** osob, kde došlo klinicky jen k částečné odpovědi na léčbu, přetrvával histologicky nález karcinomu in situ typu morbus Bowen.

Ke **kontrole za 3 měsíce** se dostavili jen 2 pacienti se zhojeným nálezem po léčbě, u kterých přetrvával totožný klinický obraz. Zbývajících 4 nemocní se nedostavili z následujících důvodů: u 1 osoby, u které došlo jen k částečnému zlepšení s histologicky přetrvávajícím nálezem nádoru, byla v té době již zahájena jiná terapie, u zbývajících 3 osob je kontrola za 3 měsíce plánovaná.

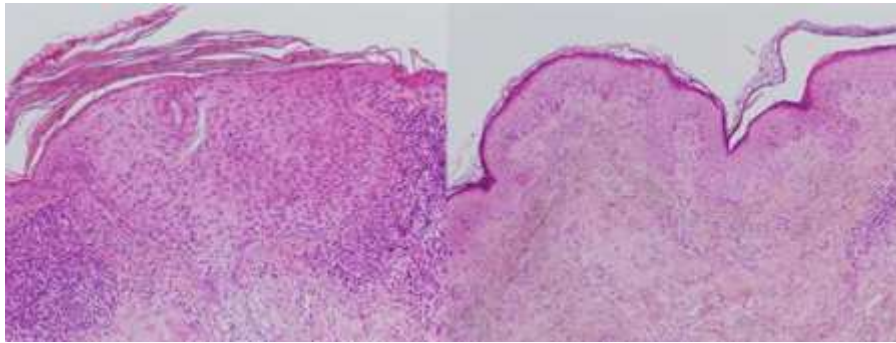
Ke **kontrole za 6 měsíců** se dostavili jen 2 pacienti se zhojeným nálezem po léčbě, kde přetrvával stejný klinický obraz. Znamky recidivy nebyly zjištěny ani **při kontrole za 1 rok** od ukončení PDT.

Ve vztahu klinický nález po léčbě vs kontroly po 3 a 6 měsících byla v obou případech korelace statisticky nevýznamná pro malý počet nemocných v období kontrol. Korelace klinického a histologického nálezu po léčbě byla statisticky nevýznamná.



Před ALA-PDT

Po ALA-PDT, klinicky zhojeno



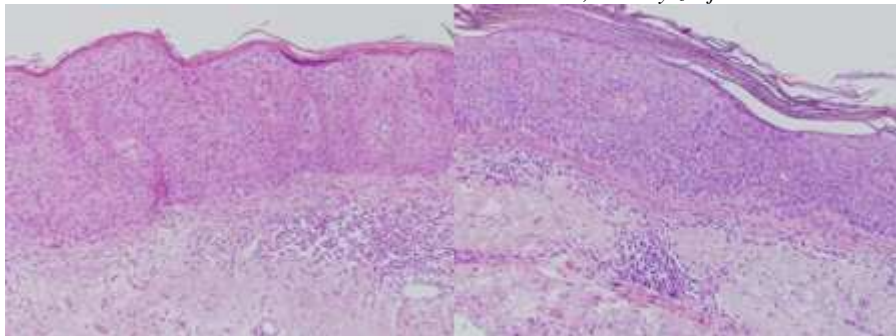
Před ALA-PDT

Po ALA-PDT, histologicky zhojeno



Před ALA-PDT

Po ALA-PDT, klinicky zhojeno



Před ALA-PDT

Po ALA-PDT, histologicky nezhojeno

Závěr:

Statisticky nebyl zjištěn rozdíl v účinku použitých fotosenzibilizátorů v léčbě morbus Bowen fotodynamickou terapií, a to jak při klinickém tak histologickém hodnocení (Fisher's Exact Test pro klinické hodnocení: 0.5671, Fisher's Exact Test pro histologické hodnocení: 1.0000). Stejně tomu bylo i při kontrole za 3 měsíce, kdy u žádného z fotosenzibilizátorů nebyla zaznamenána vyšší frekvence recidiv. (Chi-Square: 0.3499)

2.11. VERUKY VULGÁRNÍ

Ve skupině vulgárních veruk bylo léčeno s HYP i ALA 9 osob. Počet terapií byl průměrně u HYP i ALA 6x. (viz. tab.)

	Průměr ± směrod.odchylka	Median
HYP-PDT	6,78 ± 1,72	6,00
ALA-PDT	6,56 ± 2,35	6,00

Průměrný počet terapií u PDT vulgárních veruk

Fotosenzibilizátor HYP: (graf 8)

V případě **HYP** došlo po léčbě ke **kompletní klinické odpovědi** u **4** osob, k **částečné klinické odpovědi** u **3** osob a u **2** pacientů nález nereagoval na terapii.

Při **kontrolě za 3 měsíce** byl zaznamenán kompletně klinicky zhojený nález u 5 osob, z toho se v jednom případě jednalo o nemocného s klinicky zlepšeným nálezem po léčbě. U 3 osob přetrvával nález nezhojený, z toho se jednalo o 1 nemocného, u kterého došlo po PDT ke zlepšení. Při jeho kontrole za 3 měsíce bylo zaznamenáno výrazné zhoršení.

Ve vztahu klinický nález po léčbě vs kontrola po 3 měsících byla zjištěna statisticky významná pozitivní korelace (Spearman Correlation Coefficient – klinický stav po léčbě vs kontrola za 3 měsíce: 0.85201, p-value: 0.0072)



Před HYP-PDT

Po HYP-PDT, klinicky zhojeno

Fotosenzibilizátor ALA: (graf 8)

V případě **ALA** došlo po léčbě ke **kompletní klinické odpovědi** u **4** osob, k **částečné klinické odpovědi** u **2** osob a u **3** pacientů nález nereagoval na terapii.

Při **kontrolě za 3 měsíce** přetrvával zhojený nález u 4 osob, u 1 pacienta přetrvávalo zlepšení, u 4 nemocných nebyl nález zhojen. Z těchto 4 pacientů, u kterých přetrvávaly veruky, se jednalo o 1 osobu, u které došlo ke klinickému zlepšení po léčbě. Při její kontrole za 3 měsíce byl však nález výrazně zhoršen.

Ve vztahu klinický nález po léčbě vs kontrola po 3 měsících byla zjištěna statisticky významná pozitivní korelace (Spearman Correlation Coefficient – klinický stav po léčbě vs kontrola za 3 měsíce: 0.95150, p-value:<0.0001).



Před ALA-PDT

Po ALA-PDT, klinicky zhojeno

Závěr:

Nebyl zjištěn statisticky signifikantní rozdíl v účinku použitých fotosenzibilizátorů při léčbě vulgárních veruk fotodynamickou terapií (Chi-Square: 0.8187). Stejně tomu bylo i při kontrole za 3 měsíce, kdy u žádného z fotosenzibilizátorů nebyla zaznamenána vyšší frekvence recidiv. (Chi-Square: 0.5490)

2.12. PSORIÁZA

Ve skupině psoriázy byly léčeny s HYP i s ALA 3 osoby. Počet terapií byl průměrně u HYP 6x a u ALA 4x. (viz. tab.)

	Průměr ± směrod.odchylka	Median
HYP-PDT	6,00 ± 0,00	6,00
ALA-PDT	4,00 ± 1,73	3,00

Průměrný počet terapií u PDT psoriázy

Fotosenzibilizátor HYP: (graf 9)

V případě **HYP** došlo po léčbě k **částečné klinické odpovědi** u 2 osob, u 1 osoby nález nereagoval na terapii.

Při **kontrole za 3 měsíce** došlo u 1 osoby ke zhojení, u 1 pacienta přetrvávalo zlepšení, u 1 nemocného byl nález nezhojen.

Korelace ve vztahu klinický nález po léčbě vs kontrola po 3 měsících byla statisticky nevýznamná.



Před HYP-PDT

Po HYP-PDT, klinicky zlepšeno (úbytek infiltrace, vyblednutí, zmenšení ložisek)

Fotosenzibilizátor ALA: (graf 9)

V případě **ALA** došlo po léčbě ke **částečné klinické odpovědi** u všech **3** pacientů , která se projevovala vyblednutím a úbytkem infiltrace v ložiscích lupénky.

Při **kontrole za 3 měsíce** došlo u 1 osoby ke zhojení, u 1 pacienta přetrvávalo zlepšení, u 1 nemocného byl nález nezhojen.

Korelace ve vztahu klinický nález po léčbě vs kontrola po 3 měsících byla statisticky nevýznamná.



Před ALA-PDT

Po ALA-PDT, klinicky zlepšeno (úbytek infiltrace, vyblednutí)

Závěr:

Statisticky nebyl zjištěn žádný signifikantní rozdíl v účinku použitých fotosenzibilizátorů při léčbě psoriázy fotodynamickou terapií (Fisher's Exact Test: 1.0000). Výsledky však nemusí být validní pro malý počet pacientů ve sledovaných skupinách.

2.13. CONDYLOMATA ACUMINATA – POPIS PŘÍPADU

Byla úspěšně provedena fotodynamická terapie u 30 letého muže s anamnézou 20 měsíců trvajících a neúspěšně léčených kondylomat akuminata na glans penis a předkožce (20% podofylin, 0,5% podofylotoxin, 5% imiquimod). V imunologickém vyšetření zjištěna hladina lymfocytů při dolní hranici, lehký pokles IgM a C4 komplementu. HIV vyšetření bylo negativní.

Proběhla léčba PDT za použití 20% 5-ALA v gelu. Dávka záření byla 50 J/cm^2 , intenzita záření se pohybovala v rozmezí od 70 do 90 mW/cm^2 . Terapeutických sezení bylo celkem 10 a probíhaly ve 2-týdenních intervalech. Kondylomata kompletně vymizela za 22 týdnů od zahájení PDT, s tím že při kontrole za 1, 3 a 6 měsíců po skončené léčbě nebyly zaznamenány žádné známky recidivy.



Před ALA-PDT

Po ALA-PDT

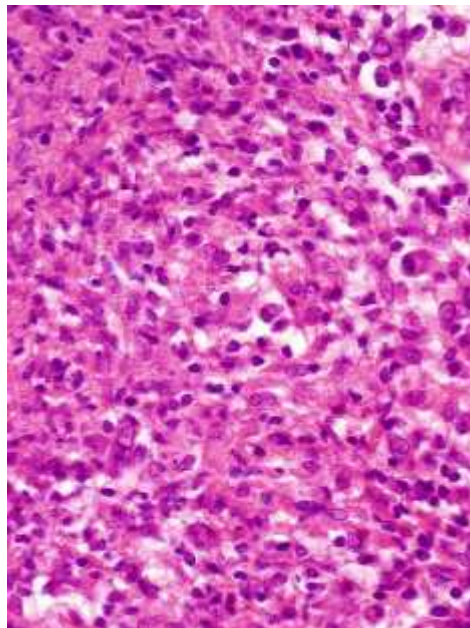
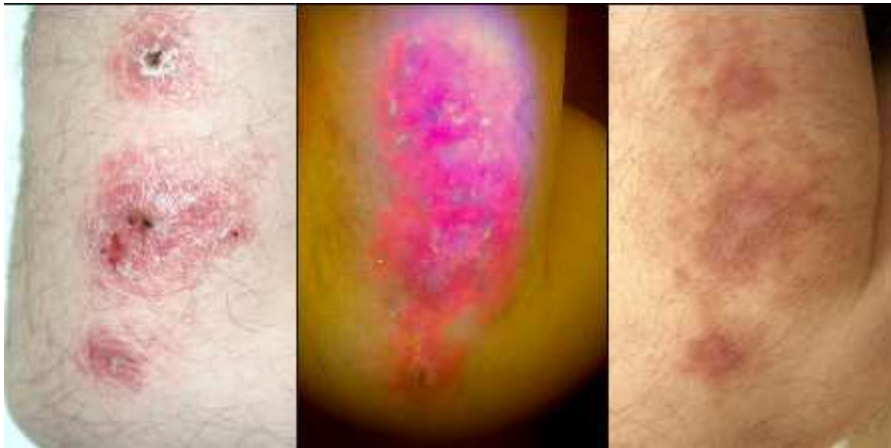


Fotodynamická dignostika

2.14. KOŽNÍ LEISHMANIÓZA – POPIS PŘÍPADU

Byla úspěšně provedena fotodynamická terapie mnohočetných ložisek histologicky verifikované kožní leishmaniózy u 39 letého muže. Jako fotosenzibilizátor byla použita 20% 5-ALA v gelu, lokálně aplikovaná pod okluzi po dobu 3 hodin. Použitá dávka záření při PDT byla $75\text{J}/\text{cm}^2$, intenzita záření se pohybovala v rozmezí od 88 do $123\text{mW}/\text{cm}^2$. Klinický nález se výrazně zlepšil po prvních 4 terapeutických sezeních, po 6. sezení, kdy byla léčba ukončena, došlo ke zhojení s minimální pigmentací v místě původních projevů.

Současně probíhala terapie tekutým dusíkem zbývajících ložisek leishmaniózy, která byla opakována v týdenních intervalech po dobu 5-ti týdnů. I při léčbě kryoterapií došlo ke zhojení projevů leishmaniózy.



2.15. REMITENČNÍ SPEKTROFOTOMETR – VÝSTUPY (viz. grafy č. 10-57)

Pro kožní měření byl používán kožní spektrofotometr s kontinuálním spektrem umožňující přenos informace v blízkém infračerveném, viditelném i ultrafialovém spektru optickými vlákny. Přístroj využíval komponent firmy Ocean Optics (USA) a umožňoval grafické i matematické zpracování naměřených dat. Jeho základem byl monolytický spektrofotometr firmy Ocean Optics (USA) doplněný o software stejnojmenné společnosti a světlovodiče.^{45, 46}

V praxi byla kůže osvětlována pomocí flexibilních světelných vláken. Reflektované rozptýlené světlo od kožního povrchu i z různých epidermálních a dermálních vrstev bylo snímáno integrovaným světelným systémem. Podobným světlovodičem byl veden odražený paprsek zpět do detektoru. Kombinovaný signál vlnových délek se signálem ze snímacího zařízení byl konvertován na signál elektrický, který byl následně převeden na soustavu číslic dále zpracovávanou počítačem.

Cílem měření bylo zachytit při jaké vlnové délce je dosaženo nejvyšší absorpce po nanesení fotosenzibilizátoru na léčený projev. Dále jsme ověřovali, zda se mění absorpce po ozáření viditelným světlem. V praxi jsme tedy chtěli zjistit, zda je možné využít remitenční spektrofotometr k detekci vstřebaného fotosenzibilizátoru do kůže a k ověření tzv. „photobleaching efektu“ po provedené PDT.

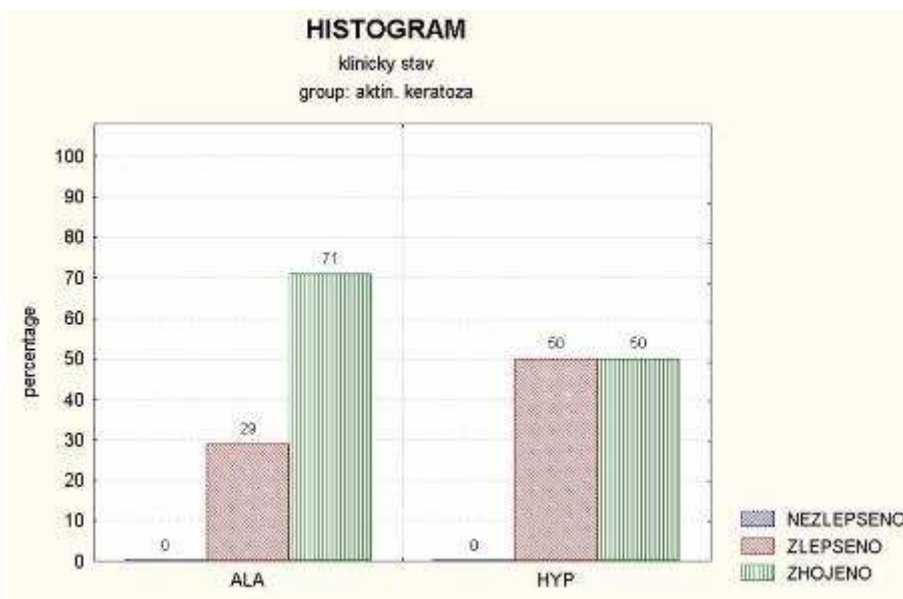
Po aplikaci hypericinu bylo vždy možné pozorovat vznik typického píku v rozmezí 650-680nm, po samotném ozáření intenzita absorpce zřetelně klesla.

U 5-ALA se nám nepodařilo zachytit žádný charakteristický pík, který by se objevil po její aplikaci.

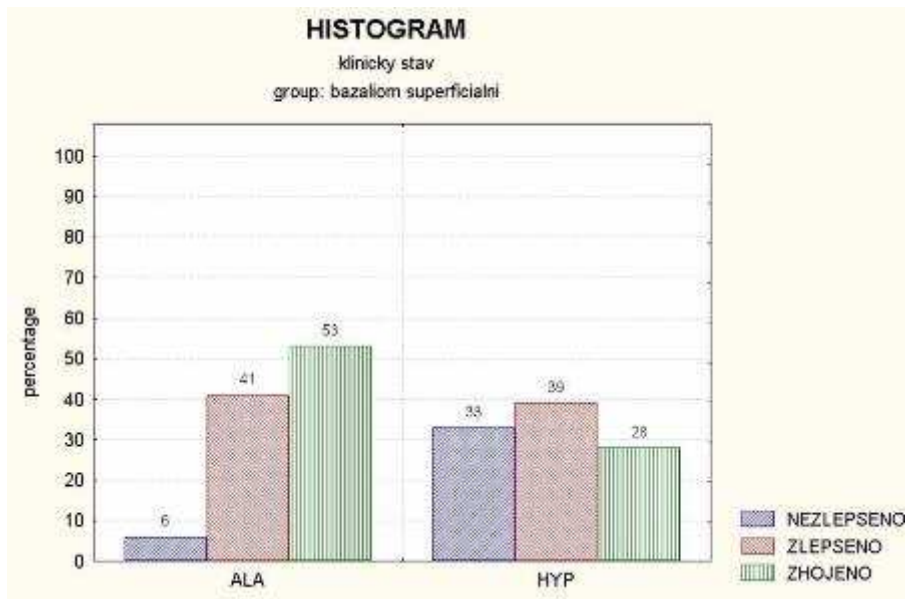
V případě obou fotosenzibilizátorů byly vždy přítomny dva píky ve spektrální oblasti mezi 520 a 580nm, a to při všech 3 měřených situacích (před nanesením PS, po jeho aplikaci a po samotném provedení PDT). Tento absorpční pás zeleného světla by měl teoreticky odpovídat absorpci oxyhemoglobinu.

ALA versus HYP – klinický stav po léčbě u jednotlivých dg

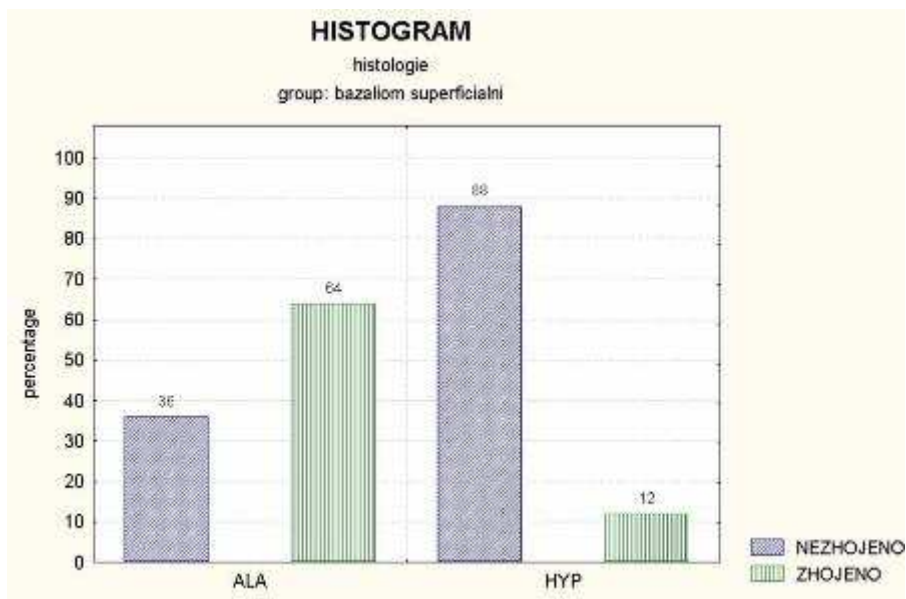
ALA versus HYP – histologie po léčbě u jednotlivých dg



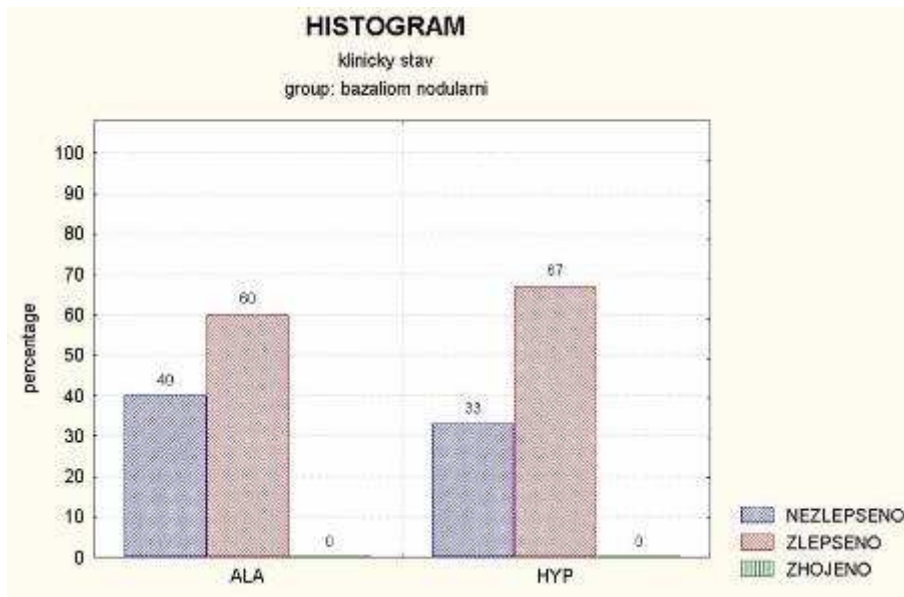
Graf 1 – aktinické keratózy – klinický nález po PDT



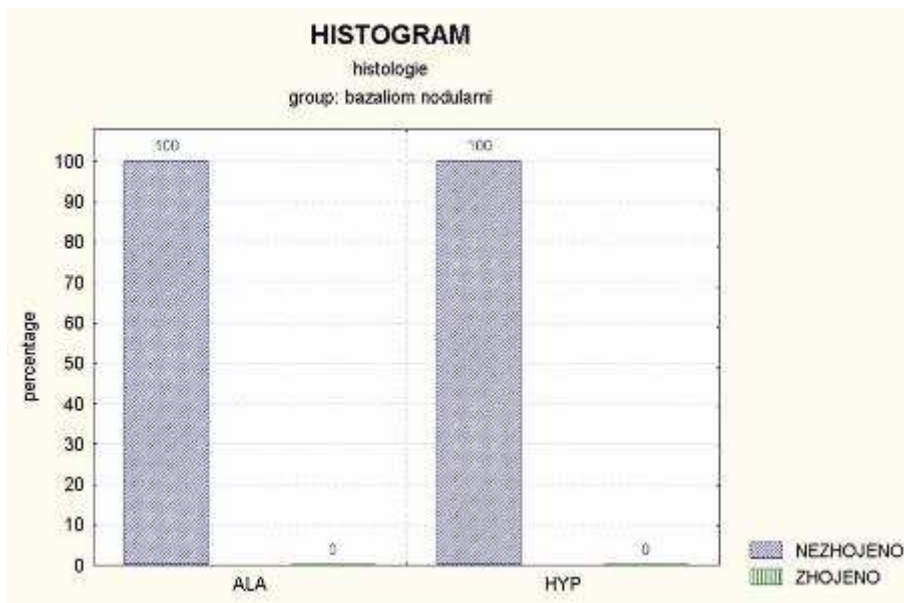
Graf 2 – superf. bazocelulární karcinomy – klinický náález po PDT



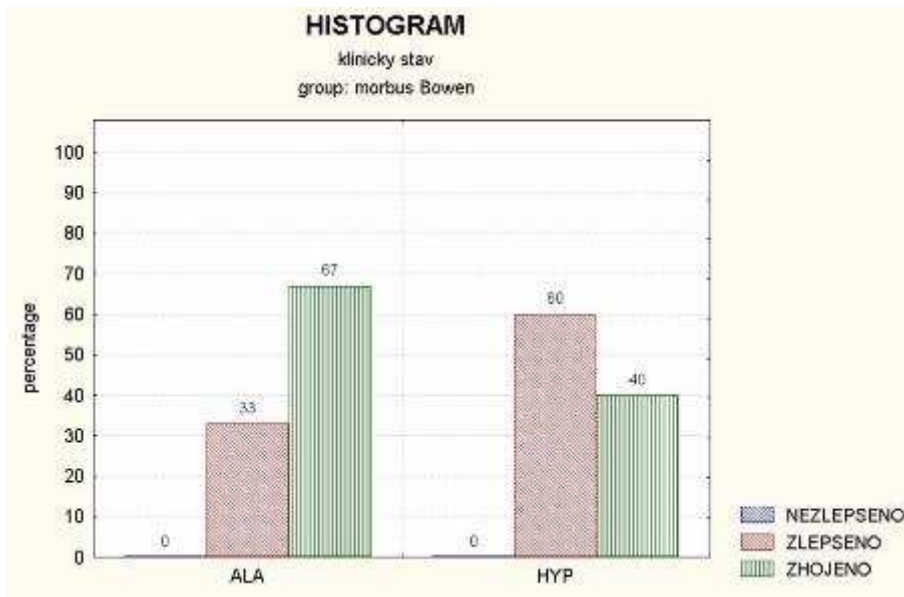
Graf 3 - superf. bazocelulární karcinomy – histologický náález po PDT



