

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**



**PREKLINICKÉ STANOVENÍ ÚČINNOSTI  
FTALOCYANINU PRO  
FOTODYNAMICKOU TERAPII TUMORŮ  
REKTA**

**MUDR. JAN ŠTUKAVEC**

**Dizertační práce**

*Praha 2009*

## **Doktorské studijní programy v biomedicíně**

*Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky*

**Obor:** experimentální chirurgie

**Předseda oborové rady:** Prof. MUDr. Jaroslav Živný, DrSc.

**Školící pracoviště:** Chirurgická klinika, 3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze

**Autor:** MUDr. Jan Štukavec

**Školitel:** Doc. MUDr. Ladislav Horák, DrSc.

**Oponenti:** Prof. MUDr. RNDr. Jiří Beneš, CSc.

Prof. MUDr. Petr Dítě, DrSc.

Prof. Ing. Helena Jelínková, DrSc.

Chtěl bych poděkovat všem spolupracovníkům za jejich zájem a pomoc při řešení výzkumných problémů. Jmenovitě Doc. MUDr. Ladislavu Horákovi, DrSc., Doc. RNDr. Pavle Poučkové, CSc., Prof. MUDr. Josefu Štinglovi, CSc. a MUDr. Tomáši Jiráskovi, Ph.D. Tato práce byla řešena za finanční podpory Ligy proti rakovině, Praha.

## Obsah

Cíl dizertační práce	5
1. Úvod	6
1.1. Historie fotodynamické terapie	9
1.2 Světelné zdroje	17
1.2.1 Světlovodné technologie	20
1.2.2 Dozimetrie a fluorescence	21
1.3 Mechanismus účinku PDT	23
1.3.1 Účinek na buněčné úrovni	23
1.3.2. Reakce na tkáňové úrovni	25
1.3.3 Další směry výzkumu fotodynamické terapie	26
1.4. Kolorektální karcinom	29
1.4.1 Incidence kolorektálního karcinomu	29
1.4.2 Terapie kolorektálního karcinomu	29
1.5 Výběr zvířecího modelu	34
2. Hypotézy a cíle práce	36
3. Materiál a metodika	38
3.1. Fotosenzitizéry použité v experimentu	38
3.2. Atymické myši	38
3.3. Kolorektální karcinom	38
3.4. Fotodynamická terapie	39
3.5. Histologické zpracování	44
4. Výsledky	47
5. Diskuse	49
6. Závěry	54
7. Seznam literatury	57
8. Přílohy	63

## CÍL DIZERTAČNÍ PRÁCE

Předkládaná dizertační práce zahrnuje výsledky výzkumu fotodynamické terapie (PDT) kolorektálního karcinomu. Vlastní experiment probíhal ve spolupráci s Ústavem biofyziky a informatiky 1. lékařské fakulty v letech 2005-2008. Kolorektální karcinom patří mezi nejčastější malignity české populace. Riziko onemocnění kolorektálním karcinomem nyní dosahuje u české populace 5,9 % a stále narůstá. Stále početná je i skupina pacientů s pokročilým nádorem (přibližně 30% nemocných), kdy je indikována pouze terapie paliativní. V dnešní době je jedním z nejčastějších postupů u nemocných s pokročilým nádorem založení stomie, což výrazně zasahuje do života nemocného. Fotodynamická terapie je již standardně používanou metodou, která je schválena k léčbě maligních i benigních onemocnění v mnoha zemích světa včetně Evropské unie. Prvním krokem v PDT je podání fotosenzitizéru, látky, která se selektivně vychytává v nádoru a následné ozáření světlem o určené vlnové délce. Výsledkem je cílená nekróza tumoru s minimálním ovlivněním okolních tkání a orgánů. Experimentální PDT kolorektální rakoviny je v literatuře popisována výjimečně. Přitom dobrá dostupnost světelného zdroje pomocí koloskopu tuto metodu výrazně zjednodušuje. Zaměřili jsme se na možnost terapie kolorektální rakoviny ftalocyaninem, který patří mezi fotosenzitizéry druhé generace s rychlým vychytáváním preparátu v nádoru. Vlastní experiment byl proveden na atymických myších, které byly rozděleny do 4 skupin. První skupina byla léčena disulfonovaným hydroxyhlinitým ftalocyaninem, druhá skupina fotofrinem, který je jedním z nejrozšířenějších fotosenzitizérů, a další dvě skupiny byly kontrolní. Obě skupiny byly ozářeny xenonovou lampou s filtrem o vlnové délce 600-700 nm. Další dvě skupiny byly kontrolní. Jedna dávka ftalocyaninu vedla k nekróze nádoru v 87 % případů. Léčba fotofrinem vedla k nekróze u 62 % myší. Cílem současného výzkumu je zlepšení screeningu a navržení nových způsobů léčby, které by dosahovaly lepších výsledků než stávající postupy. PDT může zlepšit kvalitu života i u nemocných s pokročilým maligním onemocněním a prodloužit interval přežití. Cílem naší práce je nabídnout nemocným další možnost léčby kolorektálního karcinomu.

## 1. ÚVOD

Fotodynamická terapie je vedle chemoterapie, radioterapie a imunoterapie jednou ze standardních možností léčby nádorového onemocnění. V dnešní době je fotodynamická léčba již standardně používanou léčebnou metodou k terapii rozličných benigních i maligních chorob. Fotodynamická léčba vyžaduje podání fotosenzitizéru, který se selektivně vychytává v nádoru, a následné ozáření světlem o dané vlnové délce.<sup>1,2,3,4,5</sup> Při dostatečné hladině molekulárního kyslíku dochází po ozáření fotosenzitizéru k řadě chemických reakcí, které vedou k destrukci makromolekul, především membránových lipidů a proteinů.<sup>6,7</sup> Ideální fotosenzitizér by měl být stabilní látkou o známé chemické struktuře s vysokou selektivitou k nádoru. Vlivem absorpce světla dochází ve fotosenzitizátoru ke vzniku excitovaných stavů, které v zásadě podléhají dvěma typům deaktivčních reakcí. Buď excitovaná forma fotosenzitizátoru reaguje přímo s buněčnými strukturami nebo dochází k transferu energie z fotosenzitizátoru na kyslík a ke vzniku vysoce reaktivní singletové formy kyslíku. Volné radikály, zvláště pak radikály lipidických složek buněčných membrán vedou k destrukci nádoru. Výsledným terapeutickým efektem je nekróza a (nebo) apoptóza nádorových buněk.<sup>1,3,8</sup> Reakce PDT in vivo je poměrně rychlá. Po ozáření dochází ke vzniku nekrózy již za 24 - 48 hodin. V některých případech, nejčastěji v období 1 - 2 týdnů po PDT, začne nádor opět růst. Nárůst tumoru může být způsoben rezistencí nádorových buněk na PDT a to z různých důvodů, např. hypoxie, nedostatečná akumulace fotosenzitizátoru v tumoru, nedostatečná koncentrace světelné energie v ozařované oblasti nebo kombinace výše uvedených důvodů.<sup>2,9,10</sup>

Výběr vhodného světelného zdroje je určován dvěma základními faktory: absorpčním spektrem fotosenzitizéru a hloubkou průniku světla do tkáně. Vlnové délky používaného světla v PDT se nachází mezi 600 a 900 nm. Kratší vlnové délky jsou pohlcovány endogenními barvivy, hlavně hemoglobinem, delší vlnové délky nemají dostatečnou energii potřebnou k aktivaci fotosenzitizérů.<sup>1,2,5,11,12</sup> Na průnik světla do tkáně má rozhodující vliv odraz světla, rozptyl, přenos, absorpce a

kombinace jednotlivých parametrů. Pronikání světla do tkáně rozhodujícím způsobem ovlivňuje vlnová délka. Delší vlnové délky pronikají hlouběji do tkáně, hloubka penetrace se pohybuje mezi 3 až 8 mm při vlnové délce 630 až 800 nm. Úspěšná PDT byla popsána i u nádorů šíře 10 mm, zde se předpokládají další vlivy na destrukci tumoru jako zvýšená imunitní odpověď a omezení krevního průtoku tumorem. Jako zdroje světla se pro PDT dříve používaly širokospektrální, speciálně upravené lampy s barevnými, popřípadě tepelnými filtry. Při jejich užití se nedosahovalo dostatečných příkonů zářivé energie v nádoru a docházelo též k ozáření okolních zdravých tkání. Proto se nyní používají lasery, které jsou zdrojem monochromatického, koherentního, lineárně polarizovaného a intenzivního světelného svazku s nastavitelným výkonem.  
3,13,14

V roce 1976 byla poprvé použita fotodynamická léčba s fotofrinem u pacienta s inoperabilním karcinomem močového měchýře, kdy byl celý měchýř ozářen transuretrálně zavedeným světelným zdrojem. V dnešní době se indikace PDT rozděluje na tři hlavní skupiny: onkologii, oftalmologii a dermatologii. V onkologii byl nejprve léčen bronchogenní karcinom v pokročilém a později v časném stádiu onemocnění. Světelný zdroj byl přiveden bronchoskopem a postižená oblast byla ozářena. Dalším karcinomem s dobrou odezvou na PDT je karcinom jícnu.<sup>14,15,16</sup> Ve studii s fotofrinem došlo ke zmenšení nádoru u 94 % nemocných a 76 % pacientů udává zlepšení polykacích obtíží. PDT byla následně použita k léčbě Barrettova jícnu s vysokým stupněm dysplázie jako alternativa mukosektomie či resekce. Dobrých výsledků je také dosahováno ve studiích v léčbě tumorů dutiny ústní, laryngu a faryngu. Cílem je vyhnout se obvykle mutilujícím operačním výkonům. Deriváty fotofrinu jsou dále zkoušeny v terapii astrocytomů a glioblastomů. V roce 2006 proběhla studie, kdy byla PDT kombinována s klasickým operačním postupem u primárních a recidivujících nádorů mozku. Tumor byl neurochirurgicky odstraněn a zbytková dutina byla po podání fotosenzitizéru ozářena. Výsledkem bylo delší přežívání a nižší procento recidiv. V stádiu klinických zkoušek byla i léčba mesoteliomu a diseminovaných tumorů vaječnicků. Problémem je však dostatečné ozáření pleurální či peritoneální dutiny. V očním lékařství se PDT používá k terapii makulární

degenerace (její exsudativní formy), která je nejčastější příčinou slepoty ve vyspělých zemích. Při tomto onemocnění dochází k novotvorbě cév, které vedou k výpadku v centrální části zorného pole. Po podání fotosenzitizéru se ozařuje plocha v průměru 3 milimetrů, dochází k destrukci endotelu cév a tím k jejich nekróze. Používaným fotosenzitizérem je verteporfin ze skupiny chlorinů. Tato metoda je zcela běžná a bylo jí léčeno již několik miliónů nemocných. Pravděpodobně nejvíce využívána je PDT v dermatologii.<sup>17,18</sup> Snadný přístup a lokální aplikace vedla k rozšíření indikací a využití v klinické medicíně. Nejvíce zastoupeným fotosenzitizérem je aminolevulonová kyselina a její metylester. Mezi hlavní indikace patří solární akantóza a bazocelulární karcinom. Nižší účinnost je u spinocelulárního karcinomu, Bowenovy choroby (skvamózní karcinom in situ) a melanomu, kde je hlavním problémem penetrace světla. Všechny výše uvedené indikace jsou schváleny ke klinickému použití v Evropě a mnoha jiných zemích světa.<sup>11,19,20,21</sup>

V minulých letech se výzkum PDT také zaměřil na její použití v terapii lokálních bakteriálních a virových infekcí. Jsou používány odlišné fotosenzitizéry, než jaké se používají v onkologické léčbě. PDT s metylénovou modří je schválena k léčbě periodontitidy v Kanadě. Fotosenzitizér je používán ve formě gelu, aplikován na postižené místo a následně ozářen. Dále je PDT používána například v léčbě fokálních infekcí v oblasti dutiny ústní, infikovaných ran či chronických diabetických vředů. PDT má účinek i na mykotické nebo virové infekce. PDT byla úspěšně použita k sterilizaci krevních derivátů infikovaných virem HIV a hepatitidou. Tato technologie však dosahuje takové finanční náročnosti, že ji nelze zatím používat v klinické medicíně. Využití PDT v terapii infekčních nemocí by mohlo pomoci v terapii rezistencí bakteriálních kmenů.



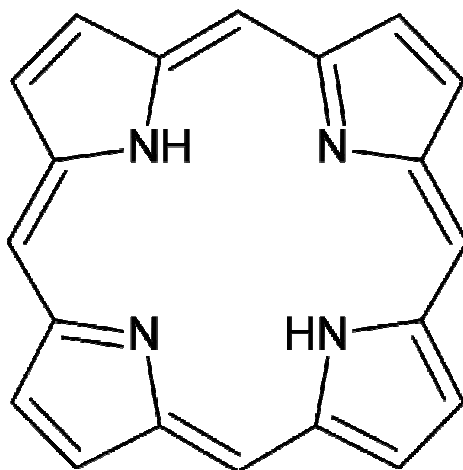
## 1.2 Historie fotodynamické terapie

Historie fotodynamické terapie je poměrně dlouhá. Již Řekové a Číňané popisovali hojivé účinky slunečního světla a Herodotus je označován za otce tzv. helioterapie. V roce 1900 německý student Otto Raab zjistil, že světlo má letální účinek na nálevníky - trepky (paramecia), když do vody, ve které trepky byly, přidal akridinovou modř. Jednalo se o náhodné zjištění, neboť Petriho misku zapomněl na okenním parapetu. Je to pravděpodobně první zmínka o využití fotoreakcí v biologických systémech.<sup>2,3,5</sup> Pro léčení nádorů byly fotosensitizátory poprvé použity v roce 1903 Tappeinerem a Jesionekem.<sup>22</sup> Jednalo se o kožní nádory (spinocelulární karcinom, bazaliom, lupus a condylomata lata ženských genitálií). Jako fotosensitizátor byl použit eosin. V roce 1904 Tappeiner prokázal, že pro úspěšnou terapii je nezbytná přítomnost kyslíku a jako první použil pojem „fotodynamický efekt“. O fotodynamiku se ve své době zajímali i Paul Ehrlich a Louis Pasteur.

Porfyrin byl objeven v roce 1871. Pozornost mu však byla věnována až v roce 1912, kdy Meyer – Betz vyzkoušel porfyrin sám na sobě. (Obr. č. 1) V následujících letech pak Meyer – Betz publikoval mnoho prací o využití fotodynamiky. V roce 1924 byla pozorována fluorescence endogenních porfyrinů v sarkomech laboratorních zvířat a v lidských nádorech a to u nemocných operovaných pro karcinom prsu a u řady dalších povrchově lokalizovaných nádorů. Za výzkum porfyrinů v roce 1925 získal H. Fischer Nobelovu cenu. Teprve v roce 1942 byl hematoporfyrin aplikován potkanům a zjistilo se, že se hromadí v transplantovaných tkáních, nádorech, metastázách a částečně i v lymfatických uzlinách. Následně bylo potvrzeno, že se hematoporfyrin hromadí nejen v nádorové tkáni a lymfatických uzlinách, ale i v embryonální a regenerující tkáni hlodavců. V roce 1945 byla poprvé popsána fotosenzitivita kůže po podání porfyrinů. O 12 let později byly připraveny z hematoporfyrinu hematoporfyrinové deriváty (HpD). Při dalších pokusech na potkanech a myších (rhabdomyosarkom, karcinom mléčné žlázy u myší, Walkerův karcinosarkom u potkanů) se zjistilo, že HpD se akumuluje lépe v nádorové tkáni než „hrubý hematoporfyrin“. <sup>23,24</sup> První porfyrinový preparát byl zaregistrován pod

firemním názvem Photofrin® v roce 1983 a schválen pro použití v klinické medicíně v roce 1993 v Kanadě. Vlastní fotosenzitizér je směs monomerů, dimerů a oligomerů vzniklých derivací z hematoporfyrinu. Ve Spojených státech amerických je schválen k terapii Barrettova jícnu, tumorů jícnu a močového měchýře.

Obr. č. 1 Molekula porfyrinu



V současnosti jsou hematoporfyrinové deriváty pod různými firemními názvy již schváleny pro klinické použití v terapii tumorů jícnu, endobronchiálních tumorů, nádorů močového měchýře a mozku, stejně tak kožních onemocnění, včetně Kaposiho sarkomu. Dávkování fotofrinu je 2,5 mg/kg a interval mezi podáním preparátu a ozářením je 48 hodin. Nevýhodou těchto fotosenzitizátorů první generace je, že se jedná o ne zcela přesně definované látky, které po intravenózní aplikaci vyvolávají kožní fotosenzitivitu po solárním ozáření, která může trvat 4-6 týdnů po aplikaci látky. Pacienti nesmí být vystavováni přímému slunečnímu svitu, rozptýlené denní světlo v místnosti obvykle fotosenzitivitu nevyvolává. Přesto HpD jsou pod firemními názvy - Photofrin® (USA), Photocarcinorin® (Čína), Photosan® (Německo), Photogem® (Rusko), Haematodrex® (Bulharsko) používány dodnes.<sup>25,26,27</sup>

Optimální fotosenzitizér musí splňovat následující předpoklady:

a) fyzikální – maximální absorpce vlnových délek 700-850 nm pro maximální penetraci do tkáně.

b) fotochemické – produkovat dostatečné množství signetového kyslíku, mít dostatečnou fluorescenci pro spektroskopii. Být dostatečně stabilní, aby výsledek terapie neovlivňoval photobleaching (ztráta fotodynamické účinnosti fotosenzitizéru).

c) chemické – vysoce stabilní, levné, se snadným procesem syntézy a výroby. Rozpustné ve vodě pro intravenózní podání nebo v tucích pro formu gelů a mastí.

d) biologické – minimální fytotoxicita, dobrá farmakokinetika.

