

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

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2008

ZEMAN JAN

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

ZDRAVOTNĚ SOCIÁLNÍ FAKULTA

**STUDIUM FOTOTOXICITY SENSITIZERŮ NA MOLEKULÁRNÍ ÚROVNI A
MOŽNOSTI JEJICH VYUŽITÍ PRO FOTODYNAMICKOU TERAPII
NÁDORŮ.**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: Zeman Jan, DiS
Vedoucí práce: Doc. RNDr. Hana Kolářová, CSc.
Datum: 9.5.2008

Study of sensitizers phototoxicity at molecular level and use of sensitizers in photodynamic therapy of tumors

Photodynamic therapy is a modern and promising method of treating some types of tumors. It can supplement and in some cases even replace the current methods. It is based on the use of a photosensitive substance, a sensitizer, which is located in tumor cells and subsequently exposed to the light of an appropriate wave length, which brings about photodynamic reaction. Photodynamic reaction arises due to the combination of four agents: a sensitizer, molecular oxygen, light of optimum wave length, and a biological substrate (proteins, nucleic acid or other cell components). After the application of the sensitizer, whose prior uptake takes place in the pathologically altered tissues, visible light of a wave length corresponding with the absorption maximum of the photosensitizer is applied, which brings about tumor cells destruction at active participation of the reactive oxygen forms as superoxide anion, hydrogen peroxide and hydroxyl radicals.

My thesis was focused on testing photodynamic properties of ZnTPPS₄ sensitizer on tumor cell lines. The production of oxygen reactive forms was tested by Synergy HT spectrofluorimeter and Olympus IX 81 fluorescence microscope with image analysis. Production of reactive oxygen forms was assessed with the use of molecular symbol CM-H₂ DCFDA. LED emitters adapted for working with cell cultures were used to irradiate the cell structures.

The results proved that ZnTPPS₄ is photodynamically effective and the production of reactive forms of oxygen depends on sensitizer ZnTPPS₄ concentration as well as on the dose of radiation.

Key words: Photodynamic therapy, ZnTPPS₄ sensitizer, reactive oxygen forms

p r o h l á š e n í

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Studium fototoxicity sensitizerů na molekulární úrovni a možnosti jejich využití pro fotodynamickou terapii nádorů“ vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v přiložené bibliografii.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce „Studium fototoxicity sensitizerů na molekulární úrovni a možnosti jejich využití pro fotodynamickou terapii nádorů“, 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

Poděkování

Děkuji Doc. RNDr.Haně Kolářové, CSc. za pomoc a odbornou konzultaci

Obsah:

1. Úvod	1
2. Současný stav	3
2.1. Historie	3
2.2 Současná klinická praxe	3
2.3 Mechanismus PDT	4
2.4 Reaktivní formy kyslíku (ROS)	6
2.5 Vlastnosti a typy sensitizerů	8
2.6 Zdroje záření	10
2.6.1 Lasery	10
2.6.2. Lampy	11
2.6.3 Jiné zdroje	12
2.7 Poškození a zánik buňky	13
2.8 Parametry ovlivňující typ buněčné smrti po PDT	16
2.9 Fluorescence	17
2.9.1 Fluorescenční barviva	19
2.9.2 Detekce reaktivního kyslíku	20
2.10 Fluorescenční mikroskopie	20
2.11 Konfokální mikroskop	22
3. Cíl práce	24
4. Experimentální část	25
4.1 Materiál	25
4.1.1 Použité experimentální buněčné linie	25
4.1.2 Sensitizer	26
4.1.3 Fluorescenční značka	26
4.1.4 Mikroskopie	26
4.1.5 Měření produkce reaktivních forem kyslíku	26
4.1.5 Zdroj světelného záření	27
4.2 Metodika	27

5. Výsledky	28
6. Diskuse	37
7. Závěr	39
8. Seznam literatury	40
9. Seznam zkratk	42
10. Přílohy	

1. Úvod

V současné době terapie nádorových onemocnění stojí na čtyřech hlavních metodách, chirurgické léčbě, radioterapii, chemoterapii a imunoterapii. Cílem těchto terapií je dosáhnout zničení nádorových buněk při současném zachování fyziologických funkcí buněk nenádorových, což je zejména v případě chemoterapie a radioterapie velmi problematické.

Momentálně jsou intenzivně studovány nové možnosti fotochemoterapie nádorových onemocnění (PDT). Jedná se o fotochemoterapii, která představuje kombinované použití fotodynamicky aktivní látky (fotosensitizeru) a světla za přítomnosti kyslíku. Kombinuje v sobě relativně vysokou účinnost se selektivním působením na postižené místo, které je způsobeno preferencí fotosensitivní látky k nádorovým buňkám. Ve srovnání s klasickou protinádorovou terapií je zde velmi malé riziko vzniku mutací a kromě fotosensibilizace kůže nemá vedlejší účinky.