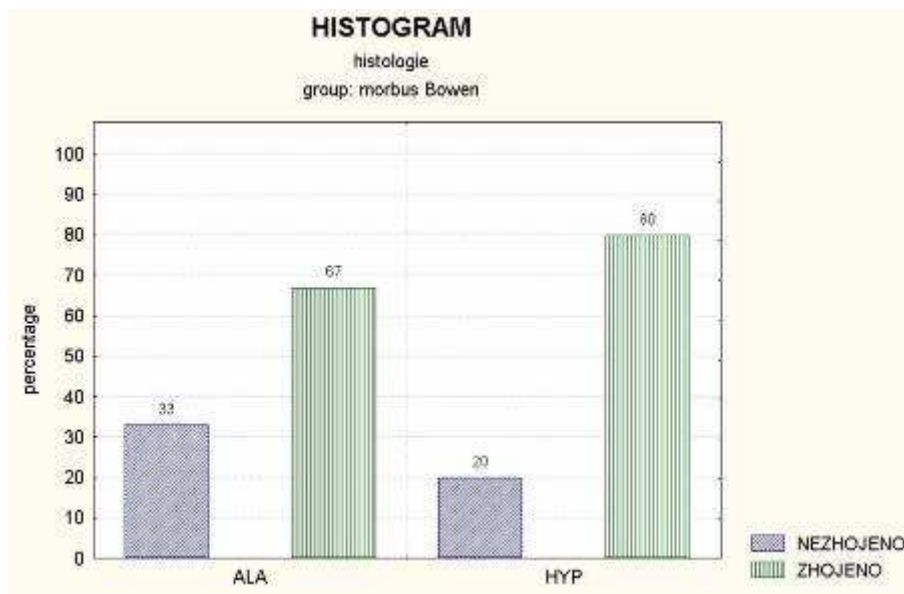
Graf 4 - nodul. bazocelulární karcinomy – klinický nález po PDT



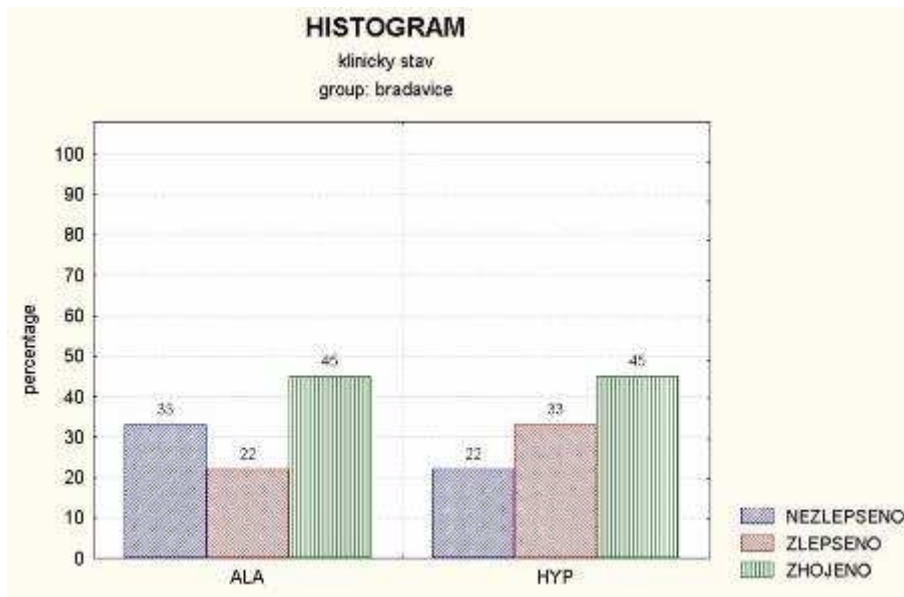
Graf 5 - nodul. bazocelulární karcinomy – histologický nález po PDT



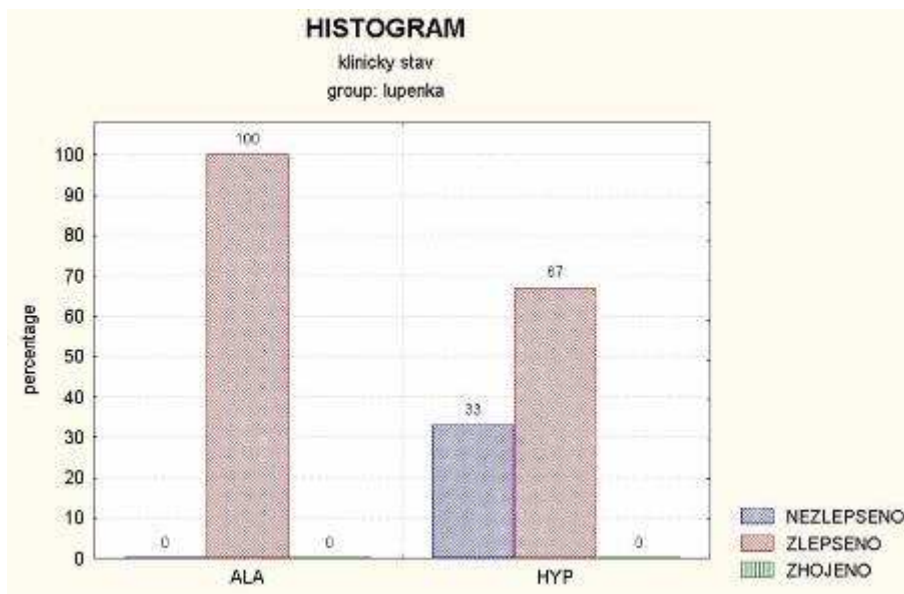
Graf 6 – karcinomy in situ typu m.Bowen – klinický nález po PDT



Graf 7 - karcinomy in situ typu m.Bowen – histologický nález po PDT

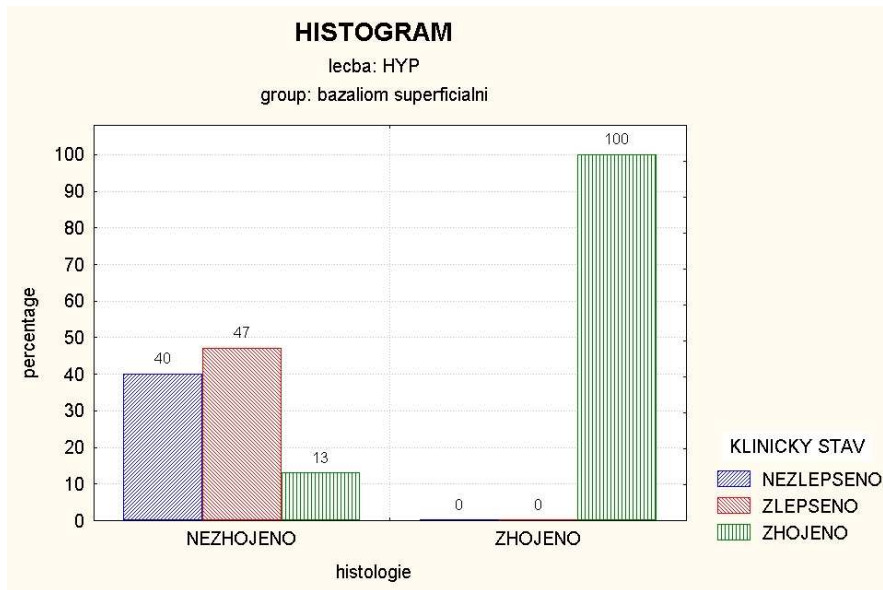


Graf 8 – vulgární veruky – klinický náález po PDT

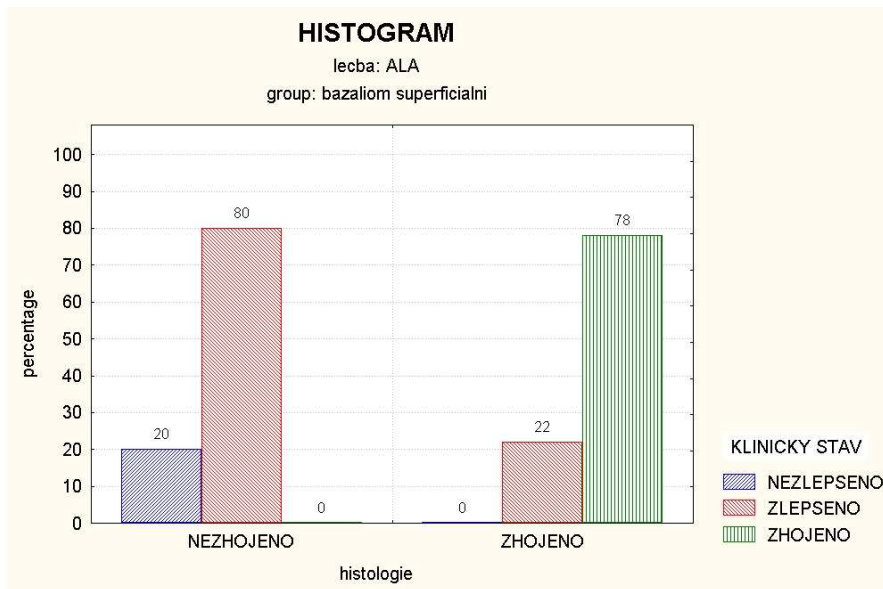


Graf 9 – psoriáza – klinický náález po PDT

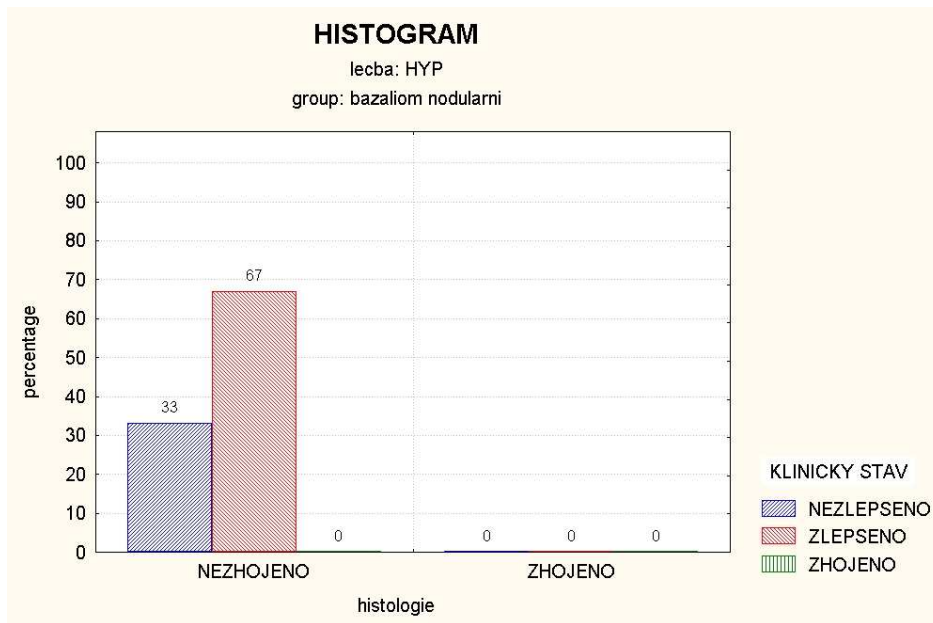
Klinický stav *versus* histologie v rámci konkrétních dg a jednotl. fotosenzibilizátorů



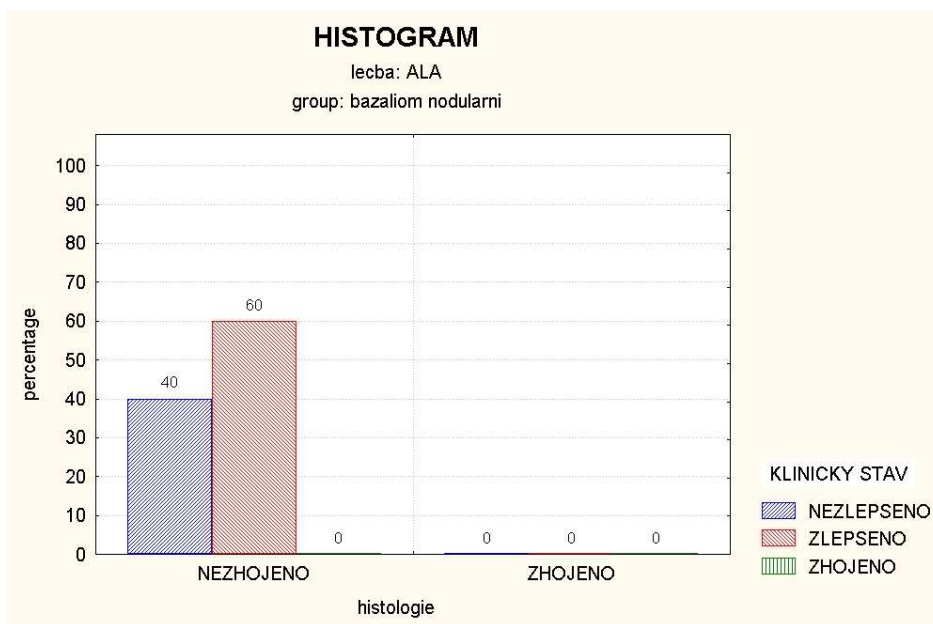
Graf10 – superf. bazaliom, HYP-PDT, klinika vs histologie



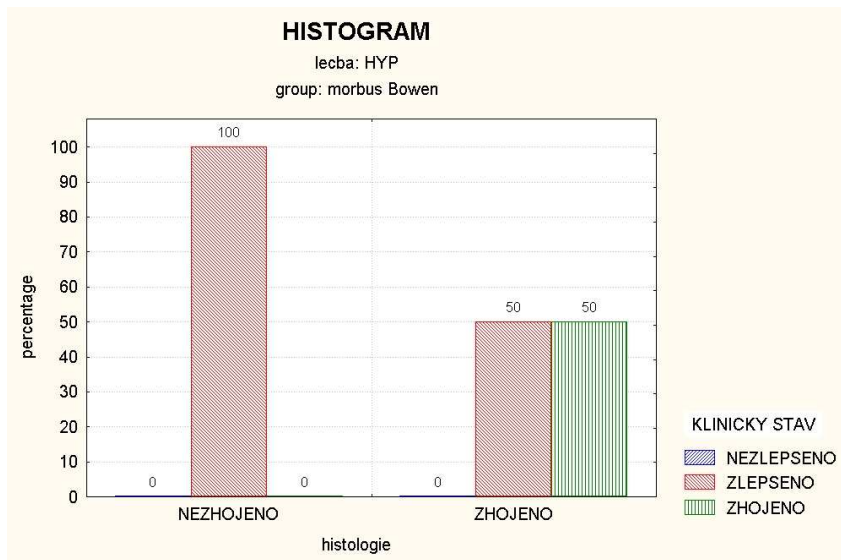
Graf11 – superf. bazaliom, ALA-PDT, klinika vs histologie



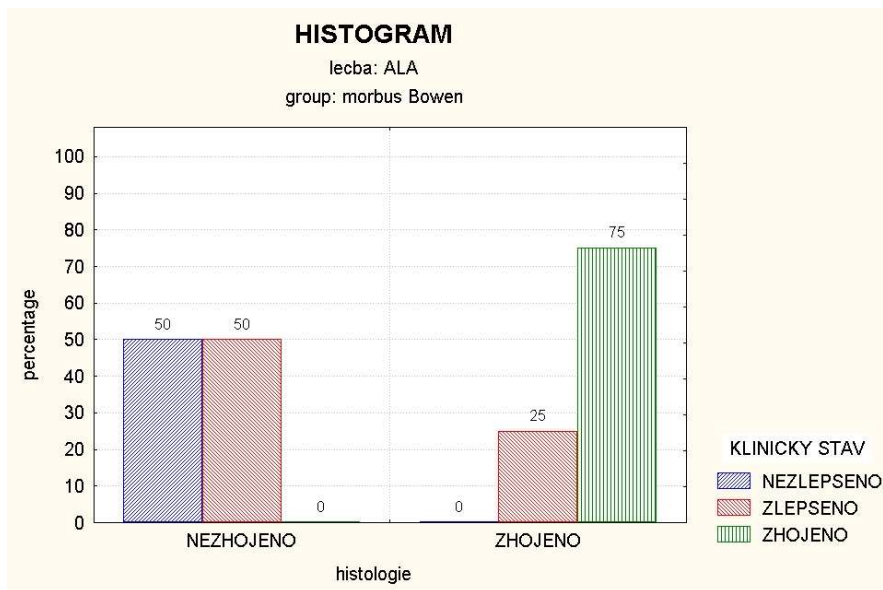
Graf12 – nod. bazaliom, HYP-PDT, klinika vs histologie



Graf13 – nod. bazaliom, ALA-PDT, klinika vs histologie

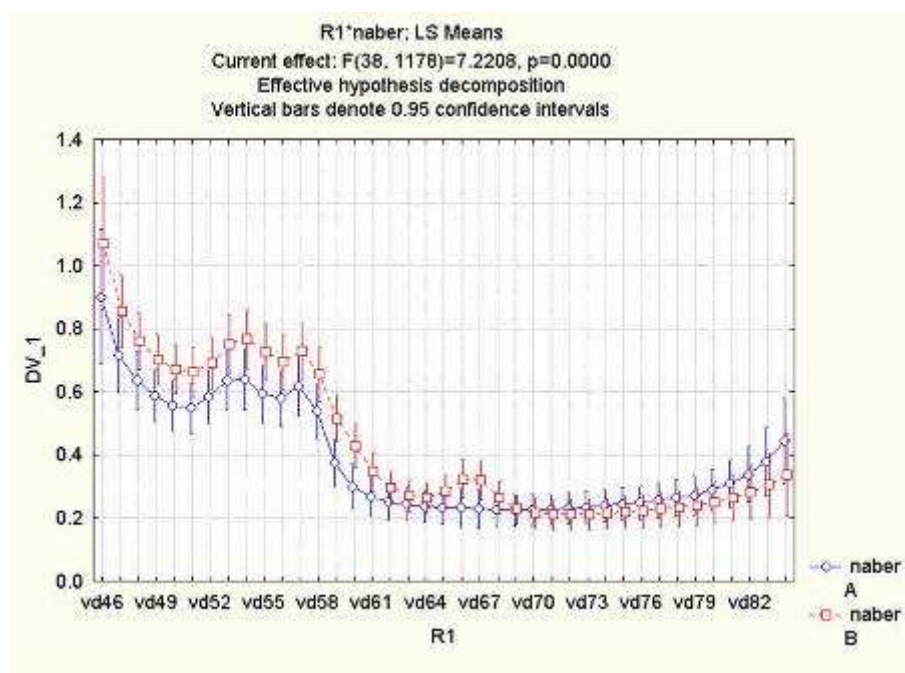


Graf14 – m. Bowen, HYP-PDT, klinika vs histologie

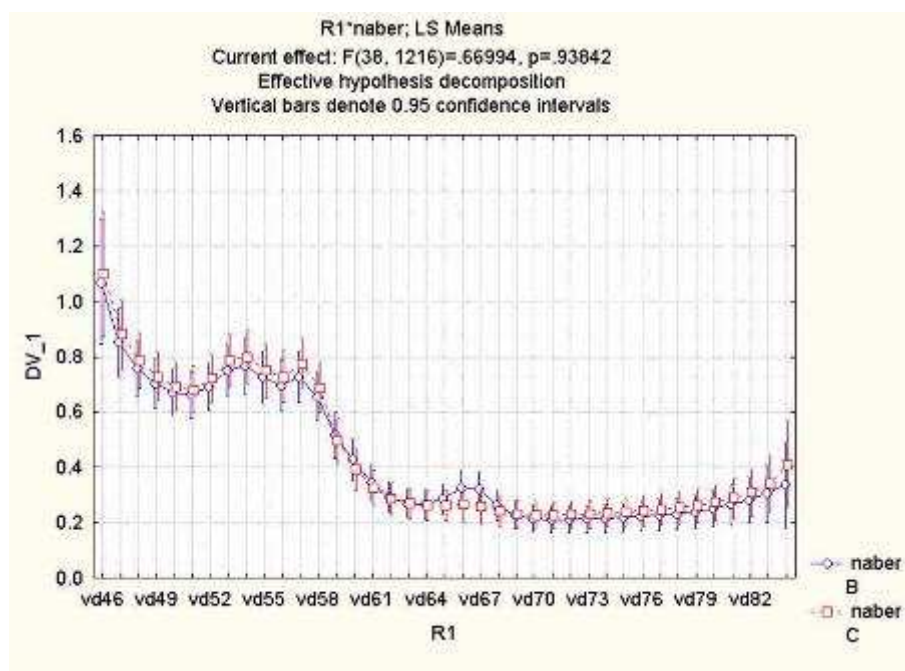


Graf15 – m. Bowen, ALA-PDT, klinika vs histologie

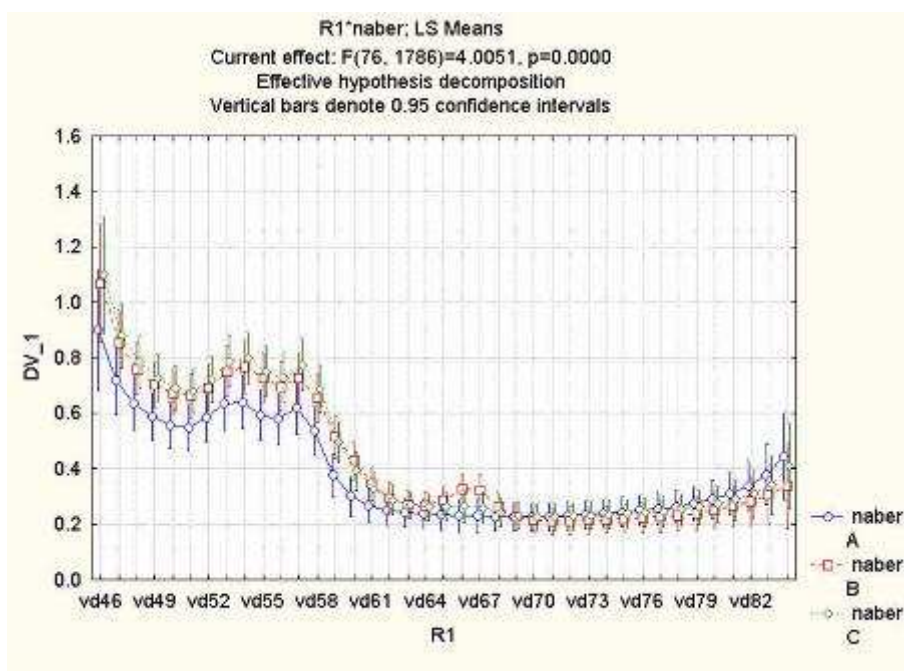
AKTINICKÉ KERATÓZY-HYP (krátký interval)



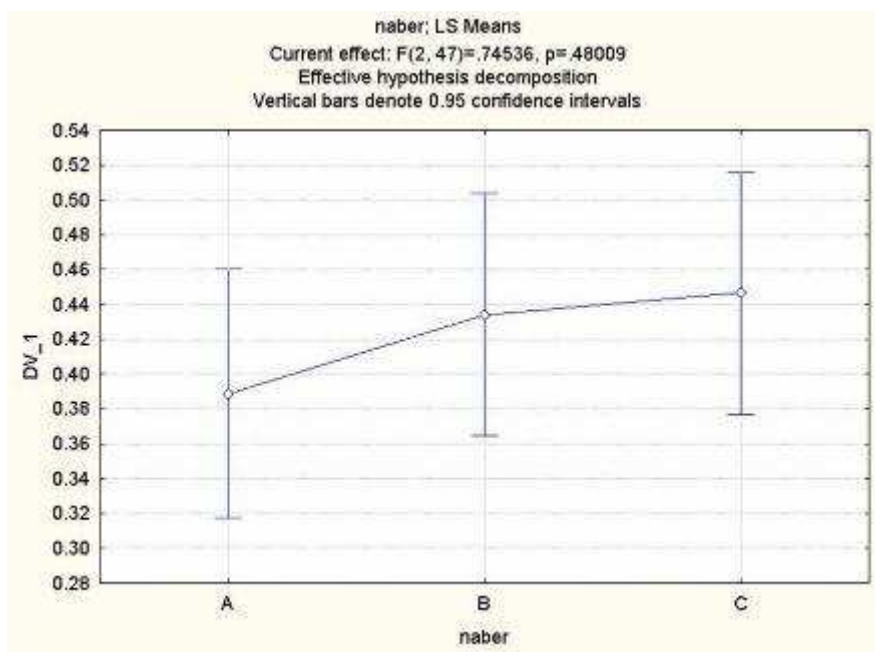
Graf 16* - „A“ - křivka před nanesením fotosenzibilizátoru(PS), „B“ - křivka po 2 hod. latence PS



Graf 17* - „B“ - křivka po 2 hod. latence PS, „C“ - křivka po ozáření

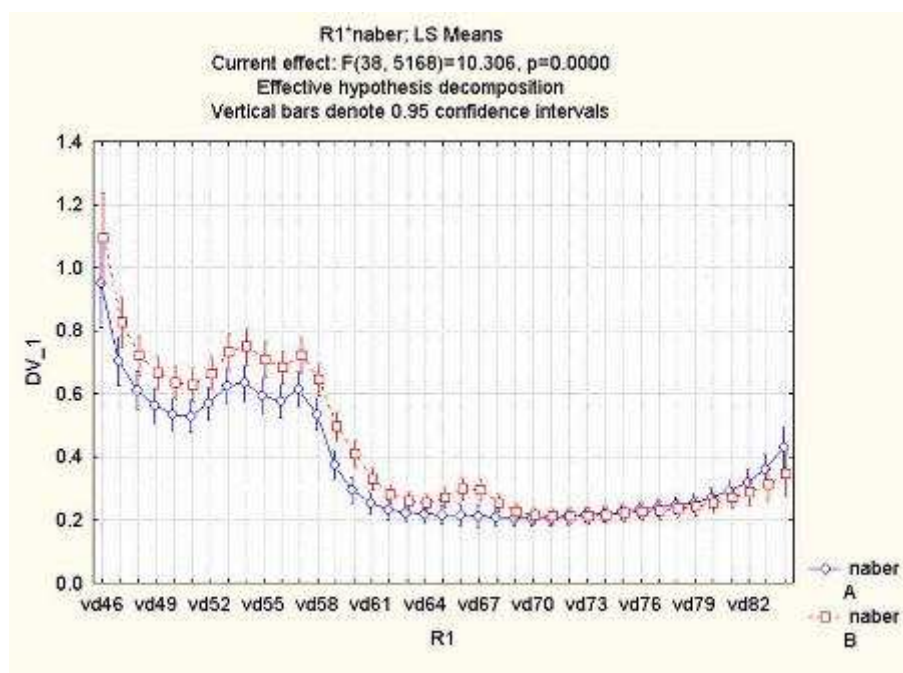


Graf 18* - „A“ - křivka před nanesením fotosenzibilizátoru(PS), „B“ – křivka po 2 hod. latence PS, „C“ – křivka po ozáření

