

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZDRAVOTNĚ SOCIÁLNÍ FAKULTA**

**STUDIUM FOTODYNAMICKÉHO JEVU
NA BUNĚČNÝCH LINIÍCH MELANOMU**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

AUTOR: ZDEŇKA KOLÁČKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE: Doc. RNDr. HANA KOLÁŘOVÁ, CSc.

9. 5. 2008

The study of photodynamic phenomenon on melanom cell lines

Abstract

Photodynamic therapy (PDT) is a medical method combining the use of photodynamic active substance and light in presence of oxygen. It extends the treatment possibilities of tumor and non-tumor disorders. It complements surgical treatment, radiotherapy, chemotherapy and immunotherapy. An increased accumulation of photosensitive substance in pathological focus is the base of PDT. Subsequent irradiation by light of suitable wavelength evokes photodynamic reactions leading to formation of reactive oxygen species and to biological answer leading to tumor cells damage. The final effect depends on sensitizer type, its concentration in target tissue and on used source of radiation. Aim of the thesis is to prove photodynamic properties of newly developed photodynamic active substance phthalocyanin CIAIPcS₂ and possibilities of its usage to induce photodynamic phenomenon in melanom cells. Owing to absorption of light in sensitizer the formation of excited states happens, and then the excited form of sensitizer reacts directly with substrate. During this reaction free radicals of substrate form or transfer of energy from sensitizer to oxygen and formation of highly reactive singlet oxygen happen. Free radicals, especially radicals of lipid components of cell membranes, are the major cause of tumor destruction. Fruitfulness of PDT depends not only on type of sensitizer and level of oxygen in tumor cell but also on used light source. Luminiscence diodes (LEDs) were used as the source of light. Formation of ROS after PDT was detected with the help of fluorescent molecular probe CM-H₂DCFDA on spectrofluorimeter Synergy HT and on fluorescent microscope Olympus IX 81 with image analysis. According to our results the production of ROS depends on concentration of sensitizer CIAIPcS₂ and the radiation dose. We proved that the sensitizer CIAIPcS₂ is suitable photodynamic active substance and evokes photodynamic phenomenon in tumor cells.

Key words: Photodynamic therapy, sensitizer, reactive oxygen species

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem 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 „Studium fotodynamického jevu na buněčných liniích melanomu“, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích 9. května 2008

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala doc.RNDr.Haně Kolářové, CSc. za odborný dohled a cenné připomínky a Ing. Kateřině Tománkové, Ph.D. za pomoc při provádění praktické části práce v laboratoři Ústavu lékařské biofyziky lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

Zdeňka Kolářková

Obsah:

1. Úvod
2. Fotodynamická terapie
 - 2.1 Historie PDT
 - 2.2 Princip PDT
 - 2.3 Mechanismy PDT
 - 2.4 Fotochemická reakce I. typu
 - 2.5 Fotochemická reakce II. typu
3. Zdroje záření pro PDT
 - 3.1 Lasery
 - 3.2 Výbojky a lampy v kombinaci s filtry určité vlnové délky
 - 3.3 Luminiscenční diody LED
4. Sensitizery
 - 4.1 Sensitizery 1. generace
 - 4.2 Sensitizery 2. generace
 - 4.2.1 Porfyriny a porfyrinové deriváty
 - 4.2.2 Chloriny
 - 4.2.3 Ftalocyaniny
 - 4.2.4 Kyselina 5-aminolevulová (ALA)
5. Nosiče fotodynamických sensitizerů
6. Poškození a zánik buňky
 - 6.1 Nekróza
 - 6.2 Apoptóza
 - 6.2.1 Mechanismus apoptózy
 - 6.3 Rozdíl mezi nekrózou a apoptózou
 - 6.4 Poškození buňky po PDT
7. Fluorescenční mikroskopie
 - 7.1 Konfokální mikroskop
8. Cíl práce a hypotézy
9. Metodika

- 10. Výsledky
- 11. Diskuse
- 12. Závěr
- 13. Použitá literatura
- 14. Klíčová slova
- 15. Seznam zkratk a symbolů
- 16. Seznam vyobrazení
- 17. Seznam tabulek a grafů

1 Úvod

Radiologie - radiodiagnostika a radioterapie - je z hlediska medicínské praxe definována jako klinický obor založený na diagnostickém a terapeutickém využití ionizujícího záření a jeho aplikací v medicíně, ale také na využití záření různých dalších části spektra elektromagnetického vlnění. Možnost využití záření a světelné energie v lékařství je však širší. Absorpce světelného záření a probíhající fotobiologické a fotochemické reakce jsou podstatou laserové terapie a fotodynamické terapie. Fotodynamická terapie (PDT) je léčebná metoda kombinující použití fotodynamické aktivní látky (sensitizeru) a světla za přítomnosti kyslíku. Rozšiřuje možnosti léčby nádorových a nenádorových onemocnění, doplňuje tak chirurgickou léčbu, radioterapii, chemoterapii a imunoterapii. Účinek PDT je závislý na typu sensitizeru, jeho koncentraci v cílové tkáni, dávce záření a koncentraci kyslíku v nádorové tkáni. Základním fyzikálním mechanismem na buněčné a molekulární úrovni je excitace molekul sensibilizátoru a molekul kyslíku. Ta se odehrává na membránových buněčných strukturách (cytoplasmatická membrána, mitochondrie, endoplasmatické retikulum). Fotodynamickým účinkem není primárně poškozena molekula DNA, nýbrž jsou porušeny energetické pochody v buňce, které vedou k její smrti. Na tkáňové úrovni ovlivňuje fotodynamický účinek především nádorovou neovaskularizaci poškozením endotelu novotvořených cév (6).

Ověřování účinnosti sensitizeru, stanovení vhodné koncentrace a dávky záření je v klinické praxi obtížné, z tohoto důvodu se pracuje s experimentálním modelem.

Nemocnice, ve které pracuji, spolupracuje s onkologickým centrem. Při své práci se setkávám s onkologickými pacienty. Bližší seznámení s nově se vyvíjejícím způsobem léčby a možnost nahlédnout do oblasti výzkumu a aspoň částečně přispět k ověřování vlastností nového možného sensitizeru byly důvodem, který mne vedl k výběru tohoto tématu bakalářské práce.

2 Fotodynamická terapie

Fotodynamická terapie je jednou z metod léčby některých nádorových a nenádorových onemocnění. Jde v podstatě o fotochemoterapii, založenou na principu aktivace fotosenzitivních látek, kumulovaných v nádorové buňce, při ozáření světlem vhodné vlnové délky za přítomnosti kyslíku. Významnou vlastností PDT je její selektivní toxicita, nebyly zaznamenány karcinogenní ani mutagenní účinky. Hlavním vedlejším účinkem je kožní fotosenzitivita (6).

Využitelnost fotodynamické terapie v klinické praxi je limitována velikostí tumoru. PDT je určena pro nádory menších rozměrů, ale využívá se také alespoň k částečnému zmenšení rozsáhlých tumorů, například obturujících bronchus. Používání fotodynamické terapie je omezeno také lokalizací tumoru. Přístupné pro fotodynamickou terapii jsou například kožní tumory, tumory orofaciální oblasti, endobronchiální tumory, tumory gastrointestinálního traktu i karcinomy močového měchýře (14).

PDT je také využívána při tzv. čištění (purgingu) kostní dřeně a začíná se využívat i u některých nemaligních onemocnění, například u kardiovaskulárních aterosklerotických změn a revmatoidní artritidě (5).

2.1 Historie PDT

Využívání světelné energie k léčení má dlouhou historii. Prvním zdrojem světla, používaným při léčbě světlem (fototerapii), bylo přirozené sluneční záření. Už ve starověkém Egyptě se využívalo sluneční světlo pro léčebné účely. Také Hipokrates popsal možnosti slunečního záření pro léčbu různých zdravotních potíží. Římští i arabští lékaři zavedli světelnou terapii jako obecnou metodu léčby. Počátky moderní terapie pomocí světla jsou spojeny se jménem dánského lékaře Finsena, který se zabýval fyziologickými účinky slunečního záření, zkoumal jeho různá spektra a jejich vlastnosti. Zjistil, že některé paprsky mají léčebné účinky. Zkoušel sluneční paprsky koncentrovat a v roce 1895 poprvé použil k léčbě lupus vulgaris lampu, při jejíž konstrukci využil

obloukové světlo uhlíkových elektrod (Nobelova cena za medicínu a fyziologii 1903). V roce 1900 objevil student medicíny Raab, který studoval trepky v roztoku akridinu fotodynamickou terapii. Jeho zkušenosti s roztokem akridinu, který usmrcoval nálevníky jen za přítomnosti světelného záření, publikoval v roce 1900 profesor von Tappeiner, který na základě tohoto pozorování předpokládal možnost použití některých fluoreskujících látek k léčbě kožních chorob. S dermatologem Jesionkem prováděli léčbu kožních nádorů a lupus vulgaris pomocí lokálně aplikovaného eosinu a následného ozáření bílým světlem a tyto první klinické zkušenosti publikovali v roce 1903. Následně prokázal v roce 1904 von Tappeiner a Jodelbauer závislost léčebného účinku akridinu na přítomnosti kyslíku a začal používat výraz fotodynamický efekt. Jako senzitizery užívané pro studium fotodynamických reakcí byly používány nejčastěji deriváty porfyrinu.

Současná PDT začala studiemi Lipsona a Schwartze, kteří vypožadovali, že injekce preparátů hematoporfyrinu vedla k fluorescenci neoplastických lézí, viditelných během operace. Aby získal přípravek, optimálně lokalizující nádor, obohatil Schwartz hematoporfyrin octovou a sírnou kyselinou a získal hemato-porfyrinový derivát (HPD), který použil Lipson k detekování nádoru. HPD obsahuje různé porfyriny, monomery, oligomery a dimery, které nejdou úspěšně separovat. Odstraněním méně aktivních monomerů porfyrinu byl částečně očištěn do podoby Photofrinu, nejčastěji používaného fotosenzitizeru v klinické PDT (2).

2.2 Princip PDT

Principem fotodynamické terapie je schopnost fotosensitivních látek specificky se hromadit v rychle proliferujících buňkách. Tyto látky se po aplikaci, nejčastěji intravenózní, za určitou dobu selektivně akumulují v nádorové tkáni.

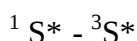
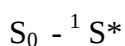
Na retenci senzitizeru v tumorech se vedle jejich afinity k rychle proliferujícím buňkám podílí řada faktorů, včetně odlišné morfologie a metabolismu tumorů (9).

Po optimálním nasycení tkáně fotosenzitizerem dojde k ozáření světlem o vhodné vlnové délce, shodné s absorpčním maximem fotosenzitizeru. Ve fotosenzitizeru

dochází po absorpci světla k jeho vybuzení do excitovaného stavu. Přenosem transformované energie na molekulární kyslík, přítomný ve tkáních, vzniká singletový kyslík, který je reaktivnější než základní molekulární stav a vede k oxidaci membránových lipidů a proteinů, což se projevuje cytolýzou a tumorózní destrukcí. Dále může excitovaná forma fotosensitizeru reagovat přímo se substrátem za vzniku volných radikálů substrátu. Volné radikály, především radikály lipidických složek buněčných membrán, jsou pak příčinou destrukce nádoru. Předpokládá se, že oba mechanismy mohou probíhat při PDT současně, avšak jejich relativní podíl na destrukci nádoru závisí na typu a koncentraci fotosensitizeru, na koncentraci kyslíku v nádoru a na vazbě fotosensitizeru na substrát. Výsledným terapeutickým efektem je nekróza, současně s apoptózou nádorových buněk (6).

2.3 *Mechanismus PDT*

Fotodynamická reakce tedy nastává při současném působení fotosensitivního barviva, biologického substrátu, molekulárního kyslíku a světelného záření. Základem tohoto jevu je schopnost sensitizeru přenášet energii absorbovaného záření na molekulu kyslíku a vytvářet tak energeticky bohatší vysoce reaktivní singletový kyslík. Molekula sensitizeru v základním stavu absorbuje světlo a přechází do vyšších singletových excitovaných stavů. Nezářivou vnitřní konverzí přes první singletový stav může mezisystémovým přechodem (intersystem crossing) přejít do stavu tripletového, který má relativně dlouhou dobu života a vrací se do základního stavu přenosem energie na molekulární kyslík, ze kterého vzniká cytotoxický singletový kyslík.

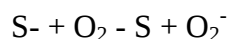
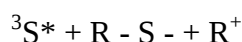


Následující reakce jsou podle povahy substrátu, sensitizeru a podmínek, ve kterých probíhají, dvojího typu.

2.4 Fotochemická reakce I. typu (přenos elektronu)

Při fotochemické reakci I. typu dochází přenosem elektronu k oxidačně-redukční reakci, při které předává molekula svou energii přímo biologickému substrátu za vzniku oxidovaného substrátu a redukováného senzitizeru. Dochází ke vzniku volných radikálů a radikálových iontů, které reagují s kyslíkem a produkují peroxidové radikály a další reaktivní druhy kyslíku, jako např. superoxidový anion a peroxid vodíku. Volné radikály, především radikály lipidických složek buněčných membrán, jsou pak příčinou destrukce nádoru. K reakci tohoto typu dochází hlavně při snížené koncentraci kyslíku.

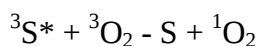
Typ I (přenos elektronu)



2.5 Fotochemická reakce II. typu (přenos energie)

Při tomto typu reakce dochází k přenosu energie ze senzitizeru v tripletovém stavu na molekulární kyslík ve tkáni (substrátu) v základním stavu. Jeho excitací dochází ke vzniku vysoce reaktivního cytotoxického singletního kyslíku. Singletní kyslík je silný oxidant, který způsobuje změny v buněčných membránových strukturách a reaguje s řadou biomolekul, včetně lipidů, proteinů a nukleových kyselin. Tento typ fotochemické reakce převažuje při vyšších koncentracích kyslíku.

Typ II (přenos energie)



Výsledkem obou cest je jednoelektronová oxidace substrátu na radikál kation R^+ a jednoelektronová redukce kyslíku na superoxidový radikál. Tyto reakce se následně projeví cytolýzou a destrukcí tumoru. Předpokládá se, že oba mechanismy mohou při PDT probíhat současně, jejich relativní podíl na destrukci nádoru však závisí na typu a koncentraci senzitizeru, na dávce ozáření, na koncentraci kyslíku v nádorové tkáni a na vazbě senzitizeru na substrát. Výsledným terapeutickým efektem je nekróza, současně s apoptózou nádorových buněk (6).

3 Zdroje záření

Efektivitu PDT ovlivňuje absorpční spektrum fotosenzitizeru, vlnová délka aktivačního světla, hloubka tkáňové penetrace a biologická odpověď na singletový kyslík. Vlnová délka použitého zdroje záření by se měla shodovat s absorpčním pásmem daného senzitizeru, který absorbuje světelnou energii a předává ji singletnímu kyslíku. Hloubka průniku světla do tkáně závisí na vlnové délce, v oblasti viditelného světla se při vyšší vlnové délce penetrace zvyšuje. Z tohoto důvodu musí být vybrány vlnové délky tak, aby určeného místa zásahu dosáhlo dostatečné množství fotonů.

V souvislosti s PDT byla studována hloubka průniku červeného světla. Bylo stanoveno, že hloubka průniku je dostatečná k tomu, aby se vyvolala biologická odezva v hloubce až 10 mm ve tkáni (15).

Jako zdroje pro PDT se mohou používat koherentní i nekoherentní zdroje světla, které může být aplikováno na nádor přímo nebo pomocí optického vlákna. Výběr vhodného zdroje závisí na typu senzitizeru, lokalizaci nádoru a na dávce světelné energie. Zdrojem světla pro PDT mohou být širokopásmové lampy, jejichž použití je výhodné v případech, kdy se světlo aplikuje přímo na nádor (kožní nádory, nádory v dutině ústní atd.). Jejich zářivé výkony v aktivačních vlnových délkách nemusí být dostatečné pro navození fotodynamického jevu v celém objemu nádoru a z tohoto důvodu se jako zdroj velmi intenzivního koherentního, monochromatického a lineárně polarizovaného světla používají lasery. Při PDT je třeba zajistit co nejkratší ozařovací časy a velkou intenzitu záření na relativně malých plochách a proto laser vyhovuje jako vhodný zdroj záření. Stále více se používají lasery polovodičové, které mají menší

rozměry a nižší pořizovací a provozní náklady než laditelné barvivové lasery (6).