Souběžně se studiem hematoporfyrinových derivátů byl syntetizován meso-tetra-(4-sulfonatofenyl)-porfin (TPPS<sub>4</sub>), který byl po chemické stránce přesně definovanou látkou, která byla v roztoku stabilní a dobře rozpustná.<sup>24</sup> Sledována byla distribuce TPPS<sub>4</sub> do Walkerova karcinosarkomu a ostatních orgánů u potkanů. Nalezla se nejvyšší koncentraci TPPS<sub>4</sub> v nádoru, v ostatních orgánech a tkáních byla koncentrace nižší. Důležité bylo, že koncentrace TPPS<sub>4</sub> v nádoru byla vyšší než koncentrace HpD.

V následujících letech se sice potvrdili výsledky o akumulaci TPPS<sub>4</sub> do nádorů ve srovnání s HpD, ale našla se také zvýšená koncentrace TPPS<sub>4</sub> v ledvinách. Druhým problémem, ještě složitějším, byla otázka neurotoxicity. Srovnával se vliv těchto látek na rychlost vodivosti motorických nervů a na jejich morfológické změny. Zjistilo se, že jak podání HpD, tak i TPPS<sub>4</sub> v uvedených dávkách vyvolá snížení rychlosti vodivosti motorických nervů. V případě HpD se tyto změny vrátí k normálním hodnotám asi za 3 týdny. V případě TPPS<sub>4</sub> nebyl návrat k normálu zjištěn ani za 60 dní po jeho aplikaci myším. Na základě morfológických studií byly po aplikaci TPPS<sub>4</sub> myším zjištěny strukturální abnormality motorických nervů, které nebyly pozorovány po podání HpD.<sup>24,28,29</sup> Vzhledem k uvedeným problémům se od klinického využití TPPS<sub>4</sub> upustilo. (Tab. č. 1)

**Tabulka č. 1      Dělení fotosenzitizérů**

<b>Porfyriny</b>	<b>Porfyrin, hematoporfyrin</b> <b>5-aminolevulonová kyselina</b> <b>Benzoporfyrinové preparáty</b> <b>Texafyriny</b>
<b>Chlorofylové deriváty</b>	<b>Chloriny</b> <b>Purpuriny</b> <b>Bakteriochloriny</b>
<b>Barviva</b>	<b>Ftalocyaniny</b> <b>Naftalocyaniny</b>

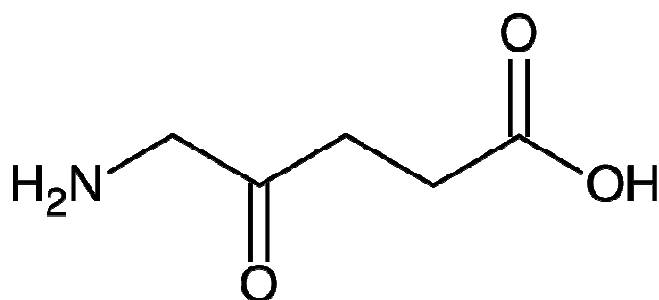
Hlavním zástupcem benzoporfyrinových derivátů je verteporfin. Je aktivován světlem o vlnové délce 690 nm, rychle se kumuluje v nádoru a má rychlou clearance, takže fotosenzitivita je minimální. Verteporfin dominantně působí na cévní zásobení nádoru, proto je jeho nástup účinku poměrně rychlý a je výhodný u nádorů s bohatou neovaskularizací. V klinické medicíně s verteporfin používá k terapii makulární degenerace. 80 % nemocných udává zlepšení stavu po jediném cyklu terapie. Vzhledem k recidivám se doporučuje PDT opakovat v tříměsíčním intervalu. Využívá se také k terapii chorioretinopathie. Vertoporfirin byl vyzkoušen s dobrým efektem i v terapii maligního melanomu sítnice.

Texafyriny patří do skupiny plně syntetických porfyrinů. Jsou základem kontrastních látek pro magnetickou rezonanci ve sloučeninách s gadoliniem. V PDT se využívají texafyriny v kombinaci s gadoliniem nebo luteciem. Byly použity v léčbě kožních a cévních chorob. Dobře se váží na lipoproteiny, takže byly vyzkoušeny i v terapii aterosklerózy. V ostatních cévních indikacích se jedná o fotosenzitizér s vysokou afinitou k endotelu, takže dosahuje dobrých výsledků u neovaskularizačních procesů jako je makulární degenerace. Texafyriny jsou aktivovány světlem o vlnové délce 730 nm, což zajišťuje hluboký průnik světla do tkáně a současně nedochází k pohlcování

světla v cévním řečišti hemoglobinem. Vzhledem k rychlému vylučování z organismu u nich fotosenzitivita nebyla prokázána.

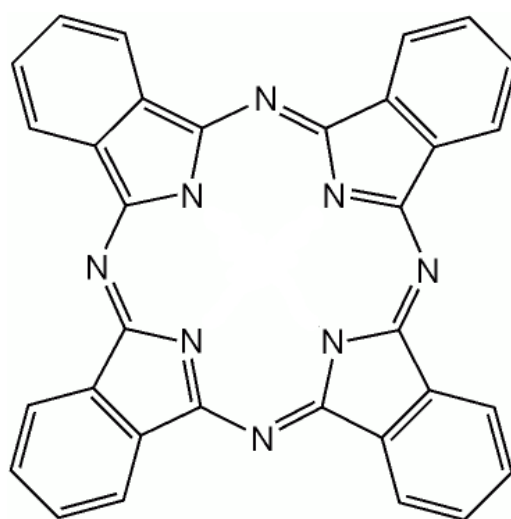
5-aminolevulonová kyselina (ALA) je prekursorem protoporfyrinu, který je syntetizován v mitochondriích. Vzniká syntézou glycinu a sukcinylkoenzymu A. Buňky s vysokým metabolickým obratem produkují v mitochondriích protoporfyrin ve zvýšené míře. Je hlavním zástupcem preparátů používaných k lokální aplikaci. Indikace k systémovému podávání jsou velmi omezené. ALA je aktivován světlem o vlnové délce 635 nm. Vzhledem k nízké aktivitě ALA je třeba použít vysokoenergetické zdroje nebo delší čas ozáření. Interval mezi aplikací a ozářením je 4 hodiny. ALA byla schválena k léčbě solární akantózy v roce 2000 ve Spojených státech amerických a její metylester (Metvix®) ve stejné indikaci v Evropě.<sup>30,31</sup> Vzhledem k výbornému kosmetickému efektu se dá předpokládat stále častější používání. Ozařuje se modrým spektrem světla. Jedná se pravděpodobně o nejčastější indikaci PDT v klinické praxi. Dále se používá v lokální léčbě dalších kožních nemocí, bazocelulárního a spinocelulárního karcinomu. U kožních nádorů je jedna aplikace PDT dostačující na tumory do 1 cm v průměru. U větších nádorů je potřeba PDT opakovat nebo použít ozáření v kombinaci se zavedením světlovaného vlákna do tumoru. Nevýhodou může být někdy bolestivost a tudíž nutnost použití anestetika. Benzylester je schválen k paliativní léčbě gastrointestinálních nádorů. ALA byla také použita s dobrým efektem v terapii papilárního karcinomu močového měchýře. Roztok s ALA byl instalován do měchýře a následně ozářen. Další z indikací je leukoplakie dutiny ústní.

Obr. č. 2 Molekula 5 aminolevulonové kyseliny



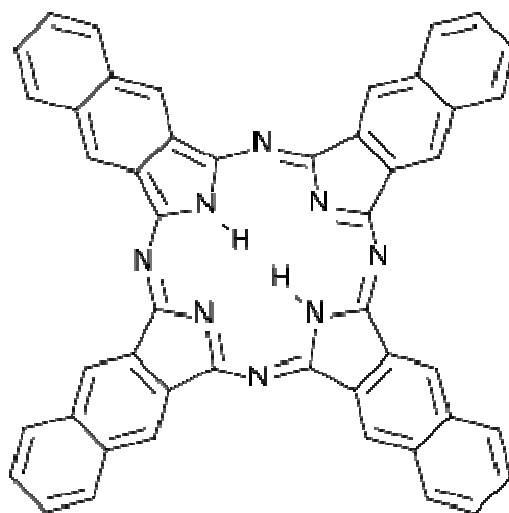
Ftalocyaniny a naftalocyaniny patří do skupiny fotosenzitizérů ze skupiny barviv. Ftalocyaniny jsou látky známé již více než 90 let. Jejich hlavní použití bylo v metalurgickém a chemickém průmyslu, kde se používaly jako barviva. Později došlo k rozšíření jejich použití v textilním a papírenském průmyslu. V posledních letech se využití ftalocyaninů přesunulo do sofistikovaných technologických aplikací. Denně se s nimi setkáváme na záznamové straně kompaktních disků, nebo v laserových tiskárnách. Jedná se o symetrické cyklické sloučeniny, kde se do jejich centrálního kruhu vážou kovové prvky nebo vodík. Na centrální atom se pak mohou vázat další ligandy. Jejich použití v PDT je otázkou posledních 30 let. Jedná se o hydrofobní látky, které se mohou aplikovat ve formě liposomálních preparátů – např. zinečnatý ftalocyanin. Sulfonací ftalocyaninů pak vznikají fotosenzitizátory, které jsou více hydrofilní a tím použitelné pro intravenózní podávání. Syntézou s kovy – zinkem, hliníkem a křemíkem se zvyšuje fotodynamický efekt ftalocyaninů.<sup>9,32-36</sup> Jsou to syntetické látky s absorpčním maximem 675 - 700 nm, které absorbují světlo v červené oblasti spektra. Jejich obrovskou výhodou proti všem ostatním fotosenzitizérům je rychlá absorpce v tumoru, kde dostatečné hladiny pro účinnou PDT je dosaženo po minutách. Hlinitý sulfonovaný ftalocyanin (Photosen ®) registrovaný v Rusku je schválen k terapii kožních a endobronchiálních nádorů.

Obr. č. 3 Molekula ftalocyaninu



Naftalocyaniny jsou odvozeny od ftalocyaninů. Naftalocyaniny patří mezi preparáty s vysokou selektivitou k tumorózní tkáni, s pomalým vylučováním z tumoru, s nulovou fotosenzitivitou a s výrazným fotodynamickým efektem na různé nádory. Nejlepších účinků dosahuje hlinitý naftalocyanin v terapii maligního melanomu. (Obr. č. 4)

Obr. č. 4 Molekula naftalocyaninu



Další velkou skupinou fotosensitizerů II. generace jsou chloriny (degradační produkty chlorofylu, které absorbují světlo o vlnových délkách 640 - 700 nm). Hlavním zástupcem je temoporfin (Foscan®), který je schválen v klinické medicíně v terapii kožních onemocnění, nádorů hlavy a krku, jícnu a endobronchiálních nádorů. Interval mezi ozářením a aplikací je 4 dny a vlnová délka laseru je 660 nm. Temoporfin patří mezi fotosenzitizery s nejnižší energií potřebnou k aktivaci, dostačuje pouze 20 J/cm<sup>2</sup>, takže doba ozáření je také nejkratší. Jeho nevýhodou je fotosenzitivita. Proto je potřebné v průběhu ozařování zakrýt části těla, které nemají být ozářeny. Další zástupce této skupiny je aspartyl-derivát chlorinu e6 (Npe6), který je ve vodě rozpustný a nevyvolává kožní fotosenzitivitu. Využívá se k terapii kožních onemocnění a nejlepších výsledků dosahuje v terapii makulární degenerace. Interval mezi podáním látky a ozářením je 4 hodiny. Experimentální studie ukazují, že Npe6 primárně působí na cévní zásobení nádoru. HPPH (Photochlor) je hydrofobní lipofilní fotosenzitizer s výbornými účinky v terapii nádorů. Byl použit k terapii recidiv

endobronchiálních nádorů a Barrettova jícnu. Fotosenzitizér je podáván intravenózně a doba potřebná ke kumulaci v nádoru je 2 dny. V některých případech se ale objevila fotosenzitivita. Talaporfin sodný (LS11) je ve vodě rozpustný a je vylučován játry, proto je nevhodný u pacientů s chronickým postižením jater. Při jeho aplikaci se objevily u pacientů oběhové problémy, proto se v dnešní době nepoužívá. Purpurin je degradační produkt chlorofylu. Interval mezi aplikací fotosenzitizéru a ozářením je 24 hodin a vlnová délka laseru je 660 nm. Nevýhodou je nestabilita ve vodním prostředí a časté alergické reakce. Další preparáty ze skupiny chlorinů jsou např. feoforbidy a pyrofeoforbidy (byly rovněž izolovány z chlorofylu, nevyvolávají kožní fotosenzitivitu a mají absorpční maximum 665 nm), temoporfin, a řada jiných.<sup>37</sup> Meta-tetrahydroxyfenylchlorin je schválen k paliativní léčbě nádorů v oblasti hlavy a krku v některých státech Evropské unie. (Tabulka č. 2)

**Tabulka č. 2 Hlavní zástupci fotosenzitizérů schválených pro klinickou praxi**

<b>Fotosenzitizér</b>	<b>Generický název</b>	<b>Výrobce</b>
Hematoporfyrinové deriváty	Photofrin	Axcan, Kanada
Hematoporfyrinové deriváty	Photosan	SeeLab F&E, Německo
Benzoporfyriny	Visudyne	Novartis, Švýcarsko
5 aminolevulonová kyselina (5 ALA)	Levulan	DUSA, Kanada
Metylester 5 ALA	Metvix	Photocure, Norsko
Sulfonovaný hlinitý ftalocyanin	Photosens	Institut obecné fyziky, Rusko
Chlorin e6	Laserphyrin	Meiji Seika Kaisha, Japonsko
Lutécium texafyrin	Abtrin	Pharmacyclics, USA
Tetrahydroxyfenylchlorin	Foscan	Biolitec, Irsko



Snahou je vyvinout takové fotosensitizátory, které by měly tyto základní vlastnosti:

- a) být látkou o známé chemické struktuře
- b) selektivně se akumulovat v nádoru
- c) v dostatečné míře produkovat singletový kyslík
- d) aktivovat se světlem o vyšších vlnových délkách, které penetrují hlouběji do tkáně
- e) být minimálně toxický k ostatním tkáním
- f) nevyvolávat fotosenzitivitu k solárnímu záření
- g) být ve vhodné lékové formě
- h) být levnější než stávající léčba
- i) být fotolabilní a snadno se rozkládat po ozáření světlem odpovídající vlnové délky
- j) rychle se vylučovat z organismu
- k) neinterferovat s ostatní protinádorovou léčbou
- l) aktivovat se světlem o přesně stanové vlnové délce
- m) být vhodnou látkou i pro ambulantní použití

Afinita jednotlivých fotosensitizátorů k různým nádorovým buňkám je rozdílná. Na rozdílné akumulaci fotosenzitizérů v buňkách se podílí rozdílná lymfatická drenáž nádorů, změny v pH, nárůst lipoproteinových receptorů a abnormální nádorové stroma.