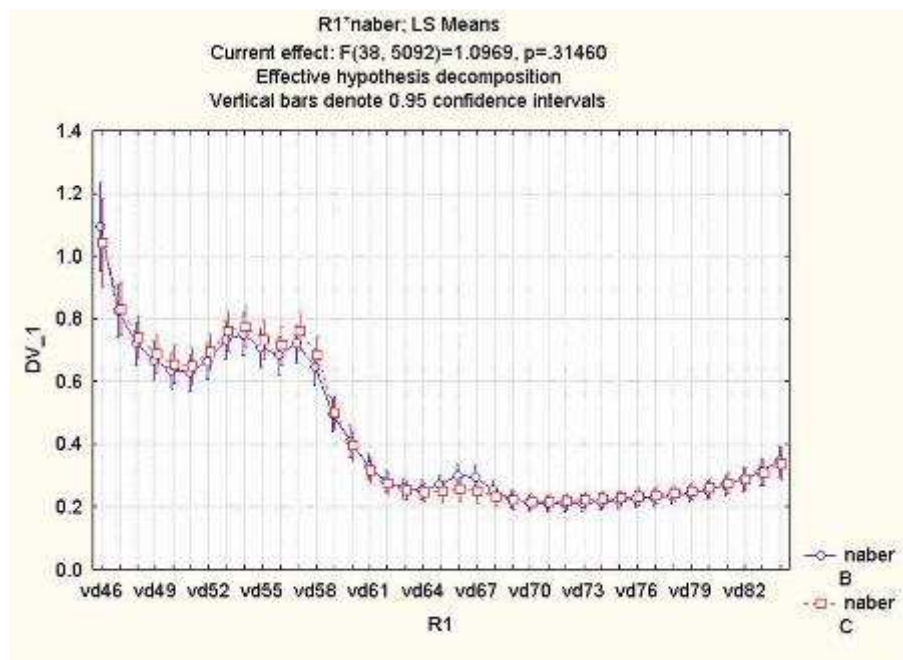


Graf 19 – průměrné hodnoty křivek „A“, „B“, „C“

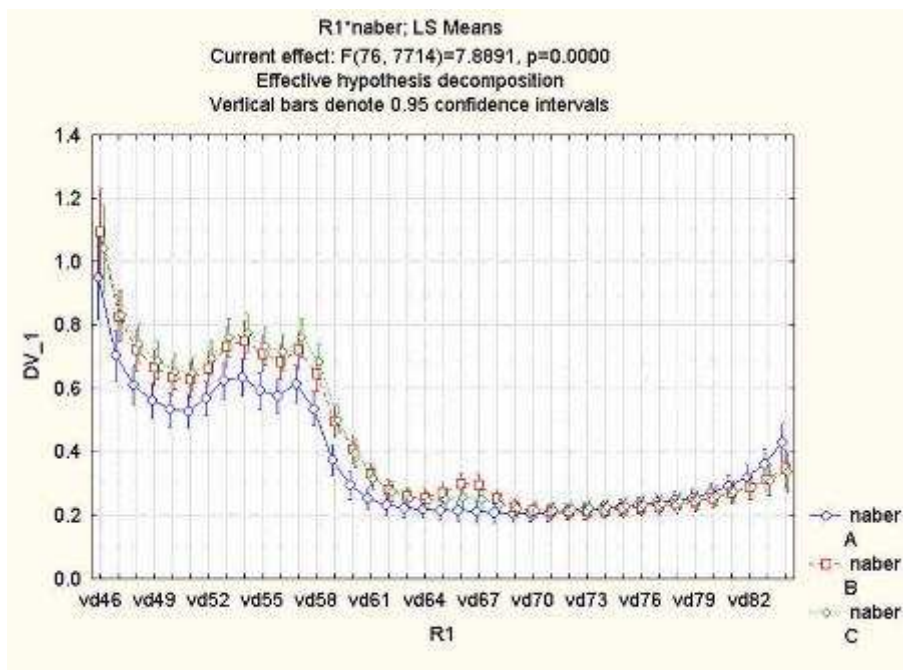
SUPERFICIÁLNÍ BAZOCELULÁRNÍ KARCINOM-HYP (krátký interval)



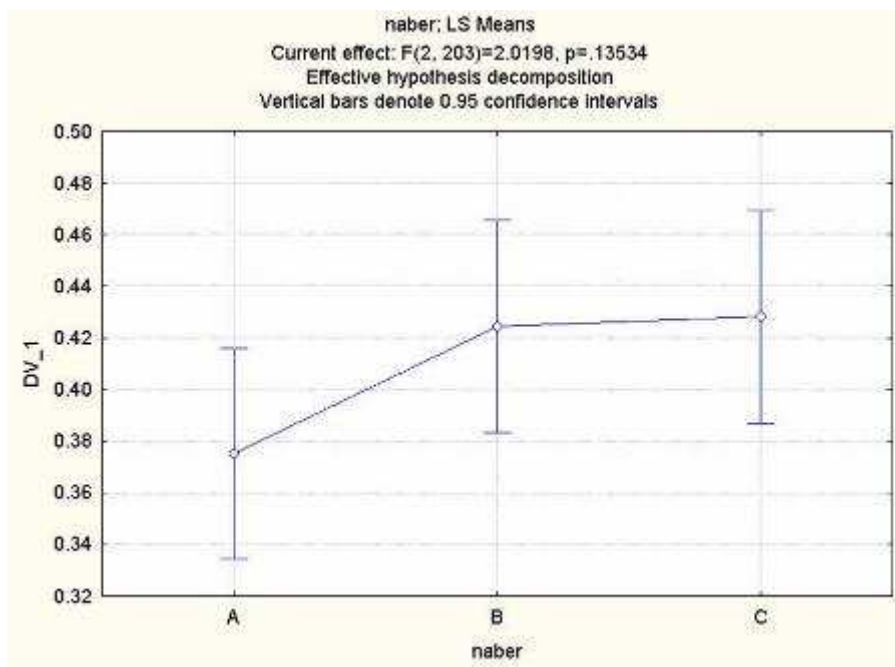
Graf 20* - „A“ - křivka před nanesením fotosenzibilizátoru(PS), „B“ – křivka po 2 hod. latence PS



Graf 21* - „B“ - křivka po 2 hod. latence PS, „C“ – křivka po ozáření

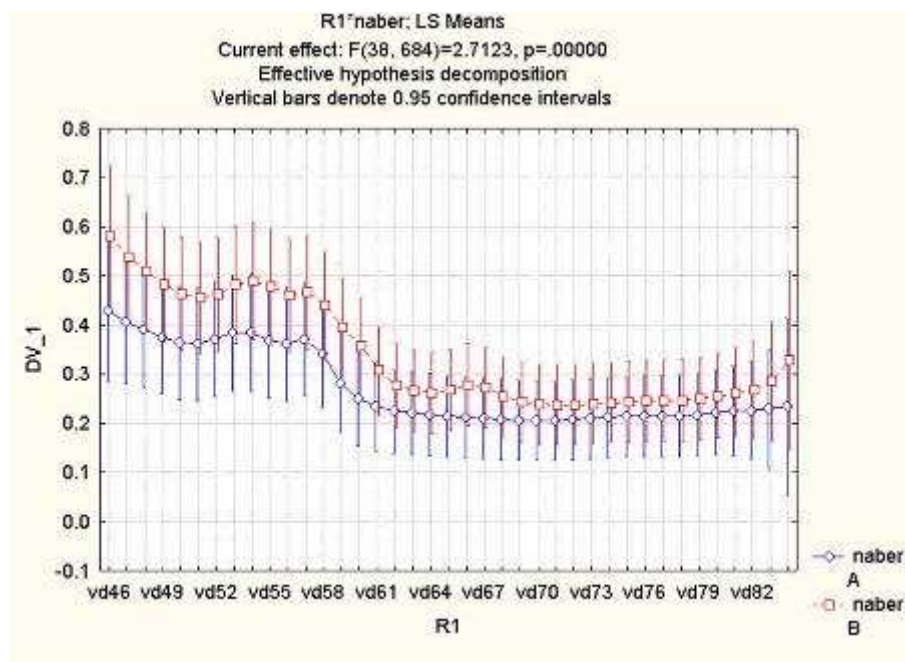


Graf 22* - „A“ - křivka před nanesením fotosenzibilizátoru(PS), „B“ – křivka po 2 hod. latence PS, „C“ – křivka po ozáření

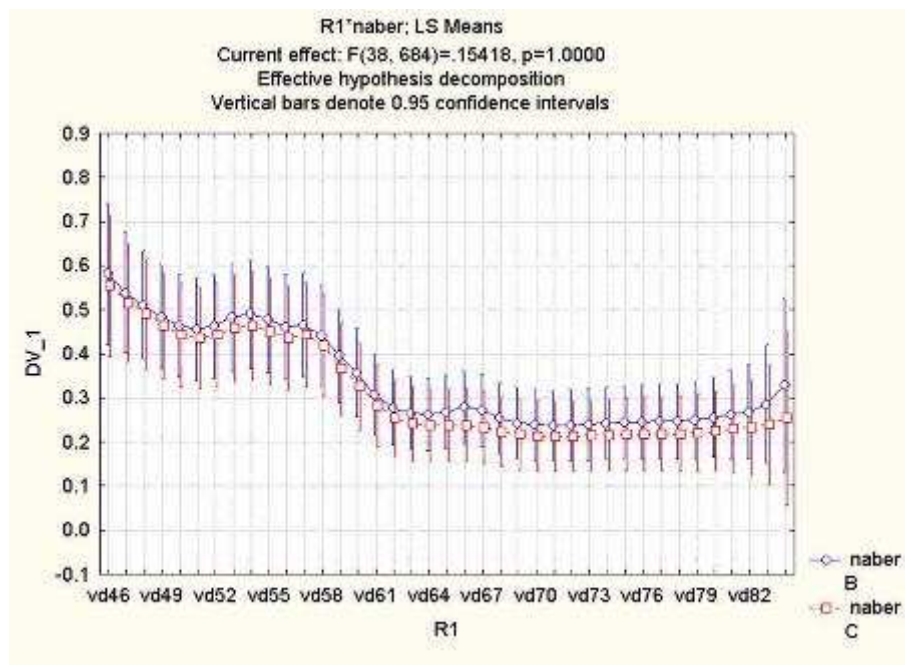


Graf 23 - průměrné hodnoty křivek „A“, „B“, „C“

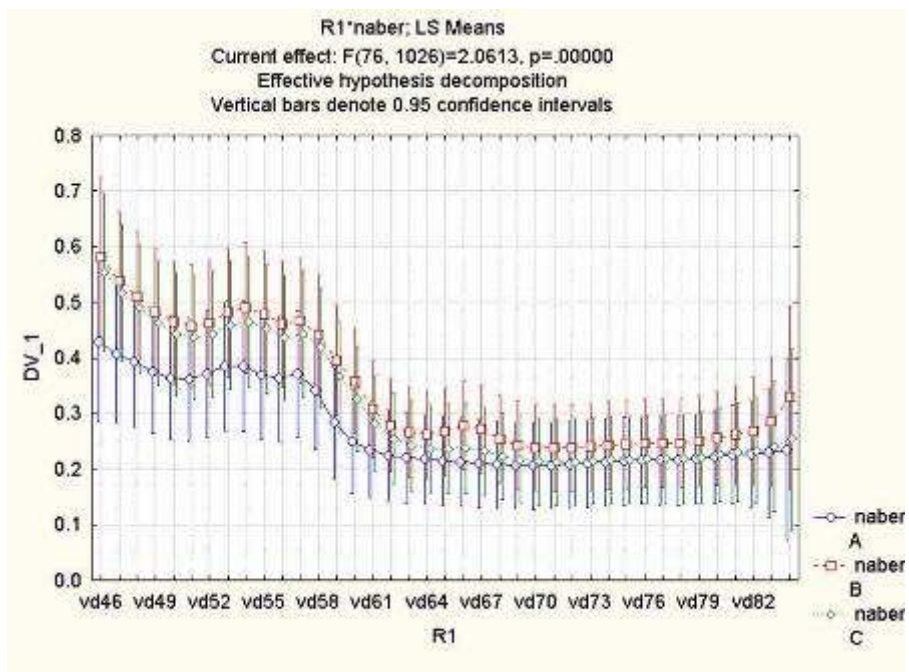
NODULÁRNÍ BAZOCELULÁRNÍ KARCINOM-HYP (krátký interval)



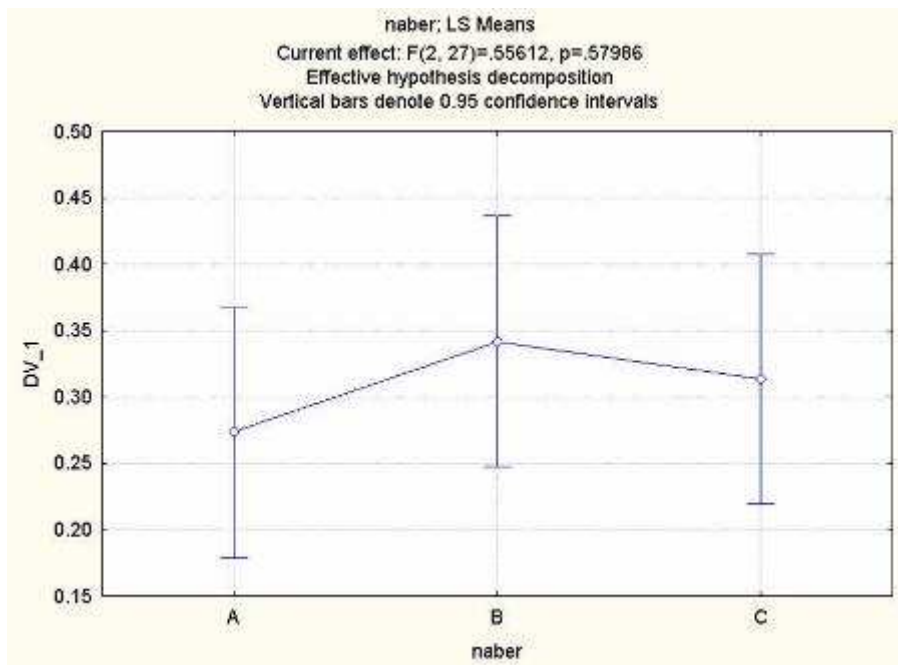
Graf 24* - „A“ - křivka před nanesením fotosenzibilizátoru(PS), „B“ - křivka po 2 hod. latence PS



Graf 25* - „B“ - křivka po 2 hod. latence PS, „C“ - křivka po ozáření

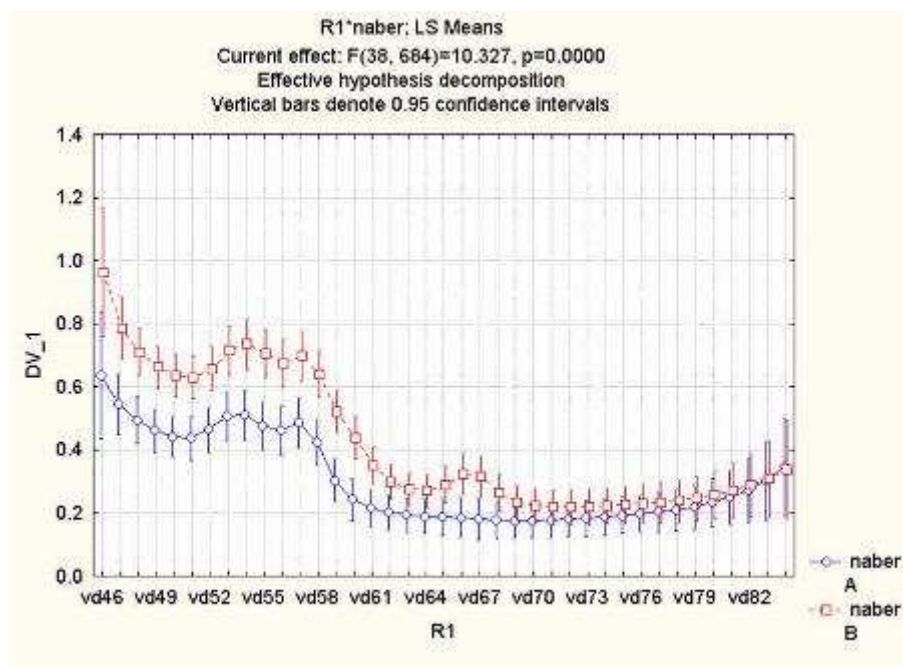


Graf 26* - „A“ - křivka před nanesením fotosenzibilizátoru(PS), „B“ – křivka po 2 hod. latence PS, „C“ – křivka po ozáření

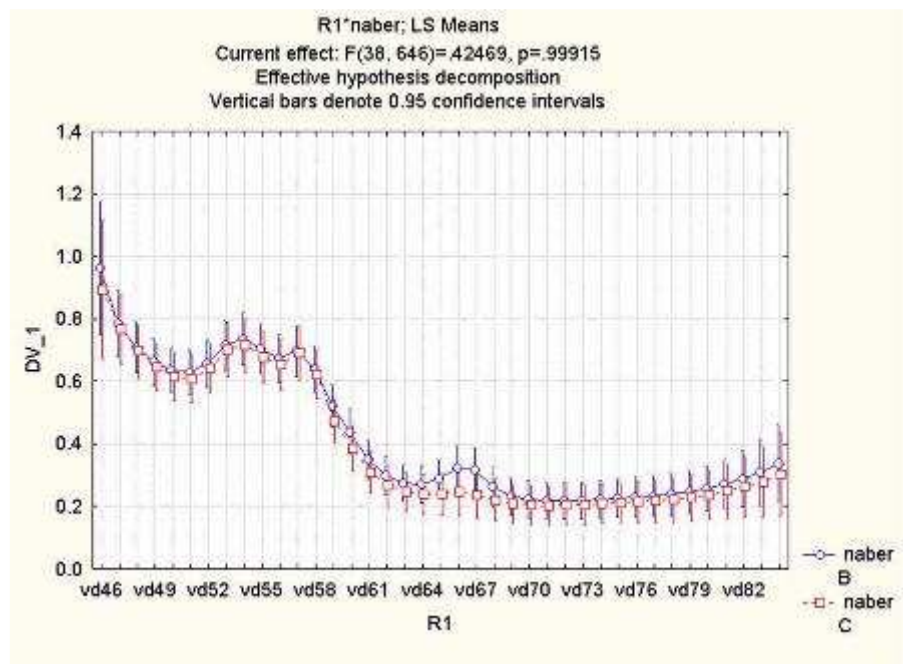


Graf 27 - průměrné hodnoty křivek „A“, „B“, „C“

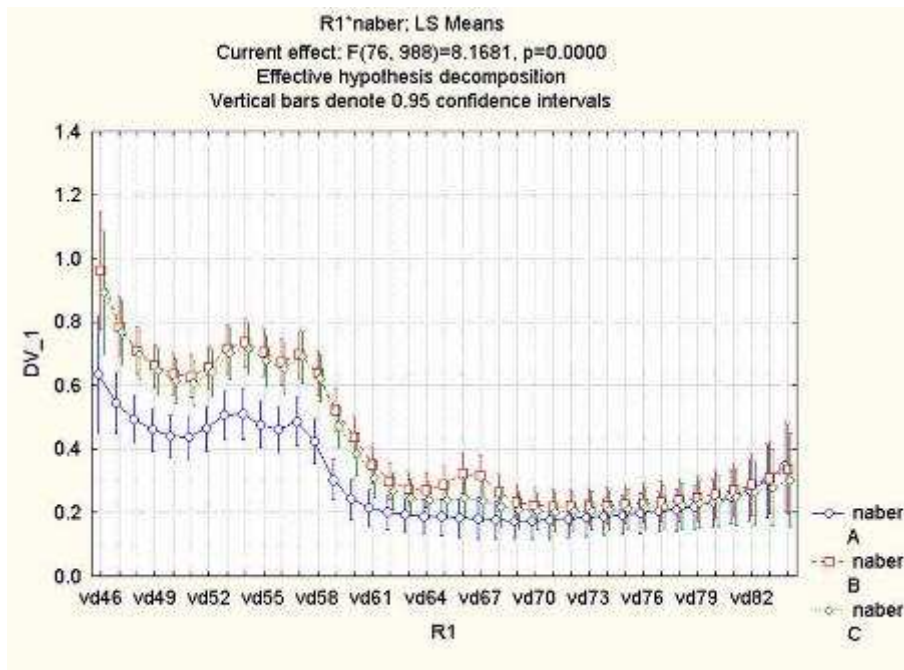
KARCINOM IN SITU TYPU MORBUS BOWEN-HYP (krátký interval)



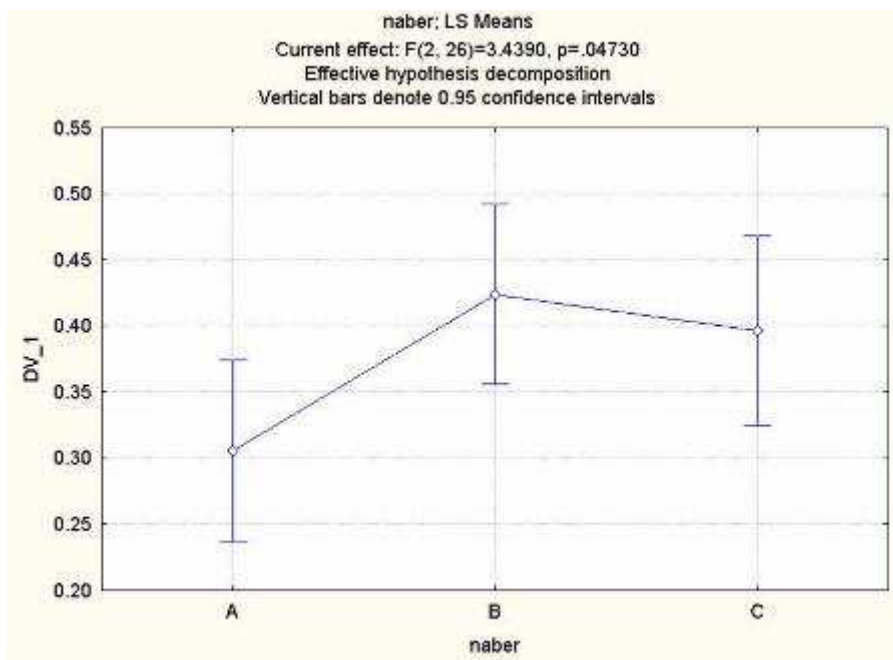
Graf 28* - „A“ - křivka před nanesením fotosenzibilizátoru(PS), „B“ – křivka po 2 hod. latence PS



Graf 29* - „B“ - křivka po 2 hod. latence PS, „C“ – křivka po ozáření

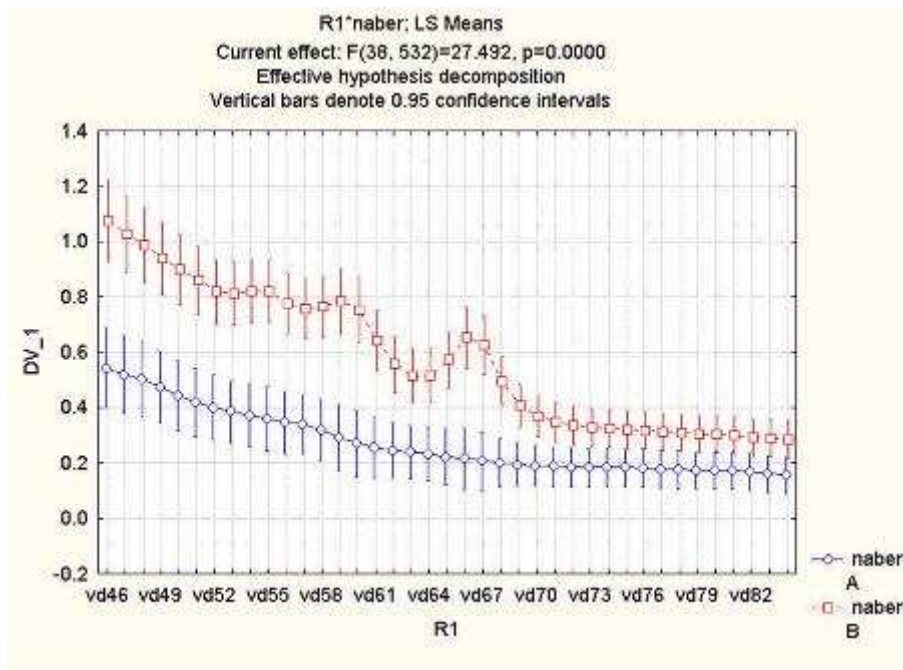


Graf 30* - „A“ - křivka před nanesením fotosenzibilizátoru(PS), „B“ – křivka po 2 hod. latence PS, „C“ – křivka po ozáření

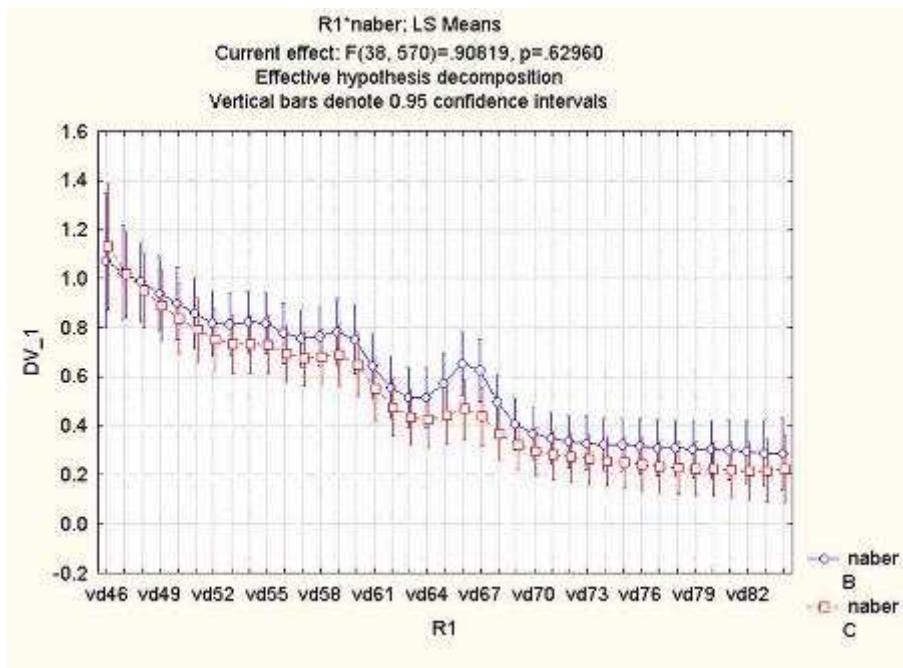


Graf 31 – průměrné hodnoty křivek „A“, „B“, „C“

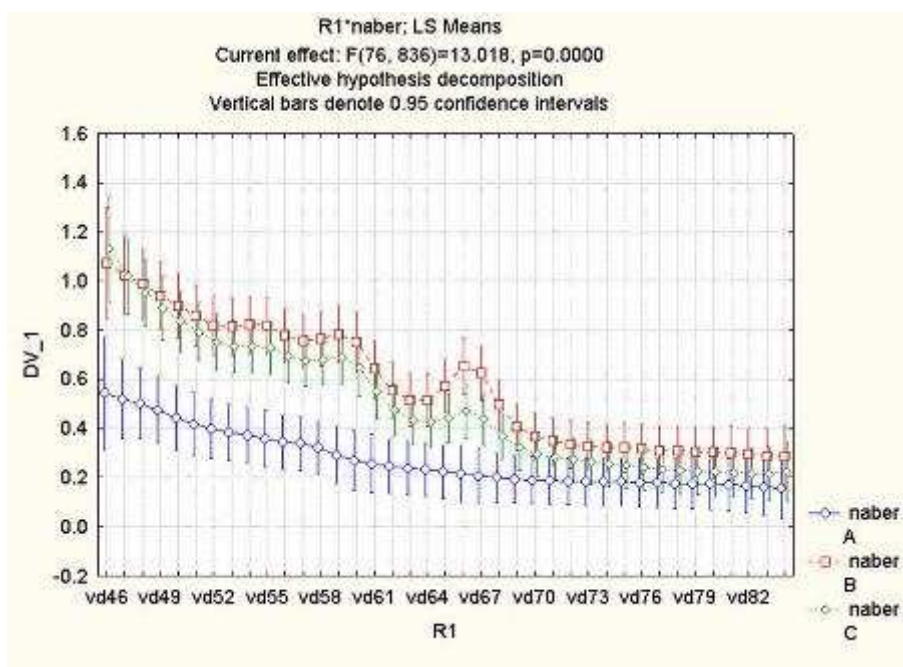
VULGÁRNÍ VERUKA-HYP (krátký interval)