3.1 Lasery

Laser (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation - zesilování světla stimulovanou emisí záření) je zdroj koherentního elektromagnetického záření nejčastěji ve viditelné, ultrafialové nebo infračervené oblasti spektra, který využívá jevu stimulované emise záření aktivních částic (atomů, molekul, iontů, elektronů) buzených vnějším zdrojem energie. Podle typu laseru může mít laserové záření vlnovou délku od gama záření, přes rentgenové, ultrafialové a viditelné vlnové délky, až po mikrovlnné záření. Laserové záření vzniká konverzí některého druhu energie (např. elektrické, optické, chemické) na záření. Účinnost této přeměny je od zlomku procenta do více než 80 %, podle typu laseru (7).

Každý laser je charakterizován vlnovou délkou vyzařovaného světla, režimem vyzařování a výkonem. Vlnová délka paprsku výrazně určuje míru absorpce laserového záření, k výpočtu hustoty energie ozáření a pro posouzení průniku do tkáně je nutné znát výkon laseru. Hustota energie, působící na ozářenou tkáň, je dána poměrem násobku doby ozařování (v sekundách) a výkonu laseru (ve watttech) k ozařované ploše (v cm^2) – J/cm^2 . Při použití méně výkonného zdroje laseru musíme pro dosažení stejné hustoty energie jako u výkonnějšího zdroje prodloužit dobu ozařování (21).

Pro neinvazivní fototerapii se používají nízkovýkonné lasery, s výkonem maximálně do 500 mW. Dnes se používají většinou polovodičové laserové diody, které podle použitého polovodičového materiálu vyzařují záření o vlnových délkách v rozmezí 630 – 900 nm. Terapeutický záměr rozhoduje o volbě vlnové délky. Obecně platí, že pro povrchové aplikace se volí lasery s kratší vlnovou délkou (většinou v oranžové a červené oblasti viditelného spektra) a pro hlubší aplikace se volí lasery vyzařující v blízké infračervené oblasti (3).

Pro PDT se volí zdroj světla v závislosti na typu použitého senzitizeru (jeho absorpčního spektra), na umístění nádoru a na potřebné dávce ozáření.

Jako první laserové zdroje byly použity pro aplikace PDT **argonové lasery a**

lasery pracující v parách kovu (např. rtuti). Jsou charakterizovány vysokým výstupním výkonem a poskytují vhodné vlnové délky pro excitaci porfyrinových senzitizerů. V kombinaci s optickým vláknem se mohou barvivové lasery čerpané argonem používat k endoskopické aplikaci při léčbě plicních nádorů, nádorů močového měchýře a jícnu. Jejich výkon je v rozsahu $10 - 500 \text{ mW/cm}^2$. Barvivové lasery čerpané laserem využívajícím páry kovu se mohou v kombinaci s optickým vláknem využívat k léčbě nádorů dutiny ústní, močového měchýře, plic, hlavy a krku. Poměrně velká plocha paprsku (až 3 cm^2) tento laser nabízí také k léčbě rozsáhlejších, hlavně kožních nádorů.

Pevnolátkové lasery se při aplikaci PDT užívají k léčbě kožních nádorů, nádorů jícnu, dutiny ústní, plic a močového měchýře. Mimo to jsou vhodné k použití v laboratorích. Příkladem pevnolátkového laseru je Nd:YAG laser, který emituje v infračervené oblasti (1064 nm) a jeho energie je až 7 J/puls . Při dvojnásobné frekvenci může dosáhnout viditelné oblasti spektra a popř. také UV oblasti (532 nm a 266 nm pro Nd:YAG laser). Aktivním materiálem je izotropní krystal yttrium aluminium granátu dopovaný neodymem. Při kontinuálním režimu je laser opticky buzen kontinuálně kryptonovou výbojkou a může dosahovat výkonů $100\text{-}200 \text{ W}$. Jeho záření se ve tkáni méně rozptyluje a penetruje až do hloubky $2\text{-}6 \text{ mm}$, kde vyvolává koagulační nekrózu. Tohoto efektu je využíváno v léčbě některých vaskulárních névů.

V současné době se používají většinou **polovodičové lasery**. Principem činnosti je vytvoření populační inverze, která zajistí převahu stimulované emise nad absorpcí, stejně jako u jiných laserů. Tato inverze se obvykle uskutečňuje injekčním elektrickým proudem v diodě, napětí v propustném směru vyvolává injekci párů nosičů do oblasti přechodu, kde rekombinují při stimulované emisi.

Polovodičový injekční laser se rovněž nazývá laserová dioda. Je podobná luminescenční diodě (LED), v obou součástkách je zdrojem energie elektrický proud injektovaný do přechodu párů nosičů. Záření laserových diod ale vzniká stimulovanou emisí, zatímco LED emituje záření, které vzniklo spontánní emisí. Výhodou polovodičového laseru jsou malé rozměry, vysoká účinnost a integrovatelnost s elektronickými součástkami a snadné propojení pomocí optického vlákna. Laserové diody emitující ve viditelném pásmu se obvykle vyrábějí z GaInP. Pracují na vlnových délkách od blízké

ultrafialové do vzdálené infračervené oblasti, s výstupními výkony do 2 W. Jsou vhodné pro léčbu nádorů dutiny ústní, kůže a očí. Používají se také v očním lékařství k léčbě větrem způsobené makulární degenerace.

Femtosekundové pevnolátkové lasery se používají ke dvoufotonové excitaci v oblasti mikroskopie a spektroskopie. Vybíjejí se ale také za účelem dvoufotonové PDT. Dva fotony dopadajícího světla o vysoké fotonové hustotě mohou být současně pohlceny chromoforem. Při této absorpci dojde k excitaci elektronu na energetickou hladinu, která je úměrná součtu energií dvou absorbovaných fotonů. Světlem o vlnových délkách 800 – 900 nm je tak možné dosáhnout excitace senzitizeru v oblasti 400 – 450 nm. Vysoká fotonová hustota vznikne tím, že laser emituje velké množství fotonů během krátkého pulsu. Poté jsou tyto fotony fokusovány do velmi malého objemu (12).

3.2 Výbojky a lampy v kombinaci s filtry pro určité vlnové délky

Emitují mnohem širší spektrum vlnových délek než lasery, je nutná kombinace s filtry příslušné vlnové délky.

Zdrojem světla **wolframových halogenových lamp** je rozžhavené wolframové vlákno, které dosahuje teploty asi 3 000 K. Při této teplotě dochází k emisi širokého spektra vlnových délek od UV oblasti až po blízkou infračervenou oblast (350 – 850 nm). Požadovaná vlnová délka se dá vybrat pomocí vhodného filtru. Lampy dosahují intenzity až 250 mW/cm². Používají se pro ALA PDT.

Záření **xenonových výbojek** je generováno pomocí elektrického oblouku v prostředí xenonových par. Xenonové lampy se vyznačují vysokým výkonem (8 W), potřebnou oblast vlnových délek lze z širokého emisního spektra (300 – 1200 nm) vybrat pomocí vhodných filtrů. Používají se většinou pro PDT kožních nádorů.

Rtuťové výbojky obsahují směs rtuťových par a par určitého kovu, která se zapaluje elektrickým výbojem. Konkrétnímu složení směsi odpovídají charakteristické čáry v širokém emisním spektru (590 – 720 nm). Výkon lamp je v rozmezí 10–250 mW/cm². Využívají se v léčbě nádorů zevního pohlavního ústrojí a kožních nádorů.

K léčbě kožních nádorů se využívají také **sodíkové lampy**. K elektrickému výboji dochází v prostředí sodíkových par, charakteristické čáry spektra sodíku pohlcuje vrstvička wolframu, kterou je potažena žárovka. Emituje záření v rozmezí 590 – 670 nm o intenzitě 25 – 100 mW/cm². Fluorescenční lampy emitují záření v Soretově oblasti (400 - 450 nm) . V této oblasti je při nižších dávkách senzitizeru dosaženo lepší efektivity PDT, průnik světla do tkáni je ovšem velmi malý, takže léčba těmito lampami je omezena na povrchové nádory.

3.3 Luminiscenční diody LED (*light emitted diodes*)

Emitují záření o vlnových délkách v rozmezí 350 – 1100 nm, intenzita ozáření může být až 150 mW/cm². Jejich velkou výhodou je univerzálnost a možnost uspořádat diody geometricky tak, aby pokryly větší plochu a obsáhly celý nádor. Mohou být napájeny bateriemi, takže jsou přenosné a jejich další nespornou výhodou je také v porovnání s ostatními zdroji nízká cena (12).

4 Senzitizery

Senzitizery jsou látky se schopností absorbovat světelnou energii a prostřednictvím této energie vyvolávají chemickou reakci v buňkách a tkáních. Přednostně jsou vychytávány v patologicky změněné tkáni. Vlastnosti této cílové tkáně spolu s použitým typem senzitizeru určují rychlost akumulace v nádoru, která může trvat od 3 do 96 hodin. Tyto látky jsou bez přístupu světla netoxické.

Při vhodné kombinaci koncentrace senzitizeru a hustoty energie po ozáření se dá vyvolat fototoxický účinek v nádorových buňkách. Senzitizer pro PDT by měl splňovat řadu kritérií, z nichž nejdůležitější jsou:

- vhodná absorpce senzitizeru, z důvodu možné sensitizace kůže je výhodná nízká absorpce v oblasti spektrálního maxima denního světla 400 – 600 nm a vyšší absorpce v oblasti vlnových délek 600 – 900 nm (oblast tzv. terapeutického okna)
- dostatečné selektivní vychytávání a retence v nádorových tkáních

- nízká toxicita sensitizeru za nepřítomnosti záření
- rychlý úbytek ze zdravé tkáně, hlavně z kůže a očí
- chemická čistota, stabilita a známé složení

Existuje velké množství barviv, ať přírodních nebo syntetických, pro použití v PDT jsou však vhodné jen některé typy. Jejich základní vlastností je, že kromě přenosu světelné energie na molekulu kyslíku mají také schopnost zvýšené kumulace v buňkách, které vykazují rychlejší růst a proliferaci, *in vivo* 48 – 72 hodin po intravenózním podání (2).

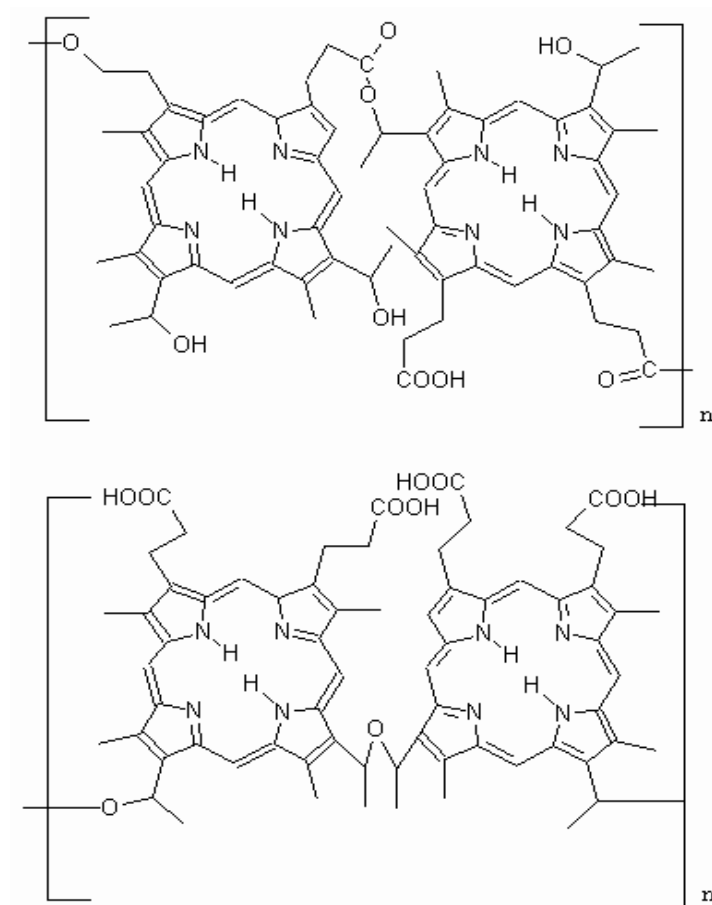
Významnou vlastností barviv, která vykazují fotodynamický efekt, je jejich fluorescence, což dokazuje, že barviva mají elektronovou strukturu. Excitovaný stav - první singletový, který se uplatňuje při fluorescenci, nemá pro fotodynamický účinek význam z důvodu krátké doby života (10^{-9} s). Fotodynamicky aktivní jsou sloučeniny, které mohou tvořit excitované stavy s dlouhou dobou života (10^{-6} s) tzv. tripletové stavy, vznikající vnitřním přechodem ze svých excitovaných singletových stavů. Mezi takové fotosensibilizátory dnes patří porfyriny a hematoporfyrinové deriváty, chloriny (reduované porfyriny) bakteriochloriny a benzochloriny, naftalocyaniny a ftalocyaniny (6).

4.1 Sensitizery 1.generace

Hematoporfyrin a jeho purifikované deriváty jsou představitelé sensitizerů 1. generace. Hematoporfyrin je vynikající sensitizer, jeho vychytávání v nádoru však není dostačující. Pro získání látky, která by lépe lokalizovala nádor, vznikly obohacením hematoporfyrinu o octovou a sírnou kyselinu a následnou neutralizací hydroxidem sodným hematoporfyrinové deriváty, obsahující směs porfyrinů, monomerů, oligomerů a dimerů. Tyto deriváty se vyznačovaly dobrými fotosyntezitujícími vlastnostmi a schopností lokalizace nádoru.

Po dalším pročišťování některých hematoporfyrinových derivátů vznikl Photofrin (viz obr.4.1.). Byl první látkou v klinickém použití PDT. Používá se k léčbě rakoviny močového měchýře a rakoviny plic a jícnu v pokročilém stadiu. Světelná penetrace do tkání je maximální při 630 nm.

Obr.4.1 Složení Photofrinu I (Quadra Logic Technologies Inc., Kanada)



Zdroj: <http://www.jergym.hiedu.cz/~canovm/barva/a/le.html>, [on line]

Nevýhodou fotosensitizerů první generace je, že tyto látky nejsou přesně definované a po intravenózní aplikaci vyvolávají kožní fotosenzitivitu po interakci se slunečním zářením. V současné době jsou HPD používány v klinických studiích pod firemními názvy - Photofrin (USA), Photocarcinorin (Čína), Photosan (Německo), Photogem (Rusko), Haematodrex (Bulharsko) (6).

4.2 Sensitizer 2. generace

Jsou ověřovány a vyvíjeny od r.1991. Jejich předností je nižší fotosenzitivita kůže po léčbě. Mezi tyto sensitizery patří chloriny a bakteriochloriny (degradační produkty

chlorofylu, aktivací vlnová délka 640 – 700 nm), ftalocyaniny, 5-aminolevulová kyselina (ALA) – nevyvolávají kožní fotosenzitivitu a aktivací vlnové délky mají v oblasti 630 – 700 nm, s větší penetrací do kůže.

Ve stadiu vývoje jsou pheoforbidy a pyropheoforbidy izolované z chlorofylu s absorpčním maximem 665 nm, puriny, naftalocyaniny a další. Jsou chemicky jednotné a snadno charakterizovatelné, mají lepší poměr kumulace mezi nádorovou a zdravou tkání (6).

4.2.1 Porfyriny a porfyrinové deriváty

Patří mezi nejčastěji užívané sensitizery, jsou hydrofobní a mají tedy afinitu k buněčným lipofilním membránám. Mají tendenci hromadit se v membránách vnitrobuněčných organel, jako jsou lysozomy a mitochondrie (12).

Pro klinické lokální použití v dermatologii bylo u nás povoleno používání meso-tetra-para-sulfonato-fenyl-porfinu (TPPS₄). Akumulace v nádorové tkáni je u TPPS₄ vyšší než u derivátů hematoporphyrinu, působení *in vitro* je podobné jako u X záření, má vyšší kvantových výtěžek singletového kyslíku než Photofrin II. Byl také popsán anti-mitotický účinek TPPS₄, který může mít význam při léčbě maligních nádorů. Fototoxicitu porfyrinů je možné zvýšit pomocí chelatace kovy (ZnTPPS₄, PdTPPS₄). TPPS₄ a strukturálně podobné sensitizery se hromadí zejména v buněčných membránách, především lysozomů a po ozáření mohou být přemístěny do okolí buněčného jádra (12).