### **1.3 Světelné zdroje**

Výběr vhodného světelného zdroje je určován dvěma základními faktory: absorpčním spektrem fotosenzitizéru a hloubkou průniku světla do tkáně. Vlnové délky používaného světla v PDT se nachází mezi 600 a 900 nm. Kratší vlnové délky jsou pohlcovány endogenními barvivy, hlavně hemoglobinem, vodou, některými lipidy, melaninem a ostatními pigmenty. Delší vlnové délky nemají dostatečnou energii potřebnou k aktivaci fotosenzitizérů.<sup>1,2,5,11,12</sup> Na průnik světla do tkáně má rozhodující vliv odraz světla, rozptyl, přenos, absorpce a vzájemná kombinace jednotlivých parametrů. Tyto parametry se vzhledem k nehomogenní struktuře tkání určují poměrně obtížně. Odraz světla může u delších vlnových délek dosahovat až

50%. Naopak odrazení světla v dutinách vede ke zvýšení účinku díky úplnému vstřebání světla. Množství světla proniklého do tkáně tak může být při použití PDT v dutinách (močový měchýř) 5 až 7 krát vyšší. Pronikání světla do tkáně rozhodujícím způsobem ovlivňuje vlnová délka. Delší vlnové délky pronikají hlouběji do tkáně, hloubka penetrace se pohybuje kolem 8 mm při vlnové délce 630 až 800 nm (někteří autoři ale uvádějí penetraci světla až 20 mm). Úspěšná PDT byla popsána i u větších nádorů, zde se předpokládají další vlivy na destrukci tumoru jako zvýšená imunitní odpověď a omezení krevního průtoku tumorem. Jako zdroje světla se pro PDT dříve používaly širokospektrální, speciálně upravené lampy s barevnými, popřípadě tepelnými filtry. Při jejich užití se nedosahovalo dostatečných příkonů zářivé energie v nádoru a docházelo též k ozáření okolních zdravých tkání. Proto se nyní používají lasery, které jsou zdrojem monochromatického, koherentního, lineárně polarizovaného a intenzivního světelného svazku s nastavitelným výkonem.<sup>3,13,14</sup> Rozhodujícími parametry každého světelného zdroje jsou vlnová délka, světelný výkon (udávaný ve  $W/cm^2$ ) a celková energie záření (udávaná ve  $J/cm^2$ ). Ideální světelný zdroj by měl být dostatečně absorbován fotosenzitizérem, měl by dosahovat dostatečného průniku do tkáně, mít dostatečnou energii ke spuštění fotochemické reakce. Neměl by vyvolávat purpuru, termické poškození nebo změny pigmentace. Ideální zdroj vyzáří dostatečné množství energie v co nejkratším časovém intervalu při minimálním poškození tkáně.

Širokospektré světelné zdroje byly využívány v PDT nejdříve. V roce 1942 byl hematoporfyrin aktivován křemíkovou lampou v experimentální léčbě nádorů u zvířat i lidí. Dalším krokem bylo používání xenonových lamp s vlnovou délkou 600 až 660 nm v šedesátých letech minulého století. Následně se používaly lampy halogenové a wolframové. V roce 1990 Kennedy použil k léčbě solární keratózy a kožních nádorů ALA v kombinaci s wolframovou lampou s filtrem 600 nm a ALA se tak stala dominantním fotosenzitizérem používaným k léčbě kožních onemocnění.<sup>5,9,19</sup> Vlnové délky u kožních onemocnění se posunuly spíše k modrému spektru světla, vzhledem k povrchové lokalizaci kožních lézí. Inkoherentní světelné zdroje se v dnešní době používají pouze k ozařování velkých ploch u kožních chorob, jinak je jejich využití

v PDT minimální. Mezi hlavní nevýhody konvenčních lamp patří výrazný tepelný efekt, nízká intenzita světla a obtížně kontrolovatelná celková energie záření. V dnešní době jsou k ozáření velkých ploch používány světlo emitující diody (LED), které jsou schopné generovat dostatečnou energii osvětlení při odpovídající vlnové délce.

Prvními lasery používanými v PDT byly v 70. letech minulého století lasery argonové. Možnost nastavení různé vlnové délky umožňovalo použít rozdílné fotosenzitizéry, což v porovnání s dnešními přístroji s přesně nastavenou jednou vlnovou délkou představovalo značnou výhodu. Jejich nevýhodou byla velikost, energetická náročnost, nutnost vodního chlazení, nízká spolehlivost a samozřejmě cena. V roce 1980 se začínají používat Nd:YAG lasery. V porovnání s předchozí skupinou dosahují vyšší účinnosti, spolehlivosti a nižší náročnosti na údržbu. LED diody se začaly používat v různých oborech lidské činnosti v 90. letech minulého století a byly také využity k výrobě diodových laserů, které v dnešní době dosahují nejširšího využití. Jejich hlavní výhodou je nízká pořizovací cena, malé rozměry a nízké provozní náklady. Diodové lasery se používají jak pro vlákna v endoskopech, tak mohou být používány pro ozáření velkých ploch. Hlavní nevýhodou diodových laserů je přednastavená vlnové délky bez možnosti její změny, takže je nutné pro každý fotosenzitizér používat jiný laser. Problémem diodových laserů je poměrně nízká účinnost v převodu elektrické energie na světelnou (méně než 15 %), takže dochází také k poměrně velikým tepelným ztrátám. Poslední novinkou je spárování každé diody s vlastním světlovodným vláknem, kdy účinnost převodu je 50 %. Lasery jsou zdrojem monochromatického, koherentního záření s přesně definovanou vlnovou délkou. Lasery se dočkaly rozšíření v PDT v 90 letech minulého století.<sup>1,2</sup> Využívají se jak k léčbě kožních onemocnění, tak pro léčbu nádorů vnitřních orgánů, čímž výrazně rozšířily možnosti využití PDT. Mezi hlavní výhody patří vedení světla optickými vlákny a tím jejich použití v endoskopech, stanovení přesně definované vlnové délky, dosažení maximální penetrace do tkáně a zkrácení doby potřebné k ozáření.<sup>11,13,14</sup>

Vývoj laserů v následujících letech se zaměřuje na vývoj diodového laseru s možností nastavování různých vlnových délek, tak aby je bylo možno měnit podle potřeby jednotlivých fotosenzitizérů. S jejich rozvojem se předpokládá snižování pořizovací ceny a tím celé PDT. Začínají se používat i organické LED lasery. Vysokorychlostní pulzní lasery jsou testovány pro 2 fotonovou PDT.

### **1.3.3 Světlovodné technologie**

Rozvoj PDT v posledních 20 letech je úzce svázán s rozvojem světlovodných vláken, které umožnili přenos světelné energie od zdroje k cílové tkáni. Ve srovnání s ionizovaným zářením, které proniká kůží k cílovým tkáním s minimální ztrátou, hlavním problémem světla je omezená penetrace a jeho rozptyl při pronikání do organismu. Existují tři základní možnosti ozařování světelným zdrojem. Světlo působí na ozařované místo přímo, bez nutnosti jeho přenosu, nebo je použit systém čoček a filtrů k jeho korekci. Tyto postupy se používají při ozařování větších ploch na povrchu těla. V dutinách se používají optická vlákna zavedená pracovním kanálem endoskopu. Optimálního rozptylu světla se může dosáhnout vyplněním dutin koloidním roztokem, který zajistí disperzní rozptyl světla všemi směry. Tento postup se například používá při odstraňování reziduální nádorové tkáně po operacích nádorů mozku. Podmínkou je stoprocentní hemostáza, jinak dochází k pohlcování světla hemoglobinem. Novinkou v posledním období jsou speciálně upravená optická vlákna s částečně opláštěvaným povrchem, která jsou upravena tak, že z nich světlo disperzně vyzařuje v předem stanoveném úseku. Ve srovnání s klasickými optickými vlákny, kdy světlo vyzařuje pouze z jeho konce, dochází tak k lepšímu ozáření tkáně. Při ozařování dutých orgánů při endoskopii či ozařování dutin po odstranění solidních nádorů se také na konce vláken používají speciální difuzéry zajišťující rovnoměrný rozptyl světla do okolí. Dále se používají speciální vlákna a koncovky pro ozařování solidních tumorů, které se přímo zavedou do tkáně nádoru.<sup>39,40</sup>

### 1.3.4 Dozimetrie a fluorescence

Základní údaje, které se v klinické PDT vždy udávají, jsou dávka fotosenzitizéru, vlnová délka světla a doba ozáření. Tyto údaje jsou pro klinickou praxi dostatečné. Rozhodujícím momentem v účinnosti PDT je ale světelná energie předaná fotosenzitizéru. Tyto údaje nám upřesní dozimetrie. Měření dozimetrie je však v organických tkáních značně složité. Existují tři základní možnosti měření. Přímá dozimetrie, kde se sleduje hladina singletového kyslíku v tkáni, explicitní dozimetrie, kde se hladina singletového kyslíku vypočítává z hodnot fotosenzitizéru a implicitní dozimetrie, kde se používají k výpočtu vedlejší produkty fotochemických reakcí. Cílem dozimetrie je stanovení optimálních dávek fotosenzitizérů a světelné energie, tak aby PDT dosahovala nejvyšší účinnosti. V optimálních podmínkách ozáření vede k destrukci maligních buněk při nulovém nebo zanedbatelném poškození ostatních tkání. Příliš vysoké dávky světla vedou k poškození tkáně, nízké dávky naopak k selhání terapie. Vzhledem ke složitosti měření dozimetrie v nehomogenních organických tkáních se energie záření vypočítává ze světelného paprsku a množství energie dopadlé na povrch tkáně.<sup>41,42</sup>

Pokud je energie dostatečná, dochází k aktivaci fotosenzitizéru do excitované formy, která pak může předat elektron molekule kyslíku. Výsledkem je singletová forma kyslíku, která je hlavně zodpovědná za destrukci buněk. Následně se fotosenzitizér vrací do základního stádia. Tento děj ovlivňuje koncentrace fotosenzitizéru v tkáni, penetrace světla a případná hypoxie. Všechny tyto parametry se mohou měnit i v průběhu PDT, kdy pouhá změna jednoho parametru ovlivní zbylé dva. Prakticky nedostupná dozimetrie v tkáních pacientů by nám dokázala vysvětlit selhání PDT v důsledku nedostatečného ozáření, nízké hladiny kyslíku nebo nedostatečné hladiny fotosenzitizéru.

Standardní metodou, která se používá ke stanovení malignity a průkazu nádorových buněk, je v dnešní době histologické vyšetření vzorku tkáně odebrané nemocnému. Využít ale také můžeme vlastností světla. Optické vlastnosti tkáně jsou

určovány endogenními chromoforami, které jsou odlišné v nenádorové a nádorové tkáni. Při ozáření tkáně ultrafialovým zářením a i částí viditelného spektra jsou absorpce a následná fluorescence z nádorové nebo nenádorové tkáně odlišné. Fluorescence tak hraje důležitou roli v diagnostice nádorových onemocnění.<sup>5,7,42</sup>

První údaje o fluorescenci byly zaznamenány již v roce 1924 při použití porfyrinu. Postupným zdokonalováním světelných zdrojů a hlavně přístrojů schopných detekovat vyzářené světlo se zdokalovala i metoda fluorescence. S rozvojem znalostí o autofluorescenci se začaly zkoušet i látky, které by po ozáření světelnou energií vyzářily a vedly k fluorescenci. Zjistilo se, že tento efekt mají fotosenzitizéry. Nejvíce používanou látkou je 5aminolevulonová kyselina, která je prekurzorem protoporfyrinu. Využívá se k diagnostice rozsahu nádorových onemocnění kůže, jícnu a močového měchýře. Organická tkáň je značně nehomogenní struktura s komplikovanými optickými vlastnostmi. Při ozáření tkáně ultrafialovým světlem ale mají rozhodující vliv na optické vlastnosti tkáně endogenní chromofory. Základní (nefluorescentní) chromofor – hemoglobin pohlcuje vlnové délky kratší než 600 nm. Ostatní sloučeniny a tkáň pohlcují světlo v rozsahu 350 až 500 nm a vyzářují světlo s vlnovou délkou 300 až 700 nm. Mezi tyto sloučeniny patří například kolagen, elastin, tryptofan, nebo porfyriny.<sup>43,44</sup>

K diagnostice fluorescence se používají dva základní postupy. Zdroj světla i detektor snímající vyzářené světlo je v jedné sondě, která pak dále předává údaje do spektrometru. V druhém případě je zdroj světla laser s předem stanovenou vlnovou délkou nebo širokospektrá lampa s filtrem a fluorescence je snímána druhou sondou. Rozdíl mezi zdravou a nádorovou tkání se pak určuje podle intenzity emitovaného světla, jeho distribuce ve spektru a délce trvání fluorescence. Příkladem může být zdravá bronchiální tkáň, která při ozáření ultrafialovým světlem je zelená. Při přítomnosti tumoru se barva postiženého místa mění na červenou. Pravděpodobnost záchytu těžké dysplázie nebo carcinoma in situ se při použití fluorescence zvyšuje 6x proti prosté bronchoskopii.

## 1.4 Mechanismus účinku PDT

PDT má cytotoxický účinek na většinu nádorových buněk, bez ohledu na to, o jaký druh nádoru se jedná. Protinádorový efekt PDT je výsledkem tří vzájemně působících procesů: přímé nekrózy buňky, poškození cévního zásobení a aktivace nespecifického imunitního procesu. Změnou dávky fotosenzitizéru, vlnové délky a energie ozáření můžeme měnit role jednotlivých komponent ve výsledné destrukci nádoru. Při optimální PDT smrt většiny buněk nastává nekrotickou. K apoptóze dochází při nedostatečně účinné PDT, například při velkém objemu nádoru, nedostatečné koncentraci fotosenzitizéru nebo hladiny kyslíku v tkáních. K aktivaci apoptózy dochází při PDT oběma hlavními cestami, vnitřní přes mitochondrie a zevní přes „receptory smrti“.

### 1.4.1 Účinek na buněčné úrovni

Již za několik hodin po PDT dochází k poškození buněčných membrán, zvláště pak plazmatické membrány. Buňky se přestávají dělit a dochází k cytolýze. Kromě plazmatické membrány jsou zasaženy i membrány jádra, mitochondrií, lysozomů, Golgiho aparátu a endoplazmatického retikula. Poškození mitochondrií vede k inhibici elektron-transportních enzymů, inhibici oxidativní fosforylace a snížení hladiny ATP, proto poškození mitochondriální membrány je rozhodující pro účinek PDT. Po PDT se také zvyšuje transkripce a translace některých genů, které souvisejí s produkcí látek při oxidačním stresu. PDT dále zasahuje do systému kontroly buněčného cyklu prostřednictvím rb - tumor supresorového genu a onkogenu p53.<sup>3,6,45</sup> V řadě případů pak dochází k tzv. apoptóze – naprogramované smrti nádorových buněk. Apoptóza zahrnuje sled biochemických procesů vedoucích k typickým změnám vzhledu buňky, degradaci cytoskeletu a následné změně tvaru cytoplazmatické membrány, smrštění buňky, fragmentaci jádra i chromozomů v důsledku účinku nukleázy vedoucí k fragmentaci DNA. Následně dochází k odstranění zbytků této buňky (a nikoliv k zánětu), čímž se apoptóza v základech liší od nekrózy. Mezi nekrotickou a apoptózou však není ostrá hranice a často se tyto jevy kombinují. Podobně i aplikovaná dávka

fotosensitizátoru ovlivňuje mechanismus účinku PDT. Zatímco nižší dávky fotosensitizátoru vyvolávají po PDT u 90 % buněčné populace tumoru apoptózu, vyšší dávky fotosensitizátoru vyvolávají spíše poškození buněčných membrán s následnou nekrózou.<sup>2,3,8,9</sup> Na vychytávání fotosenzitizéru izolovaně v nádorové tkáni se podílí několik faktorů. Patří mezi ně vyšší proliferativní aktivita nádorových buněk, změněná lymfatická drenáž, vysoká exprese LDL receptorů na buněčných membránách, abnormální struktura tkáňového stromatu charakterizovaná širšími mezibuněčnými prostory, vyšší produkce kolagenu a vyšší výskyt makrofágů, které zachycují hydrofobní fotosenzitizéry. Dále se na selektivním vychytávání protilátek podílí vazba fotosenzitizérů na transportní mechanismy buňky a monoklonální protilátky.

Pokroky ve výzkumu fotochemických reakcí vedly ke zjištění, že rozhodující pro vlastní fotodynamickou reakci je schopnost fotosenzitizérů přejít do excitovaného tripletového stádia. Fotosenzitizéry v základním stavu nemají volné elektrony. Absorpce fotonu fotosenzitizérem vede k přechodu elektronu na vyšší orbit a tím dojde k přechodu fotosenzitizéru do tripletového stádia. Tripletová excitovaná forma fotosensitizátoru pak působí přímo na struktury buňky (I. typ reakce) a vede je jejich poškození, nebo dochází k transferu energie z excitované formy fotosensitizátoru na molekulu kyslíku za vzniku vysoce reaktivní singletové formy kyslíku (II. typ reakce).<sup>2,5,6</sup> Ten je pak příčinou nekrózy a apoptózy buněk. II. typ reakce je častější. Singletový kyslík má však velmi krátkou dobu životnosti (< 40 nsec) a minimální akční rádius (< 0,02  $\mu\text{m}$ ). Vzhledem k omezenému akčnímu rádiu singletového kyslíku, pak rozhoduje o destrukci buněčných organel lokalizace fotosenzitizéru. Některé fotosenzitizéry je možné prokázat pouze v určitých organelách. Například porfyrin selektivně poškozuje mitochondrie, ale nedosahuje dostatečných hladin v ostatních organelách, aby došlo k jejich poškození. Fotosenzitizéry, které se nacházejí v mitochondriích, obvykle vedou k apoptóze, zatím co ty, které se vyskytují v buněčných membránách, obvykle způsobují nekrózu buňky. Tento stav je možné sledovat při pokusech in vitro, ale in vivo je situace komplexnější a izolovaná apoptóza či nekróza buňky není pozorovatelná. Hladina kyslíku v tkáni je pro efekt fotodynamické reakce jeden z rozhodujících faktorů. Poškození buněk je také



způsobováno ostatními kyslíkovými radikály, jako jsou peroxidový anion a jeho konjugované kyseliny a hydroxylové radikály.<sup>46,47,48</sup> Předpokládá se, že oba mechanismy mohou probíhat při PDT současně, avšak jejich relativní podíl na destrukci nádoru závisí na povaze a koncentraci fotosensitizeru a na koncentraci kyslíku v nádoru. Excitovaný fotosensitizer může přejít zpět do základního stádia, uvolněná energie se pak projeví fluorescencí, která je dobře patrná v ultrafialovém světle. Uvedený postup se používá ve fotodiagnostice k určení přesné hranice nádorových a benigních lézí.<sup>49</sup> PDT vede v buňce k mnoha dalším změnám, dochází k aktivaci fosfolipázy, změnám hladiny buněčného kalcia, změnám ve fosforylaci proteinů a změnám genové exprese.