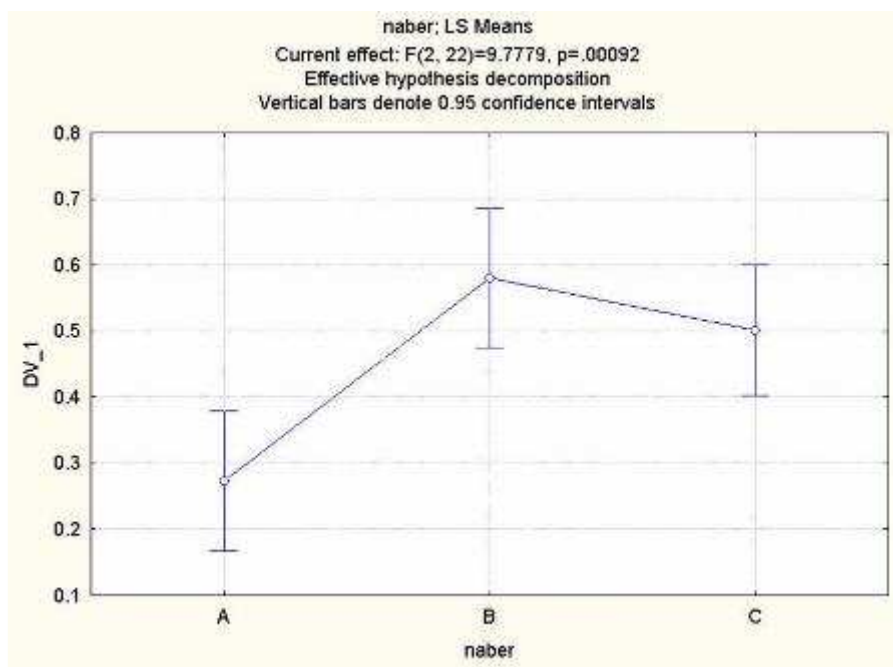
Graf 32* - „A“ - křivka před nanesením fotosenzibilizátoru(PS), „B“ – křivka po 2 hod. latence PS



Graf 33* - „B“ - křivka po 2 hod. latence PS, „C“ – křivka po ozáření

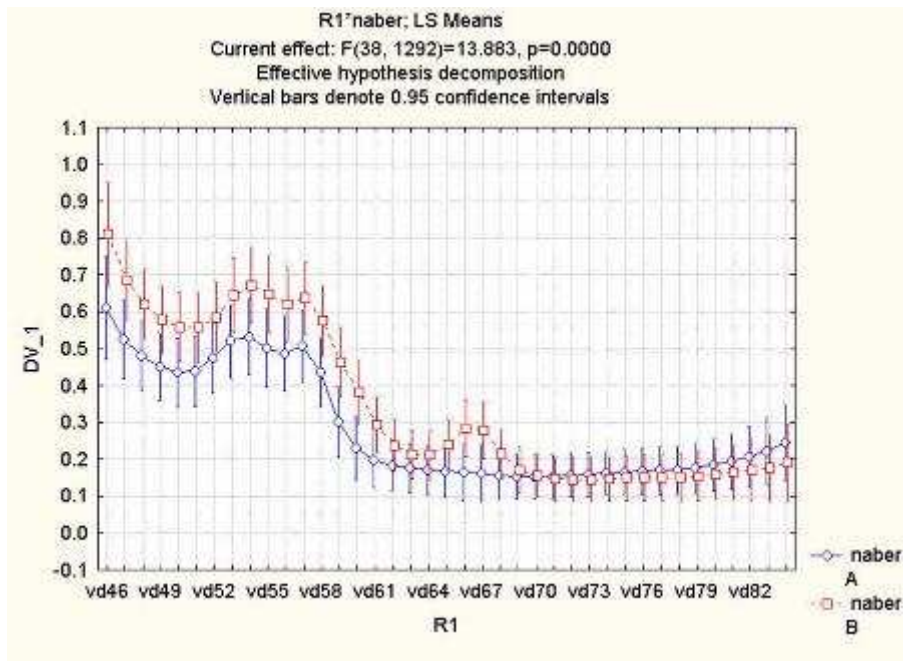


Graf 34* - „A“ - křivka před nanesením fotosenzibilizátoru(PS), „B“ – křivka po 2 hod. latence PS, „C“ – křivka po ozáření

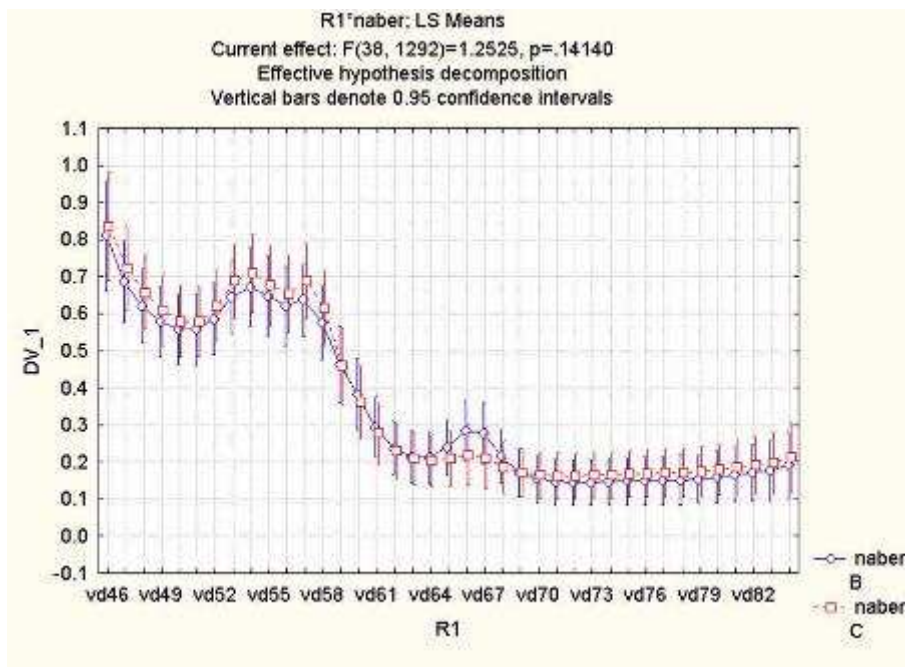


Graf 35 – průměrné hodnoty křivek „A“, „B“, „C“

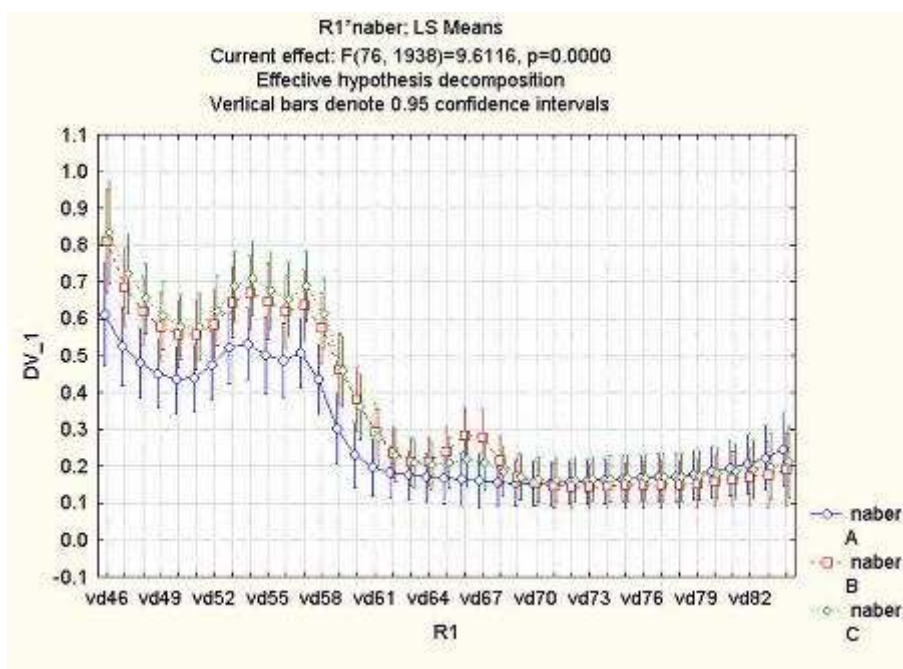
PSORIÁZA-HYP (krátký interval)



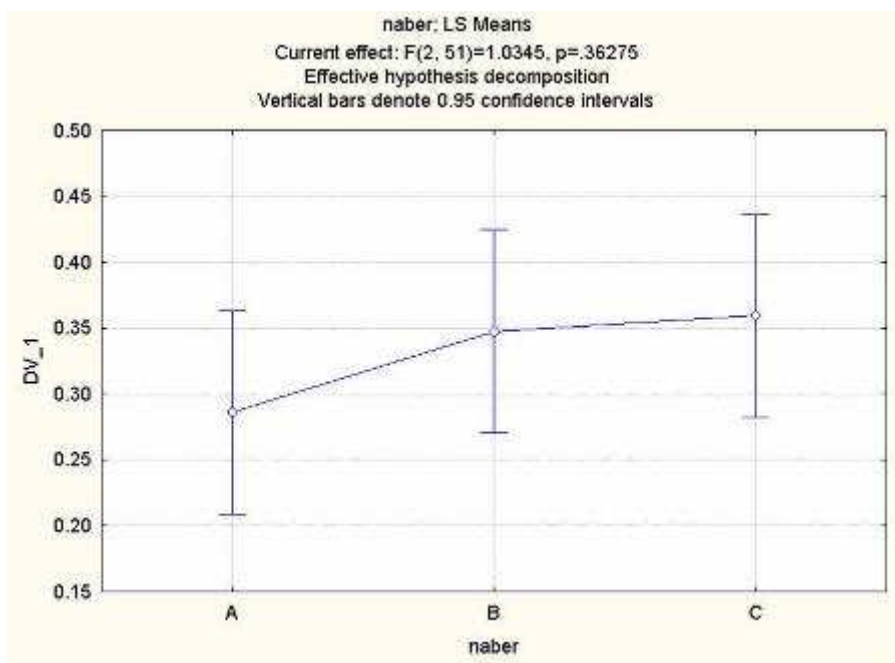
Graf 36* - „A“ - křivka před nanesením fotosenzibilizátoru(PS), „B“ – křivka po 2 hod. latence PS



Graf 37* - „B“ - křivka po 2 hod. latence PS, „C“ – křivka po ozáření

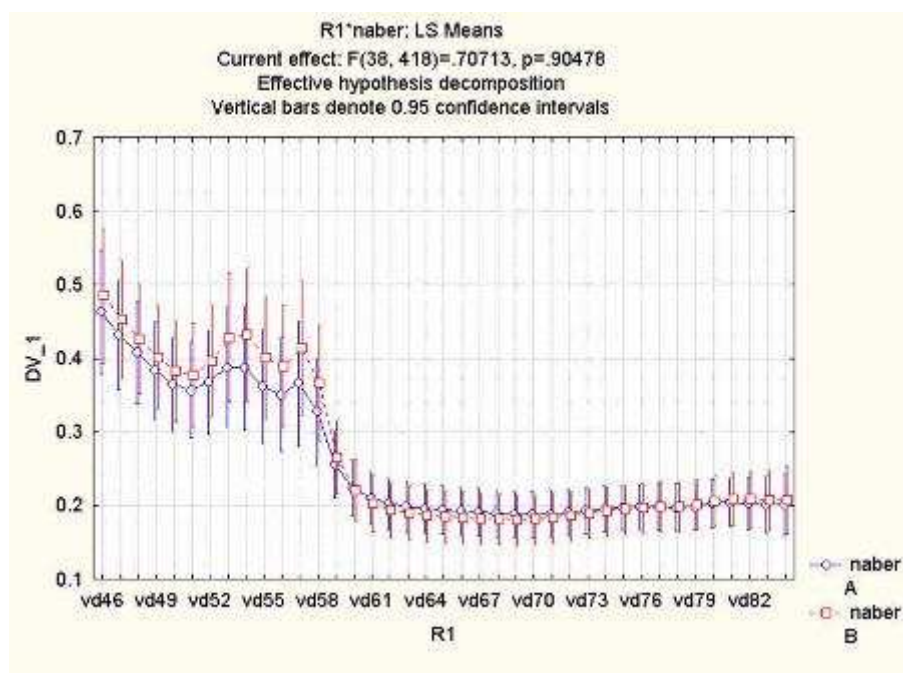


Graf 38* - „A“ - křivka před nanesením fotosenzibilizátoru(PS), „B“ – křivka po 2 hod. latence PS, „C“ – křivka po ozáření

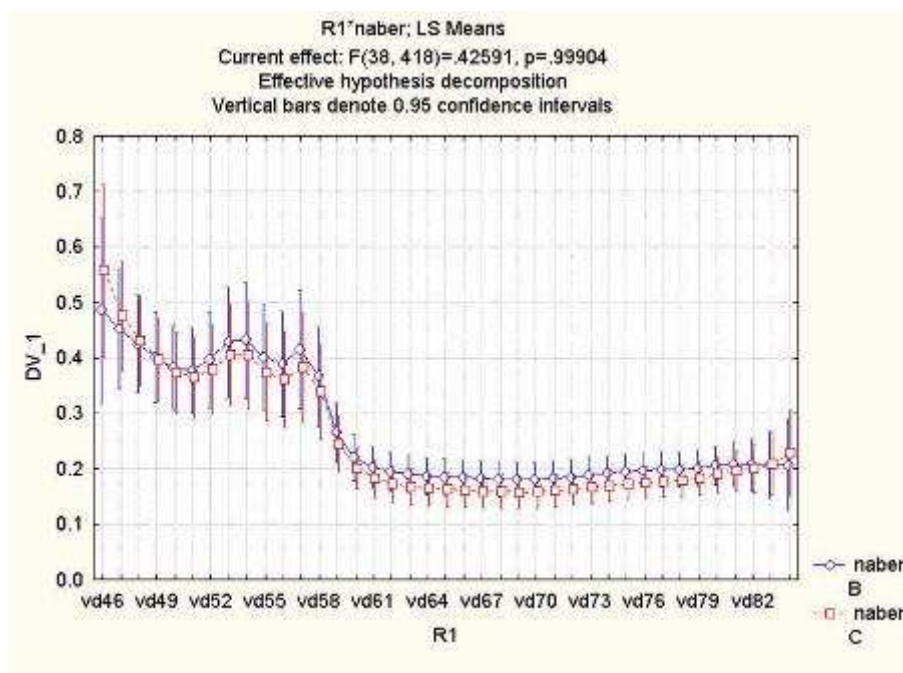


Graf 39 – průměrné hodnoty křivek „A“, „B“, „C“

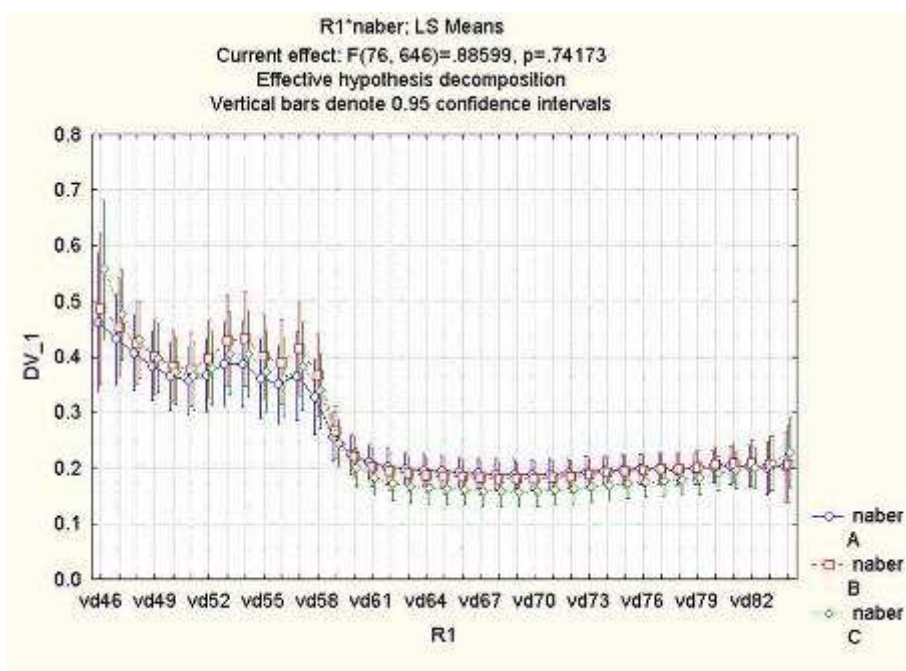
AKTINICKÉ KERATÓZY-ALA (krátký interval)



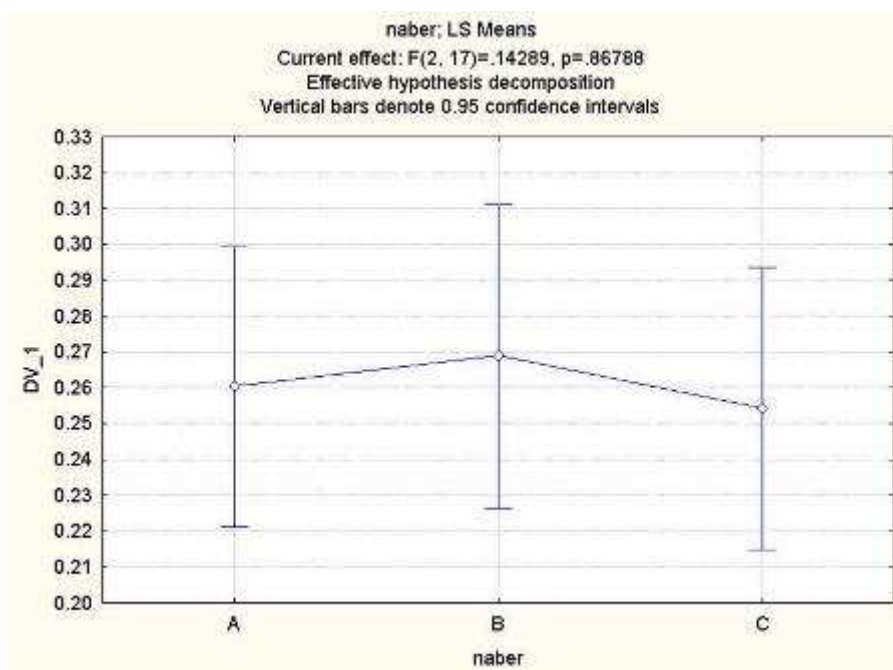
Graf 40* - „A“ - křivka před nanesením fotosenzibilizátoru(PS), „B“ – křivka po 2 hod. latence PS



Graf 41* - „B“ - křivka po 2 hod. latence PS, „C“ – křivka po ozáření

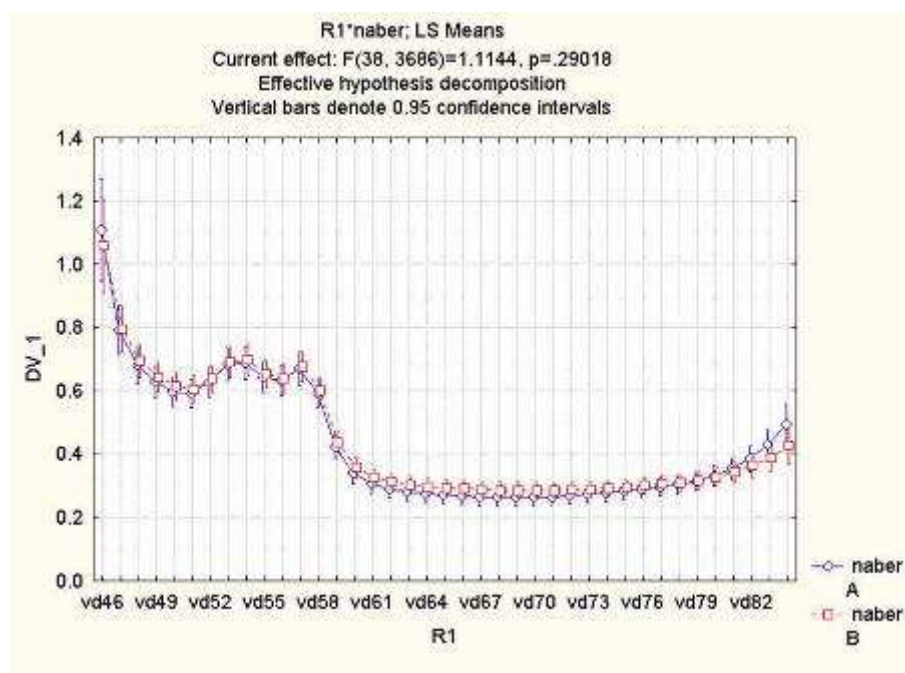


Graf 42* - „A“ - křivka před nanesením fotosenzibilizátoru(PS), „B“ – křivka po 2 hod. latence PS, „C“ – křivka po ozáření

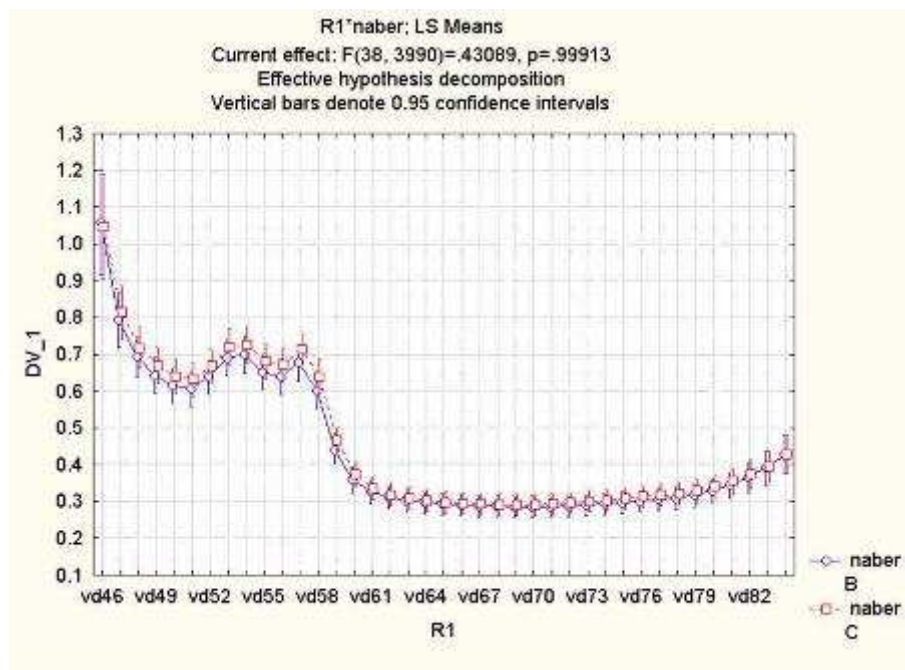


Graf 43 – průměrné hodnoty křivek „A“, „B“, „C“

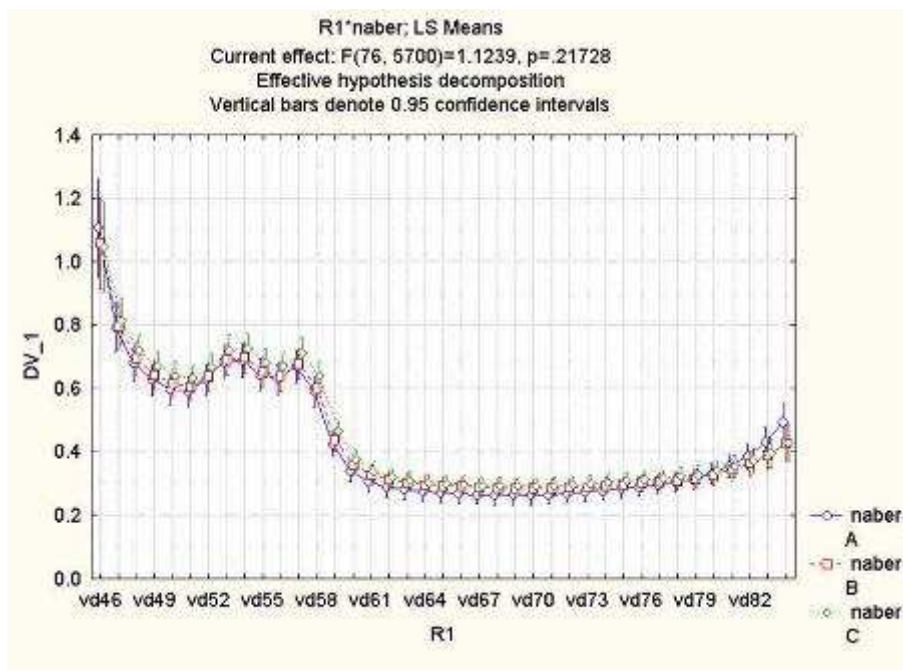
SUPERFICIÁLNÍ BAZOCELULÁRNÍ KARCINOM-ALA (krátký interval)