Většímu rozšíření využití TPPS₄ brání neurotoxické účinky, které byly popsány u laboratorních zvířat. Při lokální intraleziální aplikaci nebyla tato neurotoxicita nikdy potvrzena. TPPS₄ je látka, která působí přímo senzibilizaci a její účinek je závislý na vstřebání do buňky. Výhodou jeho lokální aplikace, ve srovnání s metodou, při které je jako fotosensitizer aplikován i.v. Photofrin II, je dosaženo podstatně vyšší koncentrace fotosenzibilizátoru v nádorové tkáni bez vyššího celkového fototoxického zatížení organismu (4).

4.2.2 Chloriny

Dalším typem substituovaného porfyrinového senzitizeru je chlorin. Pro své spektrální vlastnosti je zvláště vhodný chlorin II. Další částečnou hydrogenací porfyrinové jednotky lze získat odpovídající bakteriochlorin (18).

Zástupcem skupiny chlorinů je Temoporfin (tetra(*meta* – hydroxyfenyl) chlorin, *m*THPC). Je to zřejmě nejúčinnější dosud známý senzitizer. Jeho absorpční maximum je při 652 nm, díky zvýšené absorpci v červené oblasti světla a dalším faktorům, jako je vazba této látky na komponenty plazmy, jeho penetrace do buněk a subcelulární lokalizace, je z hlediska požadované fotodynamické dávky (což je dávka záření x dávka léku) přibližně stokrát účinnější než Photofrin (12).

Jeho nevýhodou jsou jeho farmakologické parametry, poměrně malá selektivita mezi nádorovou a zdravou tkání a poměrně dlouho přetrvávající kožní senzitivita (asi 2-3 týdny). Tento sensitizér pod jménem Foscan byl zaveden k léčbě nádorů v oblasti hlavy a krku. V klinických zkouškách je testován pro léčbu nádorů jícnu a dysplazie u Barrettova jícnu, připravují se další klinické zkoušky u karcinomu žaludku, prostaty a kůže (10).

Dalším sensitizérem chlorinového typu je Verteporfin. Tato hydrofobní látka má absorpční maximum při vlnové délce 690 nm, kdy proniká světlo do tkáně asi dvakrát hlouběji než při 630 nm. Verteporfin je tumorózní tkání rychle vychytáván, jeho koncentrace v této tkáni ale také velice rychle klesá. Třebaže jeho selektivita v nádorové tkáni není ideální, je tato látka je ve stadiu klinických zkoušek pro léčbu karcinomu z bazálních buněk kůže, psoriázy a revmatoidní artritidy. Největší úspěch zaznamenal verteporfin v očním lékařství. Pod obchodním názvem Visudyne je registrován již v 71 zemích a užívá se k léčbě senilní degenerace makuly (AMD) (10).

4.2.3 Ftalocyaniny

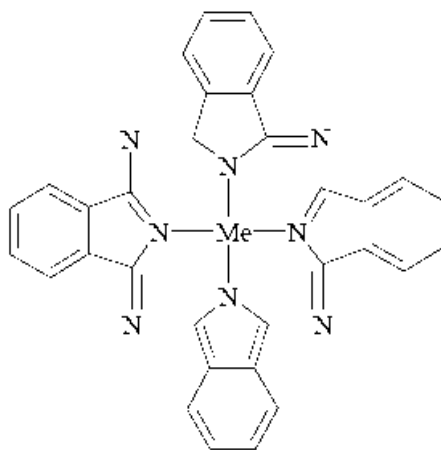
Od 90. let jsou předmětem vědeckého zájmu fotosensitizery 2. generace. Jejich základní charakteristika je definována takto: preparátem je chemicky čistá látka cyto-

toxická za přítomnosti světla, absorpční maximum je v oblasti 650 – 800 nm a fotochemický proces má vysoký kvantový výtěžek.

Do této skupiny patří také ftalocyaniny. Mezi rozličnými ftalocyaniny můžeme nalézt látky se základním porfyrinovým kruhem, v jehož aktivním centru je kovalentní vazbou připoután kov (zinek, hliník, křemík, germanium apod.) a jako substituenty navázané na benzenová jádra je možno použít sulfonované, hydroxylové či obdobné skupiny. Počtem i druhem těchto skupin a centrálního atomu lze ovlivnit jejich farmakologické vlastnosti. Ftalocyaniny jsou skupinou sensitizerů s rozsáhlou možností využití v průmyslu, ekologii i medicíně. Vykazují největší absorpci v dlouhovlnné oblasti světla (670 – 700 nm). Tento posun v oblasti červeného světla je výhodný pro lepší penetraci do tkáně. Jejich velkou předností je minimální kožní fototoxicita a mají cytotoxický účinek na většinu nádorových buněk. Ftalocyaniny mohou být chelatovány diamagnetickými kovy (Zn, Al), které prodlužují tripletový stav a tím zvyšují fototoxicitu senzitizeru. Naproti tomu komplexy s paramagnetickými kovy (Cu, Co, Fe) nebo bez kovu mají krátké doby tripletového stavu a tím jsou méně účinné. Nevýhodou některých ftalocyaninů je jejich hydrofobicita a špatná rozpustnost ve vodě. Přidáním substituentů, jak do centrálního metalového atomu tak do periferie hydrofobického Pc makrocyclu, lze pozitivně ovlivnit jejich farmakologické vlastnosti (viz obr.4.2).

Ftalocyaniny vstupují do buněk endocytózou a jsou lokalizovány v lysozomech. V současné době je ve fázi klinických testů preparát na bázi ftalocyaninů zinku (firma Ciba-Geigy, Švýcarsko), preparát Photosens na bázi směsi sulfonovaných ftalocyaninů hliníku (NIOPIK, Moskva), v Bulharsku je testován křemičitý naftalocyanin. V České republice byly ve Výzkumném ústavu organických syntéz a.s. v Pardubicích ve spolupráci s Divizí radiofarmak Ústavu jaderného výzkumu v Řeži u Prahy a s Ústavem biofyziky 1.Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze ukončeny preklinické testy preparátu na bázi čistého, disulfonovaného hydroxyhlinitého ftalocyaninu(19).

Obr.4.2 Základní struktura ftalocyaninu s kovovým centrálním atomem; substituenty navázány v různých pozicích na benzenových jádrech.



Zdroj: Chem. Listy 101, 315–322 (2007)

4.2.4 Kyselina 5-aminolevulová (ALA)

V současné době je snad nejvíce využívaným sensitizerem. Tato endogenní látka se podílí na biosyntéze hemu. Její exogenní podání vede k syntéze protoporphyrinu IX, který je účinným sensitizerem a akumuluje se především v nádorech. Tato akumulace je přechodná, optimální pro PDT je po 4 hodinách po podání ALA. Fotosenzitivita je podmíněna porfyrinem, aktivací vlnová délka protoporphyrinu IX je při 640 nm a penetrace do tkáně je omezená. K vyčištění protoporphyrinu IX z organismu dochází do 24 hodin, což umožňuje opakování léčby po 48 hodinách bez rizika poškození zdravé tkáně. ALA se používá pro léčbu kožních nádorových i nenádorových onemocnění (rakovina kůže, lupénka, aktinová keratóza). Vzhledem k nízké penetraci ALA se používají její estery, které jsou více lipofilní a lépe pronikají tkání. Při hydrolýze uvolňují volnou ALA. ALA se dále užívá pro léčbu Barretova jícnu, kdy se podává orálně a k léčbě rakoviny močového měchýře, kdy se podává intravezikálně. Estery ALA jsou také vhodné k fotodetekci nádorů (12),(10).

Nádorová ložiska, ve kterých se po podání esteru ALA nahromadil protoporfyrin IX, se ozáří modrým světlem. Ložiska potom červeně fluoreskují a umožní detekovat a lokalizovat nádor.

5 Nosiče fotodynamických sensitizerů

Vhodnými přenašeči fotodynamicky aktivních látek, ale i dalších léků jsou cyklodextriny. Představují hostitelskou molekulu s vnitřní dutinou, která je hydrofobní, vnější plášť je hydrofilní. Cyklodextriny jsou netoxické, ve vodě rozpustné sloučeniny, které vytvářejí tzv. hostitelské (“host – guest”) komplexy s množstvím látek, jsou schopny je obklopit, navázat a modifikovat. Látky se vážou k dutině pomocí hydrofobních a van der Walsových sil a tato vazba umožňuje hydrofobním látkám transport ve vodním prostředí. Vytvoření komplexu senzitizeru s cyklodextrinem je provázáno fotofyzikálními a fotochemickými změnami. Většina těchto změn má za následek zvýšení kvantového výtěžku a doby života excitovaného stavu senzitizerů. Cyklodextrinové komplexy obvykle zlepšují odolnost léků vůči teplotní a oxidační degradaci, snižují vedlejší účinky a zvyšují jejich rozpustnost a biologickou aktivitu (12).

6 Poškození a zánik buňky

Každá buňka prodělává za fyziologických podmínek určité funkční a morfologické změny, které jsou dané jejím programem a reaguje tak na požadavky svého metabolismu, rozvíjí se podle své diferenciace a provádí své specifické funkční zaměření. Reaguje na různé podněty, ale zůstává v určité dynamické rovnováze, kterou je možno označit jako normální homeostázu. Větší fyziologickou zátěž nebo menší patologické změny dokáže obvykle zvládnout buněčnými adaptačními mechanismy. Morfologické i funkční změny, které tuto adaptaci provázejí a kterými se buňka na novou situaci připraví, nastaví nový, ale jiný rovnovážný stav. Buňka je dále životaschopná, přizpůsobená vzniklé situaci. Je-li však zátěž příliš silná nebo není-li adaptace z určitých důvodů možná, dochází k poškození buňky. Toto poškození může být vratné (reversibilní), když

se buňka z poškození vzpamatuje nebo nevratné (ireverzibilní), končící její smrtí, tedy postupným ukončením jejích funkcí a struktury. Zánik buňky může nastat nejenom jako konečný důsledek závažného poškození buňky, který označujeme jako nekróza, ale může být naprogramován se záměrem normální eliminace pro organismus již nepotřebných buněk. V tomto případě mluvíme o apoptóze. Zánik buňky, stejně jako její proliferace nebo diferenciace, hraje důležitou úlohu v homeostáze mnohobuněčných organismů (11).

6.1 Nekróza

Nekróza, neboli pasivní zánik buňky je nevratný patologický proces. Je vyvolán různými vlivy na buňku, ať již mechanickými, chemickými či tepelnými. Nekrózu může také vyvolat virová infekce buňky, různé bakteriální toxiny nebo dlouhodobé přerušení výměny látek a energie mezi buňkou a okolím (dlouhodobý nedostatek živin, kyslíku atd.). Při nekróze dochází k narušení integrity cytoplazmatické membrány a narušení rovnováhy vnitřního prostředí buňky. To vede k edému jak buňky, tak některých organel (mitochondrie, endoplazmatické retikulum), nastane únik vnitřního obsahu do okolí; tím se navodí zánětlivá reakce a nakonec rozpad postižené buňky. Takto uvolněné enzymy mohou indukovat nekrózu okolních buněk a vyvolat zánětlivou reakci okolní tkáně.

6.2 Apoptóza

Apoptóza, programovaná buněčná smrt, je fyziologický děj, při němž je zánik buňky cíleně indukován. Buňka je usmrcena a následně odstraněna takovým způsobem, že nedojde k poškození okolních buněk. Je to organizovaný a přísně regulovaný děj. Apoptóza může být indukována dvojím způsobem: signálem zvenčí nebo signálem z buňky samotné. Průběh apoptózy je složitý enzymově řízený proces, na němž se podílejí zejména kaspázy, které se nacházejí v buňce v neaktivním stavu a jejich aktivace proapoptotickým signálem vede k dějům, kterými se buňka připravuje na svou smrt. Při tomto procesu dochází k fragmentaci jaderné DNA, na rozdíl od nekrózy je však frag-

mentace nenáhodná a fragmenty jsou stejně dlouhé. Buňka se také trochu smrští a změní se charakter jejích organel. Významnou úlohu v apoptóze hrají zejména mitochondrie. Proces apoptózy je završen rozpadem buňky do apoptotických tělísek, což jsou membránou ohraničené buněčné fragmenty, které jsou následně fagocytovány makrofágy. Tímto procesem je buňka "ekologicky" likvidována a buněčný materiál recyklován, aniž by nitrobuněčné enzymy poškodily okolní buňky(13).

Mezi hlavní složky, které se účastní apoptózy patří kaspázy, proteiny Bcl-2 rodiny, mitochondrie a mechanismy na buněčném povrchu.

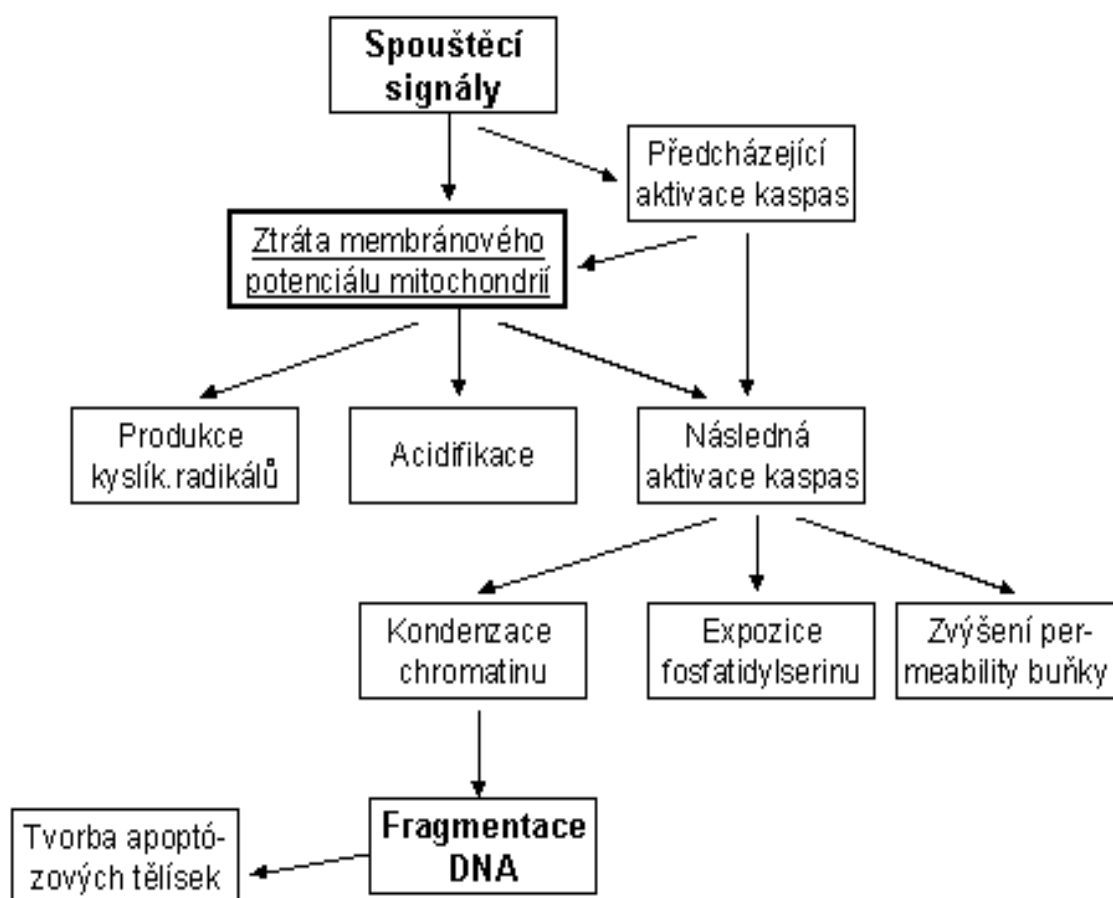
6.2.1 *Mechanismus apoptózy*

Proces apoptózy může být navozen různými stimuly jako je UV nebo γ -záření, chemoterapeutika, odstranění růstových faktorů, proapoptické cytokiny a další, které jsou přijaty receptory postižené buňky pro příslušný ligand. Přírozenými iniciátory nadbytečných, poškozených nebo nádorových buněk jsou ligandy/receptory smrti (death-ligands/receptors), patřící do rodiny TNF.