Celý princip vyšetření je tedy založen na spolupůsobení látek, jež samy o sobě nemají žádný biologický dopad (fotosensitivní látka, světlo, kyslíkové molekuly v základním stavu) a teprve vzájemným působením dochází ke vzniku reaktivních forem kyslíku s následným způsobením buněčné smrti ve formě nekrózy nebo apoptózy. Fotosensitizující látky jsou obvykle podávány intravenózně, nebo u povrchových lézí jako externí forma a jsou přednostně vychytány v patologicky změněné tkáni. Následně se aplikuje viditelné záření o vlnové délce shodné s absorpčním maximem sensitizeru a dochází k destrukci nádoru, na niž se účastní převážně reaktivní formy kyslíku vzniklé z molekulárního kyslíku přítomného ve tkáních. Jeho přímý oxidační účinek způsobuje změny v buněčných membránových strukturách a poškozuje biologické molekuly, včetně lipidů, proteinů a nukleových kyselin. Účinnost PDT závisí na typu a koncentraci sensitizeru, na dávce ozáření, na koncentraci kyslíku v nádorové tkáni a na vazbě sensitizeru na substrát. Vlastní fluorescence sensitizeru bývá užitečná také k detekci léze, k určení její velikosti a k stanovení koncentrace sensitizeru.

Nedílnou součástí našeho oboru je práce s onkologickými pacienty, setkáváme se s nimi jak v diagnostice, nukleární medicíně a hlavně v radioterapii při ozařování a i při plánování celé léčby. Fotochemoterapie je další oblast ve které by radiologičtí asistenti mohli uplatnit své znalosti a dovednosti. Nejenom, že radiologický asistent bude muset asistovat při lokalizaci nádorového ložiska a při aplikaci fotosensitizeru, ale i obsluha zdrojů světelného záření – jako například lasery, diodové lampy by se mohla stát další oblastí naší působnosti. Toto je jeden z důvodů, proč sem si vybral toto téma bakalářské práce. Další důvod je ten, že fotochemoterapie je novou, dynamicky se rozvíjející oblastí, která začíná přinášet výsledky a dává do budoucna obrovskou naději mnoha pacientům na vyléčení a já mám možnost se alespoň okrajově prostřednictvím své bakalářské práce tohoto výzkumu zúčastnit.

2. Současný stav

2.1 Historie

Světlo jako terapeutický nástroj je využíváno již několik tisíc let. Staří Egyptané nebo Číňané jej používali k léčbě některých kožních onemocnění.

Počátky moderní léčby světlem jsou na přelomu devatenáctého a dvacátého století, kdy byla poprvé úspěšně použita oblouková uhlíková lampa imitující sluneční spektrum k léčbě lupus vulgaris.

První experimenty s buněčnou smrtí v závislosti na působení světla uskutečnil student medicíny Oskar Raab v Mnichově již roku 1900. Zjistil že kombinace akridinové červeně a světlo má na protozoa rodu *Paramecium* letální efekt. V roce 1903 aplikoval Von Tappeiner a dermatolog Jesionek eosin a bílé světlo na při léčbě kožního nádoru – na základě pozorování poprvé použili výraz „fotodynamický efekt“. Nejstudovanější senzitizery jsou deriváty porfyrinu, v roce 1955 byl připraven z hematoporfyrinu jeho derivát (HpD) jež se vyznačuje zvýšenou akumulací v nádorové tkáni.

Po úspěšných pokusech na myších došlo také k experimentálním aplikacím v humánní medicíně. První schválená léčba využívající PDT se uskutečnila v roce 1993 v Kanadě. Byla indikována k profylaxi karcinomu močového měchýře.⁽⁸⁾

2.2 Současná klinická praxe

V klinické praxi se doposud fotodynamická léčba využívá v terapii nádoru a premaligních lézí oblasti hlavy, krku, nádorů kůže, mozku a terapii karcinomu močového měchýře. V orofaciální oblasti jsou tímto způsobem léčeny například karcinomy dutiny ústní, nasofaryngu, orofaryngu, glanduly parotis a i například oční tumory. V terapii kůže se užívá například u spinocelulárního karcinomu, Kaposiho sarkomu a kožních metastáz. Dále se používá k paliativnímu řešení maligních endobronchiálních a ezofageálních obstrukcí. Úspěšně byla PDT použita také u léčby

primárních stadií karcinomu plic a nádorů hrdla děložního. PDT lze použít i jako doplňkovou léčbu při chirurgickém řešení rozsáhlých tumorů různých systémů.

Hlavní výhoda která vede k nejčastěji k indikaci PDT je její menší agresivnost než chirurgický zákrok nebo radioterapie.

PDT je dále standardně využívána k čištění (purging) kostní dřeně, k odstranění leukemických buněk z autonomních štěpů kostní dřeně a výhodou je, že se fotosensitizer z kostní dřeně odstraní před reinfuzí, takže nedochází k systémové fotosenzitizaci.