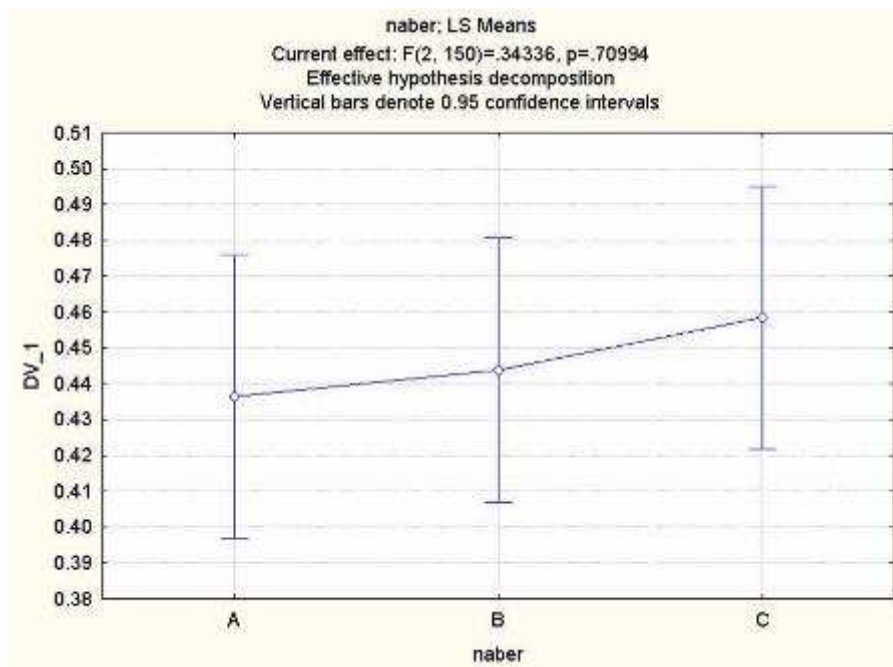
Graf 44* - „A“ - křivka před nanesením fotosenzibilizátoru(PS), „B“ - křivka po 2 hod. latence PS



Graf 45* - „B“ - křivka po 2 hod. latence PS, „C“ - křivka po ozáření

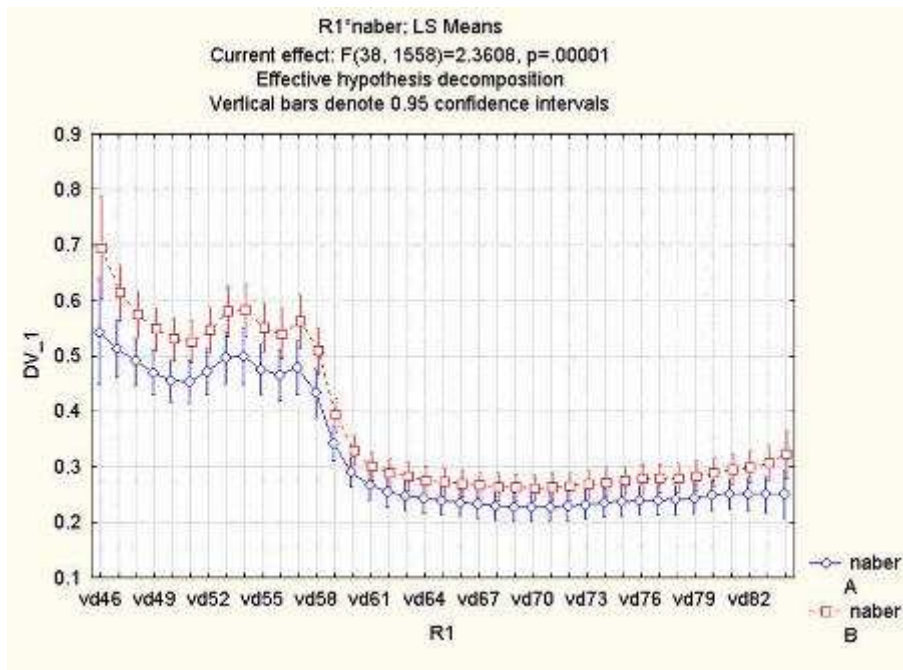


Graf 46* – „A“ - křivka před nanesením fotosenzibilizátoru(PS), „B“ – křivka po 2 hod. latence PS, „C“ – křivka po ozáření

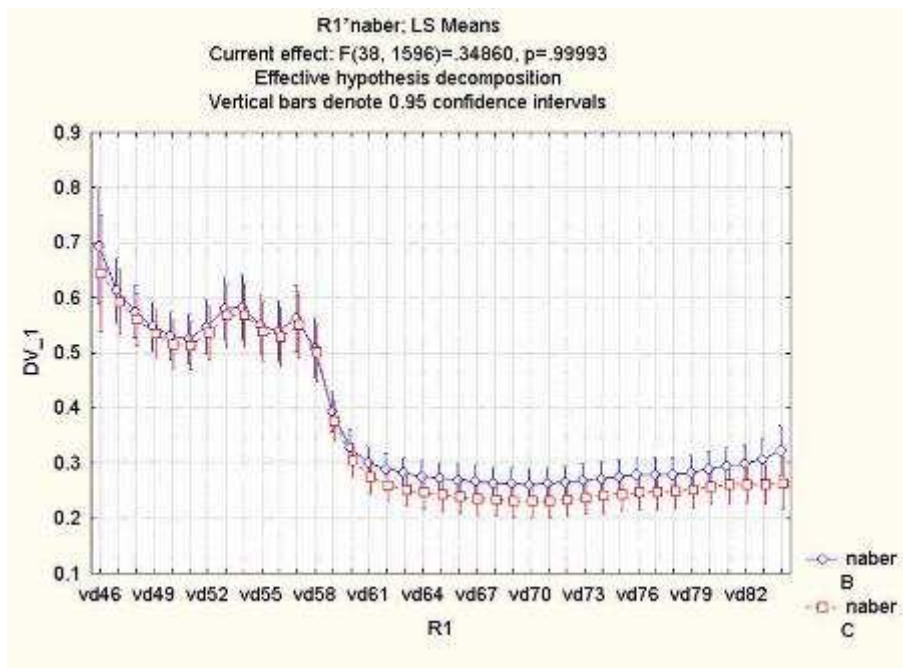


Graf 47 – průměrné hodnoty křivek „A“, „B“, „C“

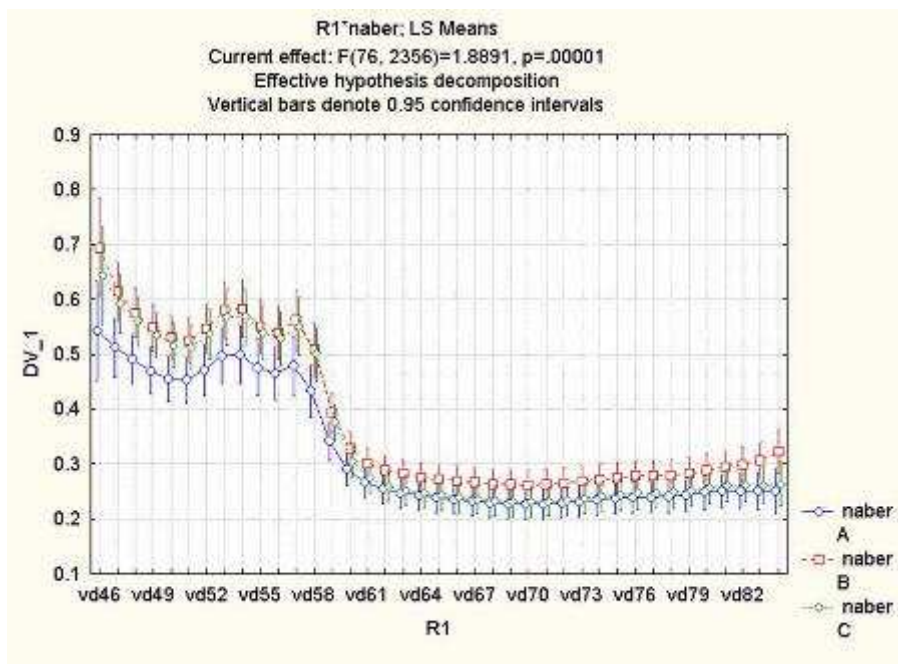
NODULÁRNÍ BAZOCELULÁRNÍ KARCINOM-ALA(krátký interval)



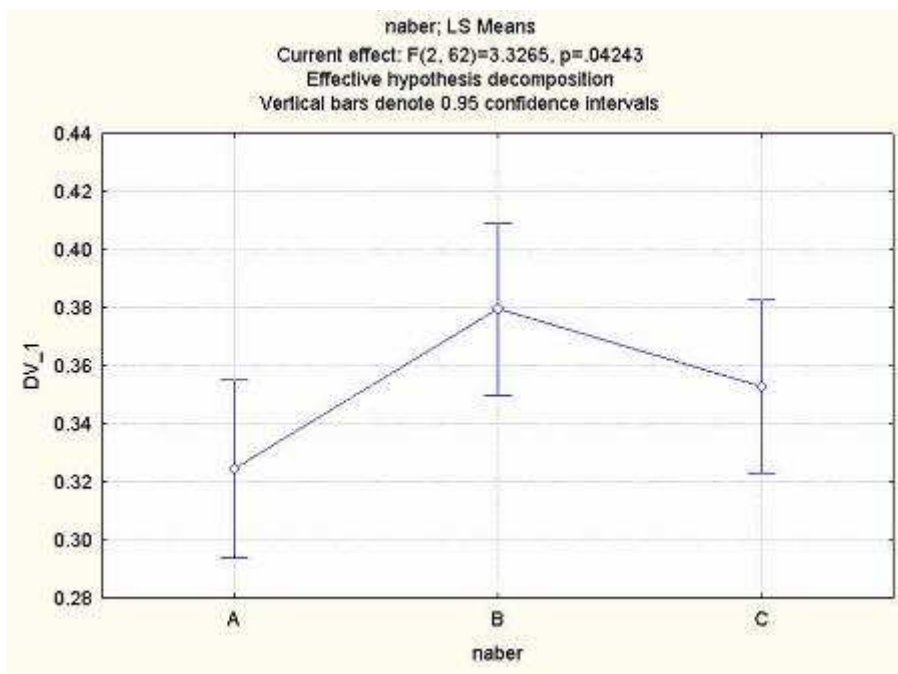
Graf 48* - „A“ - křivka před nanesením fotosenzibilizátoru(PS), „B“ - křivka po 2 hod. latence PS



Graf 49* - „B“ - křivka po 2 hod. latence PS, „C“ - křivka po ozáření

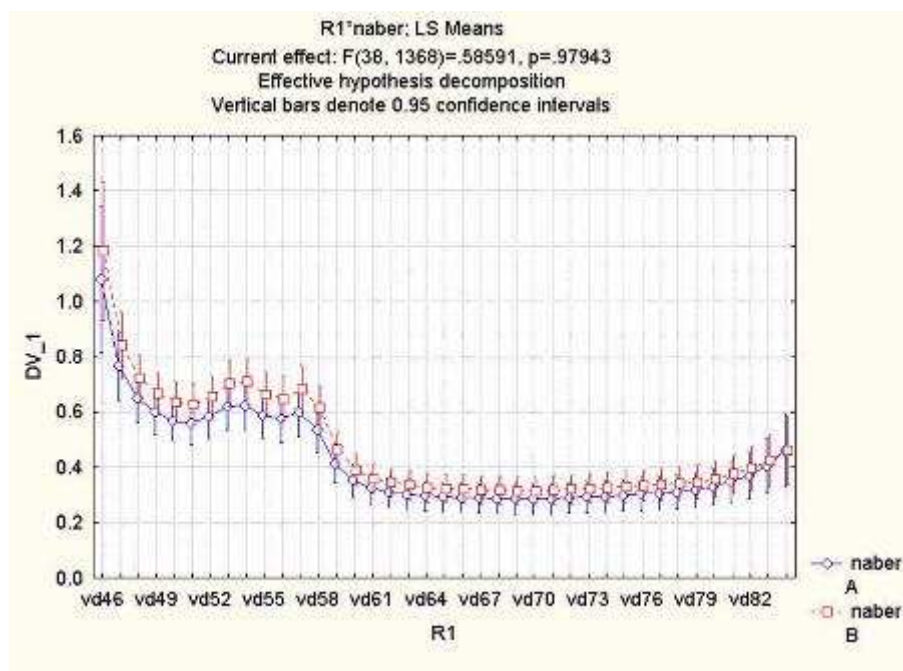


Graf 50* - „A“ - křivka před nanesením fotosenzibilizátoru(PS), „B“ - křivka po 2 hod. latence PS, „C“ - křivka po ozáření

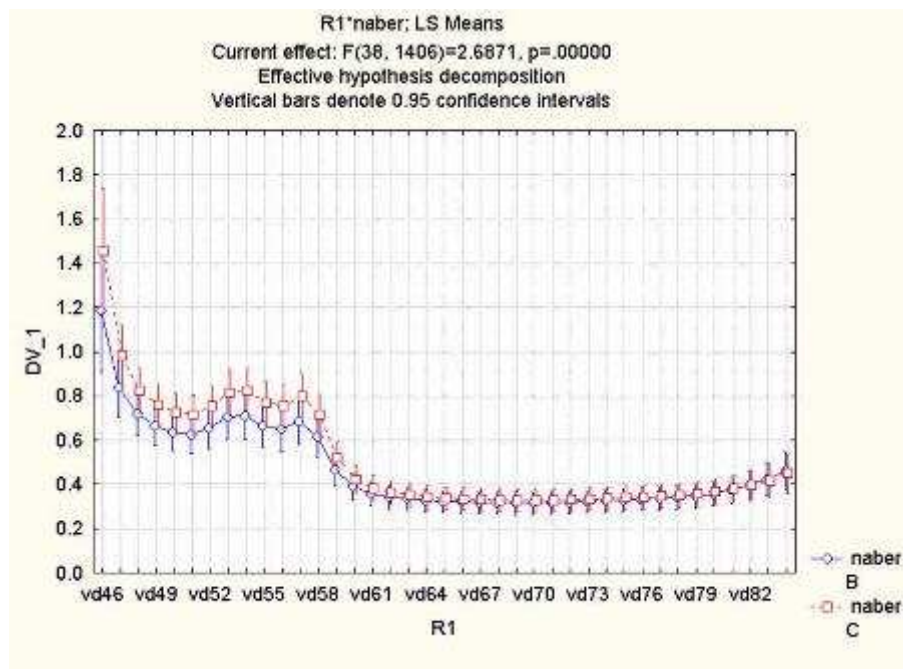


Graf 51 - průměrné hodnoty křivek „A“, „B“, „C“

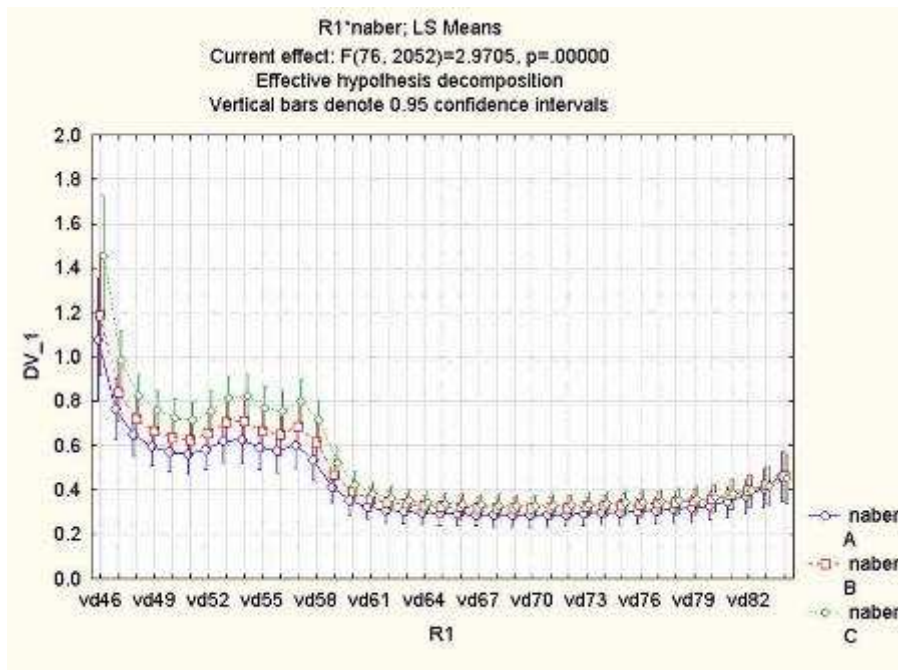
KARCINOM IN SITU TYPU MORBUS BOWEN-ALA (krátký interval)



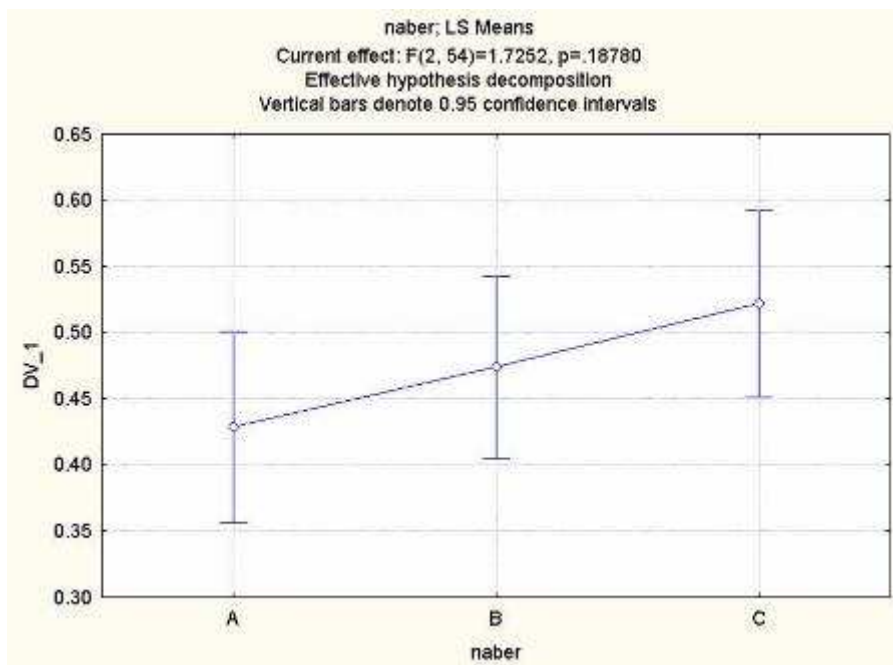
Graf 52* - „A“ - křivka před nanesením fotosenzibilizátoru(PS), „B“ - křivka po 2 hod. latence PS



Graf 53* - „B“ - křivka po 2 hod. latence PS, „C“ - křivka po ozáření

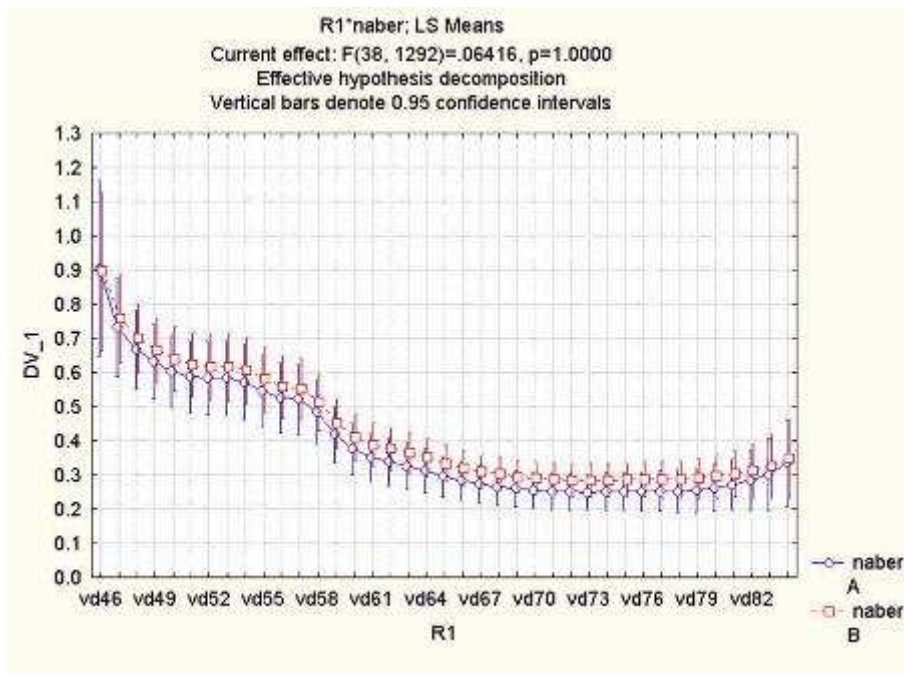


Graf 54* - „A“ - křivka před nanesením fotosenzibilizátoru(PS), „B“ - křivka po 2 hod. latence PS, „C“ - křivka po ozáření

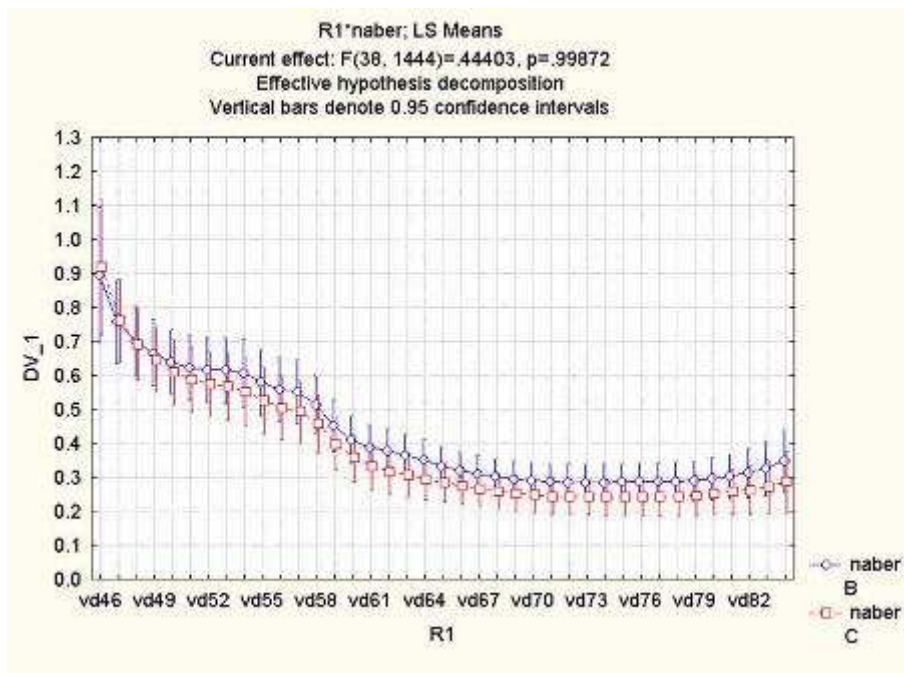


Graf 55 - průměrné hodnoty křivek „A“, „B“, „C“

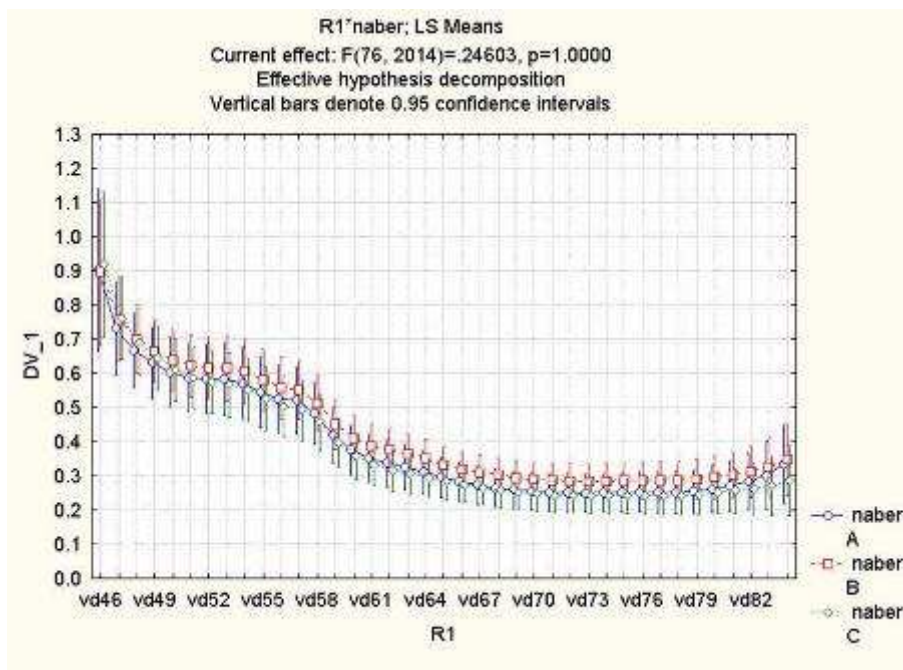
VULGÁRNÍ VERUKA-ALA (krátký interval)



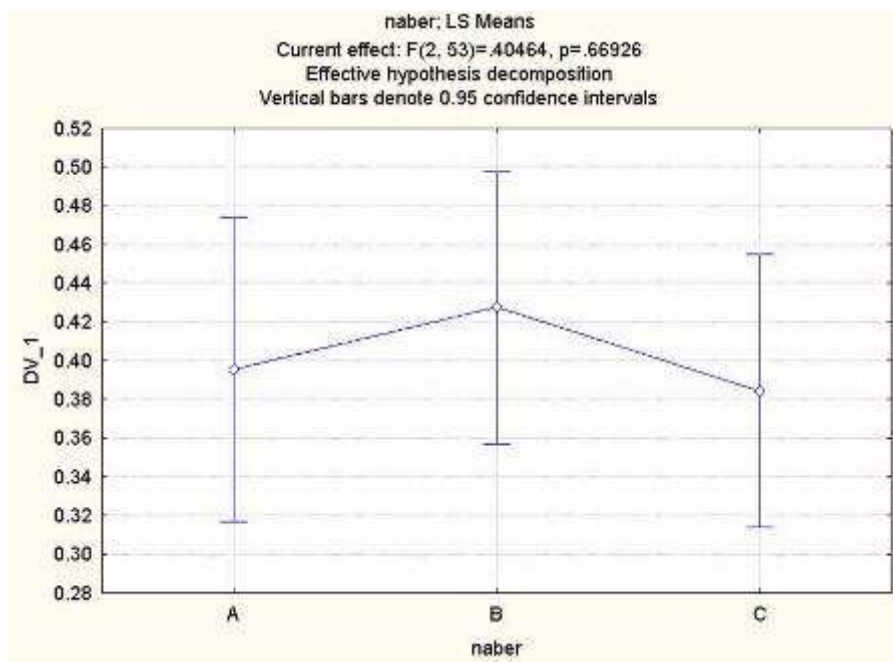
Graf 56* - „A“ - křivka před nanesením fotosenzibilizátoru(PS), „B“ - křivka po 2 hod. latence PS