V dalším průběhu apoptózy hrají důležitou úlohu mitochondrie (uvolnění cytochromu c) a aktivace tzv. kaspázové kaskády. V další fázi pak dochází ke štěpení proteinů cytoskeletu a jádra. Apoptóza je děj velmi komplexně regulovaný. Kromě proapoptotických molekul, existují molekuly antiapoptotické (kupř. Bcl-2), podporující přežívání buněk (tumory). Vlastní proces apoptózy nastává proteolýzou intracelulárních bílkovin pro buňku životně důležitých. Enzymy, které tuto proteolýzu katalyzují (nebo aktivují jiné efektorové molekuly), se nazývají kaspasy (Cytosolic Aspartate-Specific cystein Proteases = CASPASE). Aktivaci může zahájit buď indukční signál nebo ztráta inhibujících signálů. Kaspázy hrají klíčovou úlohu v efektorové fázi apoptózy. Hlavními cílovými molekulami jsou cytoplasmatické a jaderné proteiny (viz obr 6.1). Další apoptózový mechanismus předpokládá alteraci mitochondriální membrány. Inhibující signál reguluje funkci mitochondriálních kanálů pro ionty a vodu. Potlačení supresivního signálu (antiapoptózy cytokiny nejsou k dispozici) navodí neschopnost kanálů udržovat normální iontový potenciál mezi vnitřkem a vnějškem mitochondrií. Kolaps

transmembránového potenciálu zvýší permeabilitu mitochondriální membrány otevřením jejích pórů, což způsobí nabobtnání mitochondrií. Vnitřní mitochondriální membrána má větší povrch než membrána vnější, proto nabobtnání postihne především vnitřní membránu, což způsobí ruptury membrány vnější a rozrušení respiračního řetězce s následným uvolněním cytochromu c z intermembránového prostoru (11).

Obr.6.1 Blokové schéma dějů při navození apoptózy



Zdroj: Masopust J. Patobiochemie buňky (2003)

6.2.2 Rozdíl mezi nekrózou a apoptózou

Během časných stádií nekrózy buňky a jejich organely (mitochondrie) bobtnají, protože došlo k poruše celistvosti membrán. Nitrobuněčný obsah se vyplavuje do okolí

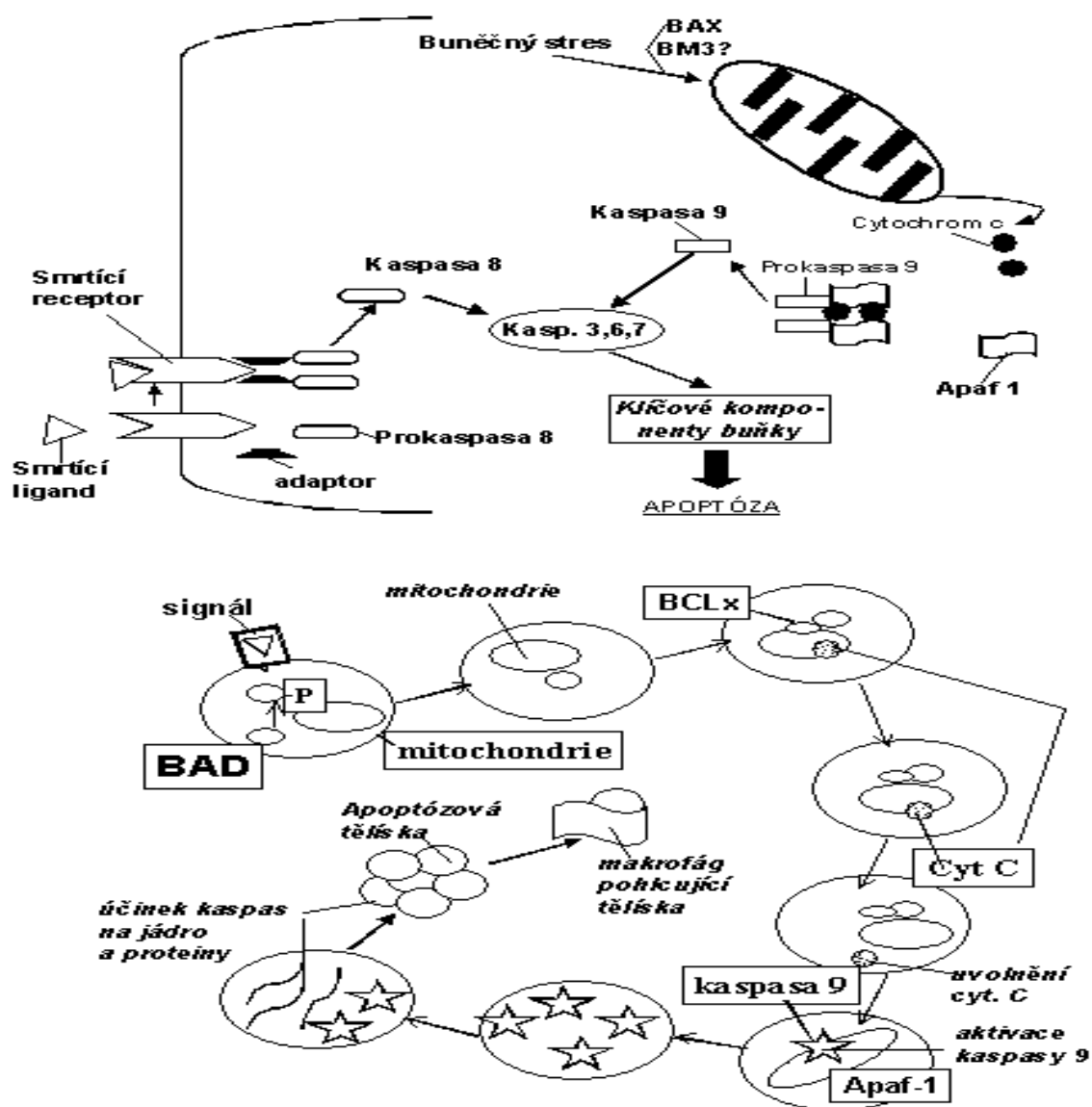
buněk, kde navodí zánětlivou reakci a nakonec dochází k úplnému rozpadu buňky. Na-proti tomu při apoptóze ztrácí buňka nejprve asymetrii fosfolipidů v membráně, dochází ke kondenzaci chromatinu, redukci velikosti jádra, ke štěpení internukleosomové DNA, k svraštění buňky, k vydouvání membrány a k rozpadu buňky na apoptotická tělíska, obklopená zbytky membrány, která jsou v konečné fázi fagocytována bez vzniku zánětlivé reakce (viz obr.6.2).

Poznámka: Existuje i "třetí cesta" - aponekróza - , kdy situace nedovoluje dokončení klasické apoptózy a objevují se známky nekrózy. Klíčovým momentem je pravděpodobně intracelulární obsah ATP; dostatek metabolické energie je potřebný pro kompletizaci apoptózy, není-li k dispozici, zánik buňky je dokončen formou nekrózy. Reaktivní formy kyslíku hrají podstatnou úlohu při nekróze (11).

6.3 Poškození buňky po PDT

Již za několik hodin po PDT dochází k poškození buněčných membrán, buňky se přestávají dělit a dochází k cytolýze. Je zasažena plazmatická membrána 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. Po PDT se také zvyšuje transkripce a translace některých genů, které souvisejí s produkcí látek při tzv. oxidativním stresu. PDT také zasahuje do systému kontroly buněčného cyklu a dochází i k apoptóze (programovaná smrt nádorových buněk). Poměrné zastoupení apoptotické a nekrotické smrti buněk závisí na typu nádoru, ale především na koncentraci sensitizeru a dávce ozáření. Nízké koncentrace sensitizeru a nízké dávky ozáření vyvolávají po PDT u 90 % buněčné populace tumoru apoptózu, vyšší dávky ozáření a vyšší koncentrace fotosensitizeru vyvolávají poškození buněčných membrán s následnou nekrózou. Prakticky tedy dochází jak k apoptóze (spíše v hlubších vrstvách nádorové tkáně, kde je už dávka ozáření nižší než na povrchu) tak k nekróze nádorových buněk (6).

Obr.6.2 Zjednodušené schéma mechanismu apoptózy



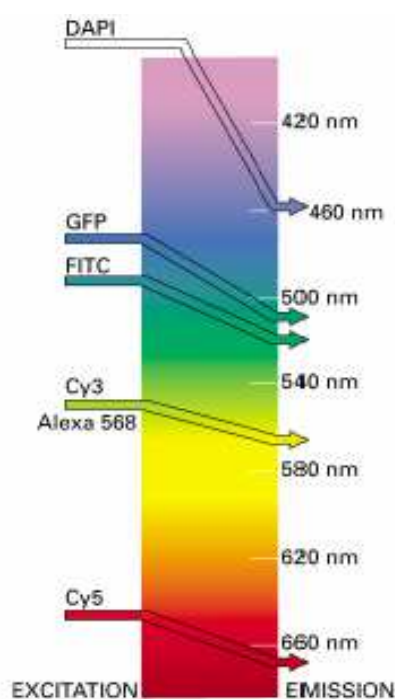
Zdroj: Masopust J. Patobiochemie buňky (2003)

7 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie je dnes nejčastější metodou pro detekci specifických molekul v buňkách bez nezbytnosti jejich destrukce a biochemické frakcionace.

Klíčovou úlohu ve fluorescenční mikroskopii zaujímá fluorofor – látka, která je schopná absorbovat světlo určité vlnové délky a následně emitovat světlo o delší vlnové délce (viz obr.7.1)

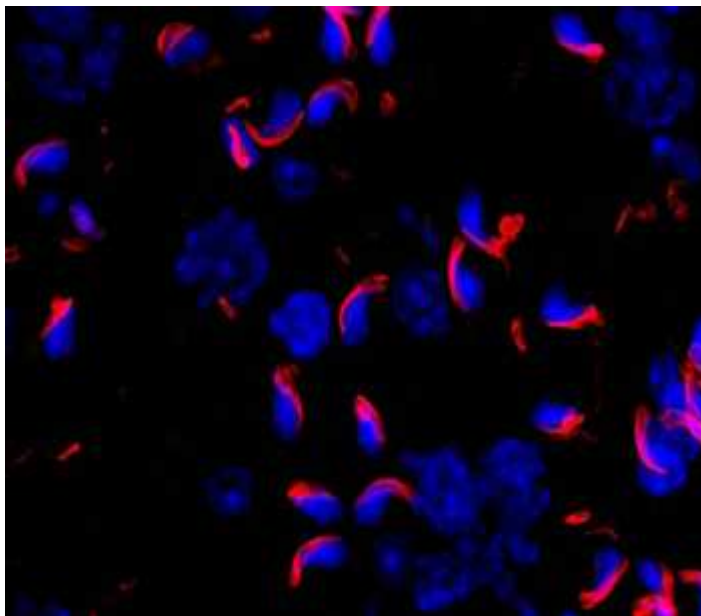
Obr.7.1 Příklady některých fluoroforů s příslušnými excitačními a emisními vlnovými délkami (upraveno dle Alberts a kol. Molecular Biology of the Cell.)



Zdroj: Fluorescenční mikroskopie, Černý J.

Pomocí filtrů je možné od sebe oddělit světlo různých vlnových délek, do okuláru tak pronikne pouze pozitivní emitovaný signál na černém pozadí (excitující záření je odfiltrováno), tím se výrazně zvyšuje citlivost celé techniky. Fluorofory jsou detekovány pomocí fluorescenčního mikroskopu, který je na rozdíl od klasického optického mikroskopu doplněn o silný zdroj světla a dva typy filtrů. První sada filtrů je mezi zdrojem světla a vzorkem (umožňuje excitovat jednotlivé fluorofory světlem o vybraných vlnových délkách), druhá sada filtrů vpouští do objektivu světlo, které bylo emitováno příslušným fluoroforem (viz obr.7.2) (1).

Obr.7.2 Příklad detekce, využívající fluorofor schopný přímo vazby na buněčnou strukturu (DAPI se váže na DNA) a faloidin vážící se na polymerovaný aktin (modifikovaný fluoroforem TRITC). *Otlakový preparát myšího varlete, fixovaný 4% formaldehydem, permeabilizovaný pomocí 0,1 % Tritonu X-100.*

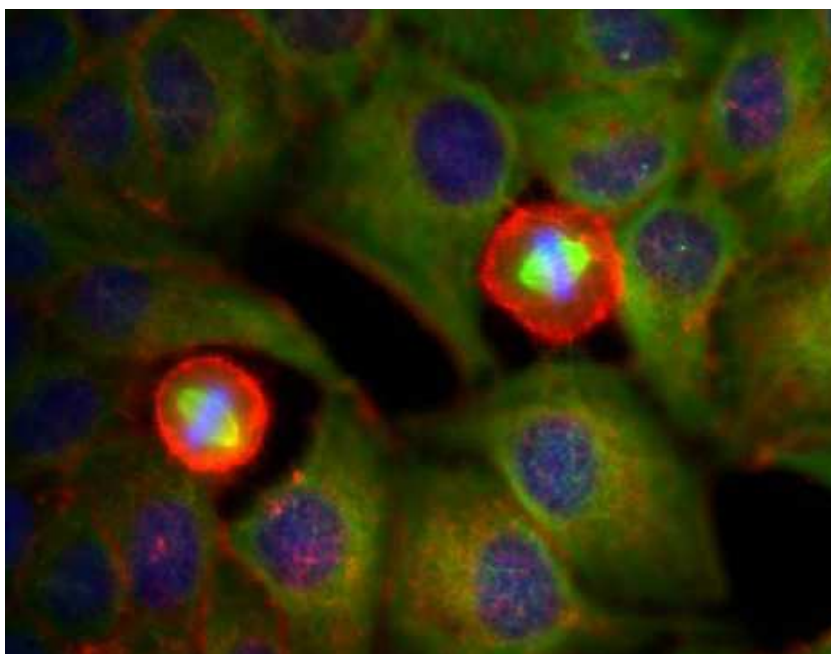


Zdroj: Fluorescenční mikroskopie, Černý J.

K získání specifické reagentie pro rozpoznání jednotlivých struktur v buňce, použitelné pro fluorescenční mikroskopii, se využívá protilátky s kovalentně navázaným, vhodně zvoleným fluoroforem. Dnes je k dispozici několik desítek různých sloučenin, vesměs heterocyklických, které se od sebe liší absorpčními i emisními vlnovými délkami. Touto paletou fluoroforů je možné pokrýt celé spektrum viditelného světla a s využitím příslušných filtrů je možné simultánně pozorovat několik struktur. Každá z těchto struktur je obarvena specifickou reagentií s kovalentně navázaným fluoroforem s příslušnými absorpčními a emisními charakteristikami. Záření z jednotlivých fluoroforů je od sebe možné oddělit pomocí příslušných filtrů. Klasickým příkladem je detekce jadra pomocí fluorescenční látky vnikající do struktury DNA (DAPI – modrá emise), detekce aktiniového cytosketu pomocí látky pevně se vážící na polymerovaný aktin

s kovalentně navázaným fluoroforem (např. faloidin./TRITC – červená emise) a detekce tubulového skeletu pomocí specifické protilátky označené zeleným fluoroforem – např. FITC (viz obr.7.3)(1).

Obr.7.3 Příklad detekce kombinující DAPI, faloidin/TRITC s monoklonální protilátkou proti tubulinu. Buňky buněčné linie HeLa. Mikroskop je zaostřen na dělící se buňky, které mají více-méně tvar koule, interfázické ploché buňky jsou pod rovinou ostrosti.



Zdroj: Fluorescenční mikroskopie, Černý J.

Buněčný biolog si dnes může vybrat z mnoha fluoroforů, které se samy vážou na buněčné struktury – např. už zmíněné DAPI na DNA. Může si také zvolit reagentie, které byly připraveny kovalentním spojením vhodného fluoroforu a látky, u níž je prokázána specifická vazba na určitou buněčnou strukturu. Běžně je využíváno nepřeberné množství značených protilátek.

Biologická technologie dnes umožňuje nejen vnášení genů do buněčných kultur, je možné také vytváření geneticky modifikovaných organismů, které ve svém genomu nesou informaci vytvořenou nebo pozměněnou rukama genového inženýra. V současné době existuje velké množství transgenních organismů, které ve svém genomu nesou informace pro proteiny označené variantou některého fluorescenčního proteinu – některé i v několika barvách.

