

**Jihočeská univerzita v Českých
Budějovicích**

Přírodovědecká fakulta

**Fotodynamická terapie (PDT)
- moderní aplikace**

Bakalářská práce

Eliška Paclíková

Školitel: doc. RNDr. Šárka Klementová, CSc.

České Budějovice 2019

Paclíková E., 2019: Fotodynamická terapie (PDT) – moderní aplikace [Photodynamic therapy (PDT) – modern application. Bc. Thesis, in Czech] – 30 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The Bachelor thesis presents an overview of Photodynamic therapy, PDT, a clinical photochemical method used for tumor treatment.

The thesis elucidates the principle of PDT action mechanism, gives a survey of sensitizers used in PDT and provides examples of PDT application.

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 27. 11. 2019

.....
Eliška Paclíková

Poděkování:

V první řadě bych ráda poděkovala svojí školitelce, paní docentce Klementové, na kterou jsem se mohla kdykoliv obrátit a to nejen při psaní své bakalářské práce, ale i během celého studia. Vždy mi ve všem dobře poradila a kdykoli jsem potřebovala pomoci, byla vstřícná, velmi ochotná, vždy si na mě našla čas a měla se mnou trpělivost. Předala mi zkušené rady a já jí tímto moc děkuji. Velký dík patří i mé nejbližší rodině, která při mě stála a nadále stojí v lepších i horších časech a to nejen během studia. Jsou mi velkou oporou. Děkuji Vám.

Obsah

1. ÚVOD.....	1
2. PRINCIP METODY PDT.....	2
3. FOTOSENZITIZÁTORY POUŽÍVANÉ V PDT.....	6
4. PDT NA ÚROVNI BUNĚK.....	14
5. PDT NA ÚROVNI TUMORU.....	16
6. PŘÍKLADY APLIKACE PDT.....	17
7. PDT A BUDOUCNOST.....	22
8. POUŽITÁ LITERATURA.....	24

1. Úvod

Fotodynamická terapie (photodynamic therapy, PDT) je klinicky schválená terapie některých nádorových onemocnění, založená na fotochemické aktivaci v tkáních rozpuštěného molekulárního kyslíku v přítomnosti speciálních barviv, tzv. senzitizerů. K aktivaci se používá červená část viditelné oblasti elektromagnetického záření (Straten et al., 2017).

PDT metoda byla schválena k terapeutickému využití již před třiceti lety (Straten et al., 2017) a od té doby se neustále vyvíjí. Za posledních deset let zaznamenal vývoj PDT velký nárůst a našel uplatnění u širokého spektra nádorových onemocnění.

Terapeutický potenciál světla se využívá při léčbě více než tisíc let (Straten et al., 2017). Ve starověkém Egyptě, Číně nebo Indii bylo světlo využíváno ve spojení s reaktivními chemikáliemi k léčení svalů, psoriázy nebo rakovin kůže (Ackroyd et al., 2001). V moderních dějinách je přelomový rok 1900, kdy byla několika vědci nezávisle objevena buněčná smrt způsobená kombinací některých chemikálií a světla. Prvním z objevitelů byl Oscar Raab, který při mikroskopickém zkoumání bičíkovců druhu *Paramecium* pozoroval při barvení akridinovými barvivy snížení pohyblivosti v závislosti na délce expozice vůči světlu (Straten et al., 2017). Ve stejném roce přispěl k výzkumu Jean Prime, který pracoval s eosinem, používaným k léčbě epilepsie - perorálně podávaný eosin způsoboval rozsáhlé záněty kůže při expozici kůže slunečnímu záření (Straten et al., 2017). První užití fotodynamického působení je doloženo u Meyera – Betzeho z roku 1913 (Straten et al., 2017), jenž využil ke svému experimentu hematoporfyrin. Po aplikaci na svou vlastní kůži a vystavení světelnému záření pozoroval bolest a otoky. Diamond et al. (1972) publikovali studii uvádějící, že deriváty hematoporfyrinu ve fotodynamické terapii by mohly být využity při léčbě rakoviny, neboť v experimentech na myších byl vyzorován snížený růst gliomu již po několika týdnech aplikace této metody. Během sedmdesátých let minulého století vydláždili Daugherty et al. (1975) cestu pro PDT v té formě, jak je používána dnes – léčba nádorů s použitím hematoporfyrinu a jeho derivátů v kombinaci s červeným světlem, které dobře proniká do živočišné tkáně. Výzkum začal přecházet z experimentálních

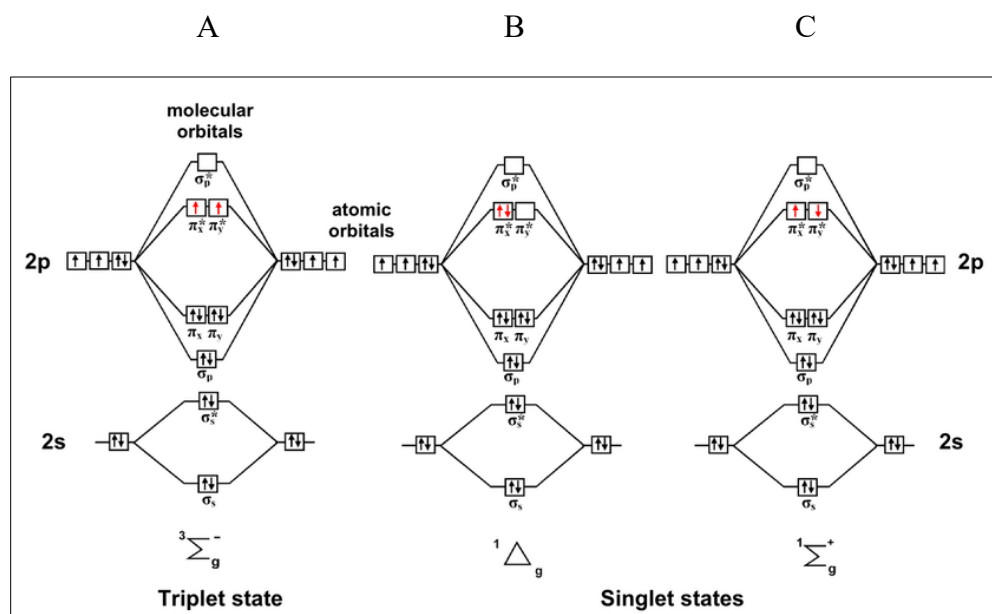
modelů myši na přímé léčení lidské populace. Studie Doughertyho et al. (1978) prezentovala výsledky léčby dvaceti pěti pacientů s mnohačetnými nádory kůže - pozitivní výsledky přinesla léčba devadesáti osmi ze sto třinácti nádorů, částečná odezva pak nastala u dalších třinácti nádorů a pouze dva nádory se jevily jako PDT rezistentní. Právě tyto studie byly klíčové pro první klinicky schválenou léčbu močového měchýře, která byla uskutečněna v Kanadě v roce 1993 (Straten et al., 2017).

2. Princip metody PDT

Fotodynamická terapie je založena na fotochemické tvorbě reaktivních molekul kyslíku (reactive oxygen species, ROS) z molekulárního kyslíku přítomného v tkáních. Hlavní reaktivní molekulou kyslíku v této terapii je tzv. singletový kyslík. K tomu, aby se singletový kyslík tvořil, je zapotřebí přítomnosti tzv. senzitizerů, což jsou obecně organická barviva (Mehraban & Freeman, 2015).

Molekulární kyslík je relativně silným oxidačním činidlem - jeho standardní elektrodový potenciál pro čtyřelektronový přechod na vodu je +1,27 V ve vodném prostředí (Brezonik et al., 2011). Přesto nedochází v přítomnosti rozpuštěného kyslíku k oxidaci organických látek.

Důvodem je molekulární struktura kyslíku, resp. přítomnost dvou nepárových elektronů v jeho molekule, jak vysvětluje teorie molekulových orbitalů (TMO). Na Obr. 1 v části A je ukázána tvorba molekulových orbitalů z atomových orbitalů v molekule kyslíku.



Obr. 1: Molekula kyslíku: základní tripletový stav, A, a dva excitované singletové stavy, B, C (Scholz M., 2011).

Z valenčních orbitalů 2p dvou vázících se atomů kyslíku je vytvořeno šest molekulových orbitalů, které jsou podle stoupající energie seřazeny následovně: vazebný orbital σ_p , vazebné orbitály π_x a π_y o stejné energii, antivazebné orbitály π_x^* a π_y^* též o stejné energii a antivazebný orbital σ_p^* .

Osm valenčních elektronů z původních atomových orbitalů p je v nových molekulových orbitalech uspořádáno podle výstavbového principu analogického pro obsazování atomových orbitalů v atomech. Proto jsou dva elektrony, jež zbývají na antivazebné orbitály π_x^* a π_y^* rozmístěny po jednom do každého z těchto orbitalů. Molekula kyslíku má tedy v základním energetickém stavu dva nespárované elektrony.

Ve spektroskopii je definována tzv. multiplicitu stavu, která se počítá podle vztahu $2S+1$, kde S je celkové spinové číslo molekuly. Jsou-li v molekule dva nespárované elektrony (každý s hodnotou spinového čísla $+\frac{1}{2}$), je $S = 1$ a multiplicita stavu se rovná třem, proto se tento stav nazývá tripletový. Základní elektronový stav kyslíku je vzhledem ke dvěma nespárovaným elektronům stavem tripletovým.