#### **1.4.2. Reakce na tkáňové úrovni**

Reakce na PDT in vivo je poměrně rychlá. Po ozáření dochází ke vzniku nekrózy již za 24 až 48 hodin. V některých případech po období 1 až 2 týdnů začne nádor opět růst. Nárůst tumoru může být způsoben rezistencí nádorových buněk na PDT a to z různých důvodů, např. hypoxie, nedostatečné akumulace fotosensitizeru v tumoru, nedostatečné koncentrace světelné energie v ozařované oblasti nebo kombinace všech uvedených důvodů.<sup>2,9,10</sup>

Většina publikovaných prací se shoduje v tom, že PDT působí na cévní zásobení nádoru, dochází zde k poškození endoteliálních buněk a následnému uvolnění koagulačních faktorů, což vede ke vzniku trombů v dané oblasti a zamezení prokrvení nádoru. Některé fotosensitizery se selektivně vychytávají přímo v endoteliálních buňkách. Následné Dopplerovské měření průtoku v cévách nádoru prokázalo, že již v první minutě po začátku ozáření dochází k poklesu průtoku krve nádorem, která trvá ještě asi 5 minut po ukončení ozařování. Selektivní působení na cévní zásobení nádoru se vysvětluje jak vychytáváním fotosensitizeru v nádoru a v endotelu, tak i selektivním ozářením tumoru světelným zdrojem. PDT také spouští imunitní reakci, která vzniká jako důsledek poškození nádorových buněk a endotelu. Podílí se na ní jak buněčná, tak látková imunita. Při prozkoumání všech dějů vedoucích ke zvýšené imunitní reakci po

PDT se předpokládá, že by bylo možné uведенé imunitní reakce použít v kombinaci se standardními způsoby léčby v boji proti nádorovým chorobám.<sup>50</sup>

Přes více než půl století trvajícím výzkum účinku PDT nejsou všechny mechanismy dodnes zcela objasněny.

### **1.4.3 Další směry výzkumu fotodynamické terapie**

V současné době se výzkum PDT zaměřuje na zvyšování její účinnosti, buď jako samostatné terapie, nebo v kombinaci s jinými již prověřenými postupy. Zkouší se nové preparáty, velký pokrok byl zaznamenán v technologii laserů, LED diod a především světlovodných vláken. V oblasti fyziky je dominantním problémem dozimetrie a určování množství energie potřebné k aktivaci fotosenzitizéru v organické tkáni.<sup>50-56</sup>

- **Kombinace PDT s antiangiogeními preparáty**

V průběhu PDT dochází vlivem poškození cévního zásobení nádoru k hypoxii, která aktivuje celou řadu angiogenních růstových faktorů, jako vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF), cyklooxygenázy a prostaglandinů E2. Aktivace angiogenních růstových faktorů byla poprvé popsána při použití fotofrinu. Výše uvedené pak vedlo k použití antiangiogenních preparátů, blokujících VEGF. Výsledkem pak byla signifikantně nižší exprese VEGF, nižší angiogeneze a lepší výsledek PDT. Tato terapie by tak zvládla jeden z nežádoucích účinků PDT a to angiogenzi v okolí tumoru.

- **Kombinace PDT a imunoterapie**

Po aplikaci PDT je spuštěna bouřlivá zánětlivá reakce, která je vyvolána poškozením buněčných stěn nádorových buněk. Prozánětlivé metabolity membránových lipidů poškozují endotel cévního zásobení tumoru a tak přitahují a aktivují buňky imunitního systému. Dochází k vzestupu hladin dalších zánětlivých

mediátorů, jako arachidonové kyseliny, histaminu, cytokinů, komponent komplementu a cytokinů. Aktivace imunitního systému v místě tumoru tak přispívá k jeho destrukci vlastními silami organismu. Vyzkoušeny byly různé typy imunoterapie, jako použití různých vakcín nebo použití cytokinů, či interleukinů.

- **Metronomická PDT**

Standardním postupem v PDT je podání co možná nejvyšší dávky léku, který se akumuluje v postižené tkáni, aniž by docházelo k systémové toxicitě nebo fotosenzitivitě. Při metronomické PDT se podává nižší dávka fotosenzitizéru než je obvyklé (někdy se podává kontinuálně) a následuje delší ozáření světelným zdrojem. Někdy se ozařuje postižená oblast frakcionovaně, kdy dosažení celkové energie světelného záření je dosaženo několika postupnými iradiacemi. Uvedený postup je prokázán u terapie nádorů mozku za použití 5 ALA, kdy podstatně nižší dávka a delší ozáření vede k destrukci tumoru. Ozáření ale musí probíhat několik hodin. Není jisté, jestli uvedený postup bude fungovat i u jiných nádorů a další fotosenzitizérů. Komfort pro pacienta je ale vzhledem k prodloužení času ozáření diskutabilní.

- **Dvoufotonová PDT**

Základem dvoufotonové PDT je aktivace fotosenzitizérů rychlým pulsem laseru s vlnovou délkou blížící se infračervenému záření. Výsledkem je aktivace fotosenzitizéru do excitovaného stádia dvěma fotony. Podmínkou je délka světelného impulsu, která nesmí překročit 100 fs. Výhodou je, že ztráty světelné energie jsou nižší, protože nedochází k pohlcování hemoglobinem a není tak výrazný rozptyl. Výsledkem je pak vyšší energie předaná fotosenzitizéru i hlubší penetrace světla do tkáně. K hlubší penetraci dochází především ve vysoce vaskularizované tkáni nebo u melanocytů. Studie potvrzují hlubší penetraci světla do tkáně v porovnání s klasickou PDT. Byl prokázán efekt na nádory velikosti 1 cm a některé práce dokonce prezentují výsledky, kde došlo k nekróze až v hloubce 3 cm. Mezi další výhody patří nižší rozptyl do okolních tkání a tím jejich minimální termické postižení, proto se dvoufotonová PDT používá v terapii makulární degenerace. Další metodou je používání 2 rozdílných laserových pulsů. První aktivuje fotosenzitizér do

jednoduchého excitovaného stavu. Druhý puls s odlišnou vlnovou délkou pak aktivuje fotosenzitizér do tripletového stádia, kdy fotosenzitizér pak přímo destruuje cílové makromolekuly. Výhodou tohoto postupu je, že nejsme odkázáni na dostatečnou hladinu kyslíku.

- **Beacon PDT**

Je založena na aktivaci fotosenzitizéru až po dosažení cílového místa. Používají se vazby na různé enzymy, receptory, nebo RNA.

- **Použití nanočástic**

Nanočástice, do kterých se vkládá v budoucnost v mnoha oborech lidské činnosti, se začaly používat i v PDT. Především se využívají jako nosiče pro fotosenzitizéry. Další možnosti pak představuje cílené vychytávání na buněčných receptorech. Některé nanočástice jsou samy fotoaktivní. Například porózní silikonové nanočástice jsou schopné samy produkovat singletový kyslík po ozáření. Produkce kyslíku je prokázána in vitro, jestli ale bude možné nanočástice použít pro PDT záleží na lokalizaci nanočástic u makromolekul vzhledem k velmi krátké době životnosti singletového kyslíku. Další možností je používání sloučeniny nanočástice – fotosenzitizér. Nanočástice jako primární příjemce světla a následně aktivace fotosenzitizéru fotonem uvolněným z nanočástice. Rizikem nanočástic je, že se jedná o cizorodý materiál, který se inkorporuje do buněk.

## **1.5. Kolorektální karcinom**

### **1.5.1 Incidence kolorektálního karcinomu**

Kolorektální karcinom je třetí nejčastější tumor lidské populace a nejčastější nádor zažívacího traktu. Incidence je vyšší v rozvinutých zemích Evropy a Severní Ameriky, kde je kolorektální karcinom druhou nejčastější malignitou. Populace České republiky patří do nejméně ohrožené skupiny, což se incidence i mortality kolorektální rakoviny týče. Celoživotní riziko onemocnění dosáhlo 5,9 % a stále narůstá. Počet nových onemocnění kolorektálním karcinomem se u českých mužů za posledních dvacet let zdvojnásobil a incidence je nejvyšší v Evropě. Kolorektální karcinom je druhým nejčastějším nádorem, na který Češi umírají. Podle údajů z roku 2005 si vyžádal celkem 2453 úmrtí mužů (15,8 % všech nádorových úmrtí) a byl tak hned na druhém místě za nádory plic (26,8 %). Ženských obětí si vyžádal přibližně o čtvrtinu méně (1783), ale i zde byl se 14,3 % hned na druhém místě v poměrně těsném závěsu za nádory prsu (15,4 %).<sup>57,58</sup>

### **1.5.2 Terapie kolorektálního karcinomu**

Přitom kolorektální nádory jsou vůbec jedny z nejlépe léčitelných nádorů. Stadium nádoru tlustého střeva v době diagnózy je pro určení další prognózy zcela zásadní. Nádory omezené na sliznici a podslizniční vrstvu jsou více než v 90 % případů definitivně vyléčitelné. S postupující invazí nádoru do hlubších vrstev střevní stěny klesá i šance na dlouhodobé přežití a trvalé vyléčení. U nemocných s pokročilým zhoubným nádorem pronikajícím celou tloušťkou střevní stěny a s postižením lymfatických uzlin a vzdálených orgánů je prognóza krajně nepříznivá a bohužel i krátkodobá. Nejméně třetina pacientů s nově diagnostikovaným karcinomem tlustého střeva je objevena až v těchto pozdních fázích nádorového onemocnění, kdy šance na definitivní vyléčení jsou mizivé. Z velké většiny jsou za vznik kolorektální rakoviny odpovědné zevní faktory, skladba diety, způsob přípravy a konzervace jídla. Pravidelné pití alkoholu každý den zvyšuje riziko kolorektálního karcinomu dvakrát.

Dalším rizikovým faktorem je věk, kdy výskyt onemocnění se výrazně zvyšuje po 50 roce života.<sup>58,59</sup> V posledních deseti letech se vedle faktorů zevního prostředí stále častěji diskutují i genetické vlohy.<sup>59,60</sup> Ukázalo se, že u většiny tzv. sporadických kolorektálních karcinomů se uplatňují genetické faktory, které přispívají k maligní transformaci a vzniku adenomů a invazivních karcinomů tlustého střeva. U malého počtu nemocných s adenomovými polypy nebo karcinomy tlustého střeva (5-10 %) jsou genetické vlohy pro vznik onemocnění zcela zásadní. Postupné hromadění genetických poruch na různé úrovni vede v konečném důsledku k maligní transformaci epitelu slizničních žlázek a vzniku invazivního karcinomu.

Základním a nejstarším principem terapie kolorektální rakoviny je léčba chirurgická. Jejím základem je odstranění tumoru s přilehlým úsekem střeva, s mesenteriem a tím s lymfatickou tkání. Rozsah resekce je dán lokalizací a stádiem nádoru. K operaci jsou indikováni nemocní ve všech stádiích nádorového onemocnění (s výjimkou T1), u kterých lze očekávat provedení radikálního nebo paliativního výkonu. Absolutní indikací jsou akutní stavy vyvolané kolorektálními nádory. Kontraindikováni jsou nemocní, kdy celkový stav neumožňuje operaci nebo takové nádory, kde již z předoperačních vyšetření je jasné, že nebude možno provést ani radikální ani paliativní zákrok. Důraz je kladen na dostatečnou lymfadenektomii a odečet dostatečného množství lymfatických uzlin, aby nedošlo k downstageingu nádoru a tím k nedostatečné adjuvantní léčbě. Stále diskutovaná je problematika sentinelové uzliny, která zatím nedosáhla takového rozšíření jako například v terapii tumorů prsu nebo maligního melanomu. Přesto i v chirurgické terapii je několik novinek, souvisejících převážně s technologickým pokrokem, jako zavádění laparoskopie a moderního instrumentária do operativy kolorektální rakoviny.<sup>60</sup>

Adjuvantní a neoadjuvantní chemoterapie a radioterapie je součástí léčby, ale samy nejsou schopné vést k úplnému vyléčení nádoru. V léčebné strategii se radioterapie nejčastěji používá v předoperačním období u nádorů rekta. Standardní dávkou obvyklou u pacientů bez předchozí radioterapie je 45 Gy. Výjimečně je

radioterapie indikována u inoperabilních stádií s kurativním cílem. Za optimální zdroj ionizujícího záření se pokládá lineární urychlovač.

Chemoterapie je nejmladší léčebnou metodou používanou v léčbě nádorů střev. Používá se v neoadjuvanci, jak bude uvedeno níže, nebo jako terapie adjuvantní s cílem zlikvidovat zbytkovou populaci nádoru po operačním výkonu. Mechanismus účinku cytostatik je značně různorodý jak z hlediska farmakologického, tak z hlediska jejich zásahu do buněčné kinetiky. Vzhledem k specifickému mechanismu jednotlivých cytostatik se dosáhne většího účinku kombinovanou chemoterapií nebo kombinací chemoterapie a radioterapie.

V současné době se prosazují konkomitantní režimy v neoadjuvantní léčbě tumorů konečnicku. Přidáním systémové chemoterapie k radioterapii se zvyšuje radiosenzitivita nádorových buněk. Stejně tak se předpokládá, že se snižuje riziko vzniku rezistentních buněk nádoru vlivem rozdílného mechanismu působení radioterapie a systémové léčby. K potenciaci radioterapie se standardně vyžívá bolusově nebo kontinuálně podávaný 5fluorouracil. Lepších výsledků dosahuje capecitabin. Další systémové preparáty jsou zatím ve stádiu zkoušek. Negativní stránkou konkomitantní terapie může být neúměrné zvýšení toxicity na zdravé tkáně. Kombinovaná léčba tak může vést k většímu poškození tkání, než když se používají jednotlivé složky léčby.

Nejnovější možností protinádorové léčby představuje terapie monoklonálními protilátkami. V léčbě kolorektálního karcinomu se jeví jako nejslibnější inhibice extracelulární části receptoru pro epidermální růstový faktor pomocí monoklonální protilátky cetuximabu. Zvýšená exprese tohoto receptoru se prokazuje u 25-80 % nemocných s metastazujícím kolorektálním nádorem. I když je receptor různě exprimován, nenašla se souvislost mezi jeho expresí a účinkem cetuximabu. Tato léčba je v současnosti indikována u pacientů s generalizovaným kolorektálním nádorem při selhání ostatních možností léčby.