Graf 57* - „B“ - křivka po 2 hod. latence PS, „C“ - křivka po ozáření

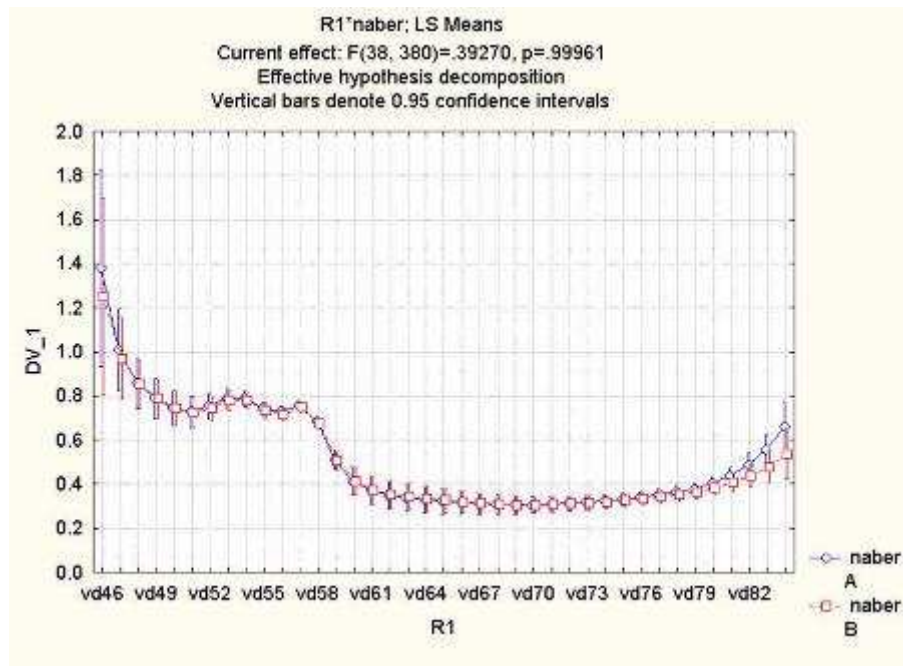


Graf 58* - „A“ - křivka před nanesením fotosenzibilizátoru(PS), „B“ - křivka po 2 hod. latence PS, „C“ - křivka po ozáření

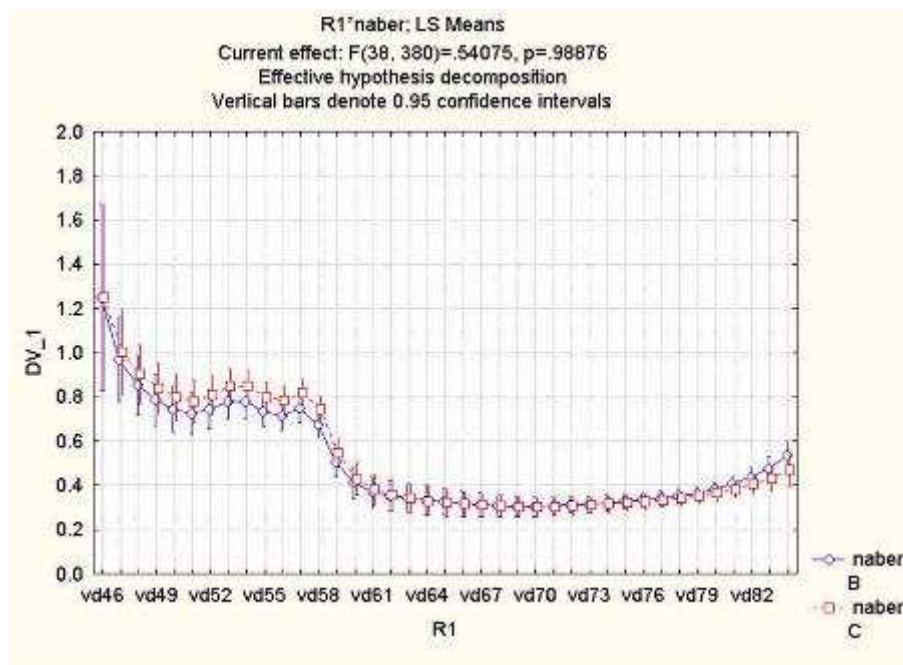


Graf 59 – průměrné hodnoty křivek „A“, „B“, „C“

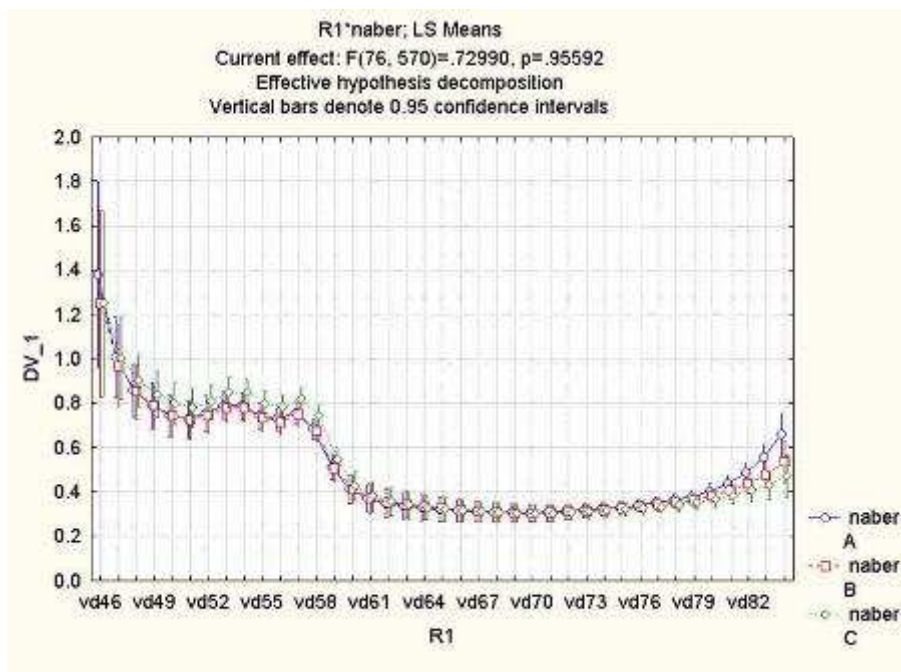
PSORIÁZA-ALA (krátký interval)



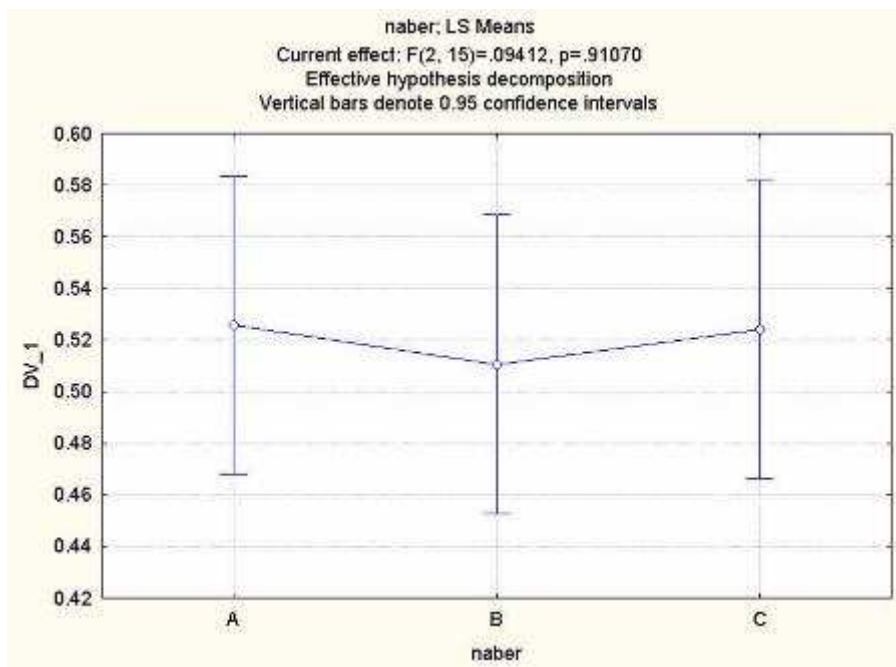
Graf 60* - „A“ - křivka před nanesením fotosenzibilizátoru(PS), „B“ – křivka po 2 hod. latence PS



Graf 61* - „B“ - křivka po 2 hod. latence PS, „C“ – křivka po ozáření



Graf 62* - „A“ - křivka před nanesením fotosenzibilizátoru(PS), „B“ - křivka po 2 hod. latence PS, „C“ - křivka po ozáření



Graf 63 - průměrné hodnoty křivek „A“, „B“, „C“

* pozn.: vd46...vd82 značí vlnové délky v oblasti od 460 do 820nm

2.16. SHRUTÍ A VÝZNAM ZÍSKANÝCH DAT:

Hlavním cílem naší studie byla snaha o nalezení a ověření ekonomicky příznivějšího fotosenzibilizátoru, a to hypericinu v glycerinovém roztoku, ve fotodynamické terapii a diagnostice některých kožních onemocnění a porovnání jeho účinnosti s nejčastěji používaným fotosenzibilizátorem, a to 20% 5-aminolevulovou kyselinou v gelu.

Ve studii byla účinnost hypericinu jako lokálně aplikovaného fotosenzibilizátoru o něco nižší ve srovnání s použitou 20% 5-aminolevulovou kyselinou. To bylo velice pravděpodobně způsobeno jeho větší molekulovou hmotností, a tím i menším průnikem do nádorové tkáně.

K ověření, zda právě nevhodný způsob lokální aplikace hypericinu byl důvodem nižšího počtu vyléčených projevů, je zapotřebí dalších studií porovnávajících jeho účinnost při odlišných způsobech aplikace (např. intralezionální, liposomy, pomocí elektr. pole aj.). Na základě dat získaných z literatury je hypericin stále řazen mezi fotosenzibilizátory se slibným terapeutickým účinkem. Jeho výroba by jistě byla podstatně levnější a snažší, než je tomu u derivátů porfyrinů.

Naše studie také potvrdila, že lze zaznamenat přítomnost hypericinu objektivně pomocí remitenční (reflexní) spektrofotometrie. Pozorovali jsme i skutečnost, že průběh křivek se liší mezi jednotlivými diagnózami. Lze říci, že jde o vedlejší, ale možná důležité zjištění, které by si ovšem vyžádalo další vyhodnocení. V tomto směru zatím statistické šetření nebylo provedeno, neboť nebylo předmětem ani cílem této studie.

3. GRAFY:

4. OBRAZOVÁ DOKUMENTACE:

Průběh léčby

HYP-PDT (superficiální bazocelulární karcinom)



Projev před zahájením HYP-PDT



Nanášení fotosenzibilizátoru



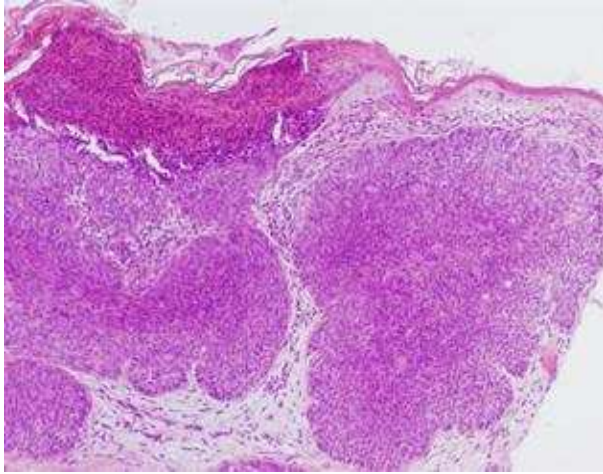
Nanesený fotosenzibilizátor pod okluzí



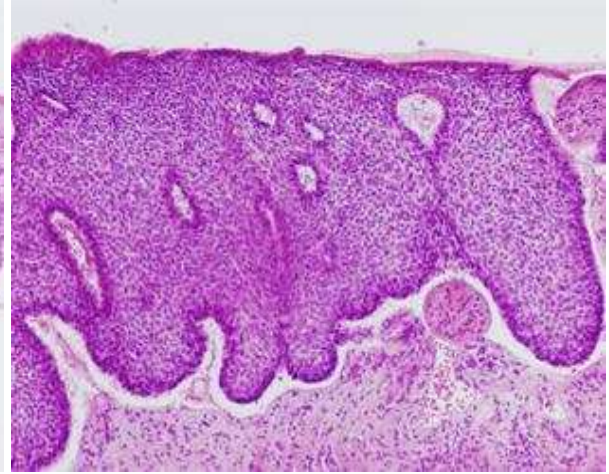
Projev v průběhu léčby



Projev po ukončení PDT, klinicky zlepšeno, histol. nezhojeno



Před HYP-PDT



Po HYP-PDT, histologicky nezhojeno

Průběh léčby

ALA-PDT (karcinom in situ typu morbus Bowen)



Projev před zahájením ALA-PDT



Projev následující 2 dny po ALA-PDT



Stádium erozí po PDT



Stádium krust po PDT



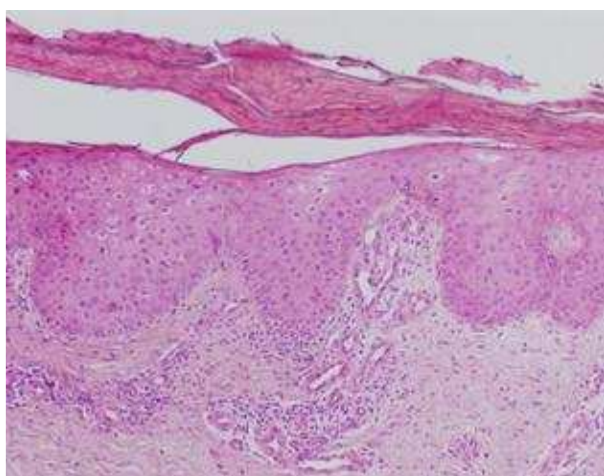
Stádium krustoskvam po PDT



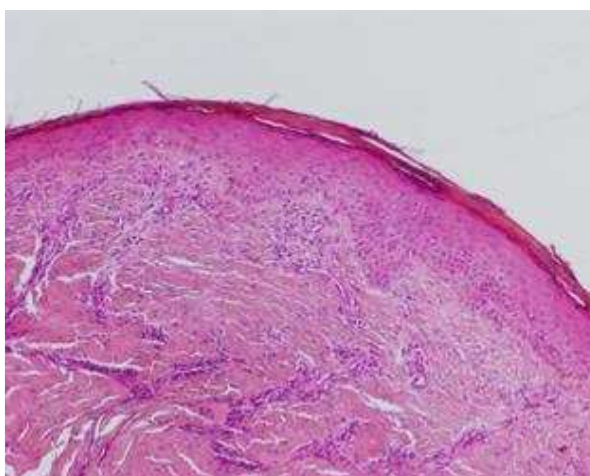
Projev po PDT, lehká hyperpigmentace



S odstupem několika týdnů po ukončení ALA-PDT

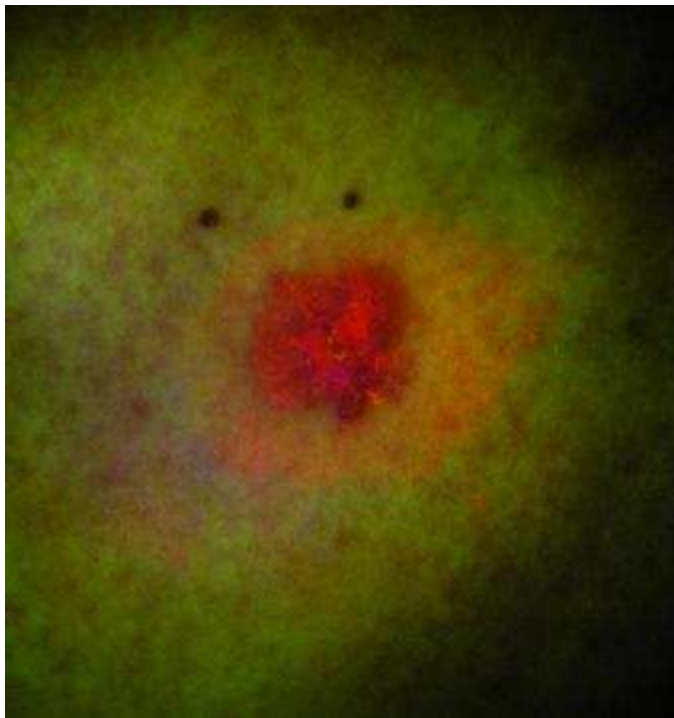


Před ALA-PDT

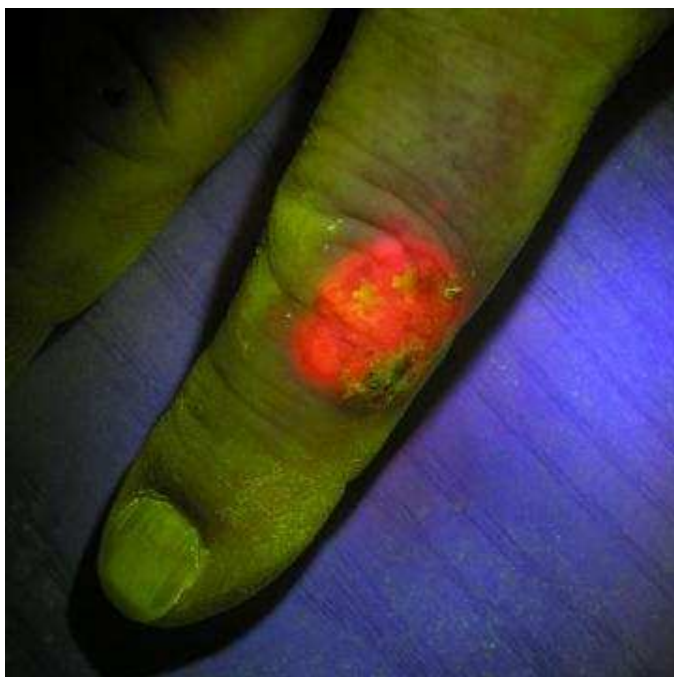


Po ALA-PDT, histologicky zhojeno

Fotodynamická diagnostika



Fluorescence po 2hod. inkubace HYP pod okluzí (superf. bazocelulární karcinom)



Fluorescence po 3hod. inkubace ALA pod okluzí (karcinom in situ typu morbus Bowen)

Sekundární impetiginizace léčených projevů



Před ALA-PDT (aktinické keratózy)



Po ALA-PDT, sekundární impetiginizace

Iritace léčeného projevu a v jeho okolí, herpes simplex labialis



Před ALA-PDT (superf. bazocelulární karcinom)



Po ALA-PDT, herpes simplex labialis, erytém, deskvamace

6. LITERATURA:

1. VON TAPPEINER H.: Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien nach Versuchen von O.Raab. Münch Med Wchnschr, 44, 1900, s.5.
2. RAAB O: Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. Zeitschr Biol, 39, 1900, s.524.
3. JESIONEK A. – VON TAPPEINER H: Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. Münch Med Wchnschr, 47, 1903, s.2042.
4. VON TAPPEINER H. – JODLBAUER A.: Über die Wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) Stoffe auf Ptotozoen und Enzyme. Arch Klin Med 80, 1904, s. 427-487.
5. HAUSMAN W.: Die sensensibilisierende Wirkung des Hematoporphyrins. Biochem Zeitschr, 30, 1911, s.276.

6. MEYER-BETZ F.: Untersuchungen über die biologische (photodynamische) Wirkung des Haematoporphyrins und anderer Derivate des Blut- und Gallenfarbstoffes. *Dtsch Arch Klin Med*, 112, 1913, s.476-503.
7. AULER M. – BANZER G.: Untersuchungen über die Rolle Porphyrine bei geschwulstkranken Menschen und Tieren. *Krebsforsch*, 53, 1942, s.65-68.
8. FIGGE F.H.J. – WEILAND G.S. - MANGANIELLO L.O.J.: Cancer detection and therapy: affinity of neoplastic, embryonic, and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins. *Proc Soc Exp Biol Med*, 68, 1948, p.640-641.
9. LIPSON R.L. – BALDES E.J. – OLSEN A.M.: The use of derivate of haematoporphyrin in tumor detection. *J Natl Cancer*, 26, 1961, p.1-11.
10. KENNEDY J.C. - POTTIER J.H.: Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B: Biol*. 14, 1992, p. 275-292.
11. PATRICE T. *Photodynamic therapy*. 1st ed., vol. 2. UK, Cambridge: The Royal Society of Chemistry 2003. Chapter 1, An outline of the history of PDT, p. 1-17.
12. CALZAVARA-PINTON P.G. – VENTURINI M. – SALA R.: Photodynamic therapy: update 2006. Part 1: Photochemistry and photobiology. *JEADV*, 21, 2007, p. 293-302.
13. PRINSZE C. – BUBBELMAN T.M.A.R. – VAN STEVENINCK J.: Protein damage, induced by small amounts of photodynamically generated singlet oxygen or hydroxyl radicals. *Photochem Photobiol*, 53, 1990, p. 152-157.
14. FRITSCH C. – RUZICKA T. *Fluorescence diagnosis and photodynamic therapy of skin diseases: atlas and handbook*. Wien: Springer-Verlag, 2003. 108p.
15. LIU X. – KIM C.N. – YANG J. et. al.: Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86, 1996, p. 147-157.
16. VARNES M.E. – CHIU S.M. – XUE L.Y. et. al.: Photodynamic therapy-induced apoptosis in lymphoma cells: translocation of cytochrome c causes inhibition of respiration as well as caspase activation. *Biochem Biophys Res Commun*, 255, 1999, p. 673-679.
17. GREEN D.R. – REED J.C.: Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281, 1998, p. 1309-1312.
18. THORNBERRY N.A. – LAZEBNIK Y.: Caspases: enemies within. *Science*, 281, 1998, p. 1312-1316.
19. CHAUDHURI K. – KECK R.W. – SELMAN S.H.: Morphological changes of tumor microvasculature following hematoporphyrin derivative-sensitized photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*, 46, 1987, p. 823-827.
20. AGOSTINIS P. – ASSEFA Z. – VANTIEGHEM A. et. al.: Apoptotic and antiapoptotic signaling pathway induced by photodynamic therapy with hypericin. *Adv Enzyme Regul*, 40, 2000, p. 157-182.
21. CLARK C. – BRYDEN A. – DAWE R. et. al.: Topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy for cutaneous lesions: outcome and comparison of light sources. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 19, 2003, p. 134-141.
22. PIACQUADIO D.J. – CHEN D.M. – FARBER H.F. et. al.: Photodynamic therapy with aminolevulinic acid topical solution and visible blue light in the treatment of multiple actinic keratoses of the face and scalp. *Arch Dermatol*, 140, 2004, p. 41-46.
23. MORTON C.A. – BROWN S.B. – COLLINS S. et. al.: Guidelines for topical photodynamic therapy: report of a workshop of the British Photodermatology Group. *Br J Dermatol*, 146, 2002, p. 552-567.

24. HENDERSON B.W. – DOUGHERTY T.J.: How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol*, 55, 1992, p. 145-157.
25. PASS H.I.: Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. *J Natl Cancer Inst*, 85, 1993, p. 443-456.
26. LEE SEE K. – FORBES I.J. – BETTS W.H.: Oxygen dependency of photocytotoxicity with haematoporphyrin derivative. *Photochem Photobiol*, 39, 1984, p. 631-634.
27. PROFIO A.E. – DOIRON D.R. Dosimetry considerations in phototherapy. *Med Phys*, 8, 1981, p. 190-196.
28. JIRSA M. Jr. – ŠÍP M. – JiRSA M.: Influence of hyperbaric oxygenation on bilirubin and ditaurobilirubin auto-oxidation and porphyrin-sensitized photo-oxidation. *Photochem Photobiol*, 5, 1990, p. 295-302.
29. JIRSA M. Jr. – POUČKOVÁ P. – DOLEŽAL J. et. al.: Hyperbaric oxygen and photodynamic therapy in tumour-bearing nude mice. *Eur J Cancer*, 27, 1991, p. 109.
30. DOUGHERTY T.J. – GOMER CH.J. – HENDERSON B.W. et. al.: Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst*, 90, 1998, p. 889-905.
31. MOAN J. – BERG K.: The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem Photobiol*, 53, 1991, p. 549-553.
32. DETTY M.R. – GIBSON S.L. - WAGNER S.J.: Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *J Med Chem*, 47, 2004, p. 3897-3915.
33. ALLISON R.R. – DOWNIE G.H. – CUENCA R. et. al.: Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiag Photodynam Ther*, 1, 2004, p. 27-42.
34. HAYATA Y. - KATO H. – KONAKA C. et. al.: Haematoporphyrin derivative and laser photoirradiation in the treatment of lung cancer. *Chest*, 81, 1982, p. 269-277.
35. PATRICE T. Photodynamic therapy. 1st ed., vol. 2. UK, Cambridge: The Royal Society of Chemistry 2003. Chapter 3, Sensitizers in photodynamic therapy, p. 59-80.
36. KRIEG R.C. – FICKWEILER S. – WOLFBEIS O.S. et. al.: Cell-type specific protoporphyrin IX metabolism in human bladder cancer in vitro. *Photochem Photobiol*, 72, 2000, p. 226-233.
37. VAN HILLEGERSBERG R.J. – VAN BERG W.O. – KORT W.J.: Selective accumulation of endogenously produced porphyrins in a liver metastasis model in rat. *Gastroenterology*, 103, 1992, p. 647-651.
38. KENNEDY J.C. - POTTIER R.H.: Endogenous protoporphyrin IX; a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B:Biol*, 14, 1992, p.275-292.
39. PENG Q. – BERG K. – MOAN J. et. al.: 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: Principles and experimental research. *Photochem Photobiol*, 65, 1997, p. 235-251.
40. BAUMGARTNER R. – KRIEGMAIR M. – HOFSTETTER A. Fluorescence diagnosis of bladder tumor by use of 5-aminolevulinic acid – Fundamentals and results. Tuttingen: Verlag Endo-Press 1998. Biological principles of fluorescence cystoscopy, p. 18-24.
41. LOMAGNO P. – LOMAGNO R.C.: Activity of *Hypericum perforatum* oil in the treatment of the bedsores in old people. *Fitoterapia*, 50, 1979, p.201-205.