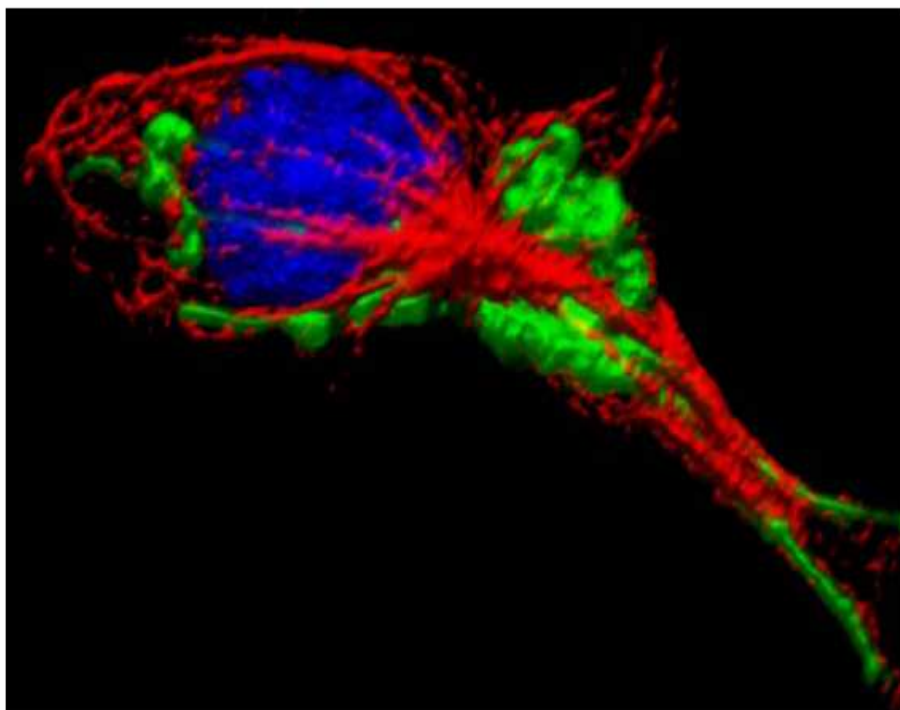
Nevýhodou klasické fluorescenční mikroskopie je to, že se i při sebelepším zaostření detekuje i část světelného signálu pod a nad rovinou ostrosti. Pro pozorování živých buněk se používá modifikace fluorescenční mikroskopie, tzv. konfokální mikroskopie. Její výhodou je to, že se získává ostrý obraz obsahující informaci (příslušné emitované fotony) pouze z roviny ostrosti. Nevýhodou je, že pro získání využitelně silných signálů vyžaduje mimořádně silný zdroj světla typu laseru a speciální technologii datelce fotonů z roviny ostrosti (což zvyšuje cenu přístroje).

Možnosti pozorování struktur v živých buňkách není omezena jen na zvýraznění hybridních fluorescenčních proteinů. Existuje celá řada reagensů, které pronikají přes plazmatickou membránu do buněk a zde se podle své chemické povahy akumulují v charakteristické lokalizaci. Při použití doporučené koncentrace těchto látek není nijak výrazně ovlivněna fyziologie pozorovaných buněk a je možné je sledovat v živých buňkách poměrně dlouhou dobu – v řádu hodin. Vzhledem k tomu, že existují různé barevné odstíny je možné je kombinovat a pozorovat simultánně např. zelené mitochondrie a červené lysozomy. Tento systém může být ještě doplněn o modře zbarvené jádro, pro jehož detekci může být využita reagentie z rodiny molekul, označovaných Hoechst (viz obr.7.4).

Obecnou komplikací fluorescenční mikroskopie je to, že fluorofory jsou intenzivním zářením rozkládány a ztrácejí schopnost absorpce a emise, tzv. fotobleaching. Při absorpcích a následných emisích také dochází k uvolňování radikálů, které mohou poškozovat fluorofory, způsobovat fotobleaching a negativně ovlivňovat životaschopnost buněk. Při práci se živými buňkami je proto zásadní omezit jejich expozici světelným zářením z vysokoenergetických zdrojů. Toho se dosahuje využitím clon, které vpoští do objektu excitační světlo pouze při expozici a co nejcitlivějších kamer nebo fotonásobi-

čů. Standardní součástí fluorescenční mikroskopie je využití software pro obrazovou analýzu, který umožňuje zpracovávat obrazový výstup kvantitativním i kvalitativním způsobem (1).

Obr.7.4 3 D rekonstrukce dendritické buňky, diferencované z kostní dřeně geneticky upravené myši. Pomocí konfokální videomikroskopie je možné např. zachytit translokaci zeleného signálu z endozomální lokalizace na buněčný povrch po aktivaci příslušných buněk. Zeleně je zachycen endozomální systém, vizualizovaný pomocí MHCII.třídy GFP, červeně mikrotubulární cytoskelet (protilátky proti tubulinu), modré jádro (DAPI)



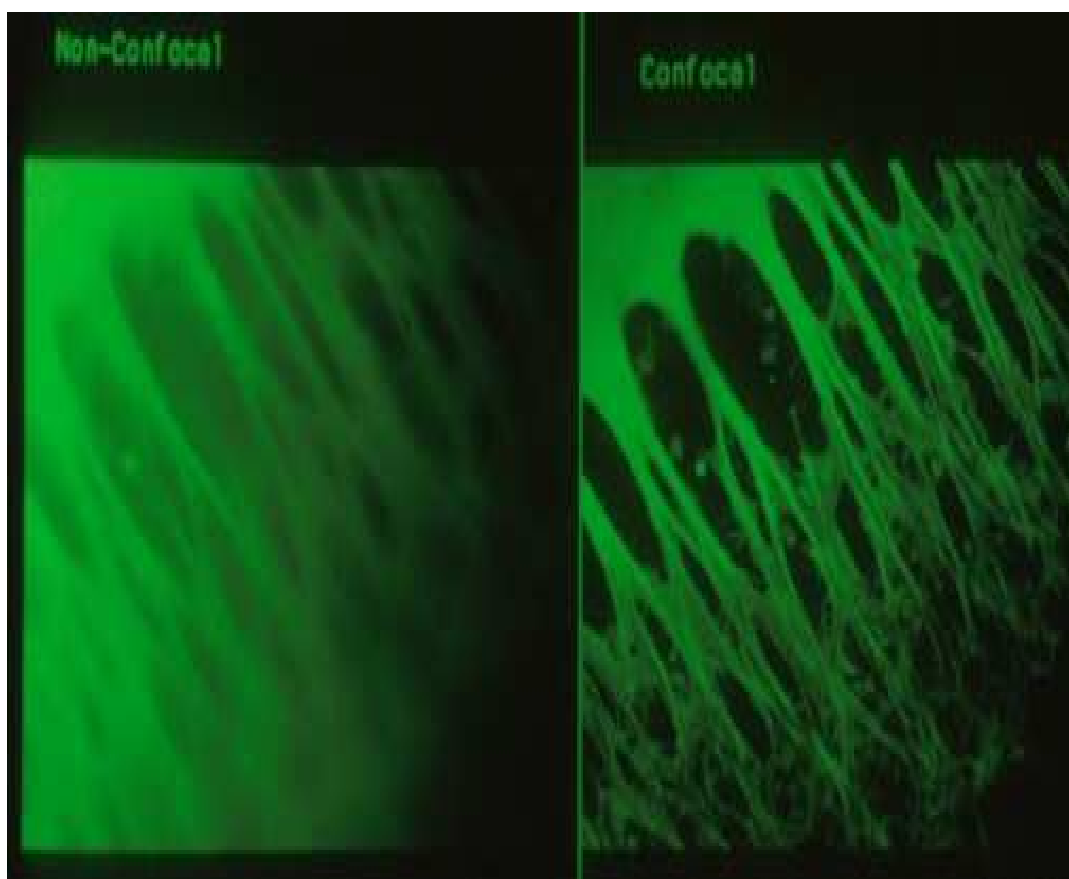
Zdroj: Fluorescenční mikroskopie, Černý J.

7.1 Konfokální mikroskop

Konfokální mikroskop umožňuje odstranit z obrazu objektu šum, který vytváří světlo nebo fluorescence emitovaná z těch rovin vzorku, na které není zaostřena optika (viz obr.7.5, viz obr.7.6). Zdrojem světla je zpravidla laser, světlo prochází úzkou štěrbinou a je zaostřeno do jednoho bodu vzorku. Světlo emitované z tohoto bodu je pak

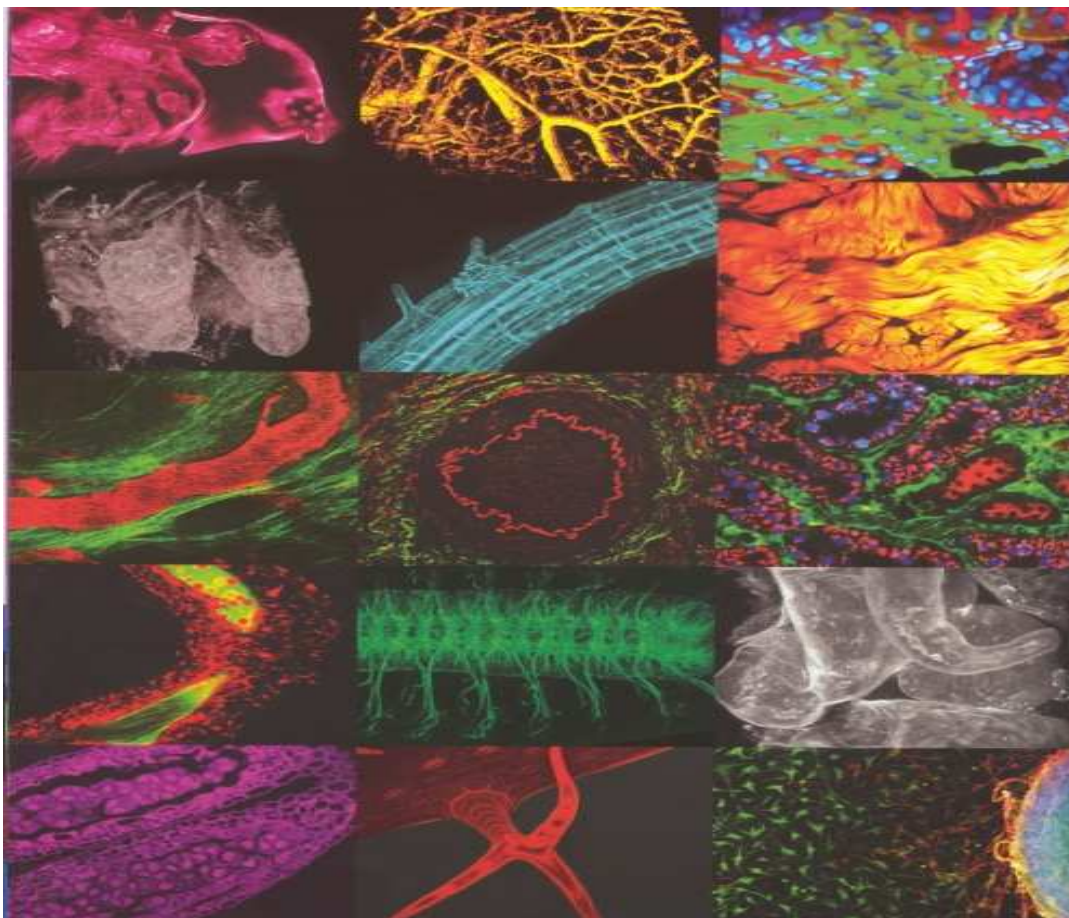
snímáno detektorem. Aby dopadlo na detektor, musí opět projít úzkou šterbinou, která leží v místě, kam objektiv zaměřuje světlo ze zaostřeného bodu objektu. Světlo emitované z osvětlených, ale nezaostřených bodů je fokusováno mimo šterbinu a do detektoru nedopadá. Signál z detektoru je odeslán do počítače, který zároveň dostává informaci o souřadnicích snímaného bodu. Tímto způsobem je bod po bodu proskenován celý objekt v různých optických rovinách. Toto skenování je automatizováno a ovládáno řídicím počítačem. Z nashromážděných informací počítač sestaví celkový obraz (viz obr.7.7). Nevýhodou konfokálního mikroskopu je především jeho cena, která se pohybuje v řádech miliónů korun. Přesto se stává v poslední době stále běžnější součástí vybavení bohatších laboratoří a výzkumných ústavů (22).

Obr.7.5 Srovnání obrazu z fluorescenčního a konfokálního mikroskopu



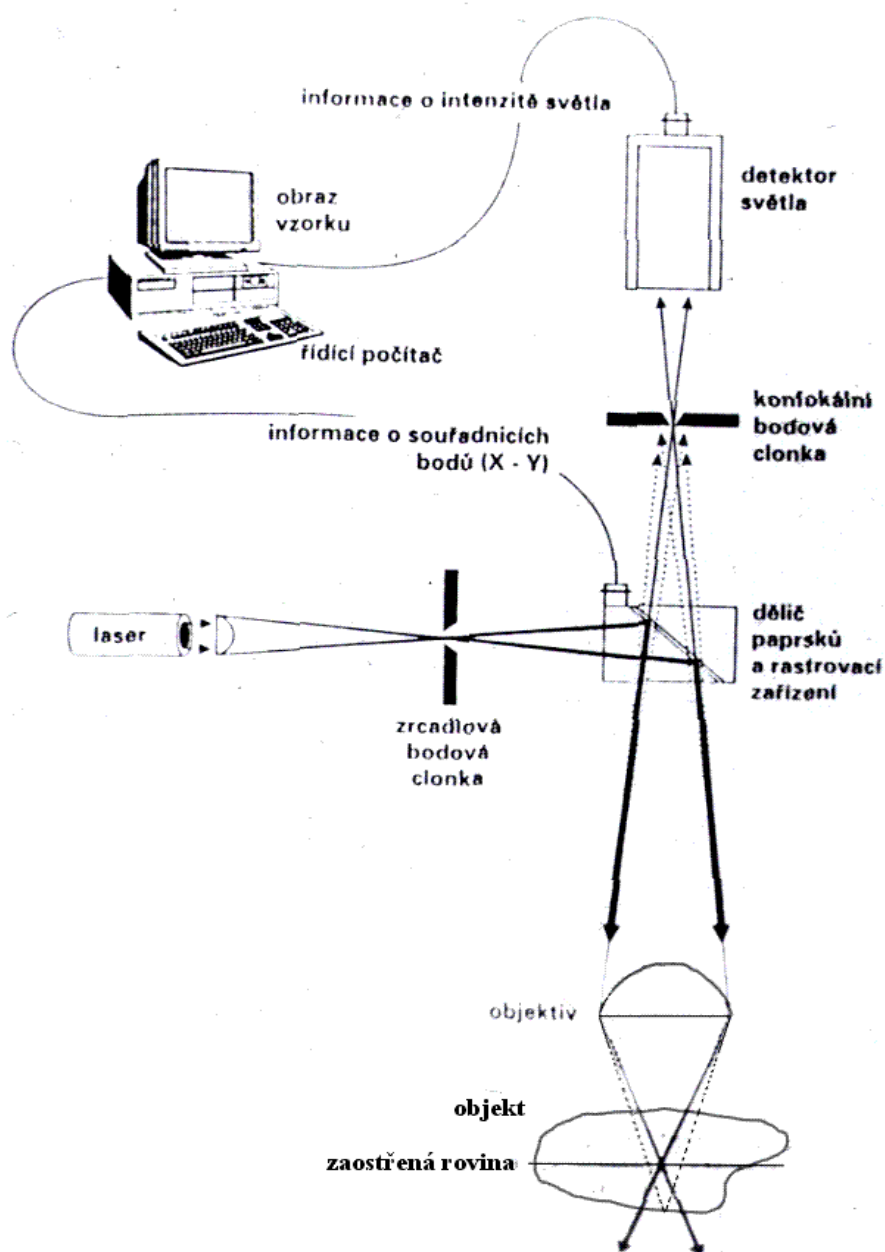
Zdroj: Příručka „The Use of the Olympus Fluorescence Microscope“

Obr.7.6 Obrázky z konfokálního mikroskopu



Zdroj: Příručka „The Use of the Olympus Fluorescence Microscope“

Obr.7.7 Schéma konfokálního mikroskopu



Zdroj: Příručka „The Use of the Olympus Fluorescence Microscope“

8 Cíl práce a hypotézy

Cílem práce je ověření fotodynamických vlastností nově vyvíjené fotodynamicky aktivní látky ftalocyaninu ClAlPcS_2 a možností jejího využití pro navození fotodynamického jevu v buňkách melanomu. Cílem práce je tedy prokázat produkci reaktivních forem kyslíku při různých koncentracích senzitizeru v buněčných liniích lidského melanomu a tím ověřit schopnost ftalocyaninu ClAlPcS_2 navodit fotodynamickou reakci.