V organických molekulách jsou elektrony v základním stavu spárovány, takže hodnota $S = 0$ a multiplicita stavu je rovna jedné. Tento stav se nazývá singletový.

Pro reakce singletových molekul s tripletovou molekulou na singletové produkty (oxidované organické sloučeniny) platí podle pravidla zachování spinu spinový zákaz. Všechny reakce kyslíku v základním stavu se singletovými molekulami mají velmi vysokou aktivační energii a probíhají měřitelnou rychlostí jen tehdy, když se podaří vytvořit podmínky pro obejití spinového zákazu ať již formou katalýzy ionty kovů či formou aktivace (excitace) kyslíku ze základního stavu tripletového do excitovaného singletového stavu (Lang et al., 2005).

Singletové stavy (tedy stavy se spárovanými elektrony) jsou u molekuly kyslíku dva, jak je vidět v části B a C na Obr. 1. Kyslík v těchto energetických stavech je označován jako singletový kyslík. Singletovému kyslíku nic nebrání v reakci s organickými molekulami, oxidace organických molekul je v jeho přítomnosti velmi rychlá.

Singletový kyslík je možné připravit fotochemicky tzv. fotosenzitizovanou reakcí, tedy v přítomnosti některých organických barviv, nazývaných senzitivátory. Příkladem senzitivátoru je methylenová modř (Cooper & Goswami, 2002), některé ftalocyaniny, hematoporfyrin a jeho deriváty – nejčastěji používaný Photofrin® (Straten et al., 2017).

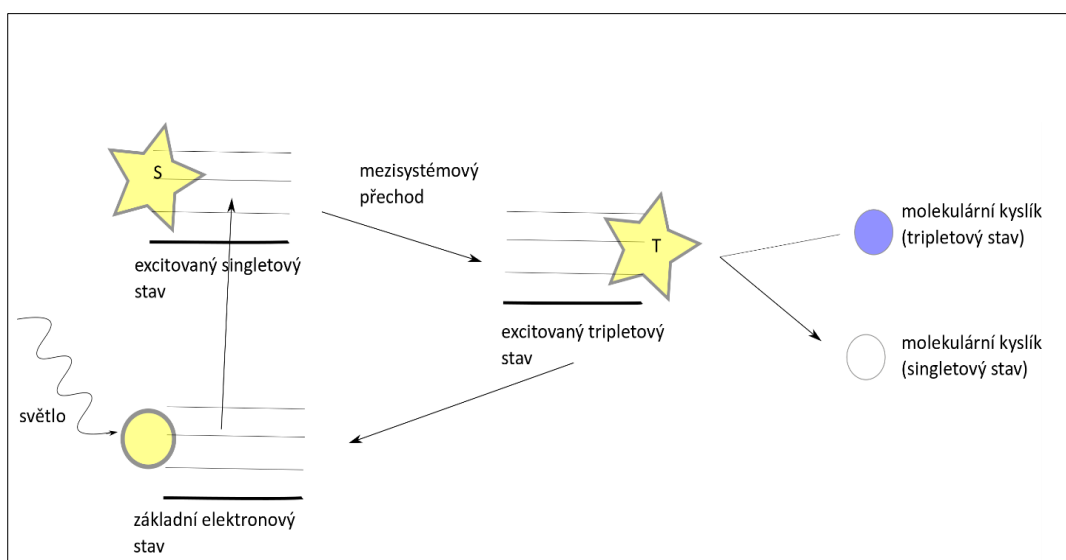
Senzitivátory jsou organické molekuly, tudíž jejich základní energetický stav je stav singletový. Tento stav (základní singletový) je označován S_0 . Pohlcením elektromagnetického záření o vhodné energii (vlnové délce) může být organická molekula excitována do vyššího energetického stavu S_1 . Z takto nestabilního a krátkodobého stavu se senzitivátor vrací do svého počátečního stavu S_0 obvykle tím, že excitační energie je přeměněna na teplo nebo u některých látek tím, že dochází k luminiscenci - fluorescenci (Straten et al. 2017).

Alternativně u některých látek (a právě takové látky se používají jako senzitivátory) dojde k procesu nazvanému mezisystémový přechod (intersystem crossing, ISC), tedy ke změně spinu elektronu (Benov, 2015). Tím

se systém barviva dostane do stavu, kdy jsou dva elektrony nespárované. Vzniklý tripletový stav organické molekuly, označovaný jako T_1 , má relativně dlouhou životnost, v řádu až několika desítek milisekund (Takemura et al., 1989).

Z tohoto tripletového stavu T_1 může senzitivátor přejít zpět do základního stavu vyzářením světla, tzv. fosforescencí, nebo případně kolizí s jinými druhy molekul. Čím delší je životnost senzitivátoru ve stavu T_1 , tím vyšší je pravděpodobnost nárazu na jinou molekulou (Benov, 2015).

Interakcí senzitivátoru v tripletovém stavu T_1 s molekulárním kyslíkem v základním (též tripletovém) stavu, může dojít k přenosu energie z organické molekuly na kyslík, v jejímž důsledku se změní spin jednoho z elektronů kyslíku a tím se stav kyslíku z tripletového změní na singletový. Mechanismus fotosenzitizované tvorby singletového kyslíku je znázorněn na Obr. 2.



Obr. 2: Fotosenzitizovaná tvorba singletového kyslíku.

DeRosa & Cruchley (2002) uvádějí, že molekula senzitivátoru může opakovanou absorpcí světla (excitací) a následným mezisystémovým přechodem a interakcí s molekulárním kyslíkem vyprodukovat tisíc až sto tisíc molekul singletového kyslíku.

Látky sloužící jako fotosenzitizátory mají v mnoha případech tu vlastnost, že se hromadí v rakovinné tkáni víc než v jiných tkáních organismu (Levy, 1994).

Po ozáření rakovinné tkáně vhodným světlem, které je schopno vyvolat excitaci molekul senzitizeru, dojde k produkci molekul singletového kyslíku *in situ* a jejich následné reakci s organickými molekulami (zejména bílkovinami a nukleovými kyselinami) v rakovinné tkáni, čímž dojde k degradaci těchto molekul a tím zničení rakovinné tkáně.

Fotodynamickou terapii lze používat u povrchových nádorů (nádory kůže) nebo u nádorů endoskopicky přístupných (např. nádory hltanu, hrtanu, močového ústrojí).

3. Fotosenzitizátory používané v PDT

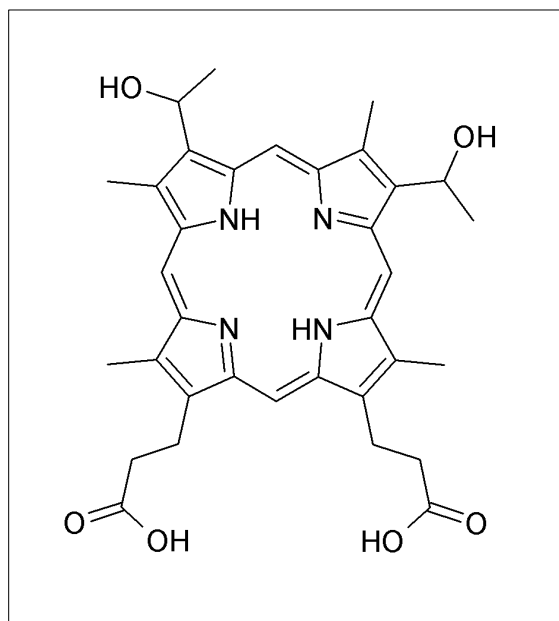
Aby látka mohla být použita jako senzitizer, musí splňovat některé základní požadavky: Senzitizer nesmí být toxický, neměl by způsobovat ani alergické či dráždivé reakce. Mělo by se jednat o dobře definovanou chemicky čistou látku. Podání senzitizeru by mělo být jednoduché. Senzitizer by měl absorbovat světlo ideálně na rozhraní červené části viditelného spektra a krátkovlnné infračervené oblasti spektra (Rosa & de Silva, 2014), kde je penetrace záření do živočišné tkáně největší. Senzitizer by měl mít vysoký kvantový výtěžek tvorby singletového kyslíku. Měl by se z těla rychle vylučovat, aby nepřetrvávala citlivost na světlo. Nezanedbatelná je také stabilita senzitizeru při skladování (Straten et al., 2017).

Fotosenzitizátory pro PDT se dělí do tří generací na základě doby vývoje a jejich vlastností.

Do první generace patří hematoporfyriny a jejich deriváty. Hematoporphyrin je porfyrin připravený z hemu, jeho strukturu ukazuje Obr. 3.

Deriváty hematoporfyrinu jsou získávány acetylací nebo esterovou či etherovou vazbou mezi dvěma hematoporfyrinovými jednotkami (Byrne et al., 1990).

Nejznámějším senzitizerem této skupiny je Photofrin[®], což je směs dimeru a trimeru hematoporfyrinů svázaných éterovou vazbou (Ormond & Freeman, 2013).



Obr. 3.: Struktura hematoporfyrinu.