Stále však zůstává početná skupina nemocných, kteří jsou indikováni pouze k paliativní léčbě. Cílem dlouhodobé paliace je kromě kontroly symptomů i dosažení stabilizace nádorového procesu, či jeho parciální regrese a tím prodloužení života nemocného. Rozhodnutí o správném postupu v případě paliativní léčby může být svízelné. Faktorů, které pak ovlivní další život nemocného je mnoho. Zhodnotit se musí lokální inoperabilita, známky šíření nádoru, celkový stav nemocného a jeho únosnost k případným extenzivním výkonům. Pokud se chirurg nerozhodne pro radikální výkon, pak musí ostatní paliativní postupy jasně vést ke zmírnění obtíží nemocného, ke zlepšení jeho kvality života, nebo alespoň k udržení stávající kvality života. Pokud se inoperabilní nádor nachází na volném střevu, pak v úvahu nejčastěji připadají bypassové operace, výjimečně stomie. Problém nastává, když se tumor nachází v rektu. Nejčastějším, ale pro pacienta nejvíce zatěžujícím postupem je založení stomie. Jedná se o veliký zásah do života nemocného a zvláště starší nemocní jsou pak často odsouzeni na pomoc ostatních, protože se již nenaučí manipulovat se stomickými pomůckami. Ani pouhé založení stomie, ale často nemusí řešit základní problém nemocného. Další prorůstání nádorů rekta do okolí posléze vede ke krvácení, odchodu hlenu, bolestem, nebo k protruzi nádorových hmot z konečníku. Pacient se založenou kolostomií je často odeslán k další terapii na onkologii a již není dále sledován chirurgem. Přitom místní a endoskopická léčba maligních stenóz patří mezi relativně opomíjené, ale vysoce efektivní metody. Základní indikací k této léčbě je chirurgicky neodstranitelný tumor v oblasti rekta či rektosigmatu. Chirurgická lokální excize je patrně nejdéle a nejčastěji používanou metodou. Rozvoj nových technologií jako použití harmonického skalpelu, nebo operačního rektoskopu vedou k lepším výsledkům při lokální terapii. Z dalších postupů v současnosti dominují laserová fotokoagulace, zavádění samoexpandibilních stentů, nebo použití argon plazma koagulátoru. Z uvedených postupů má nejvíce omezení zakládání stentů, kdy je nutné stent zavést dostatečně daleko přes stenózu a musí být vhodný tvar (nejlépe cirkulární stenóza) a délka zúžení. Stent nikdy nesmí distálně dosahovat k linea dentata. Stentování kolorektálních nádorů se do klinické praxe zavedlo v 80. letech. K výraznému zlepšení výsledků vedlo používání slitin niklu a titanu s tvarovou pamětí. Použití laseru prakticky žádné kontraindikace nemá. Využívá se termického efektu,



který vniká při interakci laserového záření s tkání, kdy dochází k její evaporizaci a koagulaci. Při použití laseru dochází k odpařování přibližně 4 mm tkáně. Výkon laseru je přenášen světlovodným vláknem, které se vysune z endoskopu (rektoskopu nebo koloskopu). V minulosti byl nejvíce používán Nd:YAG laser, který je v dnešní době nahrazován polovodičovými a diodovými lasery. Jejich výhodou je nižší cena a v porovnání s původními lasery se jedná o malé, přenosné přístroje. Výhodou laseru je velmi rychlý efekt, nevýhodou je nutnost opakování výkonu. Pouze v oblasti experimentu se pohybuje zatím paliativní fotodynamická léčba kolorektálních nádorů.

61

V experimentu na laboratorních zvířatech byla účinnosti PDT prokázána, ale uvedení do klinických studií nebo praxe nebylo provedeno. Přitom PDT by byla vhodná metoda jak pro iniciální stádia, tak pro paliativní postupy. Při schválení do klinické praxe by jistě PDT byla nejprve používána v paliativní terapii, teprve při jejím efektu by bylo možné tuto metodu používat na časná stádia. To co výrazně negativně ovlivnilo zavedení této metody do praxe, byla cena fotosenzitizérů, dlouhý časový odstup mezi aplikací látky a ozářením a fotosenzitivita, která se například u fotofrinu pozoruje několik týdnů, dokud nedojde k úplnému vyloučení preparátu z organismu. Přitom právě PDT patří mezi terapie s cíleným efektem na nádorovou buňku s minimálním postižením okolních tkání. PDT by šla také používat v kombinaci s jinými postupy, například s klasickým použitím ablačních technik, kdy se maximum porce nádoru odstraní a poté je na zbytkový tumor nebo spodinu defektu aplikována PDT, která odstraní zbylé nádorové buňky. Stejný postup je používán v terapii kožních nádorů a tumorů mozku.

## 1.6 Výběr zvířecího modelu

Jedním z důležitých předpokladů pro dosažení úspěchu v experimentálním medicínském výzkumu je volba vhodného modelu. V experimentálním onkologickém výzkumu jsou používány modely, jak *in vitro* (kultivace nádorových buněk a tkání), tak *in vivo* (laboratorní zvířata). Při práci na zvířatech jsou využívány tři základní možnosti experimentu. K terapii lze použít nádory vzniklé spontánně, nádory vyvolané chemickými, biologickými nebo fyzikálními podněty a zvířecí nádory transplantované. Hlavní nevýhodou všech uvedených možností je, že se nejedná o nádory lidské. Nejstarším způsobem jak v experimentu pracovat s lidskými tkáněmi je kultivace buněk a tkání *in vitro*. Druhou možností je přenos lidské nádorové tkáně na imunosuprimovaná zvířata tak, aby byl zajištěn růst lidské nádorové tkáně.<sup>62</sup>

Mezi imunosuprimovaná zvířata patří athymické *nu/nu* myši, které poprvé byly popsány Flanagem v roce 1962. Flanagan zjistil, že ztráta srsti je podmíněna přítomností autozomálně recesivního genu. Po poměrně krátké době myši hynuly na rozličné infekce. Další výzkum potvrdil, že tato mutace je provázena agenezí thymu a tím i deficitem T lymfocytů. Uvedený objev umožňuje na myš aplikovat lidskou tkáň, aniž by došlo k jejímu rozpoznání a odhojení. Experiment mohou ovlivňovat dvě situace: jednak nepřítomnost normální imunitní reakce, která by pomáhala destrukci nádoru a možnost odlišného metabolismu protinádorových léčiv u myší. První transplantaci lidského nádoru na athymickou myš provedli v roce 1969 Rygaard a Povlsen, kteří na *nu/nu* myš přenesli úspěšně kolorektální lidský karcinom. Poté následovaly další úspěšné transplantace různých lidských nádorů. Je zajímavé, že některé nádory (karcinom prsu, sarkomy) se transplantují snadno a mohou být dále pasážovány, naopak jiné jsou transplantovány obtížně (leukémie). Velmi obtížná je xenotransplantace nádorů produkujících hormony a nádorů hemopoetického a lymfatického systému.<sup>9,10,45,63</sup>

Péče o *nu/nu* myši vyžaduje speciální režim. Prostředí, ve kterém jsou ustájeny, musí být sterilní, stejně tak potrava a voda, jinak dochází k rychlému úhynu na

infekční komplikace. Optimální stáří jedinců je 6-8 týdnů, mimo uvedený interval se snižuje pravděpodobnost přihojení nádorů. Předpokládá se, že dochází ke změně aktivity NK buněk. Inokulace nádorových buněk se provádí subkutánně na bok myši. Aplikuje se suspenze nádorových buněk s Matrigelem (BD-Bioscience, Franklin Lakes, Spojené Státy Americké). Matrigel je směs proteinů (základem je kolagen) produkovaná myšimi nádorovými buňkami. Svoji skladbou se podobá strukturám extracelulárního prostředí, které se nachází běžně v tkáních. Buňky nanesené na vrstvu Matrigelu vytváří struktury tkáně zcela podobné tkáním in vivo. Pokud se vytvoří suspenze buněk s Matrigelem, pak vzniká trojrozměrná tkáň. Schopnost stimulovat buňky k vytváření struktur podobných tkáním je dána přítomností celé řady proteinů a růstových faktorů, které se podílí na diferenciaci a proliferaci buněk. Matrigel se také používá ve farmakologickém výzkumu.<sup>63,64</sup>

Vždy je nutné si uvědomit, že athymické myši s transplantovaným nádorem jsou jen experimentálním modelem, který musí předcházet dalším klinickým zkouškám.

## 2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

V naší práci jsme se zaměřili na možnosti fotodynamické léčby kolorektálního karcinomu. Pro kolorektální karcinom jsme se rozhodli pro nejvyšší incidenci u české populace a jeho trvalý nárůst, který bývá označován za epidemický. Kolorektální karcinom patří také mezi nejčastější nádorová úmrtí u české populace. PDT je s úspěchem používána v klinické medicíně v léčbě tumorů kůže, dutiny ústní, jícnu, močového měchýře a plic. V léčbě kolorektální rakoviny nedošlo k jejímu klinickému používání. Přitom kolorektální nádory jsou dobře přístupné endoskopicky a buď podání topické, nebo celkové a následná iradiace laserem by byla technicky poměrně snadná. PDT by ze začátku byla používána v paliativní terapii a pokud by se efekt dostatečně prokázal, pak se jistě dala PDT využít k terapii časných stádií nádorových onemocnění. V naší práci jsme se zaměřili na několik otázek a problémů. Účinek PDT na karcinomy je prokázán v mnoha studiích. Co je však rozdílné je účinnost terapie různými fotosenzitizéry. Různé preparáty dosahují rozdílných výsledků u jednotlivých nádorů, nebo i v léčbě benigních onemocnění. V našem experimentu bude zkoumaným fotosenzitizérem disulfonovaným hydroxyhlinitý ftalocyanin patřící mezi moderní preparáty ze skupiny barviv. Účinnost ftalocyaninu se zvyšuje navázáním atomů kovu na základní cyklickou strukturu ftalocyaninu, v tomto případě navázáním hliníku. Kontrolní skupinu bude tvořit PDT s fotofrinem, který je již schválen k použití v terapii maligních chorob jak v Evropě, tak v ostatních zemích světa. Předpokládáme dostatečnou účinnost u obou preparátů po jedné aplikaci, ale chceme vyzkoušet a předpokládáme, že by ftalocyanin mohl dosahovat vyšší účinnosti v porovnání s fotofrinem, protože ftalocyanin patří mezi preparáty s vysokou afinitou k epitelovým buňkám karcinomů a jeho terapeutický efekt by měl být vyšší než u porfyrinových preparátů. Další otázkou bude časový interval potřebný k dostatečné akumulaci fotosenzitizéru v nádoru. Starší preparáty, mezi které patří i fotofrin, potřebují k dosažení dostatečné hladiny v nádoru hodiny, někdy i dny. Proti tomu ftalocyanin je preparát s velmi krátkým intervalem k dosažení dostatečné hladiny účinné látky v nádoru. Interval potřebný k dosažení terapeutické hladiny by neměl být delší než 10 minut. Zkrácený interval mezi aplikací a ozářením by byl pro pacienty jasným

benefitem. Ozařovat budeme xenonovou lampou s filtrem, abychom měli u obou preparátů stejnou penetraci do tkáně, i když optimální vlnová délka pro ftalocyanin je delší než pro fotofrin. Delší vlnová délka, ale znamená hlubší průnik do tkáně a tím by vznikly rozdílné podmínky pro oba fotosenzitizéry. Myši budou po aplikaci a PDT dále sledovány vzhledem k riziku obnoveného růstu nádoru. K novému růstu nádoru obvykle dochází při nedostatečné hladině fotosenzitizéru v nádoru nebo při nízké hladině kyslíku v tkáních. Ftalocyanin by také neměl způsobovat žádnou fotosenzitivitu. Dále budou histologicky vyšetřeny plíce, ledviny, srdce, játra, střevo, mozek a svalovina k vyloučení poškození tkání ftalocyaninem nebo fotofrinem. Základní otázka naší práce tak zůstává, zda by bylo možné používat PDT u kolorektální rakoviny v paliativní terapii a v časných stádiích onemocnění. PDT by se pak mohla používat samostatně nebo v kombinaci s jinými již ověřenými postupy. V případě úspěšnosti experimentu předpokládáme, že výstupem bude potvrzení účinnosti léčby kolorektálního karcinomu ftalocyaninem, vyšší terapeutická efektivita v porovnání s fotofrinem, kratší interval mezi aplikací a ozářením v porovnání s jinými preparáty a nulová fotosenzitivita. PDT by tak mohla představovat cílenou protinádorové léčbu s minimálním účinkem na ostatní tkáně organismu. Pokud bude experiment úspěšný, mohli bychom pacientům s pokročilým onemocněním nabídnout efektivní paliativní terapii a zlepšit kvalitu jejich života.

### **Základní otázky práce**

- **Bude dostatečná účinnost ftalocyaninu po jedné aplikaci?**
- **Bude vyšší účinnost ftalocyaninu v porovnání s fotofrinem?**
- **Bude dostatečný 10 minutový interval k dosažení účinné hladiny ftalocyaninu v nádoru?**
- **Nebudou známky fotosenzitivity?**
- **Nebudou známky poškození tkání ftalocyaninem?**
- **Nedojde k regresi nebo úplné remisi nádoru v kontrolních skupinách?**
- **Mohl by být ftalocyanin použit v paliativní terapii kolorektálního karcinomu u lidí?**

### **3. MATERIÁL A METODIKA**

#### **3.1. Fotosenzitizéry použité v experimentu**

Disulfonovaný hydroxyhlinitý ftalocyanin (Al(OH)S<sub>2</sub>Pc) byl syntetizován ve Výzkumném ústavu organických syntéz v Rybitví u Pardubic. Ftalocyanin se podával ve formě roztoku s chloridem draselným s osmolalitou 0,9 %. Fotofrin (Photofrin®) byl zakoupen u společnosti Axcan Pharma Inc. (Mont-Saint-Hilaire, Quebec, Kanada). Dávka aplikovaného ftalocyaninu byla již na podkladě dřívějších experimentů stanovena na 2,5 mg na kilogram tělesné hmotnosti. Dávka fotofrinu je stejná, také 2,5 mg na kilogram tělesné hmotnosti.

#### **3.2. Atymické myši**

Atymické nu/nu myši CD-1 s tělesnou hmotností 18-22 g byly ustájeny v boxech se sterilní podestýlkou s laminárním prouděním vzduchu za aseptických podmínek, byly krmeny sterilní potravou ST-1. Myši byly zakoupeny od společnosti AnLab s.r.o., Karlův potok, Česká republika.

#### **3.3. Kolorektální karcinom**

Lidský kolorektální karcinom (tkáňová kultura HCT - 116) byl zakoupen od Evropské nádorové banky ECACC (European Collection of Cell Cultures, Salisbary, Wiltshire, Velká Británie). Buňky tumoru byly namnoženy a po dosažení počtu 10<sup>7</sup> nádorových buněk byla tkáňová kultura společně s Matrigelem (BD-Bioscience, Franklin Lakes, Spojené Státy Americké) subkutánně implantována na pravý bok myši. Objem nádoru byl pravidelně měřen a experiment začal poté, co došlo k nárůstu nádoru do velikosti 0,3-0,4 cm<sup>3</sup>. (Obr.č. 5)

**Obr. č. 5 Myš s narostlým kolorektálním karcinomem na počátku experimentu**

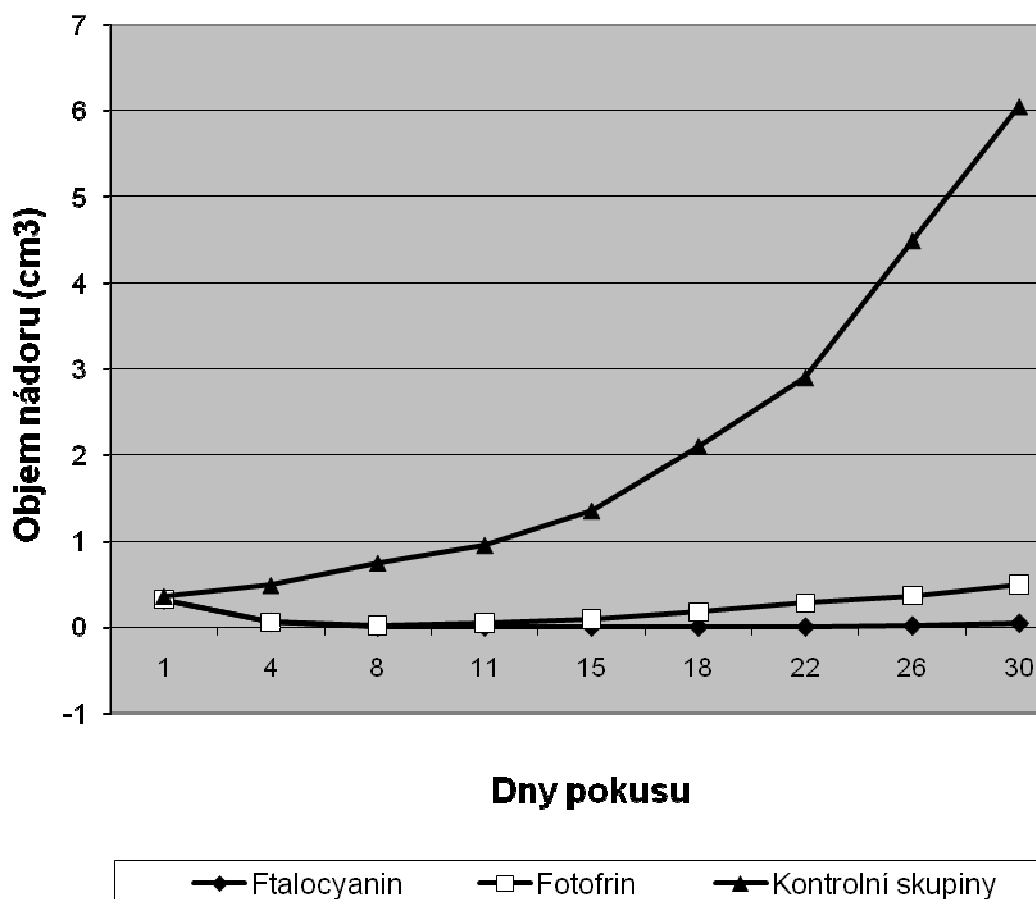


### **3.4. Fotodynamická terapie**

Myši již s narostlým tumorem do velikosti 0,3-0,4 cm<sup>3</sup> byly rozděleny do 4 skupin po 8 jedincích. První skupina obdržela disulfonovaný hydroxyhlinitý ftalocyanin (v dávce 2,5 mg/kg), druhá skupina byla léčena fotofrinem (dávka 2,5 mg/kg). Zbylé dvě skupiny byly kontrolní. Léčným skupinám byl fotosenzitizér aplikován intravenózně do ocasní žíly. Al(OH)S<sub>2</sub>Pc dosahuje vysokých koncentrací v nádoru již po minutách. Skupina myší s ftalocyaninem byla ozářena po deseti minutách od aplikace. Již z dřívějších pokusů je známo, že 10 minut by měl být dostatečný interval k dosažení účinné hladiny fotosenzitizéru v tumoru. Druhá skupina myší léčená fotofrinem byla ozářena 48 hodin po podání fotosenzitizéru. Do té doby byly myši chráněny před přímým slunečním světlem kvůli riziku fotosenzitivity. Obě skupiny myší byly v průběhu ozařování uvedeny do tiopentalové anestézie aplikací anestetika do peritoneální dutiny. Oblast nádoru byla ozářena ze vzdálenosti 1 centimetru po dobu 8 minut. Kolem nádoru byl přibližně 5 milimetrový lem, jinak

zbylá část těla nebyla ozářena. Obě skupiny byly ozářeny xenonovou lampou s filtrem (600-700 nm, Metra, Blansko). Celková energie záření byla  $120 \text{ J/cm}^2$ . Optimální vlnová délka pro disulfonovaným hydroxyhlinitý ftalocyanin je 675 nm a 632 pro fotofrin, ale rozdílná vlnová délka vede k různé penetraci světla do tkáně, tedy by nebyly dodrženy stejné podmínky pro obě látky. Myši byly dále ustájeny ve sterilních podmínkách, skupina s ftalocyaninem byla vystavena přímému slunečnímu světlu, známky fotosenzitivity nebyly zaznamenány. Skupina s fotofrinem byla proti přímému slunečnímu svitu chráněna. Obě skupiny byly pravidelně sledovány a objem tumoru byl měřen po dobu následujících 30 dnů. (Tabulka č. 3)