42. LINDE K. – RAMIREZ G. – MUIROW C.D. et. al.: St. John's wort for depression – an overview and metaanalysis of randomized clinical trials. *Br Med J*, 13, 1996, p.253-258.
43. GIESE A.C.: Hypericium. *Photochem Photobiol Rev*, 5, 1980, p.229-255.
44. DURAN N. – SONG P.S.: Hypericin and its photodynamic action. *Photochem Photobiol*, 43, 1986, p. 677-680.
45. DIWU Z. – LOWN J.W.: Photosensitization with anticancer agents. 17.EPR studies of photodynamic action of hypericin: formation of semiquinone radical and activated oxygen species on illumination. *Free Radical Biology and Medicine*, 14(2), 1993, p.209-215.
46. THOMAS C. – PARDINI R.S.: Oxygen dependence of hypericin-induced phototoxicity to EMT6 mouse mammary carcinoma cells. *Photochem Photobiol*, 55(6), 1992, p.831-837.
47. ASSEFA Z. - VANTIEGHEM A. – DECLERCQ W. et. al.: The activation of the c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways protects HeLa cells from apoptosis following photodynamic therapy with hypericin. *J Biol Chem*, 274, 1999, p.8788-8796.
48. AGOSTINIS P. - ASSEFA Z. – VANTIEGHEM A.: Apoptotic and antiapoptotic signaling pathway induced by photodynamic therapy with hypericin. *Adv Enzyme Regul*, 40, 2000, p.157-182.
49. VANDENBOGAERDE A.L. - GEBOES K.R. - CUVEELE J.F. et al.: Antitumour activity of photosensitized hypericin on A431 cell xenografts. *Anticancer Res*, 16, 1996, p.1611-1618.
50. ALECU M. – URSACIUC C. - HALALAU F. et. al.: Treatment of squamous and basal cell carcinoma with hypericin as a new photodynamic agent. *Anticancer Res*, 18, 1998, p.4651-4654.
51. ZHANG W. - ANKER L. - LAW R.E. et. al.: Enhancement of radiosensitivity in human malignant glioma cells by hypericin in vitro. *Clin Cancer Res*, 2, 1996, p.843-846.
52. HARRIS M.S. - SAKAMOTO T. - KIMURA H. et. al.: Hypericin inhibits cell growth and induces apoptosis in retinal pigment epithelial cells: possible involvement of protein kinase. *Curr Eye Res*, 15, 1996, p.255-262.
53. VANDENBOGAERDE A.L. - DELAEY E. - VANTIEGHEM A. et. al.: Cytotoxicity and antiproliferative effect of hypericin and derivatives after photosensitization. *Photochem Photobiol*, 67, 1998, p.119-125.
54. VANDENBOGAERDE A.L. - PROOT P. - HIMPENS B.E. et. al.: Differential cytotoxic effects induced after photosensitization by hypericin. *Photochem Photobiol B*, 38, 1997, p.136-142.
55. BRAATHEN L.R. – SZEIMIES R.M. – BASSET-SEGUIN N. et. al.: Guidelines on the use of photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer: An international consensus. *J Am Acad Dermatol*, 56, 2007, p. 125-143.
56. MARKS R. – RENNIE G. – SELWOOD T.S.: Malignant transformation of solar keratoses to squamous cell carcinoma. *Lancet*, 1, 1988, p. 795-797.
57. GLOGAU R.G.: The risk of progression to invasive disease. *J Am Acad Dermatol*, 42 (Suppl.), 2000, p. 23-24.
58. COCKERELL C.J. – WHARTON J.R.: New histopathological classification of actinic keratosis (incipient intraepidermal squamous cell carcinoma). *J Drugs Dermatol*, 4(4), 2005, p.462-467.
59. COCKERELL C.J.: Histopathology of incipient intraepidermal squamous cell carcinoma („actinic keratosis“). *J Am Acad Dermatol*, 42, 2000, p. 11-17.

60. SZEIMIES R.M. – KARRER S. – RADAKOVIC-FIJAN S. et. al.: Photodynamic therapy using topical methyl 5-aminolevulinate compared with cryotherapy for actinic keratosis: a prospective, randomized study. *J Am Acad Dermatol*, 47, 2002: p. 258-262.
61. PARISER D.M. – LOWE N.J. – STEWART D.M. et. al.: Photodynamic therapy with topical methyl aminolevulinate for actinic keratosis: results of a prospective randomized multicenter trial. *J Am Acad Dermatol*, 48, 2003, p. 227-232.
62. FREEMAN M. – VINCIULLO C. – FRANCIS D. et. al.: A comparison of photodynamic therapy using topical methyl aminolevulinate (Metvix[®]) with single cycle cryotherapy in patients with actinic keratosis: a prospective, randomized study. *J Dermatolog Treat*, 14, 2003, 99-106.
63. DRAGIEVA G. – HAFNER J. – DUMMER R. et. al.: Topical photodynamic therapy in the treatment of actinic keratoses and Bowen's disease in transplant recipients. *Transplantation*, 77, 2004, p. 115-121.
64. TARSTEDT M. – ROSDAHL I. – BERNE B. et. al.: A randomized multicenter study to compare two treatment regimens of topical methyl aminolevulinate (Metvix)-PDT in actinic keratosis of the face and scalp. *Acta Derm Venereol*, 85, 2005, p. 424-428.
65. CALZAVARA-PINTON P.G.: Repetitive photodynamic therapy with topical delta-aminolaevulinic acid as an appropriate approach to the routine treatment of superficial non-melanoma skin tumours. *J Photochem Photobiol B*, 29, 1995, p. 53-57.
66. KURWA H.A. – YONG-GEE S.A. – SEED P.T. et. al. A randomized paired comparison of photodynamic therapy and topical 5-fluorouracil in the treatment of actinic keratoses. *J Am Acad Dermatol*, 41, 1999, 414-418.
67. PIACQUADIO D.J. – CHEN D.M. – FARBER H.F. et. al. Photodynamic therapy with aminolevulinic acid topical solution and visible blue light in the treatment of multiple actinic keratoses of the face and scalp: investigator-blinded, phase 3, multicenter trials. *Arch Dermatol*, 140, 2004, p. 41-46.
68. TELFER N.R. – COLVER G.B. – BOWERS P.W.: Guidelines for the management of basal cell carcinoma. *British Association of Dermatologists. Br J Dermatol*. 141, 1999, p. 415-423.
69. SOLER A.M. – WARLOE T. – BERNER A. et. al.: A follow-up study of recurrence and cosmesis in completely responding superficial and nodular basal cell carcinomas treated with methyl 5-aminolaevulinate-based photodynamic therapy alone and with prior curettage. *Br J Dermatol*, 145, 2001, p. 467-471.
70. HORN M. – WOLF P. – WULF H.C. et. al.: Topical methyl aminolevulinate photodynamic therapy in patients with basal cell carcinoma prone to complications and poor cosmetic outcome with conventional therapy. *Br J Dermatol*, 149, 2003, p. 1242-1249.
71. VINCIULLO C. – ELLIOTT T. – GEBAUER K. et. al.: MAL-PDT in patients with basal cell carcinoma: results of an Australian multicenter study. Poster presented at the International Skin Cancer Conference 2004, Zurich, Switzerland, July 22-24, 2004.
72. BASSET-SEGUIN N. – IBBOTSON S. – EMTESTAM L. et. al.: MAL-PDT vs. cryotherapy in primary sBCC: results of 48-month follow-up. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 19 (Suppl 2), 2005, p. 237.
73. KENNEDY J.C. – POTTIER R.H. – PROSS D.C.: Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *J Photochem Photobiol B*, 6, 1990, p. 143-148.

74. SVANBERG K. – ANDERSSON T. – KILLANDER D. et. al.: Photodynamic therapy of non-melanoma malignant tumours of the skin using topical delta-aminolevulinic acid sensitization and laser irradiation. *Br J Dermatol*, 130, 1994, p. 743-751.
75. FIJAN S. – HONIGSMANN H. – ORTEL B.: Photodynamic therapy of epithelial skin tumours using delta-aminolevulinic acid and desferrioxamine. *Br J Dermatol*, 133, 1995, p. 282-288.
76. WENNBERG A.M. – LINDHOLM L.E. – ALPSTEN M. et. al.: Treatment of superficial basal cell carcinomas using topically applied delta-aminolevulinic acid and a filtered xenon lamp. *Arch Dermatol Res*, 288, 1996, p. 561-564.
77. FINK-PUCHES R. – SOYER H.P. – HOFER A. et. al.: Long-term follow-up and histological changes of superficial nonmelanoma skin cancers treated with topical delta-aminolevulinic acid photodynamic therapy. *Arch Dermatol*, 134, 1998, p. 821-826.
78. HALLER J.C. – CAIRNDUFF F. – SLACK G. Et. al.: Routine double treatments of superficial basal cell carcinomas using aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. *Br J Dermatol*, 143, 2000, p. 1270-1275.
79. WANG I. – BENDSOE N. – KLINTEBERG C.A. et. al.: Photodynamic therapy vs. cryosurgery of basal cell carcinomas: results of a phase III clinical trial. *Br J Dermatol*, 144, 2001, p. 832-840.
80. PENG Q. – SOLER A.M. – WARLOE T. et. al.: Selective distribution of porphyrins in skin thick basal cell carcinoma after topical application of methyl 5-aminolevulinate. *J Photochem Photobiol B*, 15, 2001, p. 140-145.
81. TOPE W.D. – MENTER A. – EL-AZHARY R.A. et. al.: Comparison of topical methyl aminolevulinate photodynamic therapy versus placebo photodynamic therapy in nodular BCC. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 18 (Suppl 2), 2004, p. 413-414.
82. FOLEY P. – FREEMAN M. – SILLER G. et. al.: MAL-PDT or placebo cream in nodular basal cell carcinoma: results of an Australian double-blinded randomised multicenter study. Poster presented at the International Skin Cancer Conference 2004, Zurich, Switzerland, July 22-24, 2004.
83. SOLER A.M. – WARLOE T. – TAUSJO J. et. al.: Photodynamic therapy by topical aminolevulinic acid, dimethylsulphoxide and curettage in nodular basal cell carcinoma: a one-year follow-up study. *Acta Derm Venereol*, 79, 1999, p. 204-206.
84. THISSEN M.R. – SCHROETER C.A. – NEUMANN H.A.: Photodynamic therapy with delta-aminolevulinic acid for nodular basal cell carcinomas using a prior debulking technique. *Br J Dermatol*, 142, 2000, p. 338-339.
85. RHODES L.E. – DE RIE M. – ENSTROM Y. et. al.: Photodynamic therapy using topical methyl aminolevulinate vs surgery for nodular basal cell carcinoma: results of a multicenter randomized prospective trial. *Arch Dermatol*, 140, 2004, p. 17-23.
86. COX N.H. – EEDY D.J. – MORTON C.A.: Guidelines for management of Bowen's disease. British Association of Dermatologists. *Br J Dermatol*, 141, 1999, p. 633-641.
87. KAO G.F.: Carcinoma arising in Bowen's disease. *Arch Dermatol*, 122, 1986, p. 1124-1126.
88. MORTON C. – HORN M. – LEHMAN J. et. al.: A 24-month update of a placebo controlled European study comparing MAL-PDT with cryotherapy and 5-fluorouracil in patients with Bowen's disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 19 (Suppl 2), 2005, p. 237-238.

89. MORTON C.A. – WHITEHURST C. – MOSELEY H. et. al.: Comparison of photodynamic therapy with cryotherapy in the treatment of Bowen's disease. *Br J Dermatol*, 135, 1996, p. 766-771.
90. SALIM A. – LEMAN J.A. – McCOLL J.H. et. al.: Randomized comparison of photodynamic therapy with topical 5-fluorouracil in Bowen's disease. *Br J Dermatol*, 148, 2003, p. 539-543.
91. MORTON C.A. – WHITEHURST C. – MOORE J.V. et. al.: Comparison of red and green light in the treatment of Bowen's disease by photodynamic therapy. *Br J Dermatol*, 143, 2000, p. 767-772.
92. IBBOTSON S.H.: Topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy for the treatment of skin conditions other than non-melanoma skin cancer. *Br J Dermatol*, 146, 2002, p. 178-188.
93. ITOH Y. – NINOMIYA Y. – TAJIMA S. et. al.: Photodynamic therapy of acne vulgaris with topical delta-aminolaevulinic acid and incoherent light in Japanese patients. *Br J Dermatol*, 144, 2001, p. 575-579.
94. HONG S.B. – LEE M.H.: Topical aminolevulinic acid-photodynamic therapy for the treatment of acne vulgaris. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 21, 2005, p. 322-325.
95. WIEGELL S.R. – WULF H.CH.: Photodynamic therapy of acne vulgaris using 5-aminolevulinic acid versus methyl aminolevulinate. *J Am Acad Dermatol*, 54, 2006, p. 647-651.
96. FRANSSON J. – ROS A.M.: Clinical and immunohistochemical evaluation of psoriatic plaques treated with topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 21, 2005, p. 326-332.
97. SCHLEYER V. – RADAKOVIC-FIJAN S. – KARRER S. et. al.: Disappointing results and low tolerability of photodynamic therapy with topical 5-aminolaevulinic acid in psoriasis. A randomized, double-blind phase I/II study. *JEADV*, 20, 2006, p. 823-828.
98. STENDER I.M. – NA R. – FOGH H. et. al.: Photodynamic therapy with 5-aminolaevulinic acid or placebo for recalcitrant foot and hand warts: randomised double-blind trial. *The Lancet*, 355, 2000, p. 963-966
99. FABBROCINI G. – COSTANZO M.P.D. – RICCARDO A.M. et. al.: Photodynamic therapy with topical δ -aminolaevulinic acid for the treatment of plantar warts. *J Photochem Photobiol B: Biology*, 61, 2001, p. 30-34.
100. CALZAVARA-PINTON P.G. – VENTURINI M. – SALA R.: Photodynamic therapy: update 2006. Part 2: Clinical results. *JEADV*, 21, 2007, p. 439-451.
101. KACEROVSKÁ D. – PIZINGER K. – KUMPOVÁ M. et. al.: Genital warts treated by photodynamic therapy. *SKINmed: Dermatology for Clinician*. In print.
102. RUIZ-RODRIGUEZ R. – SANZ-SÁNCHEZ T. – CÓRDOBA S.: Photodynamic rejuvenation. *Dermatol Surg*, 28, 2002, p. 742-744.
103. ALSTER T.S. – TANZI E.L. – WELSH E.C.: Photorejuvenation of facial skin with topical 20% 5-aminolevulinic acid and intense pulsed light treatment: a split-face comparison study. *J Drugs Dermatol*, 4, 2005, p. 35-38.
104. LINDELOF B. – SIGURGEIRSSON B. – GABEL H. et. al.: Incidence of skin cancer in 5356 patients following organ transplantation. *Br J Dermatol*, 143, 2000, p. 513-519.
105. HARTEVELT M.M. – BAVINCK J.N. – KOOTTE A.M. et. al.: Incidence of skin cancer after renal transplantation in The Netherlands. *Transplantation*, 49, 1990, p. 506-509.

106. OTLEY C.C. – HIROSE R. – SALASCHE S.J.: Skin cancer as a contraindication to organ transplantation. *Am J Transplant*, 5, 2005, p. 2079-2084.
107. JENSEN P. – HANSEN S. – MOLLER B. et. al.: Skin cancer in kidney and heart transplant recipients and different long term immunosuppressive therapy regimens. *J Am Acad Dermatol*, 40, 1999, p. 177-186.
108. WULF H.C. – PAVEL S. – STENDER I. Et. al.: Topical photodynamic therapy for prevention of new skin lesions in renal transplant recipients. *Acta Derm Venereol*, 86, 2006, p. 25-28.
109. FRITSCH C. – RUZICKA T. Fluorescence diagnosis and photodynamic therapy of skin diseases: atlas and handbook. 1st ed., Wien: Springer-Verlag 2003. Section E, Fluorescence detection of ALA-induced porphyrins (FDAP), p. 23-31.
110. SMITS T. – KLEINPENNING M.M. – VAN ERP P.E.J. et. al.: A placebo-controlled randomized study on the clinical effectiveness, immunohistochemical changes and protoporphyrin IX accumulation in fractionated 5-aminolaevulinic acid-photodynamic therapy in patients with psoriasis. *Br J Dermatol*, 155, 2006, p. 429-436.
111. RESL V. - PRŮCHA J. – CETKOVSKÁ P. et.al.: Objektivizace barvy kůže – chromametrie (kolorimetrie, chromatometrie) a remitenční spektrofotometrie. *Čes-slov Derm*, 6, 2001, s. 318- 322.
112. RESL V. - PRŮCHA J. – CETKOVSKÁ P. etl al.: Kožní spektrofotometr s kontinuálním spektrem. *Čes-slov Derm*, 3, 2002, s. 125-132.
113. ETTLER K.: Fotodynamická terapie v dermatologickém použití – další rozvoj metody. *Čas Lék Česk*, 145 (3), 2006, s. 184- 187.
114. JIRÁSKOVÁ M. – VOSMÍK F. – KRAJSOVÁ I. et. al.: Zkušenosti s fotodynamickou terapií u některých kožních afekcí. *Čs Derm*, 74 (4), 1999, s. 161-167.
115. JIRÁSKOVÁ M. – JIRSA M.: Fotodynamická terapie. *Čs Derm*, 73 (6), 1998, s. 208-212.
116. SACCHINI V. – MELLONI E. – MARCHESINI R. et al.: Topical administration of tetrasodium-meso-tetraphenylporphinesulfonate (TPPS) and red light irradiation for the treatment of superficial neoplastic lesions. *Tumori*, 73 (1), 1987, p. 19-23.
117. JIRSA M. – KAKÁČ B.: Způsob čištění a odsolení meso-tetra-p-sulfofenylporfinu. *Čs Patent PV 7488-87*, 1990.
118. BIELICKÝ T.: Fotodermatózy. *SZN Praha 1963. Hypericimus*, s. 96-97.

7. SEZNAM PUBLIKACÍ

KACEROVSKÁ, D., PIZINGER, K., RESL, V., CETKOVSKÁ, P., JIRSA, M., ŠMÍD, F. Srovnání účinnosti dvou fotosenzibilizátorů ve fotodynamické terapii kožních nádorů. *Čes.-slov. Derm.* 2006; 81: s. 148-152.

KACEROVSKÁ, D., PIZINGER, K., MAJER, F., ŠMÍD, F. Hypericin in photodynamic therapy of non-melanoma skin cancer (odesláno k oponentuře do JEADV)

PIZINGER, K., CETKOVSKÁ, P., KACEROVSKÁ, D., KUMPOVÁ, M.: Successful treatment of cutaneous leishmaniasis by photodynamic therapy and cryotherapy. Eur J Dermatol. IF 0.807 (v tisku)

KACEROVSKÁ, D., PIZINGER, K., KUMPOVÁ, M., CETKOVSKÁ, P. Genital warts treated by photodynamic therapy. SKINmed: Dermatology for Clinician. (v tisku)

Publikace nevztahující se k tématu dizerační práce:

KACEROVSKÁ D., PIZINGER K.: Multicentrická retikulohistiocytóza. Čes.-slov. Derm. 2005; 80 (1): s. 19-22.

KUMPOVÁ, M, RESL, V., KACEROVSKÁ, D., PIZINGER, K. Zkušenosti s léčbou torpidních condylomata acuminata 5% imiquimod krémem. Praktický lékař. 2006; 86 (11): s. 662-665.

skin cancer

Names of the authors:

Denisa Kacerovská, †*

Karel Pizinger, †

Filip Majer, ‡

František Šmíd, ‡

† Department of Dermatology and Venereology, Medical School and Teaching Hospital Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic

‡ Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

Keywords: photodynamic therapy, hypericin, non-melanoma skin tumors

* Corresponding author, Department of Dermatology and Venereology, Faculty of Medicine, Charles University, Dr.E.Beneše 13, 305 99 Pilsen, Czech Republic, tel. +420 377 402 150, fax.: +420 377 402 692, e-mail: kacerovskad@fnplzen.cz

Funding source: The project was funded by the grant of the Czech Ministry of Health, Internal Grant Agency under grant number NR/7901-3

Conflict of interest: none

Abstract

Background Based on news about hypericin (HYP) as a potent photosensitizer with promising photobiological activities, we decided to try it as a topically applied photosensitizer in photodynamic therapy (PDT).

Objective The aim of this single-centre, prospective study was to investigate the effectiveness of topical HYP-PDT treatment for non melanoma skin cancer.

Methods The study was carried out on 34 patients (20 male and 14 women in the 32 to 83 years age range) with actinic keratoses (AK), basal cell carcinoma (BCC) and Bowen's disease. The patients were treated once a week with HYP in a glycerol solution and a red light dose of 75 J/cm^2 for 6 weeks on average.

Results The percentage of complete clinical response was 50% for AKs, 24% in patients with superficial BCC and 40% in patients with Bowen's disease. Complete clinical response did not occur in the group with nodular BCCs. A complete histological response rate was found out in 12% of patients with superficial BCCs and 80% in the patients with Bowen's disease. No control biopsies were performed after the treatment of AKs. All patients complained of burning and pain sensations during irradiation.

Conclusion The topical HYP-PDT is a promising treatment for non melanoma skin cancer although the results of our study were less successful in comparison with PDT using one of the most often photosensitizers (ALA, MAL). The advance of the therapy is a question of improvement of hypericin delivery into pathological cells.

Introduction

Hypericin ($C_{30}H_{16}O_8$, molecular weight 504.44, CAS Number 548-04-9) is a polycyclic, aromatic phenanthroperylene-dione with photosensitizing activity isolated from *Hypericum perforatum* plants, commonly known as St. John's wort (Fig. 1).¹

The first detailed report of the isolation of hypericin from *Hypericum perforatum* was published in 1939 by Brockmann et al.² The first correct chemical formula of hypericin was reported in 1942, also by the same author.³

In recent years increased interest in hypericin as a potential clinical anticancer agent has arisen since several studies established its powerful *in-vivo* and *in-vitro* anti-neoplastic activity upon irradiation. Photodestruction of cells charged with hypericin is dependent on the presence of oxygen and light of a distinct wavelength.⁴ Investigations of the molecular mechanisms underlying hypericin phototoxicity in cancer cells have revealed that this photosensitizer can induce both apoptosis and necrosis in a concentration and light dose-dependent fashion.^{5,6}

Here, we investigated the effects of photodynamic therapy (PDT) with a topically applied hypericin in a glycerol solution under occlusion for non melanoma skin cancer.

Material and methods

Thirty-four patients (20 men [59%] and 14 women [41%] ranging in ages 32 - 83) with actinic keratoses (AKs), superficial or nodular basal cell carcinoma (sBCC, nBCC) and Bowen's disease were included in the study (Table 1). 8 patients in the AKs group (age range: 63-83 years; mean age: 75 ± 6.72 years), 21 patients in the BCC group (age range: 32-82 years; mean age: 66 ± 13.35 years) and 5 patients in the Bowen's disease group (age range: 57-76 years; mean age: 67.2 ± 7.32 years) underwent treatment. Of these, three subjects in the BCC group had diagnosed nBCC and the rest sBCC. All clinical diagnoses, actinic keratoses excluded, had been verified by histology before starting PDT treatment with hypericin. Individual AK lesions designated for treatment were clinically graded as grade 1 (lesions slightly palpable and more easily felt than seen) or grade 2 (moderately thick AKs, easily seen and felt) or grade 3 (very thick and/or hyperkeratotic AKs).⁷

In the nBCC group no debulking of the tumor was done before treatment.

The above mentioned lesions were treated by photodynamic therapy in weekly intervals, the average period of treatment was 6 weeks.

As photosensitizer, we used hypericin product obtained by extraction with an addition of glycerol. The product was prepared by extraction of 25g of a dry drug (aerial parts of *Hypericum perforatum*, 7% loss on drying, *Hyperici Herba* sc. from MEGAFYT, Czech Republic) by 500 ml of 95% ethanol (Penta, Czech Republic) in a Soxhlet extractor. After 4 hours of extraction the ethanolic extract was concentrated to 50 ml by vacuum distillation. The raw concentrate was roughly purified by column chromatography on Kieselguhr Hyflo-Super Cel (John Mansville Co., New York, USA) with 3.5 cm diameter and 6 cm height and 95% ethanol as a mobile phase. Then 3 ml of glycerol was added and 95% ethanol was removed under reduced pressure in a rotating evaporator. Subsequently, the hot product was transferred into a storage tube. The product was black-brown, homogenous,⁸ very viscous, had density 1.2 g/ml and consisted of 36% glycerol, 17% water and 47% total solids (by freeze drying). The concentration of hypericins was estimated by spectrophotometry at 590nm (scan 450-800nm) in methanol (Fig. 2) after exposure to daylight to let convert protohypericin and protopseudohypericin to hypericin and pseudohypericin, respectively. Main absorbing compounds were hypericins and chlorophyll degradation products (Fig. 3).⁹ Fluorescence spectroscopy revealed the main photoactive compounds at 590-670 nm, the emission light of the used excitation lamp, are hypericin and pseudohypericin. TLC analysis¹⁰ with hypericin (Sigma) as a standard showed that the products contained 1.5-2.5 mg/ml of the hypericin (32.5%) and pseudohypericin (67.5%). Distinct products were mixed up to give the same final concentration of 2 mg/ml. Average yield of hypericins was 17 mg (0.07%) per 25 g of a drug. This product was protected from evaporation, shielded from light and stored at room temperature. Subsequent tests of this product gave the same spectra for periods up to 12 months.

The photosensitizer was applied to lesions and 10mm of surrounding skin in a 1-mm thick layer under occlusive dressing (Tegaderm, 3M, St. Paul, Minnesota, USA) for 2 hours, and then removed with saline and non-woven gauze. Before its application, the surface of treated areas was cleaned of possible crusting and flaking skin. After the period of incubation the site was irradiated with non-coherent red light with an emission spectrum of 580 to 680 nm wavelength (Medeikonos PDT, Model 200, Medeikonos AB, Gothenburg, Sweden). A total light dose of 75 J/cm² was delivered at all times. Before the irradiation an accumulation of hypericin in treated area was verified by a diagnostic lamp.

The clinical development of the treated manifestation was photographically documented. Dermatological medical history of all data concerning the duration of the disorder and treatment up to that point were obtained from each patient before starting the PDT treatment.

Controlled biopsies were performed from the 3rd to the 8th week after completion of the PDT in the cases of patients with BCCs and Bowen's disease.

The protocol of this prospective study was approved by the local ethics committee and all of the subjects gave informed consent. Exclusion criteria of this study included a history of cutaneous photosensitization, hypersensitivity to St. John's wort, photodermatoses, use of photosensitizing drugs, pregnancy or lactation and active infectious disease.

Results

In the group of patients with AKs a total of 8 people were treated (grade 1: 3/8, 37.5%; grade 2: 4/8, 50%; grade 3: 1/8, 12.5%). The manifestation was localized on the scalp and face. Four patients (4/4, 50%) showed complete clinical recovery, the remaining 4 (4/4, 50%) only showed improvement of clinical findings with lasting light infiltration of the treated area. The lesions that cleared completely were clinically graded as grade 1 in three cases and grade 2 in one case. Complete clinical recovery was seen in all patients with healed lesions (4/4, 50%) during follow-up at 3 months after the cessation of PDT treatment. In the remaining patients, clinical findings were aggravated. In the follow-up control at 6 months, only 3 patients, who had shown complete clinical response, were present. Two patients (2/3, 67%; 2/7, 29%) showed healed lesions, and one showed recurrence. A grade 2 patient with complete clinical recovery of AK was not present for the follow-up control after 6 months because of his death from an unrelated internal disease to the cutaneous disorder.