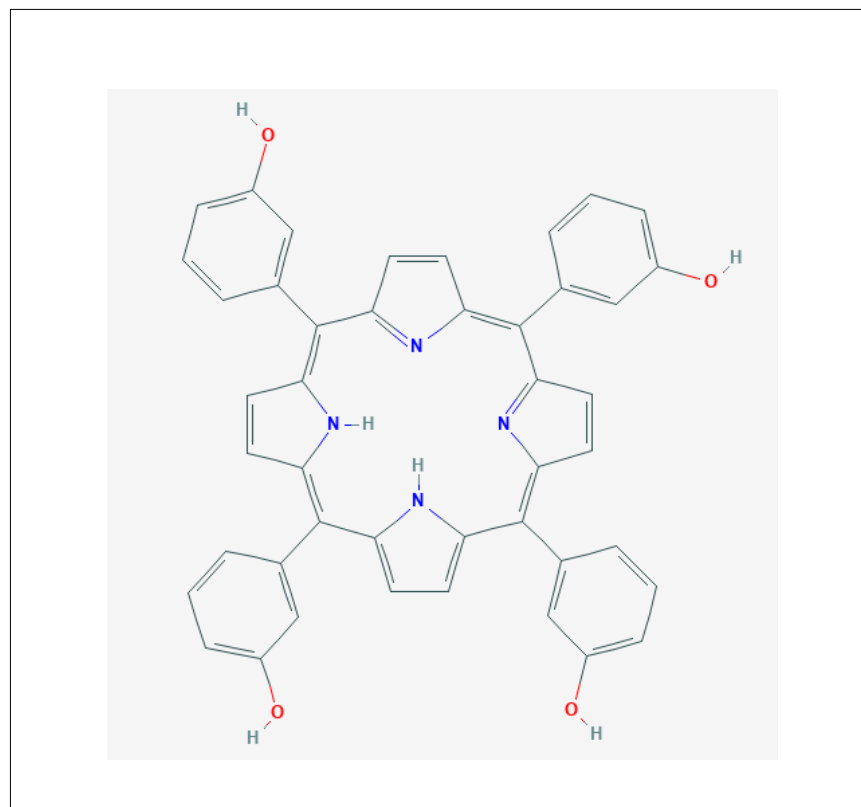
Photofrin má absorpční maximum u 630 nm, kde je efektivní penetrace světla do živočišných tkání relativně malá (2 – 3 mm), takže jeho použití je omezeno na povrchové tumory. Vykazuje dlouhou kožní fototoxicitu (šest až deset týdnů), takže pacienti se musí vyhnout po tuto dobu slunečnímu světlu i silnějšímu umělému osvětlení. Jeho výhodou jsou velké kvantové výtěžky tvorby singletového kyslíku a jeho bezpečnost. Byl povolen pro klinické použití nejprve v Kanadě na rakovinu močového měchýře. Schválení proběhlo na základě důkladné studie, které se zúčastnilo 25 pacientů s mnohačetným výskytem rakoviny kůže. Zaznamenání úspěšné vyléčení bylo pozorováno u 98 z 113 nádorů (Straten et al., 2017). Později byl Photofrin[®] schválen v USA v roce 1995 na rakovinu jícnu, v roce 1998 na rakovinu plic a v roce 2003 na Barrettův jícen. Od té doby se jeho použití rozšířilo na rakovinná onemocnění v oblasti hlavy, krku, břicha, mozku, kůže, prsu a děložního čípku (Ormond a Freeman, 2013).

Přestože se jedná o nejpoužívanější senzitivátor pro léčbu rakoviny, Photofrin® nesplňuje podmínku definované sloučeniny (je směsí molekul) a vykazuje nízkou absorpci světla při vlnové délce s relativně špatnou penetrací světla do tkáně. Pro terapeutický účinek, je zapotřebí dodávat vysoké dávky Photofrinu® (Straten et al., 2017). Všechny tyto nežádoucí aspekty postupně vedly k vývoji druhé generace senzitivátorů.

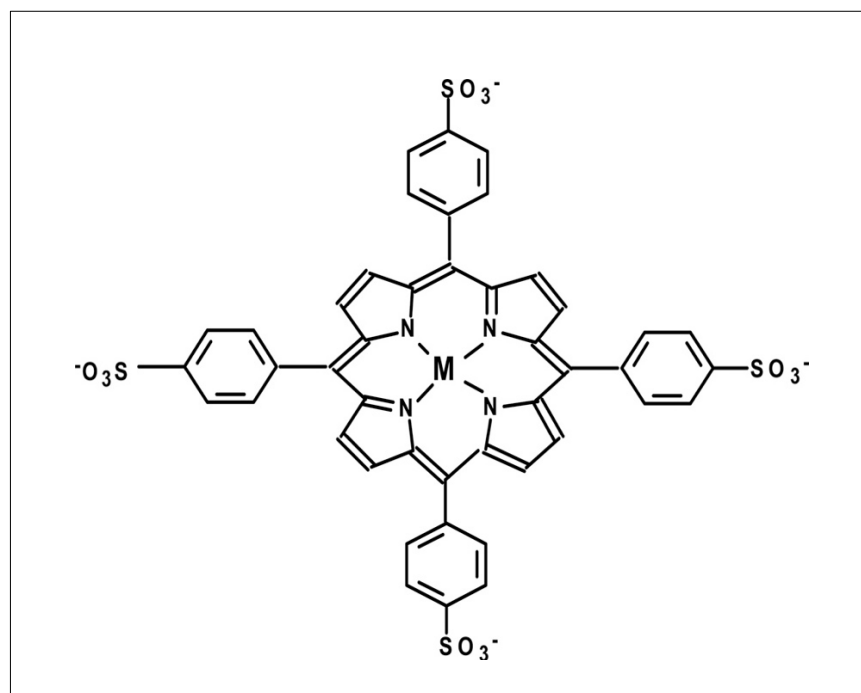
Senzitivátory druhé generace se pokoušely o snížení celkové dávky léčiva a jeho rychlejšího vyloučení z organismu či metabolického odbourání, a to z týdnů na dny (Straten et al., 2017). Fotochemické vlastnosti těchto nových senzitivátorů byly upravovány tak, aby k absorpci světla docházelo při delších vlnových délkách, které lépe pronikají do živočišné tkáně, což umožňuje léčbu nádorů v hlubších vrstvách tkání nebo použití světelných zdrojů o nižším výkonu pro povrchové tkáně (O'Connor et al., 2009).

K senzitivátorům této druhé generace patří velké množství sloučenin různých skupin, např. porfyriny, chloriny, ftalocyaniny, antrachinony, xantiny.

Synteticky připravené porfyriny, např. *m*-THPP, *meta*-tetra(hydroxyphenyl)porphyrin (Obr. 4) a TPPS₄, 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfanato-phenyl)-21H,23H-porphyrin (Obr. 5.), nebyly příliš úspěšné, protože *m*-THPP vykazoval vysokou fototoxicitu na kůži a TPPS₄ zase nízkou fotochemickou účinností (Ormond a Freeman 2013).



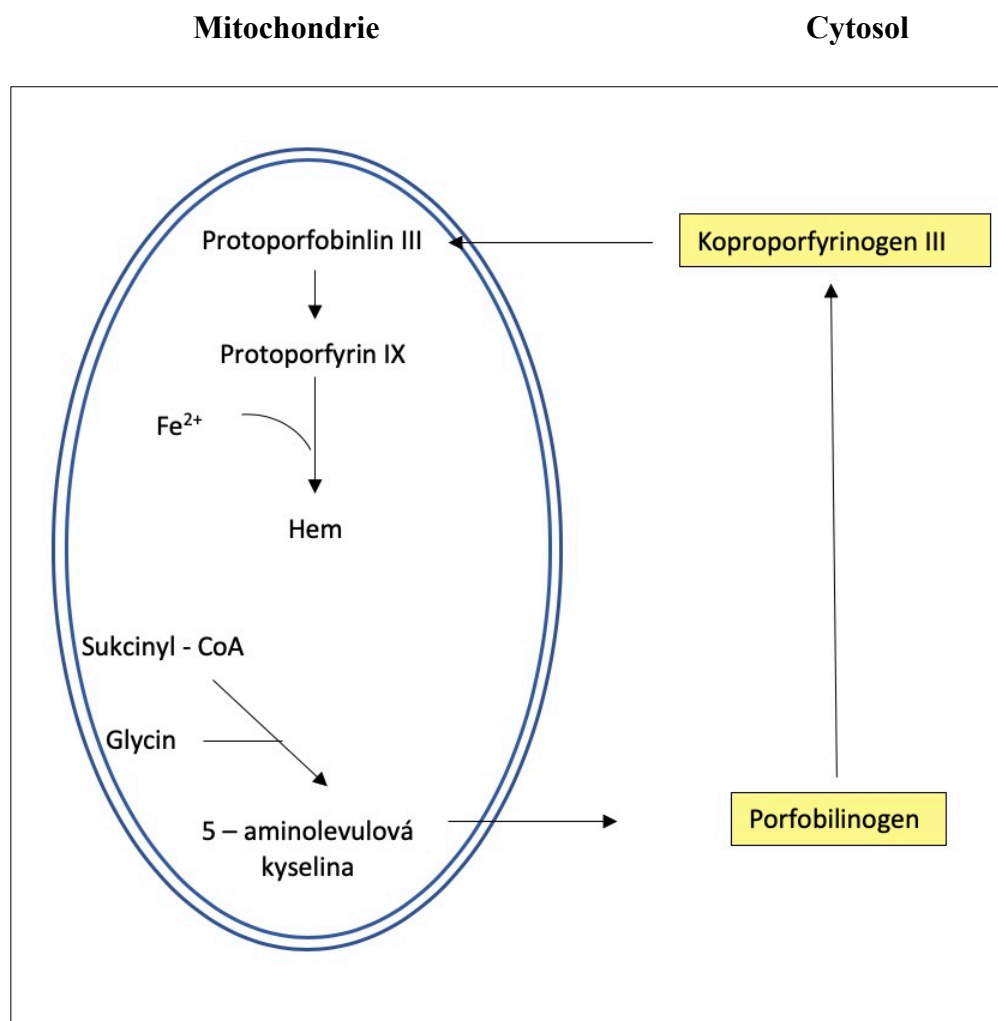
Obr. 4.: Struktura m-THPP, meta-tetra(hydroxyphenyl)porphyrinu (PubChem).