**Tabulka č. 3 Objem nádoru v průběhu fotodynamické terapie**





Objem nádoru a viditelná plocha nekrózy byly měřeny posuvným měřítkem podle následujícího vzorce. Objem nádoru  $V=(d. \times \text{š}^2)/2$  a plocha nekrózy  $S=d \times \text{š}$ , kde „d“ je délka a „š“ je šířka nádoru. První známky nekrózy byly zaznamenány v léčených skupinách 24 hodin po ozáření. Myši byly sledovány a objem nádoru a plocha nekrózy byly měřeny v třídním intervalu.

Ve skupině léčené ftalocyaninem došlo u všech myší k rozvoji nekrózy nádoru. Prakticky k vymizení nádoru došlo již 8. den od začátku pokusu, kdy objem nádorové tkáně již nebyl patrný. (Obr. č. 6 a, b) K novému růstu nádoru došlo pouze u jedné myši a to 26. den experimentu. Za 4 dny dosáhl tumor původní velikosti. Ve skupině léčené fotofrinem došlo k nekróze a regresi objemu nádoru také 8. den od začátku pokusu. Zde dochází ale k novému růstu nádoru již výrazně dříve. Nový růst nádorů, ke kterému došlo u 3 myší, se objevuje mezi 11. až 17. dnem. (Obr. č. 7) Původního objemu nádor dosáhl za 4 až 6 dní od nového růstu.

**Obr. č. 6 a) Jizva po úspěšné PDT**

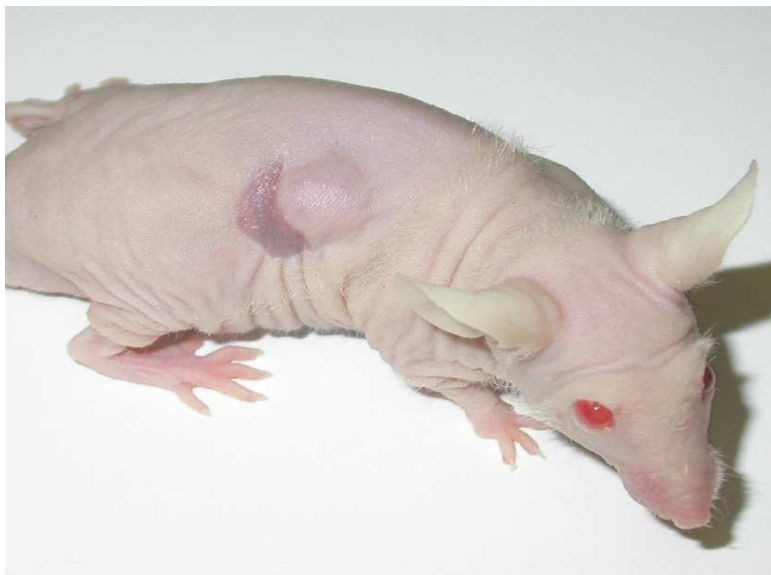


**Obr. č. 6 b) Jizva po úspěšné PDT**



Kontrolní skupiny myši byly dvě. První skupina byla ozářena, ale nedostala žádný fotosenzitizér. Zde by se dal předpokládat termický účinek laseru, který by mohl vést ke zpomalení růstu nebo i k částečné regresi tumoru. Tyto změny pozorovány nebyly. Proti laserům používaným k terapii nádorů se používá podstatně nižší výkon. Další skupina byla tzv. čistá kontrola, která neobdržela žádný fotosenzitizér, ani nebyla ozařována. V kontrolních skupinách se neobjevily žádné známky nekrózy, docházelo k rychlému růstu nádoru, kdy tumor dosáhl dvojnásobku své původní velikosti již 7. den experimentu a na konci pokusu nádor dosáhl devítinásobku své původní velikosti. Vzhledem k tomu, že se jedná o subkutánně uložený tumor, tak s ním myši poměrně dobře přežívaly i při této velikosti. (Obr. č. 8)

**Obr. č. 7 Opětovný růst nádoru ve skupině s fotofrinem**



**Obr. č. 8 Rychlý růst nádoru v kontrolní skupině**



Maligní buňky v kontrolních skupinách byly potvrzeny při histologickém zpracování. V případě úspěšné terapie byla výsledkem jizva krytá epitelovou tkání. Všechny myši byly usmrceny 30. den od začátku experimentu. Žádný předčasný úhyn myši jsme nezaznamenali. Nebylo zaznamenáno ani žádné neobvyklé chování myši.

### 3.5. Histologické zpracování

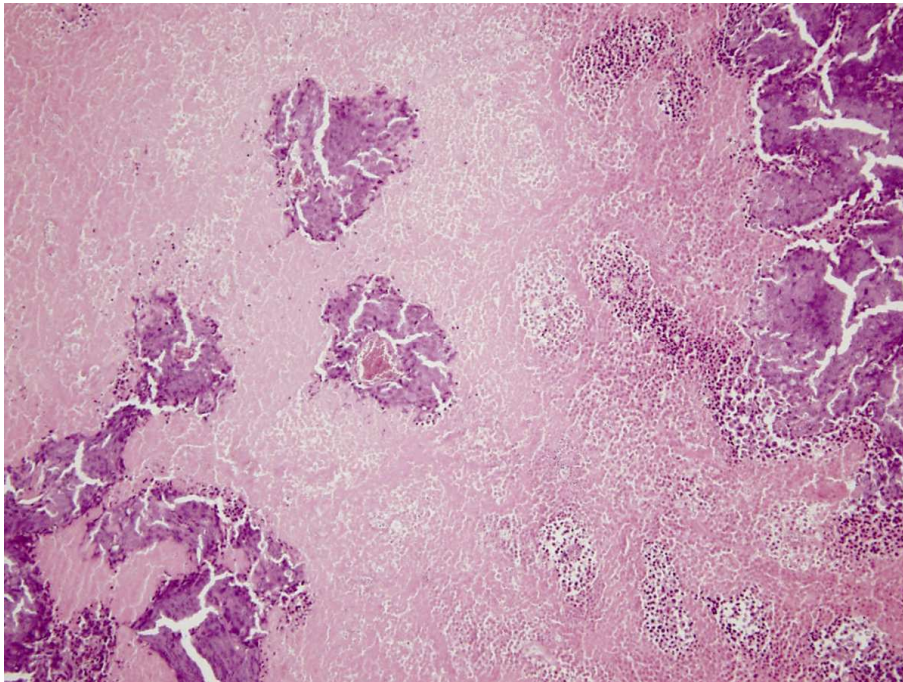
Oblast nádoru všech myší usmrcených na konci experimentu byla odebrána, (Obr. č. 9) fixována v 10 % formaldehydu, následně ve formalínu, prokrájena na 7  $\mu\text{m}$  řezy a vyšetřena histologicky. U myší s úspěšnou PDT jsme odebírali a vyšetřovali oblast jizvy, u myší s neúspěšnou PDT jsme odebírali nádorovou tkáň. Již při makroskopickém vyšetření šlo obvykle dobře rozeznat reziduální nebo novotvořenou nádorovou tkáň. Jizva po úspěšné PDT byla palpačně jemná, bez rezistence.

#### Obr. č. 9 Odběr vzorků z nádoru na histologické zpracování



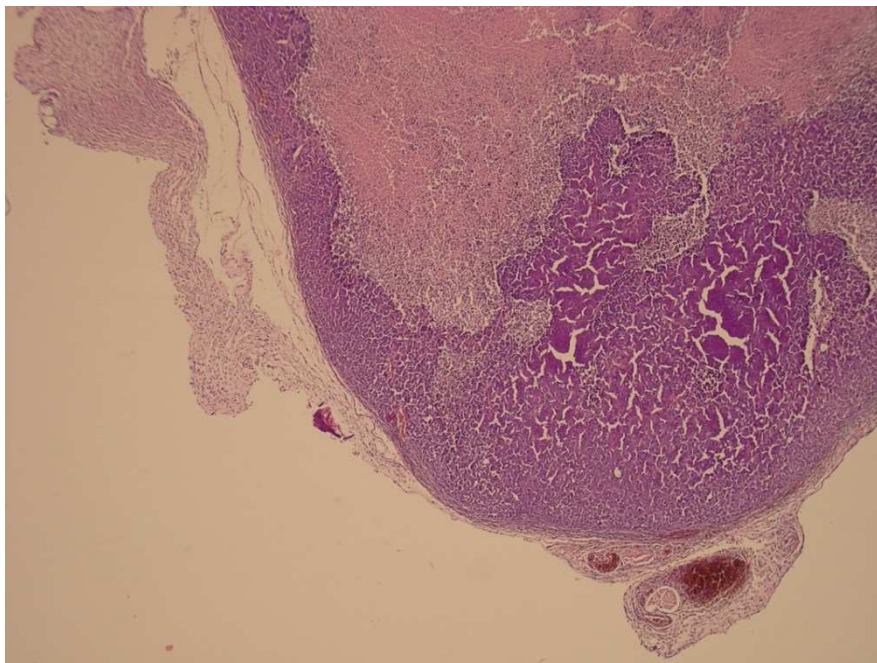
Nekróza nádoru v oblasti jizvy po úspěšné PDT byla histologicky potvrzena vymizením nádorových buněk. (Obr. č. 10) Používali jsme standardní barvení hematoxylin eosinem.

**Obr. č. 10** Nekróza nádoru po úspěšné PDT (HE 100×)

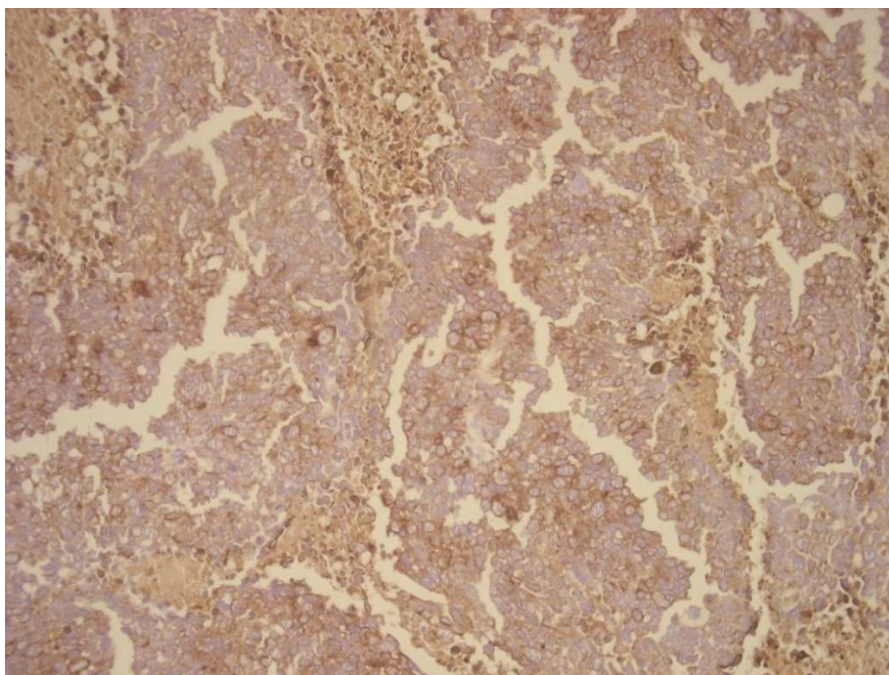


V kontrolních skupinách byly naopak vždy nádorové buňky prokázány. (Obr. č. 11) Histologické preparáty byly barveny hematoxylin eosinem nebo bylo použito barvení protilátek proti cytokeratinům k průkazu maligních epitelových buněk CAMP 5.2. (Obr. č. 12) Mikroskopické rozdíly mezi jizvami skupin léčených ftalocyaninem a fotofrinem nebyly pozorovány. Z každé skupiny byly z jedné myši odebrány vzorky jater, ledvin, plic, svalové tkáně a tenkého střeva k vyloučení případného poškození vnitřních orgánů PDT nebo laserem. Vzorky tkáně byly obarveny HE a žádné mikroskopické změny tkáně nebyly pozorovány.

**Obr. č. 11 Průkaz maligních buněk v kontrolních skupinách a při neúspěchu léčby (HE 40×)**



**Obr. č. 12 Průkaz maligních buněk v kontrolních skupinách a při neúspěchu léčby (CAMP 5.2 200×)**



## 4. VÝSLEDKY

V experimentu jsme prokázali vysokou účinnost ftalocyaninu v léčbě kolorektálního karcinomu u atymických myší po jedné dávce aplikace. Porovnávali jsme účinnost fotodynamické terapie hydroxyhlinitého disulfonovaného ftalocyaninu a fotofrinu na růst kolorektálního nádoru po jednom cyklu terapie. Použita byla optimální dávka pro obě léčiva a stejná vlnová délka laseru a stejně dlouhá doba ozáření. Rozdílná byla doba potřebná k dostatečné kumulaci fotosenzitizéru v nádoru, kdy dostatečný interval u ftalocyaninu je v minutách proti fotofrinu, kde je nutné počkat s ozářením 2 dny, než je hladina fotosenzitizéru dostatečná. Léčba s ftalocyaninem i fotofrinem vedla k remisi ve většině případů. Podání ftalocyaninu vedlo k remisi v 87 % případů. Opětovný růst nádoru byl zaznamenán v jednom případě (13 %). Podání fotofrinu mělo 62 % úspěch. (Tabulka č. 4) Opětovný růst tumoru byl potvrzen ve 3 případech (38 %). (Tabulka č. 5) Ftalocyanin dosahuje o čtvrtinu vyšší účinnost v porovnání s fotofrinem ( $P < 0,001$ ).