In the group of patients with BCCs, a total of 21 patients, 18 with sBCC and 3 with nBCC, were treated. The tumors were located on the trunk, extremities, scalp and face. In the sBCC group, of the 5 patients (5/18, 28%) showing complete clinical recovery, only 2 (2/18, 11%) showed complete histological recovery. In 3 patients, who were considered to have recovered clinically, signs of lasting basal cell carcinoma were histologically detected. Seven patients (7/18, 39%) showed partial improvement of clinical findings following treatment while the treated tumours of 6 patients (6/18, 33%) failed to respond to PDT treatment with hypericin. At 3 months following PDT treatment, 15 patients appeared for follow-up monitoring; the remaining 3 patients were started on a new therapeutic modality. Clinical healing persisted in 4 patients (4/15, 27%; 4/18, 22%) while signs of persisting tumour were clinically found in the remaining 11 patients (11/15, 73%; 11/18, 61%). At 6 months following PDT treatment, only 7 patients appeared for follow-up monitoring, 4 of whom (4/7, 57%; 4/18, 22%) still showed clinical healing. The remaining 8 patients were started on a new therapeutic modality before the 6-month follow-up.

None of the patients in the nBCC group showed complete clinical recovery. In 2 cases (67%), however, there was an improvement of the clinical picture; a reduction of the tumour mass and a decrease of infiltration. All patients were started on a new treatment.

In the group of patients with Bowen's disease, 5 subjects in total were treated. Manifestation was localised on the scalp, face, trunk and extremities. Of the total number of afflicted patients, 2 (2/5, 40%) had complete clinical recovery. Histologically, 4 (4/5, 80%) recovered completely. In 2 subjects, whose clinical findings following treatment were evaluated as improved yet not recovered, there were no histological signs of carcinoma. At 3 months following PDT treatment, complete healing persisted in 2 patients (2/5, 40%). In these patients recovery still persisted after 6 months (2/5, 40%) (Fig. 4). Aggravation was noted in 2 patients with improvement findings following treatment at 3 months follow-up control after the cessation of PDT treatment.

Upon irradiation all patients complained of pain and burning sensations, which spontaneously disappeared within 24 hours of terminating the therapeutic session. No other serious negative side effects were reported.

The results are summarized in bar charts and tables (Fig. 5, 6 and 7; Table 2 and 3).

Discussion

The term “photodynamic reaction” was first coined by Hermann von Tappeiner in early 20th century. At that time it was already known that PDT treatment required the simultaneous presence of a photosensitizer, light and oxygen inside the diseased tissue. Today, PDT serves as an effective treatment modality for non-melanoma skin cancers and certain other dermatoses.¹¹ By all appearances, PDT treatment may also have a preventive effect on premalignant lesions in immunosuppressed patients.¹²

The first PDT drugs were topically applied dyes like eosin red or erythrosine. Today, for dermatological purposes, only haematoporphyrin derivatives or protoporphyrin IX-inducing precursors such as 5-aminolevulinic acid (ALA) or methyl aminolevulinate (MAL) are of practical concern.¹³

Concurrently, however, the weight of evidence in research is directing increasingly more attention to other possible photosensitizers. The main reasons for this are the high economic costs of photodynamic therapy, both from the aspect of photosensitizers as well as that of the quality of radiation devices of varying provenance. Therefore, there have been efforts to bring into practice other new photosensitizers, which are not only chemically different from those used most frequently (ALA, MAL) in current practice, but also financially more accessible.

Hypericin would be one such example. Its stability in different formulations was proved in several studies.^{14, 15}

In-vivo experiments with hypericin in cancer phototherapy were originally performed at the University of Nevada in 1990. Thomas and collaborators demonstrated that hypericin phototherapy can kill Mx1-mammary carcinoma cells in athymic mice.¹⁶ The first local use of hypericin as a photosensitizer in photodynamic therapy for skin metastases of a malignant mesothelioma of the tunica vaginalis testis was described in 1994 by Alth and Ebermann.¹⁷ In this case, treatment with superficially applied hypericin was combined with interstitial haematoporphyrin derivatives therapy.

In 1998 eight patients with squamous cell carcinoma and eleven patients with basal cell carcinoma were treated with intralesional injections of hypericin. In those cases, as well as in ours, hypericin displayed selective tumour-targeting (Fig. 8) and lower photobleaching when compared to ALA. Penetration in the surrounding tissues did not induce necrosis or cell loss. The effectiveness of the therapy depended on the concentration and total dose of hypericin and the frequency and duration of the therapy. The duration of therapy was from 2 to 6 weeks and was repeated 3 to 5 times per week.¹⁸

In our study, the average duration of the PDT treatment was 6 weeks, repeated once a week. In contradistinction we applied hypericin topically on the surface of treated lesions under occlusion for 2 hours.

Unlike ALA-PDT or MAL-PDT, hypericin therapy showed limited success in our study. This is interpreted as being due to the higher molecular weight of hypericin (504.44 Da) in comparison with the low molecular weight of 5-aminolevulinic acid (167.59 Da), which can cause a decreased penetration of hypericin in the skin tissue. For a drug to be delivered passively via the skin it is better to have a molecular weight <500 Da and also an adequate lipophilicity, which can be affected by a suitable vehicle.¹⁹

Various strategies have emerged over recent years to optimize skin delivery and they can be categorized into passive and active methods. The passive approach entails the optimization of formulation or drug carrying vehicle to increase skin permeability. Skin penetration enhancers as dimethylsulphoxide or carriers such as liposomes are used today. But in general, passive methods do not greatly improve the permeation of drugs with molecular weights >500 Da. In contrast active enhancement of drug delivery that normally involve physical (iontophoresis, electroporation) and mechanical methods (abrasion, ablation, perforation) or other energy-related techniques (ultrasound) has been shown to be generally superior.²⁰

The present study describes diagnoses where PDT treatment with locally applied hypericin is less successful in comparison with more often used photosensitizers. However, this does not diminish the fact that hypericin is still considered to be one of the most promising photosensitizers today, especially for superficial cancers. The effectiveness might be improved by higher concentration, light source with an emission designed for hypericin or a better vehicle to improve penetration. It seems that efficient penetration of hypericin or its derivatives into the skin and its delivery into pathological cells is a critical factor for therapy effectiveness.

Acknowledgement

This work was supported by the grant of the Czech Ministry of Health, IGA NR/7901-3. Authors are also very grateful for invaluable help with all aspects of the study to Professor Milan Jirsa (who passed away on December 7th, 2004) and we would like to devote this paper to his memory. We would like to thank Mr. Ladislav Trnka, Mrs. Anna Fliegerová and Mr. Martin Leba for their technical assistances and help.

References

1. Schempp CM, Lüdtke R, Winghofer B, Simon JC. Effect of topical application of *Hypericum perforatum* extract (St. John's wort) on skin sensitivity to solar simulated radiation. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2000; 16: 125-128.
2. Brockmann H, Haschad MN, Maier K, Pohl F. Über das Hypericin, den photodynamisch wirksamen Farbstoff aus *Hypericum perforatum*. *Naturwissenschaften* 1939; 32 (27): 550.
3. Brockmann H, Pohl F, Maier K, Haschad MN. Über das Hypericin, den photodynamischen Farbstoff des Johanniskrautes (*Hypericum perforatum*). *Annalen der Chemie* 1942; 553: 1-52.
4. Delaey E, Vandebogaerde A, Merlevede W, de Witte PA. Photocytotoxicity of hypericin in normoxic and hypoxic conditions. *Photochem Photobiol B: Biology* 2000; 56: 19-24.
5. Agostinis P, Vantieghem A, Merlevede W, de Witte PA. Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34: 221-241.
6. Seyed MA, Malini O, Ganyik Y, Khee CS. Induction of apoptosis by Hypericin through activation of caspase-3 in human carcinoma cells. *Int J Mol Med* 2001; 8: 521-530.

7. Cockerell CJ, Wharton JR. New histopathological classification of actinic keratosis (incipient intraepidermal squamous cell carcinoma). *J Drugs Dermatol* 2005; 4(4): 462-467.
8. Jürgenliemk G, Nahrstedt A. Dissolution, solubility and cooperativity of phenolic compounds from *Hypericum perforatum* L. in aqueous systems. *Pharmazie* 2003; 58 (3): 200-203.
9. Schmitt LA, Liu Y, Murphy PA, Petrich JW, Dixon PM, Birt DF. Reduction in hypericin-induced phototoxicity by *Hypericum perforatum* extracts and pure compounds. *J Photochem Photobiol B* 2006; 85(2): 118-130.
10. Mulinacci N, Bardazzi C, Romani A, Pinelli P, Vincieri FF, Constantini A. HPLC-DAD and TLC-Densitometry for Quantification of Hypericin in *Hypericum perforatum* L. Extracts. *Chromatographia* 1999; 49(3/4): 197-201.
11. Nestor MS, Gold MH, Kauvar AN, Taub AF, Geronemus RG et al. The use of photodynamic therapy in dermatology: results of a consensus conference. *JDrugs Dermatol.* 2006; 5 (2): 140-154.
12. Wulf HC, Pavel S, Stender I, Bakker-Wensveen A. Topical Photodynamic Therapy for Prevention of New Skin Lesions in Renal Transplant Recipients. *Acta Derm Venereol* 2006; 86: 25-28.
13. Szeimies RM, Dräger J, Abels C, Landthaler M. History of photodynamic therapy in dermatology. In: Calzavara-Pinton, P.G., Szeimies, R.M., Ortel, B, editors. *Photodynamic therapy and fluorescence diagnosis in dermatology*. Elsevier, Amsterdam, 2001: 3-16.
14. Huygens A, Kamuhabwa AR, de Witte PAM. Stability of different formulations and ion pairs of hypericin. *Eur J Pharm Biopharm* 2005; 59: 461-468.
15. Liu F, Pan Ch, Drumm P, Ang CYW. Liquid chromatography – mass spectrometry studies of St. John's wort methanol extraction: active constituents and their transformation. *J Pharm Biomed Anal*, 2005; 37: 303-312.
16. Thomas C, Pardini L, Pardini RS. Evaluation of a potential antineoplastic agent, hypericin, against MX-1 human mammary carcinoma. *3rd Biennial meeting of the International Photodynamic Association*, Buffalo, NY 1990, July 17-21.
17. Koren H, Schenk GM, Jindra RH, Alth G, Ebermann R, Kubin A et al. Hypericin in phototherapy. *Photochem Photobiol B: Biology* 1996; 36: 113-119.

18. Alecu M, Ursaciuc C, Halalau F, Coman G, Merlevede W, Waelkens E, de Witte PA. Photodynamic treatment of basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma with hypericin. *Anticancer Res* 1998; 18 (6B): 4651-4654.
19. Bos JD, Meinardi MMHM. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp Dermatol* 2000; 9: 165-169.
20. Brown MB, Martin GP, Jones SA, Akomeah FK. Dermal and transdermal drug delivery systems: current and future prospects. *Drug Deliv* 2006; 13(3): 175-187.
21. Szeimies RM, Morton CA, Sidoroff A, Braathen R. Photodynamic therapy for non-melanoma skin cancer. *Acta Derm Venereol* 2005; 85: 483-490.

Legends:

Fig. 1: The chemical structures of hypericin and pseudohypericin. Hypericin (MF: $C_{30}H_{16}O_8$) R = $-CH_3$. Pseudohypericin (MF: $C_{30}H_{16}O_9$) R = $-CH_2OH$.

Fig. 2: The emission spectrum of the lamp and absorption spectrum of hypericin (10 μ g/ml) in methanol and our product 1:160 in methanol.

Fig. 3: Absorption spectrum of hypericin and chlorophyll degradation products (the main color components in our product) after separation by TLC and extraction with methanol.

Fig. 4: Bowen's disease: (a) Clinical finding before HYP-PDT treatment; (b) Clinical finding after HYP-PDT treatment; (c) Histological finding before HYP-PDT treatment; (d) Histological finding after HYP-PDT treatment.

Fig. 5: Clinical response to HYP-PDT treatment in patients with actinic keratosis, superficial and nodular basal cell carcinomas, Bowen's diseases.

Fig. 6: Histological response to HYP-PDT treatment in patients with superficial and nodular basal cell carcinomas, Bowen's diseases.

Fig. 7: Percentage of clinically cleared lesions after HYP-PDT treatment, at 3 and 6-month follow-up.

Fig. 8: Fluorescence of superficial basal cell carcinoma during photodynamic diagnostic (in 2 hrs after a local application of hypericin).

Table 1: Patient demographics

Table 2: Summary of clinical and histological lesion responses to HYP-PDT, at 3 and 6 month follow-up

Table 3: Lesion recurrence at 3 and 6 months after HYP-PDT

Table 1 Patient demographics

	Actinic keratosis	Basal cell carcinoma	Bowen´s disease	Total
No. (N)	N=8 (23%)	N=21 (62%)	N=5 (15%)	N=34 (100%)
Gender:				
Male	5	12	3	20 (59%)
Female	3	9	2	14 (41%)
Race				
Caucasian	8 (24%)	21 (62%)	5 (15%)	34 (100%)
Age (year)				
Mean \pm SD	75.0 \pm 6.72	66.0 \pm 13.35	67.2 \pm 7.32	
Median	74.5	71	67	
Min-Max	63-83	32-82	57-76	
Lesion location				
Face	3	3	1	7 (21%)
Scalp	5	1	1	7 (21%)
Trunk	0	15	1	16 (47%)
Upper extr.	0	2	1	3 (9%)
Lower extr.	0	0	1	1 (3%)

Skin type II or III on the Fitzpatrick scale in all patients

Table 2 Summary of clinical and histological lesion responses to HYP-PDT, at 3 and 6 month follow-up

	Percentage of cleared lesions:		
	after HYP-PDT	3-month follow-up	6-month follow-up
AKs – clinical response			
- complete	50% (4/8)	50% (4/8)	29% (2/7)*
- partial	50% (4/8)	-	-
- no response	-	-	-
sBCC – clinical response			
- complete	28% (5/18)	22% (4/18)	22% (4/18)
- partial	39% (7/18)	-	-
- no response	33% (6/18)	-	-
sBCC – histological response			
- complete	11% (2/18)	-	-
- incomplete	89% (16/18)	-	-
nBCC – clinical response			
- complete	-	-	-
- partial	67% (2/3)	-	-
- no response	33% (1/3)	-	-
nBCC – histological response			
- complete	-	-	-
- incomplete	100% (3/3)	-	-
BD – clinical response			
- complete	40% (2/5)	40% (2/5)	40% (2/5)
- partial	60% (3/5)	40% (1/5)	-
- no response	-	-	-
BD – histological response			
- complete	80% (4/5)	-	-
- incomplete	20% (1/5)	-	-

AKs, actinic keratoses; sBCC, superficial basal cell carcinoma; nBCC, nodular basal cell carcinoma; BD, Bowen's disease; PDT, photodynamic therapy; HYP, hypericin.

* one patient was excluded from the study because of his death from an unrelated internal disease to the cutaneous disorder.

Table 3 Lesion recurrence at 3 and 6 months after HYP-PDT

	Complete clinical recovery after PDT	Recurrences at 3-month follow-up	Recurrences at 6-month follow-up
AKs	4/8 (50%)	0/4	1/3*
sBCC	5/18 (28%)	1/5	0/4
nBCC	0/3 (0%)	0/0	0/0
BD	2/5 (40%)	0/2	0/2

AKs, actinic keratoses; sBCC, superficial basal cell carcinoma; nBCC, nodular basal cell carcinoma; BD, Bowen's disease; PDT, photodynamic therapy; HYP, hypericin.

* one patient was excluded from the study because of his death from an unrelated internal disease to the cutaneous disorder.

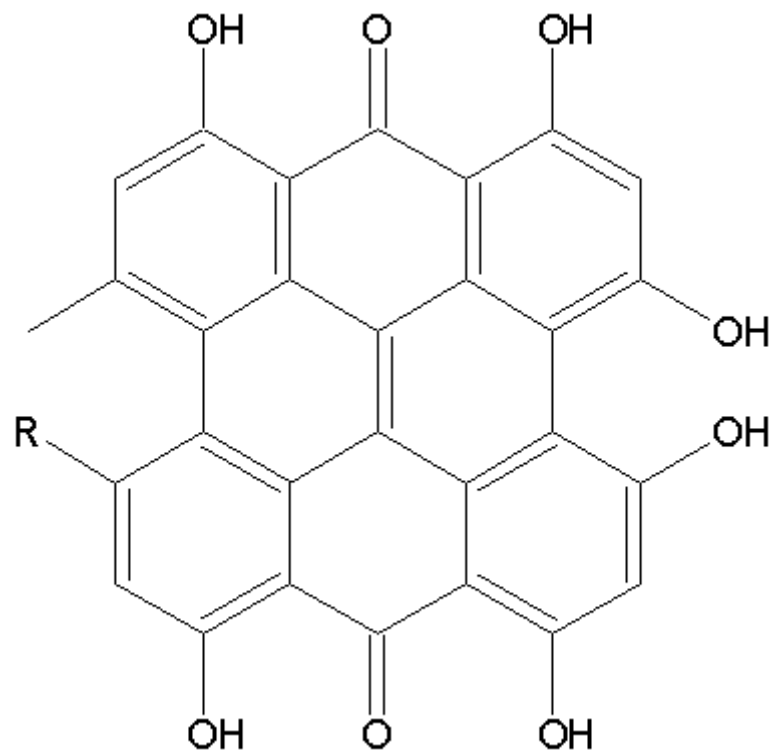


Fig. 1

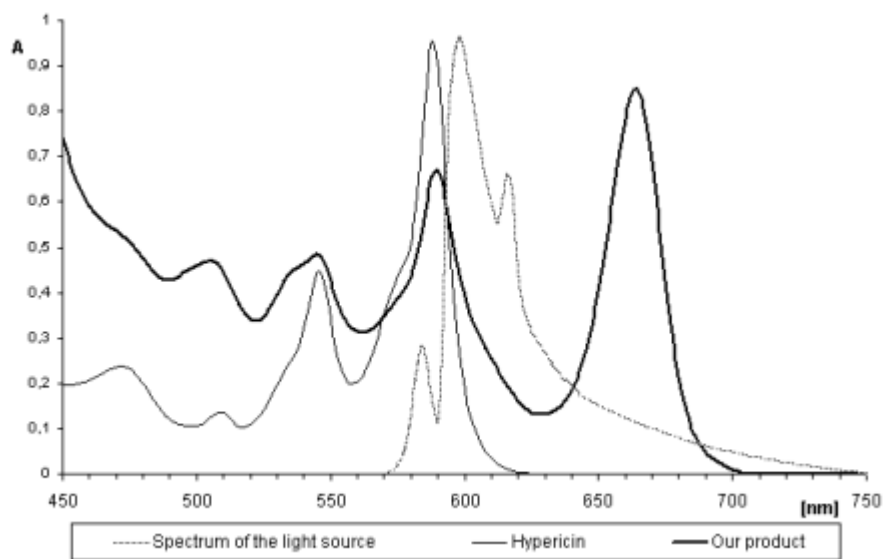


Fig. 2

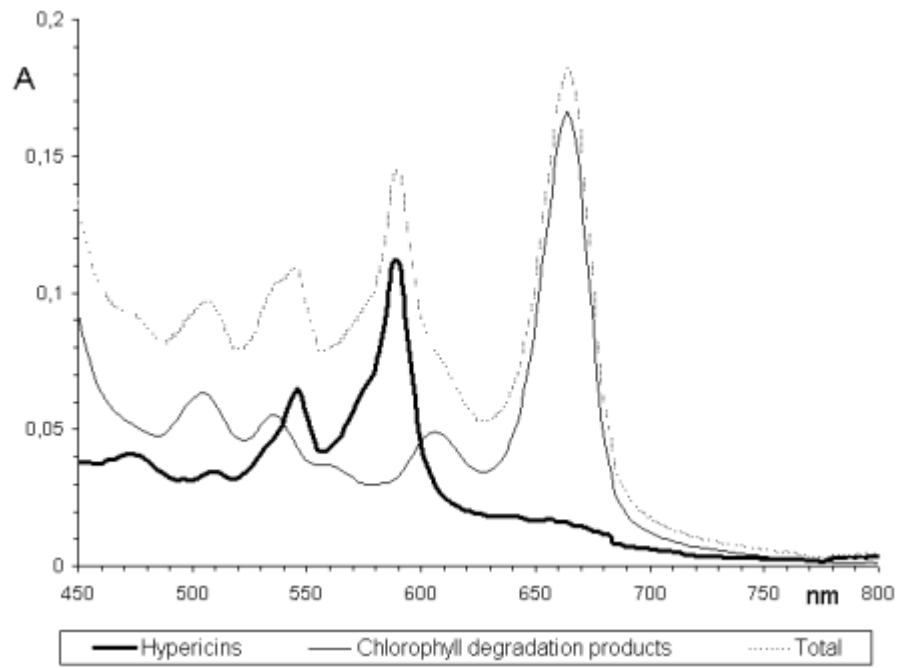


Fig. 3

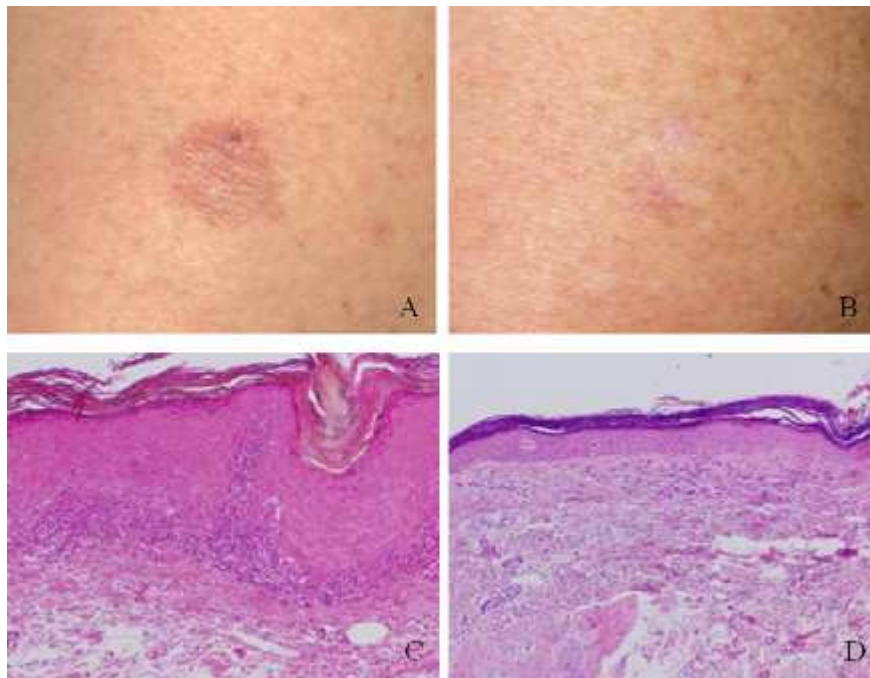


Fig. 4

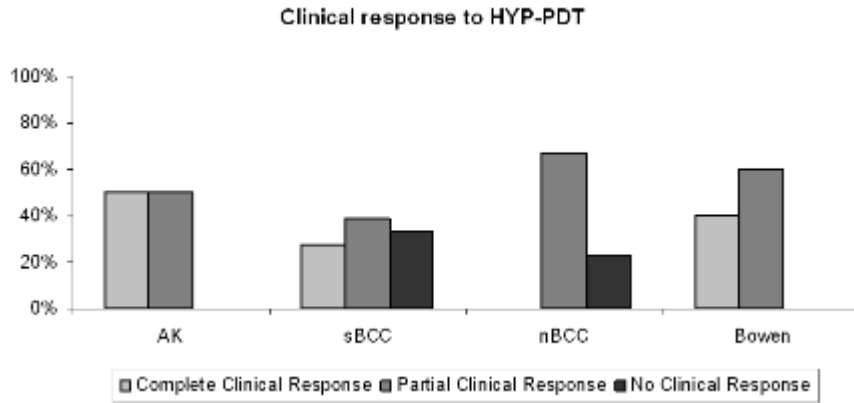


Fig. 5

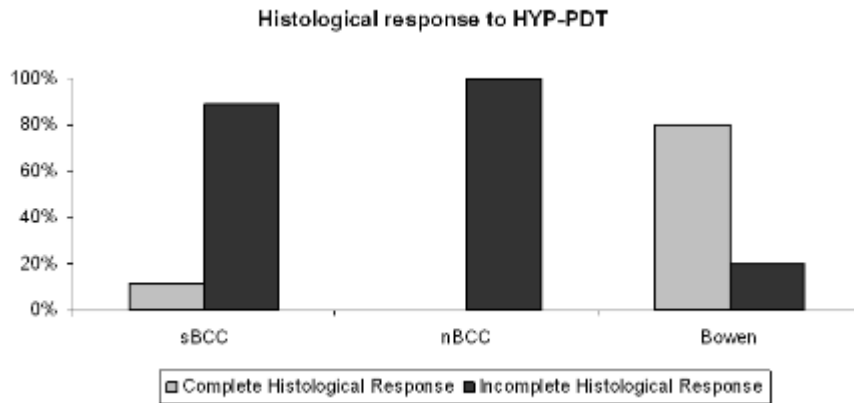


Fig. 6

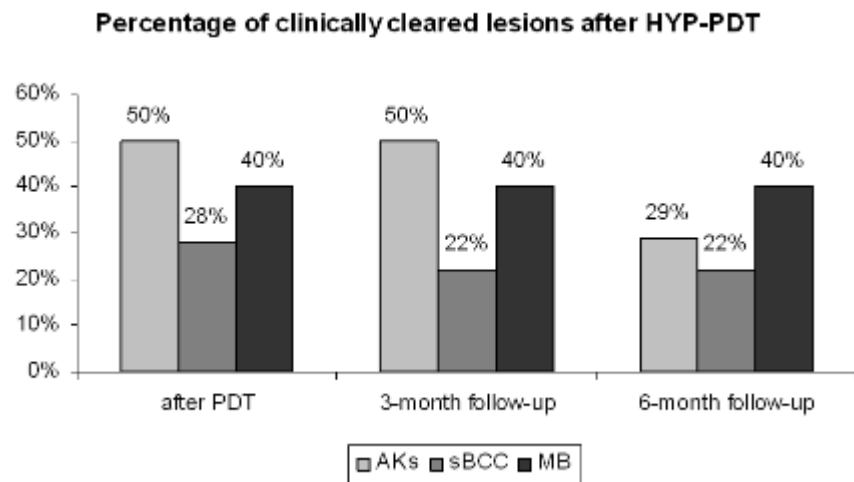


Fig. 7



Fig. 8