Vlivem absorpce světla dochází v senzitizeru ke vzniku excitovaných stavů. Excitovaná forma senzitizeru potom dále reaguje přímo se substrátem (buňkou melanomu) za vzniku volných radikálů substrátu. Dalším možným typem reakce excitovaného senzitizeru je přenos energie ze senzitizeru na kyslík a ke vzniku vysoce reaktivní singletové formy kyslíku. Volné radikály, především radikály lipidových složek buněčných membrán, jsou příčinou destrukce nádoru. Zvýšená akumulace ftalocyaninu by měla způsobit po ozáření v buňkách melanomu fotodynamické reakce, které vedou k biologické odpovědi navozením buněčné smrti.

9 Metodika

Fotodynamické vlastnosti ftalocyaninu ClAlPcS_2 byly ověřovány pomocí detekce ROS (reaktivní formy kyslíku) v laboratoři Ústavu lékařské biofyziky lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Jako biologický model byly použity nádorové buněčné linie G 361 (lidský melanom), zkoumaným senzitizerem byl ftalocyanin ClAlPcS_2 (získán z Výzkumného ústavu organických syntéz, Rybitví, ČR). Zdrojem záření byly luminiscenční diody (LEDS).

Tvorba ROS byla detekována pomocí fluorescenční značky $\text{CM-H}_2\text{DCFDA}$. Tato látka je po vstupu do buňky buněčnými esterázami přeměněna na derivát $\text{CM-H}_2\text{DCF}$. Po reakci s ROS dochází k jeho oxidaci a vzniku fluorescenčního produktu CM-DCF , který zůstává zachycen uvnitř buňky a odpovídá množství intracelulární oxidace (12). Buňky lidského melanomu G361 (ATTC USA) byly inkubovány 24 hodin v Petriho miskách (500 000/na misku) ve 2 ml kultivačního média DMEM v termostatu (viz obr.9.1) při 37°C a 5% atmosféře CO_2 .

Obr.9.2 Flowbox (laboratoř Ústavu lékařské biofyziky lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci)

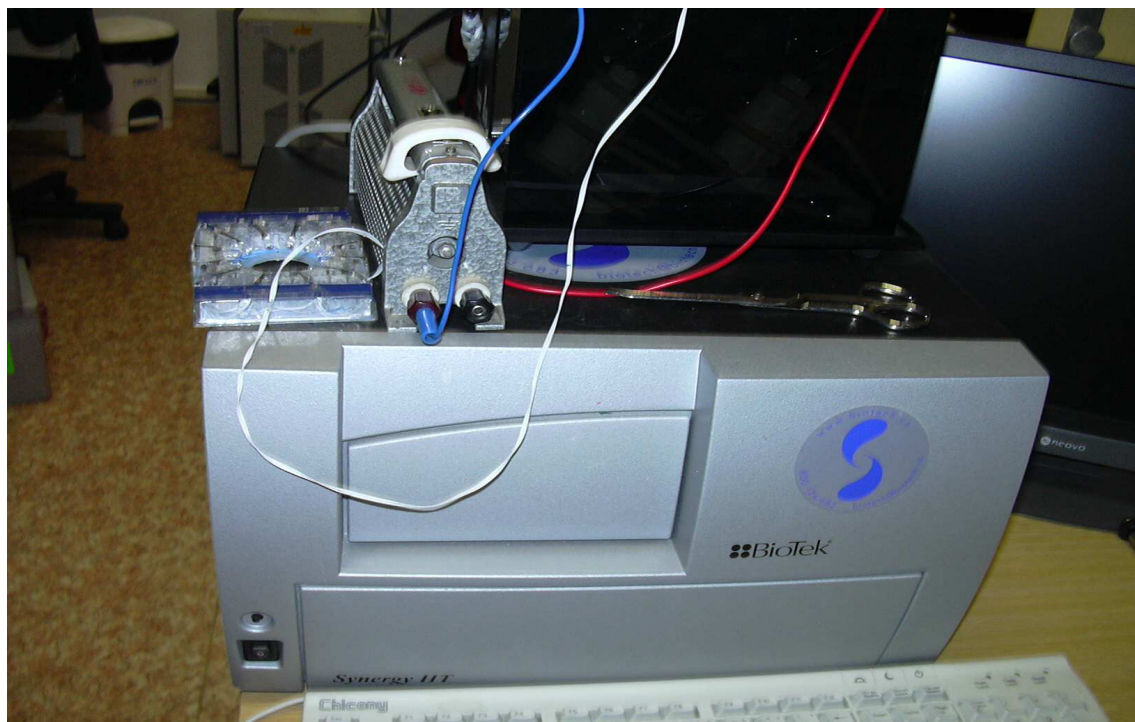


Buňky byly dále inkubovány 20 minut ve tmě při 37°C a 5% atmosféře CO₂. Produkce ROS po fotodynamické reakci byla měřena pomocí spektrofluorimetru Synergy HT (BioTek, USA) při excitační vlnové délce 495nm a emisní vlnové délce 530 nm (viz obr.9.3).

K navození fotodynamické reakce byl použitý ozařovač složený z luminiscenčních diod (LEDs; 670 nm, 10 mW.cm⁻²) o hustotě výkonu 10mW cm⁻² v celkové dávce 15 J.cm⁻² po dobu 25 minut. Kontrolní vzorky představovaly buněčné linie pouze v kultivačním médiu bez ozáření a bez sensitizeru. Morfologické změny byly ověřovány pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus IX 81 s analýzou obrazu

(viz obr 9.4.). Pro každou koncentraci byla provedena 4 nezávislá měření a vypočítán průměr a směrodatná odchylka.

Obr.9.3 Spektrofluorimetr Synergy HT (laboratoř Ústavu lékařské biofyziky lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci)



Dále byla sestrojena kalibrační křivka, ze které se určila směrnice křivky. Kalibrační křivka se detekovala pomocí kinetického měření detekce H_2O_2 . Do misky s buněčnou linií a fluorescenční sondou inkubovanou 30 minut ve tmě v PBS s 5 mM glukózou se přidalo postupně po 4 minutách automaticky pomocí dávkovače ve fluorescenčním readeru 10 μl 20 mM H_2O_2 , 25 μl 20 mM H_2O_2 , 50 μl 20 mM H_2O_2 a nakonec 50 μl 200 mM H_2O_2 .

Po posledním přidavku peroxidu vodíku se kinetické měření provádělo ještě 20 minut, aby se hodnota nárůstu ROS ustálila na maximální hodnotě. Ze získané křivky (viz graf 1) kinetického měření byla získána data, ze kterých se určily 4 hodnoty použité k sestrojení kalibrační křivky. Hodnoty, ze kterých se kalibrační křivka sestrojovala

byly vždy ustálené maximální hodnoty po přidavku určeného množství H_2O_2 (tabulka 1). Z kalibrační křivky se určila směrnice k , která se použila k přepočtu získaných dat (tabulka 2) z fluorescenčních jednotek (FU) na koncentraci (μM H_2O_2 na 330 000 buněk). Směrnice křivky byla:

$$y = 0,5585x + 151,09$$

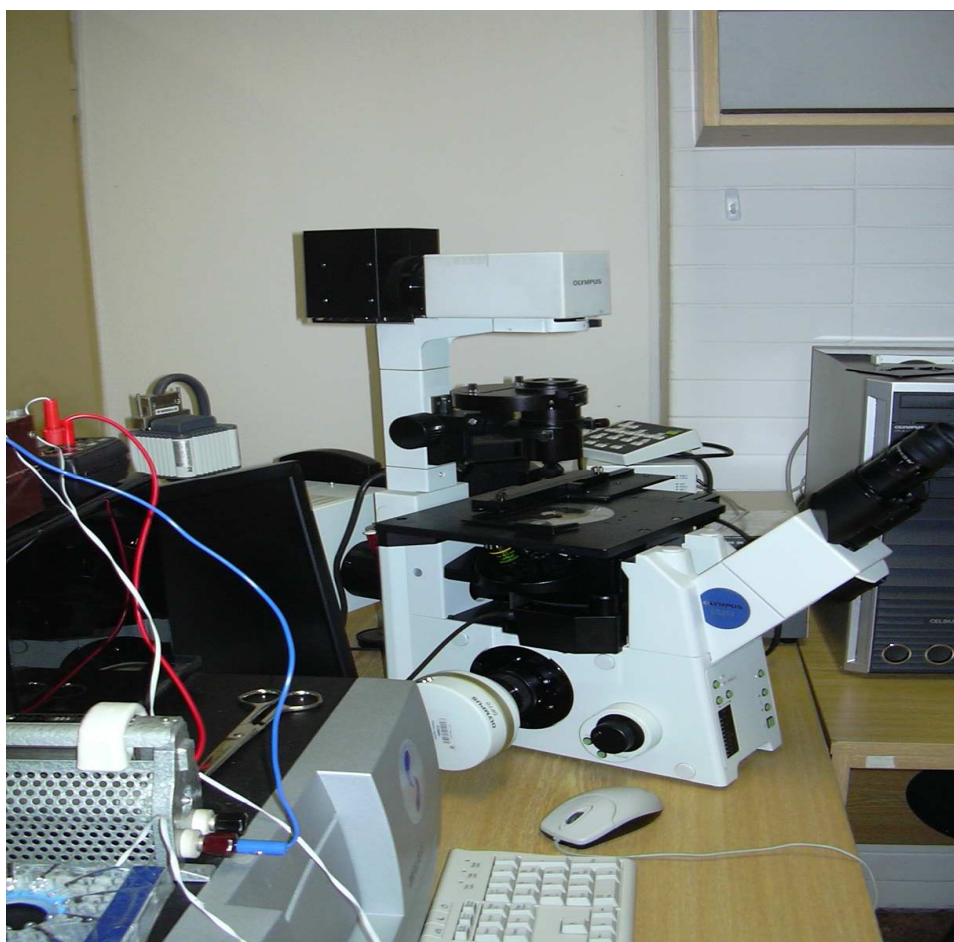
k bylo určeno podle obecného tvaru rovnice přímky

$$y = kx + q$$

čehož plyne, že $k = 0,5585$ (viz graf 2).

Tato směrnice přímky byla použita k přepočtu fluorescenčních jednotek na koncentraci H_2O_2 (tabulka 3).

Obr.9.4 Fluorescenční mikroskop s analýzou obrazu Olympus IX 81 (laboratoř Ústavu lékařské biofyziky lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci)



10 Výsledky

Fotodynamické vlastnosti ftalocyaninu ClALPcS₂ byly ověřovány pomocí měření produkce ROS v nádorových buněčných liniích lidského melanomu.G361.

Byly ozářeny buňky melanomu, které byly inkubovány s přidáním 1, 10 a 100 uM sensitizeru a pro srovnání buňky melanomu bez sensitizeru. Pro detekci ROS byla použita fluorescenční značka CM-H₂DCFDA. Morfologický obraz buněk byl sledován ve fluorescenčním mikroskopu v procházejícím světle (viz obr. 10.1.) a s využitím fluorescence byla ověřována distribuce reaktivních forem kyslíku v nádorových buňkách (viz obr.10.2).

Naměřené hodnoty byly získány ze 4 vzorků přímo při kinetice ozáření v interním ozařovači fluororeaderu a následně po dozáření do konečné dávky 15 J/cm². Zjištěné hodnoty byly vloženy do tabulek, pro každou koncentraci byl stanoven průměr a směrodatná odchylka. Koncentrace H₂O₂ v jedné misce (500 000 buněk) byla stanovena přepočtem pomocí kalibrační křivky (viz graf 1, 2). Pro grafické vyjádření kinetické produkce ROS a vlivu koncentrace sensitizeru ClALPcS₂ na produkci ROS po ozáření světlem o vlnové délce 670 nm byly sestrojeny grafy. Z výsledků (viz graf 3, 4, 5) vyplývá, že s rostoucí koncentrací sensitizeru při dávce ozáření 15 J/cm² roste produkce ROS v buňkách melanomu.

Tab.1: Naměřené hodnoty k sestrojení kalibrační křivky.

Přídavek H₂O₂ č.	Fluorescence (FU)	Koncentrace H₂O₂ (μM)
1	139	99
2	351	340
3	673	815
4	3202	5479

Tab.2: Příklad hodnot kinetické a finální produkce ROS naměřených fluorescenčním readerem pro koncentraci 1 μM ClAlPcS₂, ve fluorescenčních jednotkách FU na 500 000 buněk.

Kinetic read	Číslo měření (FU)				
	1	2	3	4	Průměr
0:00:00	311	257	277	228	268,25
0:00:20	289	256	275	225	261,25
0:00:40	317	264	283	228	273
0:01:00	351	278	304	236	292,25
0:01:20	362	296	316	249	305,75
0:01:40	361	308	328	263	315
0:02:00	360	318	327	275	320
0:02:20	360	321	332	277	322,5
0:02:40	360	327	336	281	326
0:03:00	362	329	331	284	326,5
0:03:20	363	332	335	289	329,75
0:03:40	364	330	339	289	330,5
0:04:00	366	334	337	290	331,75
0:04:20	368	334	340	289	332,75
0:04:40	371	337	342	295	336,25
0:05:00	372	339	343	294	337
0:05:20	374	337	344	299	338,5
0:05:40	375	343	346	296	340
0:06:00	376	343	347	298	341
0:06:20	379	343	348	299	342,25
0:06:40	382	348	351	301	345,5
0:07:00	382	348	354	302	346,5
0:07:20	384	349	357	305	348,75
0:07:40	385	353	354	306	349,5
0:08:00	387	351	356	308	350,5
0:08:20	391	355	358	309	353,25
0:08:40	391	358	361	311	355,25
0:09:00	394	359	365	312	357,5
0:09:20	395	360	365	313	358,25
0:09:40	398	362	366	313	359,75
0:10:00	399	360	371	311	360,25
0:10:20	400	364	371	317	363
0:10:40	405	365	372	316	364,5
0:11:00	404	368	372	320	366
0:11:20	408	365	377	321	367,75
0:11:40	409	369	381	321	370

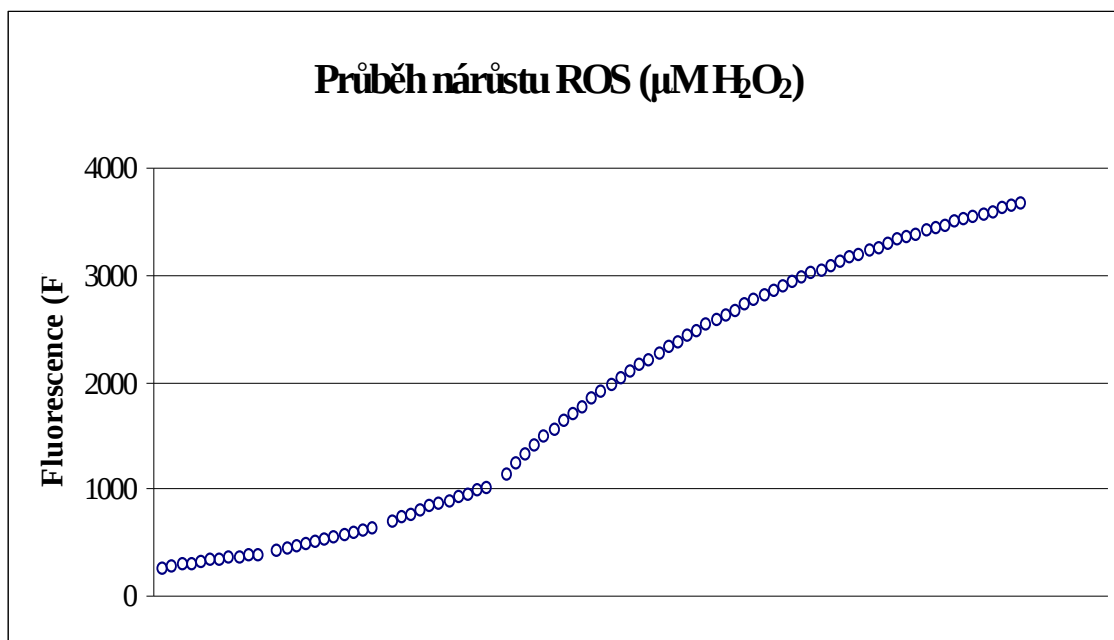
0:12:00	411	370	380	323	371
0:12:20	413	371	381	325	372,5
0:12:40	415	373	382	326	374
0:13:00	418	375	386	325	376
0:13:20	420	379	385	329	378,25
0:13:40	423	376	387	329	378,75
0:14:00	423	379	388	331	380,25
0:14:20	425	380	391	330	381,5
0:14:40	429	381	392	333	383,75
0:15:00	429	385	395	335	386
0:15:20	435	388	394	336	388,25
0:15:40	439	388	400	334	390,25
0:16:00	438	393	401	339	392,75
0:16:20	443	392	403	343	395,25
0:16:40	446	396	406	339	396,75
0:17:00	447	395	409	343	398,5
15 J/cm²	1438	1150	823	722	1033,25

Tab.3: Příklad hodnot kinetické a finální produkce ROS ve vzorku o koncentraci 1 μM ClAlPcS₂ přepočítaných na koncentraci ROS (μM H₂O₂ na 500 000 buněk).