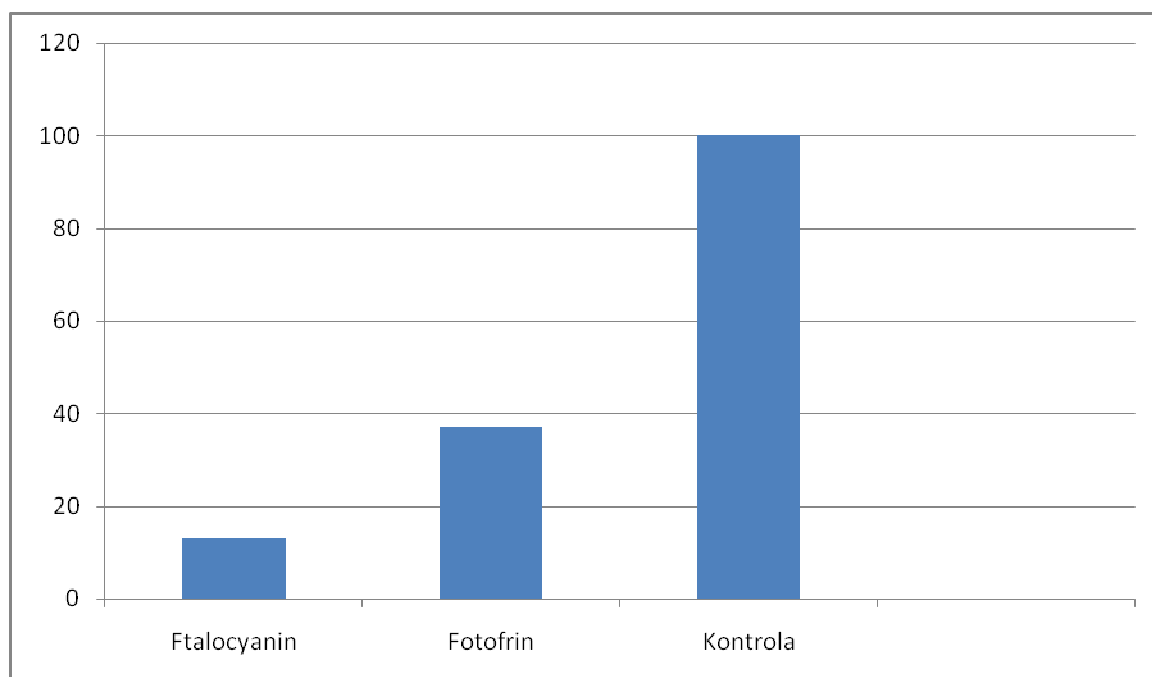
**Tabulka č. 4 Výsledky PDT**

	DÁVKA	OZÁŘENÍ	ÚSPĚŠNOST	OPĚTOVNÝ RŮST
Ftalocyanin	2,5 mg/kg	600-700 nm	87 %	13 %
Fotofrin	2,5 mg/kg	600-700 nm	62 %	38 %

Prokázala se tak vyšší účinnost moderních ftalocyaninových preparátů v porovnání se staršími preparáty porfyrinové řady. PDT v obou skupinách vedla k vymizení téměř všech nádorových buněk v průběhu čtyř dní. 8. den od začátku experimentu již u ftalocyaninu nebyla nádorová masa pozorovatelná. Nádor se pak objevil až při novém růstu 3 dny před ukončením experimentu. U fotofrinu dochází k novému růstu nádoru při nedostatečné PDT již dříve, obvykle kolem 10. dne po PDT. Všechny výsledky jsme potvrdili histologicky vymizením nádorových buněk z oblasti jizvy a naopak přítomností maligních. V průběhu terapie jsme u skupiny

léčené ftalocyaninem nezaznamenali žádné známky fotosenzitivity, což by představovalo pro pacienty jednoznačný benefit v porovnání s preparáty z obou generací fotosenzitizérů. Nepozorovali jsme žádný samostatný efekt ozáření laserem na maligní buňky. Stejně tak nebyly pozorovány žádné nežádoucí účinky fotosenzitizérů na ostatní tkáň v těle myši v průběhu PDT.

**Tabulka č.5 Opětovný růst nádoru po PDT**





## 5. DISKUSE

V závěru jsme jednoznačně demonstrovali úspěšnost PDT s ftalocyaninem v terapii kolorektálního karcinomu. Níže zodpovíme jednotlivé otázky, které jsme si položili před začátkem naší práce.

- **Bude dostatečná účinnost ftalocyaninu po jedné aplikaci?**

Aplikace ftalocyaninu vedla k remisi nádoru v 87 % případů po jedné aplikaci. Jedná se o vysokou terapeutickou účinnost tohoto fotosenzitizéru v terapii kolorektálních nádorů. Afinita ftalocyaninu k jiným epitelovým nádorům je známá a zde byla prokázána i v terapii kolorektálního karcinomu.

- **Bude vyšší účinnost ftalocyaninu v porovnání s fotofrinem?**

Porovnávali jsme účinnost fotodynamické terapie hydroxyhlinitého disulfonovaného ftalocyaninu a fotofrinu na růst nádoru po jednom cyklu terapie. Léčba s ftalocyaninem i fotofrinem vedla k remisi ve většině případů. Podání ftalocyaninu vedlo k remisi v 87 % případů. Opětovný růst nádoru byl zaznamenán v jednom případě (13 %). Podání fotofrinu mělo 62 % úspěch. Opětovný růst tumoru byl potvrzen ve 3 případech (38 %). Prokázala se tak vyšší účinnost moderních ftalocyaninových preparátů v porovnání se staršími preparáty porfyrinové řady. Všechny výsledky jsme potvrdili při histologickém zpracování.

- **Bude dostatečný 10 minutový interval k dosažení účinné hladiny ftalocyaninu v nádoru?**

Další položená otázka se týkala délky intervalu potřebného k dosažení dostatečné koncentrace preparátu v tumoru a tím efektivní PDT. U ftalocyaninu jsme prokázali, že desetiminutový interval je dostatečný k dosažení dostatečné hladiny fotosenzitizéru v kolorektálních nádorech. Tím se zásadně liší od ostatních používaných preparátů (převážně z řady fotofrinů), protože ostatní preparáty dosahují dostatečných koncentrací po hodinách a některé až po dnech. Je jasné, že v klinické praxi by se jednalo o značnou výhodu, protože pacienti by absolvovali celou PDT při

jedná návštěvě lékaře. Časová prodleva po podání ftalocyaninu je minimální. To je zásadní rozdíl proti jiným preparátům (I. i II. generace), kdy pacienti přicházejí k ozáření obvykle po několika hodinách nebo až dnech.

- **Nebudou známky fotosenzitivity?**

U ftalocyaninu jsme nezaznamenali žádné známky fotosenzitivity po celou dobu experimentu. Příčinou nulové fotosenzitivity je vysoké afinita k nádorové tkáni, nízká k ostatním orgánům, zvláště kůži a rychlá clearance z organismu. Myši byly vystaveny dennímu světlu a nedošlo k žádným projevům fotosenzitivity. Tím se také ftalocyanin také liší od porfyrinových preparátů, kde fotosenzitivita trvá asi 1 měsíc, než dojde k vyloučení preparátu z organismu a je nutné vyhýbat se přímému slunečnímu světlu. Stejně tak i některé preparáty z 2. generace fotosenzitizérů vyvolávají fotosenzitivitu trvající týdny.

- **Nebudou známky poškození tkání ftalocyaninem?**

Z obou léčených skupin i ze skupin kontrolních byl odebrány vzorky z vnitřních orgánů k vyloučení změn vzniklých působením fotosenzitizérů nebo laseru. Žádné takového změny nebyly pozorovány. Nedošlo k poškození tkání působením fotosenzitizérů ani nedošlo k termickému poškození tkání laserem. Univerzálně všechny fotosenzitizéry 2. generace mají minimální nežádoucí účinky a je pro ně typická vysoká koncentrace v tumoru a nízká v ostatních tkáních organismu. To co je vlastní ftalocyaninu je nízká koncentrace v kůži a tím nulová fotosenzitivita.

- **Nedojde k regresi nebo úplné remisi nádoru v kontrolních skupinách?**

Změny objemu nádoru jsme nepředpokládali v kontrolní skupině, která neobdržela žádnou léčbu, zde naopak došlo k rychlé progresi nádoru. Laser je ale používán samostatně k terapii nádorů, kde se využívá jeho termického efektu (např. laserové rekanalizace tumorů rekta nebo laserová terapie kožních nádorů). Žádnou regresi nádorových hmot jsme nepozorovali. Celková energie ozáření při PDT je podstatně nižší než u kurativního použití laseru.

- **Mohl by být ftalocyanin použit v paliativní terapii kolorektálního karcinomu u lidí?**

Závěrečná otázka byla, zda by tedy bylo možno používat ftalocyanin v terapii kolorektálního karcinomu. Ftalocyanin je preparát s vysokou afinitou k buňkám kolorektálního karcinomu s rychle dosažitelnou účinnou hladinou v nádoru, s nulovou fotosenzitivou, bez poškození ostatních tkání. Ftalocyanin patří mezi preparáty s nejrychlejší kumulací fotosenzitizéru v nádoru. Výhodou by byl prakticky zanedbatelný časový interval mezi aplikací a ozářením, v porovnání s ostatními používanými preparáty, kde se jedná o hodiny až dny. Domníváme se tedy, že by ftalocyanin mohl být používán v terapii karcinomu konečníku a střev. Na obrázcích atymických myší je vidět, že PDT i při svém omezeném průniku do tkáně je schopna zlikvidovat poměrně objemné tumory. Musíme se uvědomit, že světlo působí na nádor za všech stran a stejně tak nekróza vzniká na celém povrchu tumoru. Jasnou výhodou by také bylo, že PDT jako proces je nebolestivý a není potřeba použití anestezie. Stejně tak krevní ztráty jsou zanedbatelné. V neposlední řadě mají preparáty ftalocyaninové řady jasně definovanou chemickou strukturu, což se o porfyrinu, kde se vlastní preparát sestává ze 40 různých substancí, nedá říci.

V našem výzkumu jsme prokázali účinek fotodynamické terapie v léčbě kolorektálního karcinomu, čímž jsme zodpověděli základní otázku naší práce. Fotodynamická terapie ftalocyaninem i fotofrinem vede již po první dávce k nekróze nádoru ve vysokém procentu případů. Rozšířili jsme tak další možnosti aplikace PDT. Zatím se jedná pouze o experiment, ale vzhledem k tomu, že PDT je již používána k léčbě zhoubných i benigních onemocnění, věříme, že dojde i ke klinickému použití. Chceme pokračovat v dalším výzkumu a spolupráci s Akademií věd, s Ústavem biofyziky membránového transportu. Spolupracujeme na výzkumu intravenózně a topicky podávaného ftalocyaninu. Topicky aplikované fotosenzitizéry ve formě mastí a gelů by byly pro použití v koloproktologii velmi výhodné. I tyto preparáty dosahují vysoké koncentrace v nádoru v minutových intervalech, takže jejich použití v klinické medicíně by nepředstavovalo výraznější zátěž pro nemocné. V současné době probíhá

jednání s firmou Zentiva a.s. o přípravě ftalocyaninového preparátu, který by byl následně použit v klinických zkouškách. Uvažuje se o jeho použití v terapii kolorektálních nádorů a nádorů kůže.

Pokud tedy shrneme výhody ftalocyaninu proti jiným fotosenzitizérům v léčbě karcinomu, pak je ftalocyanin preparát s vysokou afinitou k buňkám kolorektálních nádorů, s rychlou kumulací v tumoru, s vysokou terapeutickou účinností, s nulovou fotosenzitivitou, s nulovým nežádoucími vedlejšími účinky. Je také aktivován světlem o delší vlnové délce, které tím proniká více do hloubky. (Tab. č. 6)

#### **Tabulka č. 6 Optimální dávkování ftalocyaninu**

<b>Dávka ftalocyaninu</b>	<b>2,5 mg/kg</b>
<b>Vlnová délka použitého světla</b>	<b>675 nm</b>
<b>Interval mezi podáním látky a ozáření</b>	<b>10 minut</b>
<b>Celková energie ozáření</b>	<b>120 J/cm<sup>2</sup></b>
<b>Doba ozáření</b>	<b>8 minut</b>

V klinické praxi by PDT v léčbě kolorektální rakoviny jistě byla nejprve používána k paliativní terapii pokročilých onemocnění. Pokud by se prokázala její účinnost u pokročilých onemocnění, pak se jistě dala používat i v časných stádiích maligních onemocnění střev. Z praxe je ale známo, že odpovídající velikost tumoru v časném stádiu vhodném pro PDT je zachycena zcela ojediněle. I náhodný záchyt nádoru při skríningu již obvykle odhalí objemný nádor. Použití PDT je omezeno penetrací světla do tkáně, ale pokud bychom v jednom cyklu dokázali odstranit 8 mm nádorové tkáně, pak bychom jistě dokázali po opakované aplikaci PDT udržet průchodnost střev i u pokročilé stenózy. Proti laserové vaporizaci se jedná o dvojnásobné množství tkáně, protože laser v jednom sezení odstraní pouze 4 mm tkáně. Další z možností, která by mohla být optimální, je odstranění nádorových hmot

operačně transanálním přístupem elektrokoagulací nebo harmonickým skalpelem a následná PDT na spodinu defektu. Tím by došlo k další redukci maligních buněk na spodině defektu, kde při operačním odstraňování tumoru již hrozí perforace střeva. Technicky by odstraňování stenóz bylo poměrně snadné, protože by se do střeva zavádělo pouze světlovodné vlákno a následná destrukce nádoru by byla výsledkem PDT. Riziko perforace střeva by tedy bylo podstatně nižší. Další výhodou PDT u nádorových onemocnění střev je snadný přístup pomocí koloskopu se světelným zdrojem.

## 6. ZÁVĚRY

Výzkum v oblasti fotodynamické terapie se v posledních letech zaměřuje na vývoj nových fotosenzitizérů, výzkum PDT na molekulární a tkáňové úrovni, využití poznatků fyzikální chemie s cílem zvýšit účinnost fotosenzitizérů, výzkum dozimetrie v organismu, využívání nanotechnologií, využívání vysokoenergetických laserů nebo využívání kombinace dvou laserů s cílem dosáhnout maximálního efektu v aktivaci fotosenzitizéru, využívání ultrazvuku k aktivaci fotosenzitizérů místo světla a využívání tkáňových receptorů k vyšší afinitě fotosenzitizérů k tumoru. Samostatný výzkum se zaměřuje na studium imunitních reakcí provázejících PDT. Uvažuje se o možnosti vyvolání této imunitní reakce při „klasické“ terapii tumorů. Tato léčba by zvýšila imunitní odpověď organismu v boji s nádorovým onemocněním. Výrazných změn v posledních letech také zaznamenaly lasery a světlovodná vlákna v důsledku technologického rozvoje. Všechny uvedené postupy mají za cíl zvyšování účinnosti PDT a tím rozšiřování klinického využití fotodynamiky. Současně s fotodynamikou se pozornost také věnuje fluorescenci, která se již dnes využívá k diagnostice časných stádií maligních i benigních onemocnění.

V dnešní době se fotodynamická terapie používá k léčbě různých nádorových i nenádorových onemocnění v mnoha státech světa. V klinické praxi se již úspěšně fototerapie využívá v onkologii, očním lékařství a zejména v dermatologii. Doménou je v současné době dermatologie, kde se využívá lokální aplikace a snadného přístupu při ozáření. Nespornou výhodou je i velmi dobrý kosmetický efekt. Na druhém místě je oftalmologie v terapii makulární degenerace. V onkologii byla PDT již v klinické praxi vyzkoušena na mnoha nemocných v terapii různých malignit. Zde přes zjevný efekt zůstává tato možnost terapie stále využita minimálně. Na nedůvěře k PDT se jistě podílí nedostatečné zkušenosti v klinické praxi, omezené aplikace s ohledem na velikost tumoru a nutnost opakování PDT při objemných nádorech. Dalším omezením je současná cena fotosenzitizérů a nutnost pořízení laseru. U laserů je dominantním problémem přednastavená vlnová délka, takže laser můžeme použít pouze pro jeden nebo úzkou skupinu fotosenzitizérů. Současný výzkum fotodynamiky již

nepředstavuje pouze klasickou protinádorovou léčbu, která byla po minulá desetiletí hlavní doménou PDT, ale objevují se další možnosti jejího využití, například využití fotodynamického efektu v antibakteriální a antivirové terapii, v terapii aterosklerózy, v desinfekci a sterilizaci, nebo diagnostice chorob a mikrobiálních nákaz.

V naší studii jsme prokázali účinnost PDT s ftalocyaninem v terapii kolorektálních tumorů na zvířecím modelu. Cílem naší práce je snaha nabídnout nové možnosti terapie pacientů s tímto závažným onemocněním v časných stádiích nebo naopak v rámci paliativní terapie v pokročilých stádiích této závažné choroby. Zvláště v pokročilých stádiích je prakticky jedinou možností založení stomie, která je dramatickým zásahem do života nemocného. Méně často připadá v úvahu zavedení stentu, či ošetření nádoru laserem. PDT by představovala další možnost, jak udržet průchodnost nádorové stenózy střeva. PDT nedosáhne kurativního efektu u objemných nádorů nebo v pokročilých stádiích se známkami diseminace, ale může výrazně zlepšit kvalitu života a prodloužit interval přežití.

Mezi hlavní výhody PDT patří: žádné nebo minimální krevní ztráty, není potřeba anestézie a minimální pooperační bolest. Většina výkonů se také provádí jako ambulantní, bez nutnosti hospitalizace. (Tab. č. 7) Úspěch fotodynamické léčby závisí na potvrzení její účinnosti jako samotné terapie nebo v kombinaci s jinou protinádorovou léčbou, kdy výsledný efekt léčby je vyšší než standardně používané postupy.

V kontrastu ke všem současným možnostem protinádorové léčby je výhoda PDT založena na selektivní destrukci tumoru s minimálním poškozením ostatních tkání.