Obr. 5.: Struktura TPPS₄, 5,10,15,20-tetrakis(4- sulfanatophenyl)-21H,23H-porphyrinu (Song et al., 2013).

Velikého aplikačního rozšíření doznalo využití endogenního Photoporphyrinu IX (PpIX), který se v organismu tvoří z exogenní 5-aminolevulové kyseliny (ALA) (Obr. 6), prekursoru tvorby hemu, tvořeného syntézou aminokyseliny glycinu se sukcinylkoenzymem (Hua et al., 2018).

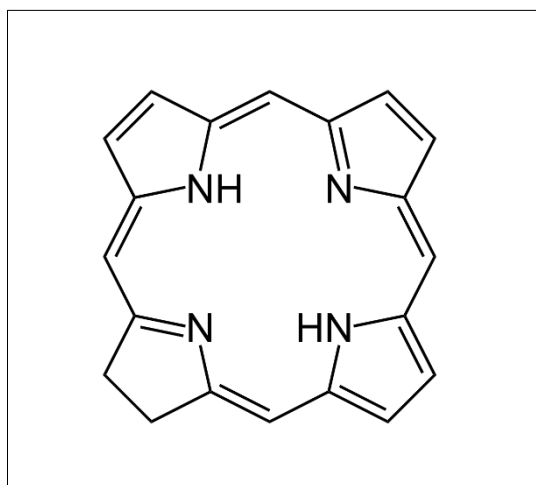
Po aplikaci ALA na kůži dojde k proniknutí do podkožních tkání a tam je ALA enzymaticky transformována na PpIX (Protoporphyrin IX). PpIX se hromadí v mitochondriích, protože jeho přeměna na hem je pomalejší než předchozí kroky (Ormond, Freeman, 2013). Absorpční maximum PpIX je při poměrně krátkých vlnových délkách (630 – 635 nm), ale jeho velkou výhodou je, že je metabolizován v průběhu 48 hodin a tím je značně omezena kožní fotosenzitivita (Juzenienne et al., 2013)



Obr. 6.: Syntéza 5 – aminolevulové kyseliny – dle (Bunn & Forget, 2002).

ALA metylester byl v roce 2004 schválen pro léčbu aktinické keratózy (kožní léze vznikající na místech chronicky vystavovaných slunečnímu záření). Tato látka je též schválena v mnoha evropských zemích, na Novém Zélandu a v Austrálii k léčení superficiálních i nodulárních bazaliomů i epitelových kožních nádorů (Wan & Lin, 2014).

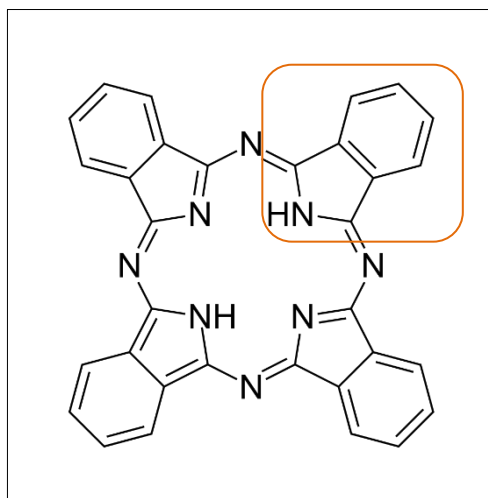
Další skupinou senzitivátorů druhé generace jsou chloriny (Obr. 7). Chloriny obsahují také tetrapyrrol, ale částečně hydrogenovaný na jednom z pyrrolových jader. K absorpci chlorinů dochází při delších vlnových délkách než u porfyrinů (650 - 660 nm) a jsou charakteristické vysokým výtěžkem reaktivních forem kyslíku (Rosa & de Silva, 2014).



Obr. 7.: Struktura chlorinu.

Chloriny jsou schopny vázat se přednostně do nádorové tkáně. U rakovinných buněk je znám Warburgův efekt – zvýšený příjem glukózy oproti zdravým buňkám (Kataoka et al., 2017). Tohoto jevu využili Kataoka et al. (2017) při syntéze zcela nového senzitivátoru, který nazvali G-chlorin. G-chlorin je chlorin konjugovaný se čtyřmi molekulami glukózy. Působí nejen jako senzitivátor, který vykazuje silné protinádorové účinky, ale lze jej využít i při zobrazovacích metodách tumoru, protože G-chlorin při excitaci UV světlem vyzařuje červené světlo a tím umožní pozorování buněk (Kataoka et al., 2017).

Ftalocyaniny jsou též cyklické molekuly složené ze čtyř isoindolových jednotek spojených dusíkovými atomy (Obr. 8).



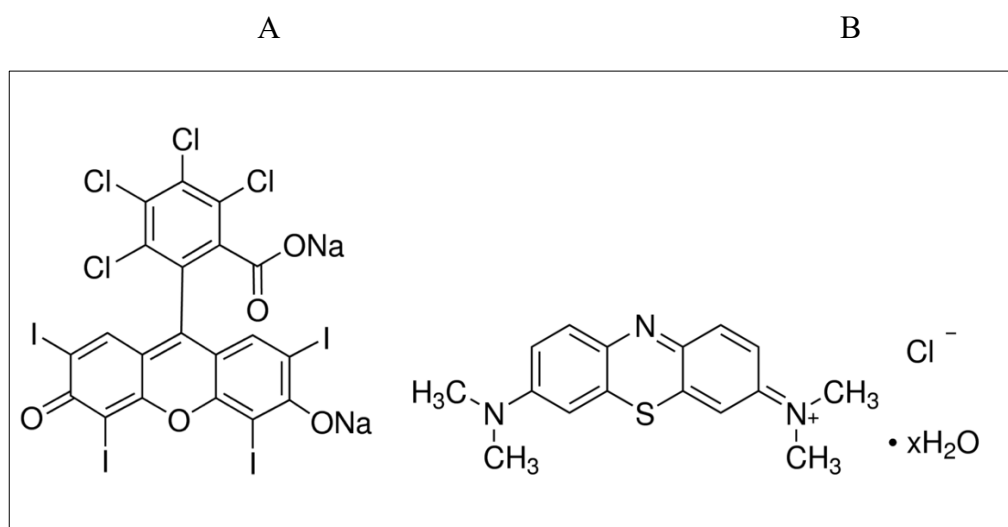
Obr. 8.: Struktura ftalocyaniny – v rámečku isoindolová jednotka.

Velmi často jsou v molekulách ftalocyaninů koordinačně kovalentní vazbou vázány atomy přechodných kovů, jejichž přítomnost zvyšuje pravděpodobnost mezisystémového přechodu (intersystem crossing) a tím tvorbu tripletového stavu barviva (Ormond a Freeman, 2013). Ftalocyaniny mají díky své struktuře absorpci posunutou k delším vlnovým délkám s maximem absorpce 670 – 700 nm (Ormond a Freeman, 2013), což je z hlediska pronikání světla do tkání výrazně vhodnější vlnová délka než např. u Photofrinu[®]. Další výhodou ftalocyaninů je dle Roseho a Silvy (2014) vysoká produkce reaktivních částic kyslíku (ROS - reactive oxygen species). Jejich nevýhodou je, že způsobují fotosenzitivitu kůže po dobu několika týdnů (Ormond a Freeman, 2013).

Tetrasulfoftalocyanin hlinitý (AlPcS₄) byl v roce 2001 schválen v Rusku pro léčbu nádorů žaludku, kůže, rtů, ústní dutiny a opakující se rakoviny prsu. Nyní probíhají klinické studie s dalšími ftalocyaniny.

Xantheny jsou cyklické sloučeniny se třemi kondenzovanými aromatickými kruhy jako v molekule antracenu, přičemž na prostředním kruhu

je jeden nebo více heteroatomů (Rosa & de Silva, 2014). Xantheny jsou senzitivátory, které se neváží k buněčné membráně, ale jsou lokalizovány v cytoplasmě. Příkladem xanthenových senzitivátorů je bengálská červeň (Rose bengal) a methylenová modř, znázorněné na Obr. 9.



Obr. 9.: Struktura – bengálská červeň – A (Sigma Aldrich) a methylenová modř – B (Sigma Aldrich).