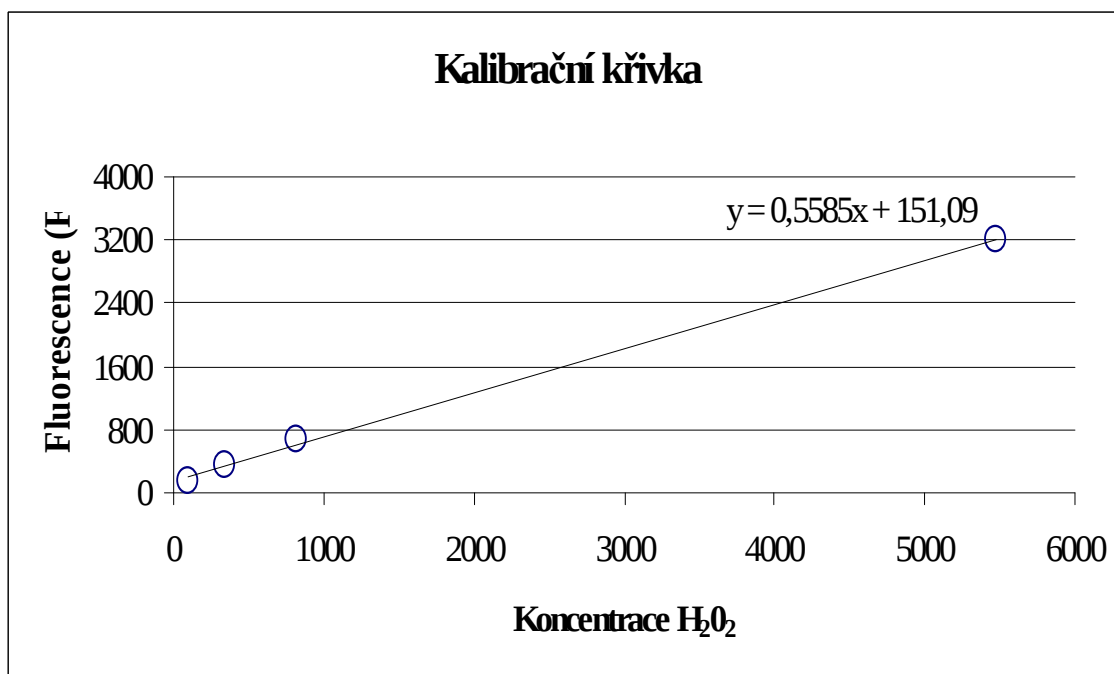
Kinetic read	Číslo měření (FU)				
(min)	1	2	3	4	prů-měr
0:00:00	556,85	460,16	495,97	408,24	480,30
0:00:20	517,46	458,37	492,39	402,86	467,77
0:00:40	567,59	472,69	506,71	408,24	488,81
0:01:00	628,47	497,76	544,32	422,56	523,28
0:01:20	648,16	529,99	565,80	445,84	547,45
0:01:40	646,37	551,48	587,29	470,90	564,01
0:02:00	644,58	569,38	585,50	492,39	572,96
0:02:20	644,58	574,75	594,45	495,97	577,44
0:02:40	644,58	585,50	601,61	503,13	583,71
0:03:00	648,16	589,08	592,66	508,50	584,60
0:03:20	649,96	594,45	599,82	517,46	590,42
0:03:40	651,75	590,87	606,98	517,46	591,76
0:04:00	655,33	598,03	603,40	519,25	594,00
0:04:20	658,91	598,03	608,77	517,46	595,79
0:04:40	664,28	603,40	612,35	528,20	602,06
0:05:00	666,07	606,98	614,15	526,41	603,40
0:05:20	669,65	603,40	615,94	535,36	606,09

0:05:40	671,44	614,15	619,52	529,99	608,77
0:06:00	673,23	614,15	621,31	533,57	610,56
0:06:20	678,60	614,15	623,10	535,36	612,80
0:06:40	683,97	623,10	628,47	538,94	618,62
0:07:00	683,97	623,10	633,84	540,73	620,41
0:07:20	687,56	624,89	639,21	546,11	624,44
0:07:40	689,35	632,05	633,84	547,90	625,78
0:08:00	692,93	628,47	637,42	551,48	627,57
0:08:20	700,09	635,63	641,00	553,27	632,50
0:08:40	700,09	641,00	646,37	556,85	636,08
0:09:00	705,46	642,79	653,54	558,64	640,11
0:09:20	707,25	644,58	653,54	560,43	641,45
0:09:40	712,62	648,16	655,33	560,43	644,14
0:10:00	714,41	644,58	664,28	556,85	645,03
0:10:20	716,20	651,75	664,28	567,59	649,96
0:10:40	725,16	653,54	666,07	565,80	652,64
0:11:00	723,37	658,91	666,07	572,96	655,33
0:11:20	730,53	653,54	675,02	574,75	658,46
0:11:40	732,32	660,70	682,18	574,75	662,49
0:12:00	735,90	662,49	680,39	578,33	664,28
0:12:20	739,48	664,28	682,18	581,92	666,97
0:12:40	743,06	667,86	683,97	583,71	669,65
0:13:00	748,43	671,44	691,14	581,92	673,23
0:13:20	752,01	678,60	689,35	589,08	677,26
0:13:40	757,39	673,23	692,93	589,08	678,16
0:14:00	757,39	678,60	694,72	592,66	680,84
0:14:20	760,97	680,39	700,09	590,87	683,08
0:14:40	768,13	682,18	701,88	596,24	687,11
0:15:00	768,13	689,35	707,25	599,82	691,14
0:15:20	778,87	694,72	705,46	601,61	695,17
0:15:40	786,03	694,72	716,20	598,03	698,75
0:16:00	784,24	703,67	717,99	606,98	703,22
0:16:20	793,20	701,88	721,58	614,15	707,70
0:16:40	798,57	709,04	726,95	606,98	710,38
0:17:00	800,36	707,25	732,32	614,15	713,52
15 J/cm²	2574,7 5	2059,0 9	1473,5 9	1292,7 5	1850,0 4

Graf 1: Křivka kinetického měření ROS po přidavku 10 μl 20 mM H_2O_2 , 25 μl 20 mM H_2O_2 , 50 μl 20 mM H_2O_2 a 50 μl 200 mM H_2O_2 .



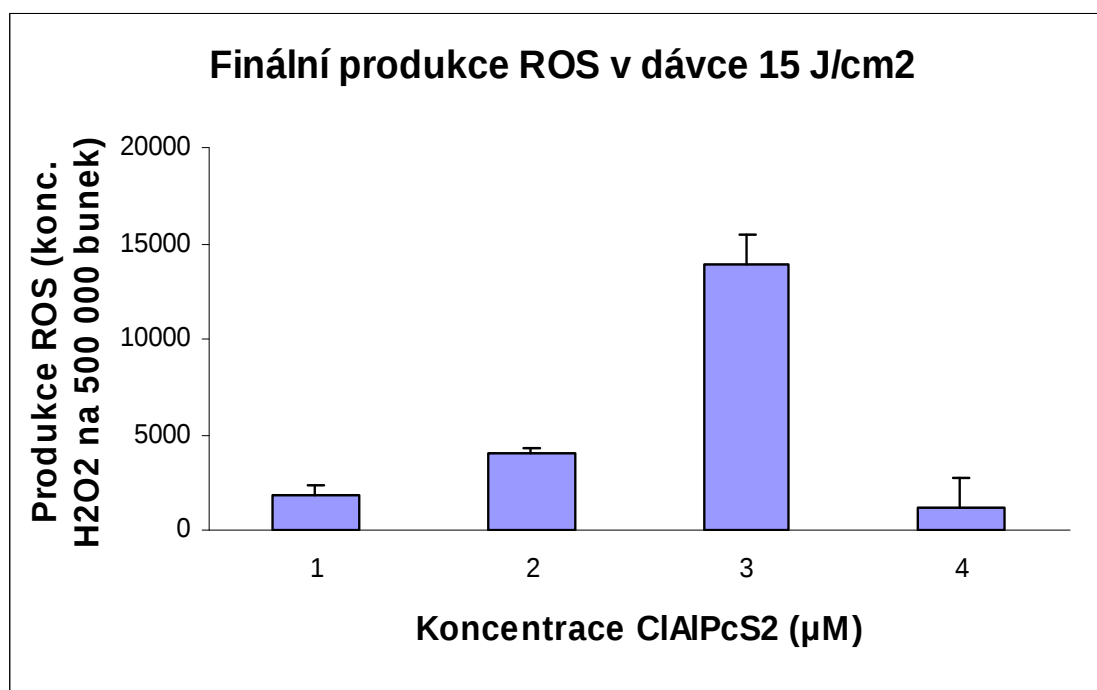
Graf 2: Kalibrační křivka.



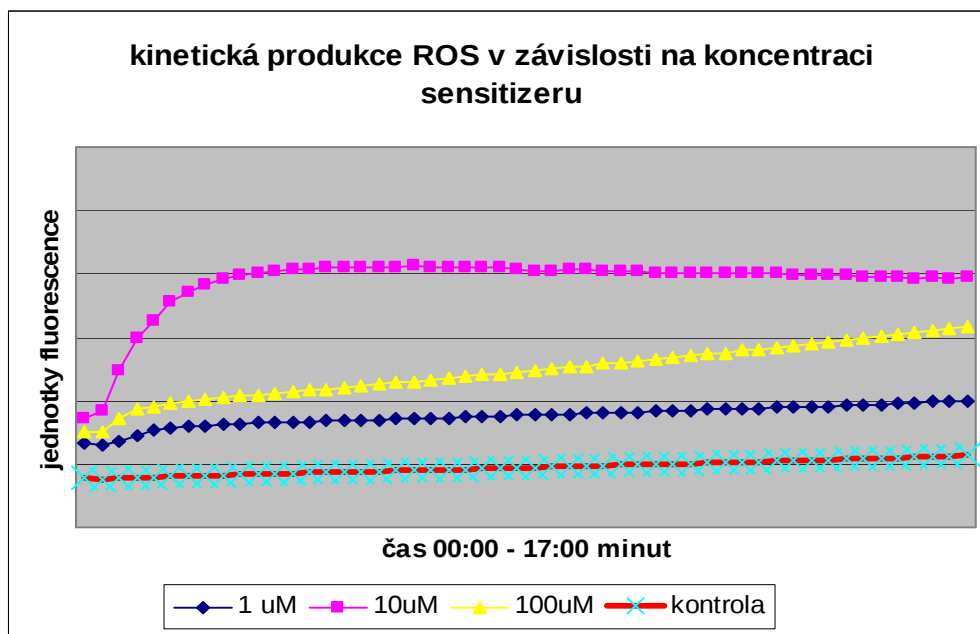
Tab.4: Kinetická produkce ROS ($\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ na 500 000 buněk) v prvních 20 sekundách, 5 minutách, 17 minutách a ve finální dávce 15 J/cm^2 .

Koncentrace ClAlPcS ₂ (μM)	ROS produkce [$\mu\text{M/s}^1$ H ₂ O ₂] v prvních 20 sekundách	ROS produkce [$\mu\text{M/s}^1$ H ₂ O ₂] v 5 minutách	ROS produkce [$\mu\text{M/s}^1$ H ₂ O ₂] v 17 minutách	ROS koncentrace v dávce 15 J/cm^2 [$\mu\text{M H}_2\text{O}_2$]
1	$11,75 \pm 9,60$	$4,83 \pm 0,70$	$2,03 \pm 0,11$	$1850,04 \pm 505,27$
10	$126,25 \pm 21,66$	$29,71 \pm 8,51$	$3,18 \pm 2,64$	$3475,38 \pm 947,73$
100	$41,00 \pm 33,23$	$8,57 \pm 2,35$	$5,51 \pm 1,58$	$13863,92 \pm 804,76$
Kontrola	$2,50 \pm 12,65$	$1,49 \pm 0,64$	$1,42 \pm 0,66$	$1197,40 \pm 305,11$

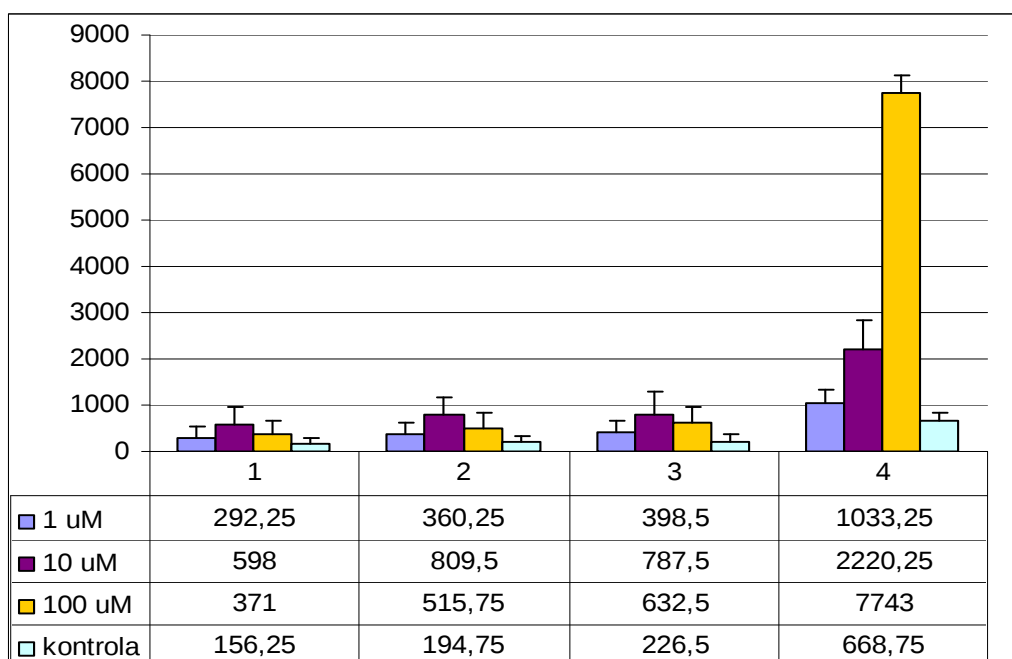
Graf 3: Produkce ROS v dávce 15 J/cm^2 přepočítaná na koncentraci ($\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ na 500 000 buněk) při koncentraci 1, 10 a 100 $\mu\text{M ClAlPcS}_2$ (vz.1:1 μM , vz.2: 10 μM , vz.3: 100 μM , vz.4: kontrola)



Graf 4: Kinetická produkce ROS v závislosti na koncentraci ClAlPcS₂



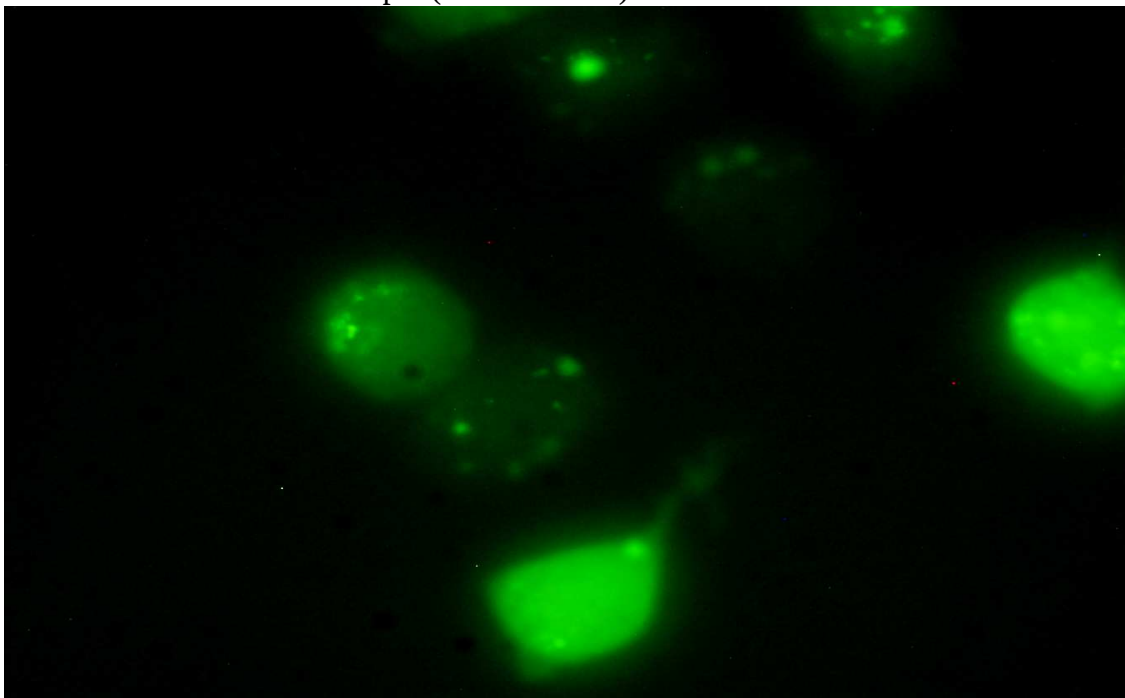
Graf 5: Nárůst produkce ROS v časových intervalech a po dozáření do dávky 15 J/cm² v závislosti na koncentraci ftalocyaninu (1 – po 1 minutě, 2 – za 5 minut, 3 – za 17 minut, 4- po dozáření do dávky 15 J/cm²)



Obr.10.1 Kontrolní živé G361 buňky lidského melanomu (zvětšení 400x).