**Tabulka č. 7 Hlavní výhody a nevýhody PDT**

<b>Výhody</b>	<b>Nevýhody</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Široké spektrum použití</li><li>• Minimální invazivita</li><li>• Nízká systémová toxicita</li><li>• Účinek na buněčné i tkáňové úrovni</li><li>• Minimální krevní ztráty</li><li>• Není potřeba anestezie</li><li>• Rychlý efekt léčby</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Omezená penetrace světla do tkáně</li><li>• Nevhodná léčba pro pokročilé a diseminované formy onemocnění</li><li>• Fototoxicita</li><li>• Nutnost opakování PDT u velkých nádorů</li><li>• Cena současných fotosenzitizérů a světlených zdrojů</li></ul>



## 7. SEZNAM LITERATURY

1. Marcus SL, McIntyre WR. Photodynamic therapy systems and applications. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2002 Oct; 7(2):321-34.
2. Nowis D, Makowski M, Stoklosa T, et al. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta Biochim Pol*. 2005; 52(2):339-52.
3. Pervaiz S, Olivo M. Art and science of photodynamic therapy. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2006 May-2006 Jun 30; 33(5-6):551-6.
4. Zimčák, P. Miletín, M. Fotodynamická terapie jako nová prospektivní metoda léčby zhoubných onemocnění. *Česká Slov Farm*, 2004 září, 53, s. 219-224.
5. Alexiades-Armenakas, M. Laser-mediated photodynamic therapy. *Clin Dermatol*. 2006 Jan-2006 Feb 28; 24(1):16-25.
6. Maftoum-Costa, M. Naves, K. T. Oliveira, A. L. Tedesco, A. C. da Silva, N. S. Pacheco-Soares, C. Mitochondria, endoplasmic reticulum and actin filament behavior after PDT with chloroaluminum phthalocyanine liposomal in HeLa cells. *Cell Biol Int.*, 2007 Aug, 32, p. 1024-8.
7. Sugden, J. K. Photochemistry of dyes and fluorochromes used in biology and medicine: some physicochemical background and current applications. *Biotech Histochem*, 2004 Apr., 79, p. 71-90.
8. Sakharov, D. V. Bunschoten, A. van Weelden, H. Wirtz, K. W. Photodynamic treatment and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress result in different patterns of cellular protein oxidation. *Eur J Biochem*, 2003 Dec, 24, p. 4859-65.
9. Mosa M, Zitko M, Pouckova P. Distribution and photodynamic effect of zinc phthalocyanine disulfonate in nude mice bearing mammary carcinoma. *Neoplasma*. 1997; 44(3):178-83.
10. Seitz G, Warmann SW, Armeanu S, et al. In vitro photodynamic therapy of childhood rhabdomyosarcoma. *Int J Oncol*. 2007 Mar; 30(3):615-20.
11. Taub, A. F. A comparison of intense pulsed light, combination radiofrequency and intense pulsed light, and blue light in photodynamic therapy for acne vulgaris. *J Drugs Dermatol*, 2007 Oct, 10, p. 1010-6.
12. Kashtan, H. Haddad, R. Greenberg, R. Skornick, Y. Kaplan, O. A non-laser light source for photodynamic therapy: in vitro effects on normal and malignant cells. *J Med*, 2002, 33, p. 93-104.

13. Kyriazi, M. Alexandratou, E. Yova, D. Rallis, M. Trebst, T. opical photodynamic therapy of murine non-melanoma skin carcinomas with aluminum phthalocyanine chloride and a diode laser. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2008 Apr, 24, p. 87-94.
14. Kruijt B, de Bruijn HS, van der Ploeg-van den Heuvel A, et al. Laser speckle imaging of dynamic changes in flow during photodynamic therapy. *Lasers Med Sci*. 2006 Dec; 21(4):208-12.
15. Mimura, S. Narahara, H. Murakami, T. Otani, T. Hirano, T. Suzuki, K. A new technique for improving visualization of mucosal lesions during endoscopic photodynamic therapy. *Diagn Ther Endosc*, 2000, 6, p. 147-52.
16. Sutedja, T. G. Photodynamic therapy in advanced tracheobronchial cancers. *Diagn Ther Endosc*, 1999, 5, p. 245-51.
17. Geissler, M. Schwacha, H. Eggstein, S. Usadel, H. Harder, J. Opitz, O. Arnold, C. Grimm, C. F./Blum, H. E. [Esophageal carcinoma: non-surgical therapy]. *Praxis (Bern 1994)*, 2004 Dec 1, 93, p. 2057-64.
18. Okunaka, T. Kato, H. Tsutsui, H. Ishizumi, T. Ichinose, S. Kuroiwa, Y. Photodynamic therapy for peripheral lung cancer. *Lung Cancer*, 2004 Jan, 1, p. 77-82.
19. MacCormack, M. A. Photodynamic therapy in dermatology: an update on applications and outcomes, *Semin Cutan Med Surg*, 2008 Mar, 27, p. 52-62.
20. Alexiades-Armenakas, M. Laser-mediated photodynamic therapy of lichen sclerosus. *J Drugs Dermatol*, 2004 Nov-Dec, 3, p. 7-25.
21. Fabris, C. Soncin, M. Mazzon, E. Calzavara-Pinton, P. Lia, F. Giacomo, C. Dei, D. Tampucci, S. Roncucci, G. Jori, G. A novel tetracationic phthalocyanine as a potential skin phototherapeutic agent. *Exp Dermatol*, 2005 Sept, 9, p. 675-83.
22. Jesionek A., von Tappeiner H.: Zur Behandlung der Hautcarcinoma mit fluoreszierenden Stoffen. *Muench. Med. Wochenschr.*, 1903, 47, 1042.
23. Auler H., Banzer G.: Investigations on the role of porphyrins in tumor-bearing humans and animals. *Z. Krebsforsch* 1942: 53, 65-68.
24. Winkelman JW.: The distribution of tetraphenyl porphinesulfonate in the tumor bearing rat. *Cancer Res*. 1962: 22, 589-596.
25. Schein, O. D. Bressler, N. M. Price, P. Photodynamic therapy with verteporfin: observations on the introduction of a new treatment into clinical practice. *Arch Ophthalmol*, 2005 Jan, 123, p. 58-63.

26. Bronshtein, I. Smith, K. M. Ehrenberg, B. The effect of pH on the topography of porphyrins in lipid membranes. *Photochem Photobiol*, 2005 Mar-Apr, 2, p. 446-51.
27. Bonnett R.: Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. *Chem. Soc. Rev.* 24, 1995, 19-33.
28. Riopelle RJ., Kennedy JC.: Some aspects of porphyrin neurotoxicity in vitro. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 60, 1982: 707-715.
29. Winkelman JW., Collins GH: Neurotoxicity of tetraphenylporphinesulfonate TPPS4 and its relation to photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 1987: 46, 801-807.
30. ALA Bourre, L. Giuntini, F. Eggleston, I. M. Wilson, M. MacRobert, A. J. 5-Aminolaevulinic acid peptide prodrugs enhance photosensitization for photodynamic therapy. *Mol Cancer Ther.* 2008 Jun, p. 1720-9.
31. ALA Klein, A. Babilas, P. Karrer, S. Landthaler, M. Szeimies, R. M. Photodynamic therapy in dermatology--an update 2008 *J Dtsch Dermatol Ges.* 2008 Oct. p. 839-45.
32. Regehly M, Greish K, Rancan F, et al. Water-Soluble Polymer Conjugates of ZnPP for Photodynamic Tumor Therapy. *Bioconjug Chem.* 2007 Mar 21; 18(2):494-499.
33. Yslas EI, Durantini EN, Rivarola VA. Zinc-(II) 2,9,16,23-tetrakis (methoxy) phthalocyanine: Potential photosensitizer for use in photodynamic therapy in vitro. *Bioorg Med Chem.* 2007 Mar 30.
34. Kolarova H, Nevrelouva P, Bajgar R, J et al. In vitro photodynamic therapy on melanoma cell lines with phthalocyanine. *Toxicol In Vitro.* 2007 Mar; 21(2):249-53.
35. Li, Y., Pritchett, T. M., Huang, J. Ke, M., Shao, P. Photophysics and nonlinear absorption of peripheral-substituted zinc phthalocyanines. *J Phys Chem A*, 2008 Aug 7, 31, p. 7200-7.
36. Duk S., Biolo R., Love WG., Jori G., Taylor PW.: Localisation of zinc (II)phthalocyanine within implanted tumors after intravenous administration of a liposomal formulation. *Proc. Soc. Photo-opt. Instrum. Eng.* 1995: 2371, 194-197.
37. Bressler N. M. et al. Verteporfin therapy for subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration: four-year results of an open-label extension of 2 randomized clinical trials: *Arch. Ophthalmol.* No. 7,

p. 1283–5.

38. Bisland S. K., Lilge L., Lin A., Rusnov R. and Wilson B C. Metronomic photodynamic therapy as a new paradigm for photodynamic therapy: rationale and preclinical evaluation of technical feasibility for treating malignant brain tumors. *Photochem. Photobiol.* 2004, 80, p. 22–30.
39. Delpy D. T., Cope M., Vanderzee P., Arridge S., Wray S. and Wyatt J. Estimation of optical pathlength through tissue from direct time of flight measurement *Phys. Med. Biol.* 2004, 33, p. 1433–42.
40. Rendon A., Weersink R. and Lilge L. Towards conformal light delivery using tailored cylindrical diffusers: attainable light dose distributions *Phys. Med. Biol.* 2004, 51, p. 5967–75.
41. Gersing E., Kelleher D. K. and Vaupel P. Tumour tissue monitoring during photodynamic and hyperthermic treatment using bioimpedance spectroscopy *Physiol. Meas.* 2002, 24, p. 625–37.
42. Sheng C., Pogue B. W., Wang E., Hutchins J. E. and Hoopes P. Assessment of photosensitizer dosimetry and tissue damage assay for photodynamic therapy in advanced-stage tumors. *Photochem. Photobiol.* 2004, 79, p. 520–5.
43. Diamond K. R., Farrell T. J. and Patterson M. S. Measurement of fluorophore concentrations and fluorescence quantum yield in tissue-simulating phantoms using three diffusion models of steady-state spatially resolved fluorescence *Phys. Med. Biol.* 2003, 48, p. 4135–49.
44. Chen J., Keltner L., Christophersen J., Zheng F., Krouse M., Singhal A. and Wang S. New technology for deep light distribution in tissue for phototherapy *Cancer J.* 2005, 8, p. 154–63.
45. Jezek P, Nekvasil M, Skobisova E, et al. Experimental photodynamic therapy with MESO-tetrakisphenylporphyrin (TPP) in liposomes leads to disintegration of human amelanotic melanoma implanted to nude mice. *Int J Cancer.* 2003 Feb 20; 103(5):693-702
46. Gonzalez-Rodriguez, D. Claessens, C. G. Torres, T. Liu, S. Echegoyen, L. Vila, N. Nonell, S. Tuning photoinduced energy- and electron-transfer events in subphthalocyanine-phthalocyanine dyads. *Chemistry*, 2005 June, 11, p. 3881-93.
47. Verma, S.; Watt, G. M.; Mai, Z., and Hasan, T. Strategies for enhanced photodynamic therapy effects. *Photochem Photobiol.* 2007 Sep-2007 Oct 31; 83(5):996-1005.

48. Pouckova, P. Pospisil, J. Zadinova, M. Jirsa, M. Kodousek, R. Horak, L. Fotodynamická léčba lidských nádorů transplantovaných na atymické nu/nu myši. *Bratisl Lek Listy*, 1991,91, s. 759-63.
49. Juzeniene, A. Peng, Q. Moan, J. Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis. *Photochem Photobiol Sci*, 2007 Dec, 12, p. 1234-45.
50. Busch T. M. Local physiological changes during photodynamic therapy *Lasers Surg. Med.* 2006, 38, p. 494–9.
51. Khurana M., Collins H. A., Karotki A., Anderson H. L., Cramb D. T. and Wilson B. Quantitative in vitro demonstration of two-photon photodynamic therapy using Photofrin R and VisudyneR. *Photochem. Photobiol.* 2004, 83, p. 1441–8.
52. Ferrari M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat. Rev. Cancer*, 2005, 5, p. 161–71
53. Kuroki, M.; Hachimine, K.; Abe, H.; Shibaguchi, H.; Kuroki, M.; Maekawa, et al. Sonodynamic therapy of cancer using novel sonosensitizers. *Anticancer Res.* 2007 Nov-2007 Dec 31; 27(6A):3673-7.
54. Yumita, N. Umemura, S. Sonodynamic antitumour effect of chloroaluminum phthalocyanine tetrasulfonate on murine solid tumour. *J Pharm Pharmacol*, 2004 Jan, 1, p. 85-90.
55. Sharman, W. M. van Lier, J. E. Allen, C. M. Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004 Jan 13, 56, p. 53-76.
56. Vzorov, A. N. Marzilli, L. G. Compans, R. W. Dixon, D. W. Prevention of HIV-1 infection by phthalocyanines. *Antiviral Res*, 2003 Jul, 59, p. 99-109.
57. Zavoral M., Závada F.: Skríňink sporadického kolorektálního karcinomu v České republice. *Čas. Lék. čes.*, 2007, 146, s. 950–954.
58. Špičák J.: Screening kolorektálního karcinomu - realita a perspektivy. *Prakt. Lék.*, 2006, 86, No. 5, s. 254-259
59. Bortlík M.: Chemoprevence, nebo screening kolorektálního karcinomu? *Endoskopie*, 2007, 16, č. 2, s. 31-37
60. Pardini, B.; Naccarati, A.; Novotný, J.; Smerhovský, Z.; Vodičková, L.; Poláková, V., et al. DNA repair genetic polymorphisms and risk of colorectal

cancer in the Czech Republic. *Mutat Res.* 2008; 638 (1-2): 146-53

61. Horák L., Skřička. Paliativní léčba rakoviny konečníku. 2008. p. 79-97, 105-129.
62. Sharkey, F. E. Fogh, J. Metastasis of human tumors in athymic nude mice. *Int J Cancer*, 1979 Dec 15, 24, p. 733-8.
63. Fogh, J. Orfeo, T. Tiso, J. Sharkey, F. E. Fogh, J. M. Daniels, W. P. Twenty-three new human tumor lines established in nude mice. *Exp Cell Biol*, 1980, 48, p. 229-39.
64. Giovanella, B. C. Stehlin, J. S. Williams, L. J. Lee, S. S. Shepard, R. C. Heterotransplantation of human cancers into nude mice: a model system for human cancer chemotherapy. *Cancer*, 1978 Nov, 42, p. 2269-81.

## **Přílohy**

### **Publikace, které jsou podkladem dizertace**

Jan Stukavec, Ladislav Horak, Vitezslav Duchac, Tomas Jirasek, Jan Rakusan, Marie Karaskova , Pavla Pouckova. Comparison of photodynamic therapy with phthalocyanine and photofrin in human colorectal carcinoma. Neoplasma. 2008;55(2):127-9. **IF 1,247**

Stukavec, J. Duchac, V., Horak, L. Pouckova, P. Photodynamic Therapy of a Human Colorectal Carcinoma Cell Line. Photomed Laser Surg. 2009 Feb;27(1):107-10. **IF 1,230**

### **Publikace bez vtahu k tématu dizertace**

Jan Stukavec, Tomas Jirasek, Vaclav Mandys, Ladislav Denemark, Lukas Havluj, Bohuslav Sosna, Markus Kosmahl, Zdena Zadorova. Poorly differentiated endocrine carcinoma and intraductal papillary-mucinous neoplasm of the pancreas: Description of an unusual case. Pathol Res Pract. 2007;203(12):879-84. **IF 0,892**

L. Horak, R. Svec, R. Grill, V. Duchac, J. Stukavec: Comparison of two endoscopic techniques (Nd:YAG laser versus argon plasmatic coagulator). J. Optoelectron. Adv. Mater. Vol. 7, No . 6, December 2005, p. 3219-3222. **IF 1,138**

Horak L., Stukavec J., Grill R.,Kubecova M.,Duchac V. Transrectal stent in endoscopic palliative therapy of malignant stenosis of the rektum. Hepatogastroenterology 2008 Jul-Aug 55, p. 1257-9. **IF 0,904**

Štukavec J., Antoš F., Nosková J.: Použití „napínáčku“ při krvácení z presakrálních plexů. Rozhl. Chir, 2000, č.1, s. 23-24.

Štukavec J., Horák L.: Metastáza maligního melanomu do těla žaludku. Rozhl. Chir, 2004, č.4, s. 195-196.

Štukavec J., Ducháč V., Jirásek T.: Divertikulární onemocnění tenkého střeva – vlastní soubor a kasuistika. Rozhl. Chir, 2005, č. 12, s. 588-592.

Štukavec J., Horák L.:Komplikace operace podle Longa – okluze rekta. Rozhl. Chir, 2006, č. 10, s. 517-520.

Ducháč V., Horák L., Grill R., Štukavec J., Feyereisl K., Otčenášek M., Svoboda B, Krupka M. Řešení syndromu obstruované defekace kombinovanou technikou STARR se zadní vaginální plastikou a levátoroplastikou. Čes. a Slov. Gastroent. 2008: 62 (1) s. 15-18.