Přítomnost halogenu v molekule bengálské červeni zvyšuje účinnost tvorby OH radikálů, senzitivátory na bázi methylenové modři zase vykazují vysokou účinnost mezisystémového přechodu a tedy následně tvorby singletového kyslíku (Ormond a Freeman, 2013). Bengálská červeň je experimentálně využívána u karcinomu prsu a melanomu s metastázemi. Methylenová modř je hodnocena jako významná pro tzv. Graft-versus-host disease (GVHD), která vzniká jako následek imunologické odpovědi na lymfocyty v transfuzní krvi. PDT s methylenovou modří jako senzitivátorem ničí lymfocyty apoptózou (Ormond a Freeman, 2013).

Třetí generaci představují senzitivátory druhé generace modifikované navázáním konjugátů jako jsou protilátky, lipozomy nebo některé malé molekuly. Důvodem modifikace je zlepšení fyzikálních, chemických a terapeutických vlastností a to zejména zvýšení selektivity senzitivátoru

k tumorózní tkáni oproti zdravé tkáni, zvýšení jeho afinity k nádorové tkáni a zlepšení specifické vazby na nádorovou tkáň (Josefsen a Boyle, 2008).

4. PDT na úrovni buněk

Odpověď buňky na fotodynamickou terapii, tedy odumření ošetřené tkáně, závisí na mnoha faktorech jako je například koncentrace kyslíku ve tkáni, chemické vlastnosti fotosenzitizátoru, vlnová délka použitého světla, ale především lokalizace senzitivizátoru (Benov, 2015; Straten et al., 2017) a jeho dávce (Kessel et al., 1995). Ten se může vázat k různým buněčným organelám – plazmatické membráně, lysosomům, mitochondriím, Golgiho aparátu či endoplazmatickému retikulu (Straten et al., 2017). Po ozáření tkáně se senzitivizátorem dochází k senzitivizované tvorbě singletového kyslíku a do jisté míry i dalších reaktivních částic obsahujících kyslík, které mají silné oxidační účinky. Oxidace tkáňových struktur těmito nespecifickými oxidačními částicemi vede k destrukci tkáně na různých buněčných úrovních. K letálním mechanismům způsobeným fotodynamickou terapií patří všechny tři hlavní cesty buněčné smrti – apoptóza, nekróza a autofagie (Saini & Poh, 2013).

Apoptóza je obecně spouštěna řadou několika faktorů: poškozením DNA, ozářením, reaktivními částicemi obsahujícími kyslík či zvýšenou vnitrobuněčnou hladinou vápníku. Tyto stimuly mají vliv na funkci mitochondrií, které jsou považovány za klíčové regulátory apoptózy a to při aktivaci kaskády kaspáz, což jsou cysteinové proteázy (Susin et al. 1998; Wyld et al., 2001). PDT může interagovat s řadou z těchto metabolických cest.

Dávka senzitivizátoru může ovlivňovat cesty buněčné smrti tak, že při malých dávkách jsou mechanismy apoptózy aktivovány, zatímco při větších dávkách je poškozen samotný mechanismus apoptózy a dochází k nekróze (Kessel et al. 1995; Wyld et al., 2001).

PDT, při níž dochází k vazbě použitého senzitivizátoru na mitochondrie, se řadí mezi nejúčinnější protinádorovou terapii, která vyvolá okamžitou buněčnou odpověď. Studie Benova (2015) uvádí, že fotosenzitivizátory vázané na mitochondriální membrány jsou při zabíjení buňky mnohem účinnější než

ty, které se pojí k jiným buněčným organelám. Při zachování stálých podmínek spouštějí fotosenzitizátory, které se navazují na mitochondriální membrány uvnitř buňky apoptickou destrukci. Apoptóza vzniká následkem oxidačního stresu, který je vyvíjen na buňku působením ROS a superoxidovaným aniontem – vzniká jako sekundární produkt, který vede k destrukci transportního řetězce elektronů a rozptýlení potenciálu z mitochondriální membrány (Benov, 2015).

Senzitizátory, které se váží na lysosomy a indukují mírné oxidační poškození tkáně, způsobují apoptózu. Naopak rozsáhlé poškození fotosenzitizátorem na plazmatické membráně blokuje program apoptózy, čímž dochází k aktivaci nekrotického systému (Benov, 2015). Lokalizace senzitivátoru na Golgiho komplexu spouští nekrózu. Závažné poškození buňky zablokuje produkci ATP – a donutí buňku k sebepoškození nekrozou (Benov, 2015).

Stejný fotosenzitizátor může spustit apoptózu i nekrotickou reakci. Hlavním faktorem při autofagii jsou opět výše dávky PDT a lokalizace senzitivátoru.

Buňka má schopnost degradovat poškozené orgány pomocí tvorby autofagosómu – struktury s dvojitou membránou a lysozomů, které degradují buněčný obsah. Autofagie byla pozorována jako reakce buněk při PDT (Straten et al., 2017). Z toho lze soudit, že pokud jsou apoptotické dráhy poškozeny a nemůže tak docházet k procesu apoptózy, ale koncentrace senzitivátoru a intenzita světla nejsou tak vysoké, aby vyvolaly nekrózu, je autofagie hlavní proces zodpovědný za buněčnou smrt (Straten et al., 2017).

Pro vyhodnocení terapeutického výsledku PDT a zjišťování typu buněčné smrti se od samého zavedení PDT používaly moderní zobrazovací techniky jako počítačová tomografie (CT), pozitronová emisní tomografie (PET), magnetická rezonance (MRI), fluorescence s využitím speciálních fluorescenčních proub a některé další (Celli et al., 2010). Ve všech případech se provádělo zobrazení tkáně před zákrokem i po něm.

5. PDT na úrovni tumoru

Fotosenzitizátory jsou přijímány stejným způsobem jak u zdravých tak i u nádorových buněk. Zdravé tkáně jsou schopny eliminace přijatého senzitivátoru. Nádorové buňky mají poškozenou funkci a nejsou schopné zbavovat se nahromaděných senzitivátorů (Straten et al., 2017). Tím dochází k nárůstu množství senzitivátoru v nádorových buňkách. Obecně je známo, že nádorové buňky mají odlišný metabolismus a zvýšené požadavky na příjem živin a energie, tj. glukózy. Tvorba ATP v nádorových buňkách vzrůstá a naopak klesá produkce mitochondriální glykolýzy. Po použití metody PDT dochází v rakovinové buňce k procesu hypoxie v důsledku snížení cévního zásobení tumoru a tím úbytkem kyslíku v buňce. Buňce chybí faktory pro základní životní podmínky. Smrt nastává po zahájení imunitní reakce, kdy organismus rozeznává buňky poškozené fotodynamickou terapií a následně je odstraňuje fagocytózou makrofágy. V důsledku neustálého a nekontrolovatelného růstu nádorových buněk dochází ke vzniku abnormálních morfologických tvarů buňky a k poškození vnitřní struktury (Straten et al., 2017). Makromolekuly v buňkách jsou stěsnané a dostávají se do extravaskulárního prostoru (Straten et al., 2017).

S vývojem rakoviny úzce souvisí vytváření nových cév k prokrvení tkáně. Poškození stávající struktury v nádorové buňce vede k její destrukci a tím inhibici tvorby nových cév (Straten et al., 2017). Poškození vaskularity se zvyšuje při zkrácení intervalu mezi podáním fotosenzitizátoru a ozáření tkáně (Fingar et al., 1999) PDT nejprve poškozuje endoteliální buňky, což způsobuje jejich vzájemné odtažení a vznik volného prostoru mezi endoteliálními buňkami a podkladovou tkání (Straten et al., 2017). Při rozsáhlém poškození struktury produkují endoteliální buňky koagulační faktory, např. glykoproteiny, které aktivují krevní destičky a dochází ke vzniku trombu a cévy se uzavírají. Neprůchodnost cév vede k hypoxii a zastavení přívodu živin a krve do orgánu (Straten et al., 2017).

Spuštění imunitní reakce je další krok, který se uplatňuje při destrukci nádoru. Oxidační stres v buňce zvyšuje expresi proteinů tepelného šoku, tj. proteinů zodpovědných za univerzální stresovou odpověď buňky v extrémních podmínkách, ve kterých buňka těžce přežívá. Vznikající reakce souvisí

s proliferací zánětlivých cytokinů a spouštěním zánětlivé reakce (Elenkov & Chrousos, 2006). Během buněčné lýzy se uvolňují buňky spojené s imunitní reakcí – makrofágy, lymfocyty a dendritické buňky (Straten et al., 2017). Imunitní buňky hrají důležitou roli při odstraňování buněčných zbytků a podpoře při hojení tkáně. Fotodynamická terapie spouští v buňkách akutní zánětlivou reakci. Ta vede k fagocytóze odumírajících apoptotických a nekrotických buněk. V čele fagocytární dráhy stojí dendritické buňky, které odklízejí buněčné zbytky a odumřelé tkáně. Zralé dendritické buňky mají schopnost prezentovat antigeny a aktivovat T-lymfocyty. Následuje reakce antigen prezentujících dendritických buněk s pomocnými CD4 buňkami, které následně aktivují toxické CD8 (CTL) T-lymfocyty. Cytotoxické buňky rozpoznávají nádorové buňky a vyvolávají protinádorovou imunitní reakci (Straten et al., 2017).