Obr. 10.2. Detekce produkce reaktivních forem kyslíku v buňkách po fotodynamické terapii ve fluorescenčním mikroskopu. (zvětšení 400x).



11 Diskuse

Fotodynamická terapie je dnes jednou z nejmladších klinicky studovaných metod léčby nádorových i nenádorových onemocnění. Využívá kombinací fyzikálních a chemických účinků způsobující destrukci nádorové tkáně. K úspěchu léčby je zapotřebí zvolit vhodnou koncentraci senzitizeru, vlnovou délku a dávku záření.

Jaké vlastnosti by měl mít fotosenzitizer? Měl by být netoxický, stabilní a o známé chemické struktuře, jež má vysokou účinnou selektivitu k rakovinotvorným buňkám. Měl by silně absorbovat (ostré maximum) v části optického spektra, kde světlo optimálně proniká živou tkání a kde energie fotonů je ještě dostatečně vysoká k produkci singletového kyslíku (600 – 1100 nm). Ten je reaktivnější než základní molekulární stav a vede k oxidaci membránových lipidů a proteinů, což se projevuje cytolýzou a tumorózní destrukcí. Další možností je reakce senzitizeru a tkáně za vzniku volných radikálů. Volné radikály, především radikály lipidických složek buněčných membrán, jsou pak příčinou destrukce nádoru (6).

Doposud jediné klinicky testované jsou hematoporfyrinové deriváty a ostatní porfyriny. Od devadesátých let jsou intenzivně studovány fotosenzitizery druhé generace, ke kterým patří deriváty ftalocyaninu. Ftalocyaniny jsou syntetické porfyriny vykazující největší absorpci v dlouhovlnné oblasti viditelného spektra. Jsou chelatovány zinkem nebo hliníkem a tyto diamagnetické kovy zvyšují jejich fototoxicitu. Ftalocyaniny vstupují do buněk endocytózou a jsou lokalizovány v lysosomech. Dále se ftalocyaniny akumulují v mikrozomech a mitochondriích (6).

Tato práce měla ověřit fotodynamické vlastnosti nově vyvíjené fotosenzitivní látky ClAlPcS₂. Fotodynamické vlastnosti a fototoxicita ftalocyaninu byla zjišťována pomocí měření produkce ROS za použití molekulární značky CM-H₂DCFDA.

Mezi reaktivní formy kyslíku patří jednak volné kyslíkové radikály, které mají jeden nebo více nepárových elektronů jako je OH·, O₂·⁻ nebo neradikálové deriváty kyslíku jako je H₂O₂ nebo kyselina chlorná (HOCl). Jde o velmi toxické částice, které poškozují membrány buněk a další komponenty (13).

Fotodynamický efekt byl zkoumán na buňkách G361 (buňky lidského melanomu) po ošetření senzitizerem v koncentracích 1, 10 a 100 μM.

Naměřené hodnoty ukazují rychlejší nárůst a také rychlejší pokles produkce ROS u koncentrace 10 μM , u koncentrace 100 μM je nárůst pomalejší a tvorba ROS stoupá lineárně až do ozáření konečnou dávkou 15 J/cm^2 . Z výsledků (viz graf. 3., 4.) vyplývá, že při celkové dávce ozáření 15 J/cm^2 s rostoucí koncentrací senzitizeru roste produkce ROS v buňkách melanomu. Prokázalo se, že produkce reaktivních forem kyslíku je závislá na koncentraci senzitizeru ClAlPcS_2 a dávce záření. Úspěšnost fotodynamické terapie je tedy ovlivněna typem senzitizeru, jeho akumulací v cílové tkáni, hladině kyslíku v nádorové buňce a použitém zdroji světelného záření. Zvýšená akumulace ftalocyaninu v buňkách melanomu navodí fotodynamické reakce, které vedou k biologické odpovědi navozením buněčné smrti.

12 Závěr

Tato práce prokázala, že přítomnost ftalocyaninu ClAlPcS_2 v buňkách G361 (lidský melanom) a ozáření světlem o vlnové délce 670 nm vyvolá fotodynamický jev a produkci ROS. Detekce ROS po fotodynamické terapii *in vitro* a jejich produkce byla ověřena pomocí fluorescenční molekulární značky CM- H_2DCFDA . Fluorescenční měření bylo prováděno na spektrofluorimetru Synergy HT a fluorescenčním mikroskopu Olympus IX 81 s analýzou obrazu.

Z výsledků vyplývá, že produkce ROS závisí na koncentraci senzitizeru ClAlPcS_2 a dávce záření. Bylo ověřeno, že senzitizer ClAlPcS_2 je vhodnou fotodynamicky aktivní látkou a navozuje fotodynamický jev v nádorových buňkách. Ftalocyaniny a jejich deriváty jsou slibnými senzitizerami pro fotodynamickou terapii. Zvýšená produkce ROS, která nastane po ozáření nádorových buněk, ve kterých se akumuloval ftalocyanin, vede k biologické odpovědi formou nekrózy a apoptózy nádorových buněk. Na akumulaci senzitizeru v nádorových buňkách se podílí vedle jejich zvýšené aktivity k rychle rostoucí tkáni řada faktorů, včetně odlišné morfologie a metabolismů tumorů (9).

Tato bakalářská práce se svým tématem vymyká běžně využívaným znalostem a praktickým vědomostem radiologického asistenta. Pro autora této práce je (vzhledem k více než dvacetileté praxi v oboru radiologický asistent) velkým přínosem seznámení se s nově se vyvíjejícím způsobem léčby a poznání termínu „mravenčí“ práce, která

zřejmě provází veškerý výzkum a studium nových metod a ověřování jejich výsledků (ať už pozitivních nebo negativních) napřed v laboratorních podmínkách a poté v klinické praxi.

13 Seznam literatury

1. Černý J., Fluorescenční mikroskopie, <http://www1.lf1.cuni.cz/~zfisar/fluorescence/Default.htm>, [on line], cit.2008-03-20
2. Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W., Jori G., Kessel D., Korbělík M., Moan J., Peng Q. 1998. Photodynamic therapy. J. Natl. Cancer Inst. 90: s.889 – 905.
3. Hrazdíra I., Mornstein V.: Lékařská biofyzika a přístrojová technika, Brno, Neptun, 2001, ISBN 80-902896-1-4
4. Jirásková M., Jirásek L., Kosmetické výhody terapie některých kožních nemocí pomocí fotodynamický aktivních látek, Dermatológia pre prax ,2007, 1: 16-19, dostupné z :www.solen.eu, cit.2008-01-1
5. Kolářová H., Fotodynamická terapie,<http://pdt.wz.cz/teorie%20PDT.html>, cit.2007-10-2
6. Kolářová H., Fotodynamická terapie, In: Kuna P., Navrátil L.,: Klinická radiobiologie, 1.vydání, Praha, Manus , 2005, ISBN 80-86571-09-2
7. Kolářová H., Zdroje a detektory záření – Lasery, In: Navrátil L., Rosina J. a kol.,: Medicínská Biofyzika, Praha, Grada, 2005, s. 230-237
8. Kolarova H., Nevrellova P., Bajgar R., Jirova D., Kejlova K., Strnad M. In vitro photodynamic therapy on melanoma cell lines with phthalocyanine. Toxicology In Vitro 2007 21., 249-253
9. Lang J., Mosinger J., Wágnerová D., Singletový kyslík v praxi – současnost a perspektiva, Chem. listy 100, 2006, s.169-177
10. Maceček J., Studium cytotoxicity fotodynamický aktivních látek na nádorových buněčných liniích, 136 s, Disertační práce, Univerzita Palackého, Lékařská fakulta, Ústav lékařské biofyziky , Olomouc, 2005
11. Masopust J., Patobiochemie buňky, Praha 2003, dostupné z http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_1478.html , cit.2008-02-22
12. Nevřelová P., Studium fotodynamických reakcí na nádorových buněčných liniích, 100 s., Disertační práce, Univerzita Palackého, Lékařská fakulta, Ústav lékařské biofyziky, Olomouc 2006,

13. Patočka J., Apoptolidin a apoptóza <http://toxicology.emtrading.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=151> [on line], cit.2008-01-17
14. Poučková P., Fotodynamická terapie maligních nádorů v experimentu, str.95, Habilitační a inaugurační přednášky na 1.lékařské fakultě UK v Praze 2004, Praha, Galén 2004, s. 95-99, ISBN 80-7262-338-9
15. Tuner,J., Hode L., Hloubka průniku laserového světla do tkáně, Clinixperience, 2000, www.laserpartner.cz [on line] česká verze: ISSN 1213-1156
16. http://www1.lf1.cuni.cz/sbornik_hab_inaugur_2004.pdf
17. <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/principy.html> [on line] cit.2008-01-15
18. http://chemicke-listy.vscht.cz/docs/full/2005_04_211-221.pdf. [on line], cit.2008-03-06.
19. http://www.vscht.cz/chem_listy/docs/full/2007_04_315-322.pdf [on line], cit.2008-03-08
20. <http://www.jergym.hiedu.cz/~canovm/barva/a/le.html> [on line], cit.2007-11-23
21. <http://www.therapy.cz/laserove-zareni.php> [on line], cit.2007-10-20
22. Příručka „*The Use of the Olympus Fluorescence Microscope*“

14 Klíčová slova

Klíčová slova: fotodynamická terapie, senzitizer, reaktivní formy kyslíku

Key words: Photodynamic therapy, sensitizer, reactive oxygen species

15 Seznam zkratek a symbolů

Al	hliník
ALA	kyselina delta aminolevulová (5-aminolevulová)
AMD	senilní degenerace makuly (Age-related Macular Degeneration)
ATP	adenosin trifosfát
Bcl-2	gen a rodina anti nebo proapoptických proteinů
CASPASES	Cysteine Aspartate Specific ProteASEs
ClAlPcS2	disulfonovaný chloroaluminium ftlocyanin
CM-H2DCFDA	5-(a-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát
CM-H2DCF	5-(a-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorofluorescein
Co	kobalt
CO ₂	oxid uhličitý
Cu	měď
DAPI	4',6-diamidino-2-fenyindol dihydrochloride
DMEM	kultivační médium
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FU	fluorescenční jednotka
Fe	železo
G361	buněčná linie lidského melanomu
HeLa	buněčná linie karcinomu děložního cervixu
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
HOCl	kyselina chlorná
HPD	derivát hematoporfyrinu
LED	luminiscenční dioda (light emitted diode)
mTHPC	tetra(meta-hydroxyfenyl)chlorin, Temoporfin, Foscan
OH·	hydroxilový radikál
O ₂ ·-	superoxidový radikál
PBS	phosphate bufferd saline, druh pufru
PDT	fotodynamická terapie

PdTPPS4	paladnatý komplex sensitizeru TPPS4
ROS	reaktivní formy kyslíku
TPPS4	meso-tetrakis(4-sulfonatofenyl)porfyrin
TNF	tumor nekrotizující faktor
UV	ultrafialové záření
ZnTPPS4	disulfonovaný zinečnatý ftalocyanin
Zn	zinek

16 Seznam vyobrazení

- Obr.4.1** Složení Photofrinu I (Quadra Logic Technologies Inc., Kanada)
- Obr.4.2** Základní struktura ftalocyaninu s kovovým centrálním atomem; substituenty navázány v různých pozicích na benzenových jádrech.
- Obr.6.1** Blokové schéma dějů při navození apoptózy
- Obr.7.1** Příklady některých flouoroforů s příslušnými excitačními a emisními vlnovými délkami
- Obr.7.2** Příklad detekce, využívající fluorofofor schopný přímo vazby na buněčnou strukturu
- Obr.7.3** Příklad detekce kombinující DAPI, faloidin/TRITC s monoklonální protilátkou proti tubulinu
- Obr.7.4** 3 D rekonstrukce dendritické buňky, diferencované z kostní dřeně geneticky upravené myši
- Obr.7.5** Srovnání obrazu z fluorescenčního a konfokálního mikroskopu
- Obr.7.7** Schéma konfokálního mikroskopu
- Obr.9.1** Termostat
- Obr.9.2** Flowbox
- Obr.9.3** Spektrofluorimetr Synergy HT
- Obr.9.4** Fluorescenční mikroskop s analýzou obrazu Olympus IX 81
- Obr.10.1** Kontrolní živé G361 buňky lidského melanomu (zvětšení 400x).
- Obr. 10.2** Detekce produkce reaktivních forem kyslíku v buňkách po fotodynamické terapii ve fluorescenčním mikroskopu. (zvětšení 400x)

17 Seznam tabulek a grafů

- Tab.1:** Naměřené hodnoty k sestrojení kalibrační křivky.
- Tab.2:** Příklad hodnot kinetické a finální produkce ROS naměřených fluorescenčním readerem pro koncentraci 1 μM ClAlPcS₂, ve fluorescenčních jednotkách FU na 500 000 buněk.
- Tab.3:** Příklad hodnot kinetické a finální produkce ROS ve vzorku o koncentraci 1 μM ClAlPcS₂ přepočítaných na koncentraci ROS (μM H₂O₂ na 500 000 buněk).
- Tab.4:** Kinetická produkce ROS (μM H₂O₂ na 500 000 buněk). v prvních 20 sekundách, 5 minutách, 17 minutách a ve finální dávce 15 J/cm².
- Graf 1:** Křivka kinetického měření ROS po přidavku 10 μl 20 mM H₂O₂, 25 μl 20 mM H₂O₂, 50 μl 20 mM H₂O₂ a 50 μl 200 mM H₂O₂.
- Graf 2:** Kalibrační křivka.
- Graf 3:** Produkce ROS v dávce 15 J/cm² přepočítaná na koncentraci (μM H₂O₂ na 500 000 buněk) při koncentraci 1, 10 a 100 μM ClAlPcS₂.
- Graf 4:** Kinetická produkce ROS v závislosti na koncentraci ClAlPcS₂
- Graf 5:** Nárůst produkce ROS v časových intervalech a po dozáření do dávky 15 J/cm² v závislosti na koncentraci ftalocyaninu.