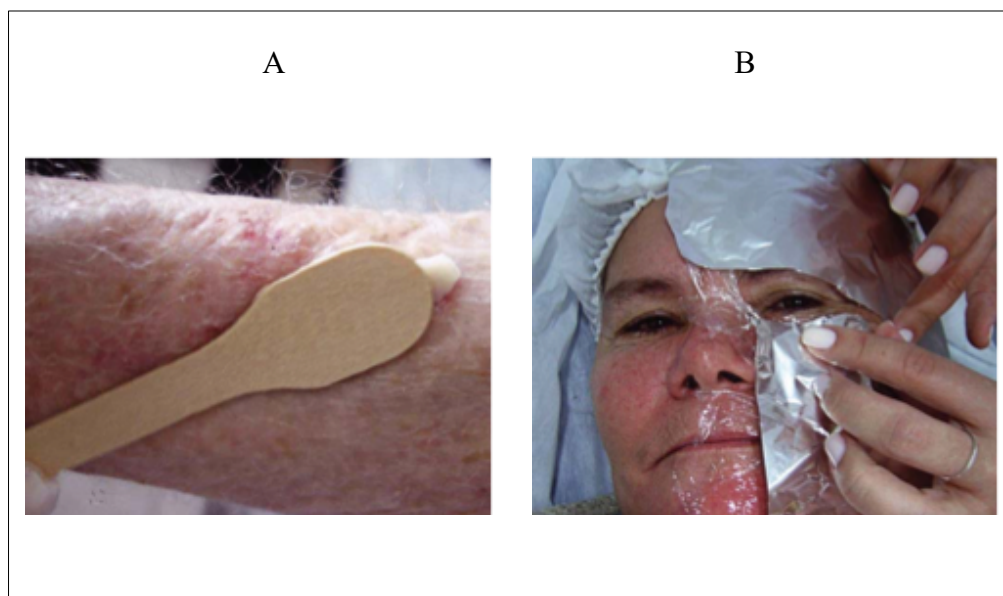
6. Příklady aplikace PDT

Předpoklad úspěšné léčby spočívá ve správné přípravě cíleného místa na kůži. Postup je podrobně popsán v práci Issy & Manela-Azuly (2010). Před zákrokem by měla být kůže dokonale očištěna, k tomu se používá obvykle alkohol na vatovém tampónu. Následuje případné odstranění poškozené tkáně na povrchu ošetřovaného místa pomocí kyrety. Suchou gázou je ošetřena krvácivá rána a je aplikován fotosenzitizátor, resp. jeho prekurzor (5-ALA), ve formě krému naneseného v tenké vrstvě cca 1 mm (Obr. 10). Nanesený přípravek se nechá působit cca tři hodiny, během této doby je postižené místo zakryto hliníkovou fólií kvůli ochraně zdravé tkáně v okolí nemocného místa před denním světlem.

Zbytek krému je po třech hodinách odstraněn z pokožky pomocí suché gázy nebo fyziologického roztoku a nemocná tkáň (s dobře zakrytou okolní zdravou tkání) je vystavena expozici červeného světla o vlnové délce 635 nm a celkové dávce energie 37 J/cm².

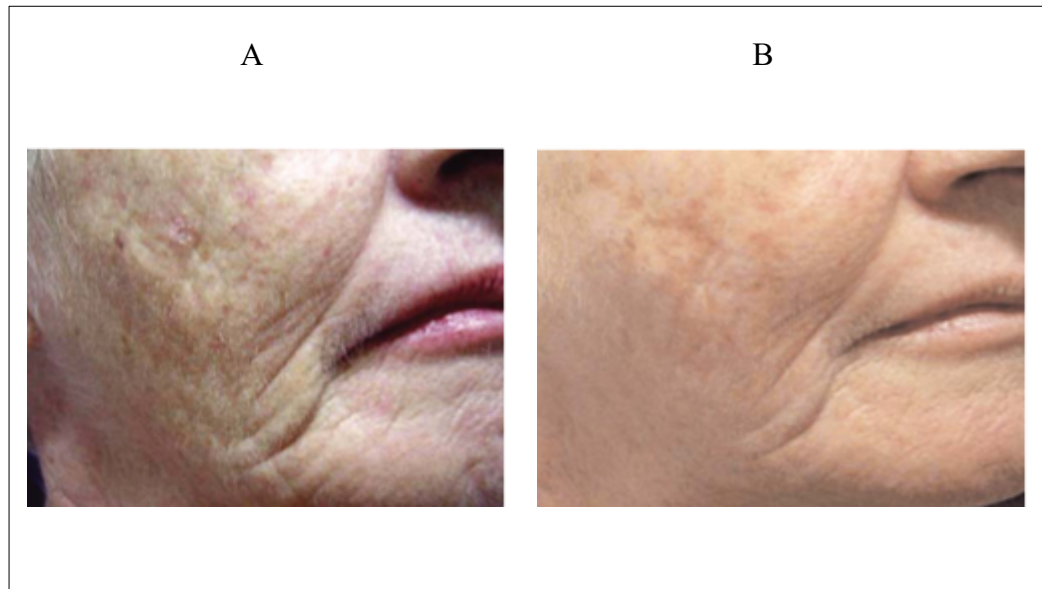
Počet dávek u jednotlivých typů nádorových onemocnění se může výrazně lišit, léčba probíhá obvykle ve dvou fázích, přičemž druhá fáze následuje po uplynutí 3 měsíců od první léčby v případě aktinické keratózy a

pouze jednoho týdny u bazoliomu či Bowenovy choroby,tj. karcinomu v povrchové vrstvy kůže (Issa & Manela – Azulay, 2010).



Obr.10: Aplikace kyseliny aminolevulové pomocí dřevěné špachtle, A a nanesení ochrany senzitizeru pomocí hliníkové fólie, B (Issa & Manela – Azulay, 2010).

U aktinické keratózy (Obr. 11), což jsou hrubé tmavé skvrny na kůži, která byla nadměrně vystavovaná slunečnímu záření, a z níž se může vyvinout nádorové onemocnění, je lokální léčbou dosaženo v 73 – 100% úspěšného odstranění těchto skvrn (Issa & Manela – Azulay, 2010).



Obr. 11: Aktinická keratóza před použitím metody PDT, A a stejná tvář po třech měsících léčby aktinické keratózy, B (Issa & Manela – Azulay, 2010).

Bazaliom, karcinom bazálních buněk, se řadí mezi nejběžnější maligní nádorová onemocnění kůže, neboť činí více než 70% těchto onemocnění (Issa & Manela – Azulay, 2010). Kvůli omezené penetraci světla do tkání by neměla tloušťka nádorového novotvaru přesáhnout 3 mm, aby došlo ke kompletnímu zhojení (Issa & Manela – Azulay, 2010). Hlavními výhodami pro PDT léčbu maligních nádorů kůže jsou zkrácení doby zotavení po provedeném zákroku, vynikající kosmetické výsledky, vysoké procento (až 95%) vyléčených pacientů a úspěšnost léčby u starších pacientů (Issa & Manela – Azulay, 2010).

Fotodynamickou terapii lze využít při nemaligních onemocněních kůže, např. následků změn, které jsou spojeny s obdobím puberty a hormonální nestabilitou. Mechanismus PDT zahrnuje proces fotodestrukce, při kterém dochází ke zmenšení mazových žláz a k celkovému snížení sekrece mazu (Issa & Manela – Azulay, 2010). V tomto případě je 5-ALA, tedy prekurzor fotosenzitizátoru PpIX, podávána pacientům perorálně ve formě tablet o dávce 10 mg/kg (Issa & Manela – Azulay, 2010). Čtyři hodiny po podání ALA kyseliny dochází k ozáření polychromatickým světlem s maximem vyzařovaného výkonu u vlnové délky 630 nm (Issa & Manela – Azulay, 2010). Inkubační doba, tj. doba potřebná k dokonalé penetraci fotosenzitizátoru do

tkáně, se uvádí v rozmezí mezi 15 minutami až třemi hodinami podle typu onemocnění (Issa & Manela – Azulay, 2010).

Kromě dermatologických aplikací je PDT hojně používaná i v případech onemocnění v oblasti hlavy a krku.

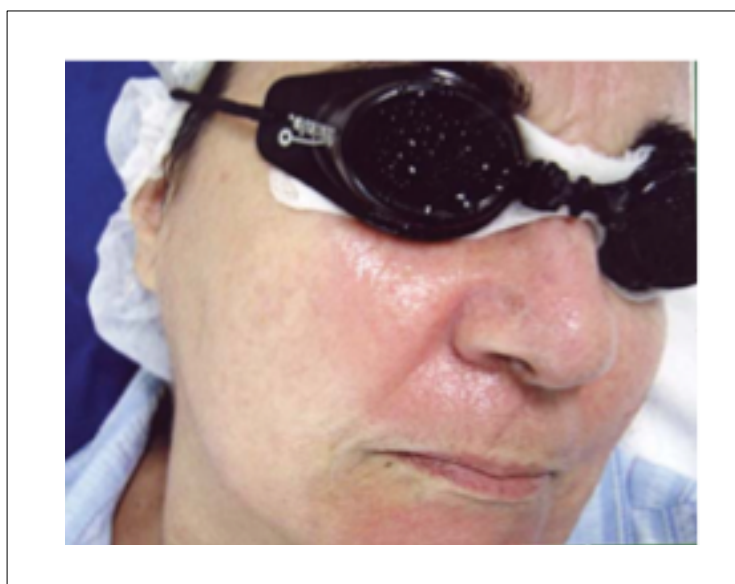
Do oblasti hlavy a krku se řadí nádory v dutině ústní, hltanu a hrtanu. Výskyt novotvarů způsobuje problémy s dýcháním, znemožňuje polknutí a tím i příjem potravin (Issa & Manela – Azulay, 2010). Chirurgické zákroky jsou invazivní a pro pacienta často smrtelné - až z 50% (Issa & Manela – Azulay, 2010). Metoda PDT se jeví jako vhodnější, má ovšem své uplatnění pouze při výskytu povrchově rostoucích karcinomů jako jsou karcinom bazálních buněk či spinocelulární karcinom. Použití PDT v časném stádiu vede obvykle k dobrému klinickému i kosmetickému výsledku bez prodloužené citlivosti kůže na světlo (Issa & Manela – Azulay, 2010).

Jak uvádějí Ferlay et al. (2015), byla rakovina jícnu v roce 2012 šestou nejčastější příčinou úmrtí na rakovinu na světě. Zhoubný novotvar se tvoří buďto v horní a střední části jícnu (tzv. jícnový skvamocelulární karcinom buněk) nebo je postižena dolní oblast jícnu, kde svým výskytem převládá adenokarcinom. Skvamocelulární karcinom má častější výskyt než adenokarcinom. Nádor lze chirurgicky odstranit i tehdy, když se jedná o rozsáhlý nádor, ale jedná se o metodu s vysokým procentem úmrtnosti po provedeném zákroku (Straten et al., 2017). Fotodynamická terapie se ukázala jako účinná metoda při léčbě běžných lézí, které nepřesahují velikosti 3 cm (Straten et al., 2017). Léčba pomocí PDT nepředstavuje pro pacienty takovou hrozbu jako samotný chirurgický zákrok (Straten et al., 2017).

Metoda fotodynamické terapie se dnes využívá při léčbě dalších onemocnění různého typu včetně některých zánětlivých, infekčních a imunologických onemocnění. Do těchto skupin spadají onemocnění různého druhu – virové bradavice, psoriázy (Issa & Manela – Azulay) či mykóz, lanshamsiazy nebo lidského papillomaviru (Wan & Lin, 2014).

Během ošetření PDT metodou dochází u pacientů k pocitu pálení či svědění na postiženém místě. Tkáň je poškozená reaktivním kyslíkem, což vede k podráždění nervového stimulu (Issa & Manela – Azulay, 2010). Vedlejší

účinky léčby se začínají projevovat v prvních minutách po začátku ošetření a přetrvávají i několik hodin, např. otok v okolí ozářeného místa (Obr.12). Za použití ALA kyseliny se může u pacientů objevit pocit zvracení a nevolnost, jelikož dochází k přechodným změnám ve složení jaterních enzymů (Issa & Manela – Azulay, 2010). Při použití vysoké dávky světla zároveň může ve vzácných případech docházet až ke vzniku puchýřů, vředů nebo zahájení nekrotického procesu tkáně již v průběhu ozařování (Issa & Manela – Azulay, 2010). Před použitím fotodynamické terapie by mělo dojít ke zvažování, zda pacient není alergický na některý z řady fotosenzitizátorů a případně volbě jiného, vhodnějšího senzitizeru, který nepovede u pacienta k alergickým reakcím (Issa & Manela – Azulay, 2010).



Obr.12: Otok vzniklý ihned po použití fotodynamické terapie (Issa & Manela – Azulay, 2010).

7. PDT a budoucnost

Z vlastních zkušeností vím, že pacientů, kteří trpí některým z nádorových onemocnění, neustále přibývá. Onemocnění, na které dříve umírali tisíce lidí jsou dnes již pomalu minulostí. Zato se neustále zvyšuje počet výskytů rakoviny, v jakékoliv části těla. Náš zdravotní stav odráží životní styl, který žijeme (a který je pro každého jedince individuální. Sedavý způsob života, neustálý stres v dnešní novodobé společnosti, přejídání, kouření a častý alkoholismus, to všechno jsou faktory, které prohlubují nežádoucí děje v jednotlivých buňkách našeho těla. Obyvatelé České Republiky nejčastěji trpí kolorektálním karcinomem nebo rakovinou prostaty. Na zdravotním stavu se také značnou měrou podílí prostředí, v němž žijeme, tj. čistota ovzduší, přísady používané v potravinářství a mnohé další.

I v důsledku zlepšujících se životních podmínek a z toho plynoucí vyšší doby dožití patří v civilizovaných zemích rakovinná onemocnění k velmi častým onemocněním a i přes pokroky medicíny jedním z hlavních příčin úmrtí.

Budoucnost vývoje metody PDT a najetí vhodné léčby, která by dokázala jednou pro vždy zachránit tisíce pacientů před onemocněním rakoviny je klíčová a hraje velmi důležitou roli. Vzhledem k šetrnému zacházení s ošetřovaným místem při fotodynamické terapii a snadném použití ve spojení s jinými účinnými terapiemi – chirurgický zákrok, chemoterapie a radioterapie, je PDT v současné době nejlepší volbou pro výzkum a následnému léčení rakovinového onemocnění.

Fotodynamická terapie ještě stále nebyla zahrnuta do kritérií standardní péče, která by měla být pacientovi poskytována (Straten et al., 2017), neboť studie týkající se právě PDT nebyly zcela dokončeny – nedostatek pacientů, kterým byla podána PDT metody. V současné době se fotodynamická terapie využívá pouze jako léčba záchranná, aplikovaná v nejnutnějších případech – při selhání předchozí léčby nebo při opakujícím se onemocnění (Straten et al., 2017).

Klíčovým momentem je využití PDT metody při léčbě hlavy a krku. Tato oblast spadá do kritických míst při léčbách nádorového onemocnění. Fotodynamická terapie má stejně srovnatelné výsledky léčby jako chirurgický

zákrok u menších lézí (Straten et al., 2017). Hlavní překážkou pro rozvoj PDT po ukončení studií je finanční náročnost na zprovoznění metody a její momentální nedostupnost v klinických zařízeních, neboť většina nemocnic je vybavena lépe dostupnými přístroji k použití radioterapií (Straten et al., 2017).

Budoucí studie se zaměří zejména na snížení vedlejších účinků při použití fotosenzitizátorů a budou zkoumat, jaká dávka je pro pacienta nejvíce přínosná. Hlavním vedlejším účinkem při použití fotosenzitizátoru první generace u PDT terapie se uvádí nedostatečné pronikání světla do tkání a příliš zdlouhavá rekonvalescence pacientů po ozáření světlem (Straten et al., 2017). U senzitivátorů druhé generace se zase objevuje zdlouhavá rekonvalescence pacientů po ozáření světlem (Straten et al., 2017). Novodobější fotosenzitizátory již vykazují sníženou citlivost kůže po ozáření a rychlejší rekonvalescenci pacientů (Straten et al., 2017). Pro budoucí využití fotosenzitizátorů v klinických zařízeních bude nutné zavést standardizovaný postup pro léčbu (Straten et al., 2017).

Pro zlepšení penetrace tkáně při léčbě PDT se začíná užívat rozšířená metoda iPDT – optického vlákna, která vede světlo hlouběji do napadených tkání tumorem (Straten et al., 2017). Cílem moderních výzkumů je zjistit optimální rozložení vláken při použití metody (Straten et al., 2017).

Studie prováděné ke zlepšení fotodynamické terapie a reakce pacientů na její použití nabývají na důležitosti s rostoucím počtem nádorových onemocnění. Fotodynamická terapie se jeví jako jedna z nejvíce účinnějších a zároveň nejšetrnějších metod k odstraňování maligních onemocnění (Straten et al., 2017).

8. Použitá literatura

Ackroyd, R.; Kelty, C.; Brown, N.; Reed, M. (2001): The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, **74**(5), 656–69.

DOI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11723793> - staženo 17. 11. 2019

Agrwal, M. L.; Clay M. E.; Harvey E. J.; Evans H. H.; Antunez A. R.; Oleinick N. L. (1991): Photodynamic Therapy Induces Rapid Cell Death by Apoptosis in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. *Cancer Research.*, **51**, 5993-5996.

DOI: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/51/21/5993.full.pdf> - staženo 19. 11. 2019

Bacellar, I.O.; Tsubone, T.M.; Pavani, C.; Baptista, M.S. (2015): Photodynamic efficiency: From molecular photochemistry to cell death. *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 20523–20559.

DOI: <https://www.mdpi.com/1422-0067/16/9/20523> - staženo 20. 11. 2019

Benov, L. (2015): Photodynamic Therapy: Current Status and Future Directions. *Medical Principles and Practice.*, **24** (suppl 1):14–28.

DOI: <https://doi.org/10.1159/000362416> - staženo 20. 11. 2019

Brezonik, P.L.; Arnold, W.A. (2011): Redox Equilibria and Kinetics. *In Water chemistry, Oxford University Press Inc., New York.*

Bunn & Forget. (2002): – syntéza 5 – aminolevulová kyseliny.

DOI: <https://sickle.bwh.harvard.edu/hbsynthesis.html>

Byrne, C. J.; Marshallasay, L.V.; Ward, A.D. (1990): The composition of Photofrin II.

J. Photochem. Photobiol., B: Biology **6**, 13-27.

Celli, J.P.; Spring, B.Q.; Rizvi, I.; Evans, C.L.; Samkoe, K.S.; Verma, S.; Poque, B.W.; Hasan, T. (2010): Imaging and Photodynamic Therapy: Mechanisms, Monitoring and Optimalization. *ACS Publications*, **110**(5), 2795-2838.

DOI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20353192> - staženo 3. 11. 2019

Cooper, A.; Goswami, D. Y. (2002): Evaluation of Methylene Blue and Rose Bengal for Dye Sensitized Solar Water Treatment. *Journal of Solar Energy Engineering*, **124**(3).

DOI:https://www.researchgate.net/publication/228490468_Evaluation_of_Methylene_Blue_and_Rose_Bengal_for_Dye_Sensitized_Solar_Water_Treatment - staženo 18.11. 2019

Diamond, I.; Granelli, S.G.; McDonagh, A.F.; Nielsen, S.; Wilson, C.B.; Jaenicke, R. (1972): Photodynamic therapy of malignant tumours. *Lancet*, **2**, 1175-1177.

DOI:[https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(72\)92596-2/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(72)92596-2/fulltext)

Dolmans, D.E.; Fukumura, D.; Jain, R.K. (2003): Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer*, **3**(5), 380-387.

DOI: <https://www.nature.com/articles/nrc1071>- staženo 5. 11. 2019

Dougherty, T.J.; Grindey, G.B.; Fiel, R.; Weishaupt, K.R.; Boyle, D.G. (1975): Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. *J. Natl. Cancer Inst.*, **55**, 115-121.

DOI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1159805> - staženo 9. 11. 2019

Dougherty, T.J.; Kaufman, J.E.; Goldfarb, A.; Weishaupt, K.R.; Boyle, D.; Mittleman, A. (1978). Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Research.*, **38** (8), 2628-35.

DOI:<https://cancerres.aacrjournals.org/content/38/8/2628.full-text.pdf>

-staženo 3. 11. 2019

Elenkov, I. J.; Chrousos. (2006): Stress Hormones, Proinflammatory and Antiinflammatory Cytokines, and Autoimmunity. *The New York Academy of Science*.

DOI:<https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04229.x?sid=nlm%3Apubmed#accessDenialLayout> - staženo 5. 11. 2019

Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; Parkin, D.M.; Forman, D.; Bray, F. (2015): Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in globocan 2012. *Int. J. Cancer*, **136**(5), E359–386.

DOI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25220842> - staženo 17. 11. 2019

Fingar, V.H.; Kik, P.K.; Haydon, P.S.; Cerrito, P.B.; Tseng, M.; Abang, E.; Wieman, T.J. (1999): Analysis of acute vascular damage after photodynamic therapy using benzoporphyrin derivative (BPD). *Br. J. Cancer*, **79**, 1702–1708.

DOI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10206280> - staženo 12. 10. 2019

Hua, H.; Cheng, J.; Bu, W.; Liu, J.; Ma, W.; Si, Ch.; Wang, J.; Zhou, B.; Luo, D. (2018): 5-Aminolevulinic Acid-Based Photodynamic Therapy Pretreatment Mitigates Ultraviolet A-Induced Oxidative Photodamage. *Hindawi - Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **11** pages.

DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/9420745> - staženo 3. 11. 2019

Hunter, G. A.; Ferreira G. C. (2009): 5-aminolevulinic acid synthase: catalysis of the first step of heme biosynthesis. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **55**(1): 102-110.

DOI:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2864774/pdf/nihms189668.pdf> - staženo 18.11. 2019

Josefsen, L. B.; Boyle, R.W. (2008): Photodynamic therapy: novel third-generation photosensitizers one step closer? *Br J Pharmacol*, **154**(1), 1-3.
DOI: <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1038/bjp.2008.98> - staženo 7. 11. 2019

Juzeniene, A.; Lani, V.; Moan, J. (2013): Clearance mechanism of protoporphyrin IX from mouse skin after application of 5-aminolevulinic acid. *Cancer Research*, **10**(4), 538-45.
DOI: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1572100013000768?via%3Dihub> - staženo 18.11. 2019

Kataoka, H.; Nishie, H.; Hayashi, N.; Tanaka, M.; Nomoto, A.; Yano, S.; Joh, T. (2017): New photodynamic therapy with next-generation photosensitizers. *Annals of Translational Medicine*, **5**(8), 183.
DOI: <http://atm.amegroups.com/article/view/14467/14770> - staženo 9. 10. 2019

Kessel, D.; Luo, Y.; Woodburn, K.; Chang, C.; Henderson, B.W. (1995) Mechanism of phototoxicity catalysed by two porphycenes. *SPIE*, **2392**, 122-128.
DOI: <https://login.spie.org/account/checktoken?returnURL=https%3a%2f%2fwww.spiedigitallibrary.org%2fconference-proceedings-of-spie%2f2392%2f1%2fMechanisms-of-phototoxicity-catalyzed-by-two-porphycenes%2f10.1117%2f12.208180.full> - staženo 15. 10. 2019

Lang, K.; Mosinger, J.; Wagnerová, D. (2005): Pokroky ve fotochemii singletového kyslíku. *Chem. Listy*, **99**, 211-221.
DOI: http://chemicke-listy.cz/docs/full/2005_04_211-221.pdf - staženo 12. 11. 2019

Levy, JG. (1994): Photosensitizers in photodynamic therapy. *Seminars in Oncology. Europe PMC*, **21**(6 Suppl 15):4-10.
DOI: <http://europepmc.org/abstract/med/7992105> - staženo 18. 11. 2019

Lipson, R.L.; Baldes, E.J.; Olsen, A.M. (1961): The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *J. Natl. Cancer Inst.*, **26**, 1-11.

DOI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13762612> - staženo 20. 10. 2019

Meyer-Betz, F. (1913): Untersuchungen über die biologische photodynamische Wirkung des hematoporphyrins und anderer derivative des blut und galenafarbstoffs. *Dtsch. Arch. Klin.*, **112**, 476-503.

Mehraban, N.; Freeman, H.S. (2015): Developments in PDT Sensitizers for Increased Selectivity and Singlet Oxygen Production. *Materials*, **8**, 4421-4456.

DOI: <https://www.mdpi.com/1996-1944/8/7/4421> - staženo 4. 11. 2019

O'Connor, A.E.; Gallagher, W.M.; Byrne, A.T. (2009): Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: Preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, **85**(5), 1053-1074.

DOI: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1751-1097.2009.00585.x> - staženo 9. 10. 2019

Ormond, A.B.; Freeman, H.S. (2013): Dye sensitizers for photodynamic therapy. *Materials*, **6**, 817-840.

DOI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28809342> - staženo 1. 11. 2019

PubChem - m-THPP, meta-tetra(hydroxyphenyl)porphyrin.

DOI: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Meso-tetra_M-hydroxyphenyl_porphine - staženo 6. 11. 2019

Scholz, M. (2011): Methods of Study of Photosensitizer-Photophysics with Application on Thiazolyl-porphyrins. Master Thesis, *Charles University Prague*.

DOI: https://www.researchgate.net/publication/297689927_Methods_of_Study_of_Photosensitizer-Photophysics_with_Application_on_Thiazolyl-porphyrins – staženo 19. 11. 2019

Sigma Aldrich – Bengálská červeň.

DOI:https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/330000?lang=en®ion=CZ&gclid=EAIaIQobChMI8vbmpIr75QIVh63tCh19RwJXEAYASAAEgIERvD_BwE - staženo 21. 11. 2019

Sigma Aldrich – Methylenová modř.

DOI:<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/methyleneblue31985anhydrousbasis12296543911?lang=en®ion=CZ> - staženo 21. 11. 2019

Song, Z.; Adeyemo, A.O.; Baker, J.; Traylor, S.M., Lightfoot, M.L. (2011): Structure of Porphyrin TPPS4 and its Interaction With Metal Ions as Elucidated by H NMR and UV- Visible Spectra. NIH Public Access, **69**(2-3), 89-101. - TPPS₄, 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatophenyl)-21H,23H-porphyrin

DOI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3615901/figure/F1/> - staženo 21. 11. 2019

Straten, D.; Mashayekhi, V.; Bruijn, H.; Oliveira S.; Robinson D. (2017): Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions. *Cancers (Basel)*, **9**(2), 19.

DOI: <https://www.mdpi.com/2072-6694/9/2/19> - staženo 20. 10. 2019

Susin, SA.; Zamzami, N.; Kroemer, G. (1998): Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim Biophys Acta*. **1366**(1-2), 151-65.

DOI:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005272898001108?via%3Dihub> - staženo 19. 11. 2019

Takemura, T.; Ohta, N.; Nakajima, S.; Sakata, I. (1989): Critical importance of the triplet lifetime of photosensitizer in photodynamic therapy.

Photochemistry and Photobiology, **50**(3), 339-334.

DOI:<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1751-1097.1989.tb04167.x> - staženo 3. 10. 2019

Wan, M.T.; Lin, J.Y (2014): Current evidence and applications of photodynamic therapy in dermatology. *Clin Cosmet Investig Dermatol*, **7**, 145-163.

DOI: <https://www.dovepress.com/current-evidence-and-applications-of-photodynamic-therapy-in-dermatolo-peer-reviewed-article-CCID> - staženo 13. 11. 2019

Wyld, L.; Reed, M.W.R.; Brown, N.J. (2001): Differential cell death response to photodynamic therapy is dependent on dose and cell type. *British Journal of Cancer*, **84**(10), 1384-1386.

DOI: <https://www.nature.com/articles/6691795> - staženo 15. 10. 2019