PDT se začíná využívat i u některých nemaligních onemocnění, například u kardiovaskulárních aterosklerotických změn a revmatoidní artritidě. Ve stadiu preklinického výzkumu je využití antivirového efektu PDT, proti HIV - I viru, herpes simplex viru a cytomegaloviru.

Karcinogenní ani mutagenní účinky PDT nebyly zaznamenány, což je její hlavní přednost ve srovnání s chemoterapeutickým a radioterapeutickými metodami a vzhledem k jejich malé systémové toxicitě lze PDT bezpečně opakovat, je-li to nutné. ⁽⁸⁾

2.3 Mechanismus PDT

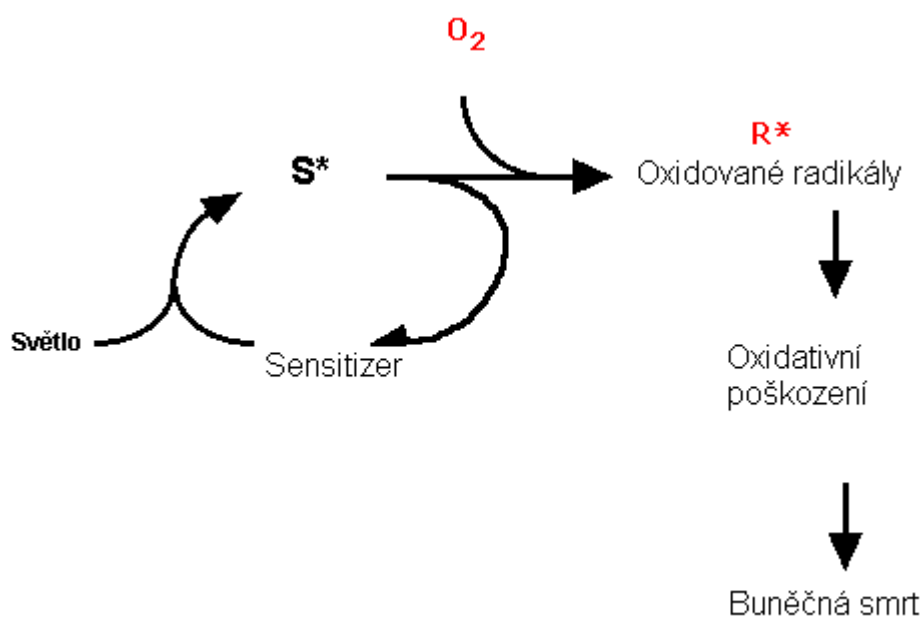
Princip léčby spočívá ve vhodně podaném sensitizeru a jeho následné aktivaci světlem vhodné vlnové délky (obr.1). Vlnová délka použitého světla je při PDT zásadní, světlo o nízkých vlnových délkách proniká tkáněmi pouze do hloubky několika milimetrů a proto je zasažená oblast velmi malá – například původně do terapie zavedený sensitizer HpD (Photofrin®) (obr.2) má velmi nízkou vlnovou délku (630 nm) pro aktivaci a to jeho použití znesnadňuje. Optimální rozpětí vlnových délek je dáno typem sensitizeru a nelze jej zobecňovat.

Fotosensitická reakce je kombinací čtyř složek: fotosensitizující látky, molekulárního kyslíku, světla optimální vlnové délky a biologického substrátu (proteiny, nukleová kyselina nebo jiné buněčné komponenty). Po vhodném podání sensitizeru (nejčastěji intravenózně), který je přednostně vychytáván v patologicky aktivní tkáni, se aplikuje viditelné světlo o vlnové délce shodné s absorpčním maximem

daného fotosensitizeru a dochází k destrukci nádorových buněk, na níž se účastní převážně singletní kyslík a další radikály. Singletní kyslík vzniká z molekulárního kyslíku již přítomného ve tkáních. Vlastní sensitizer při absorpci světelného kvanta projde jedním nebo více energetickými přechody a vstoupí do energeticky bohatšího tripletového stavu.

Sensitizer v tripletním stavu (S^*) má dva druhy interakce s živou hmotou. K fotoprocesu prvního typu dochází hlavně za podmínek snížené koncentrace kyslíku, kdy S^* reaguje přímo s okolním biologickým substrátem a to přenosem elektronu za vzniku oxidovaného substrátu a redukováného sensitizeru.

Při vyšších koncentracích kyslíku převažuje fotoproces druhého typu, kdy se energie S^* přenese na molekulární kyslík, z něhož se stává silně reaktivní singletní kyslík. Jeho přímý oxidační účinek způsobuje změny v buněčných membránových strukturách a poškozuje biologické molekuly (lipidy, proteiny, nukleové kyseliny). Výsledným terapeutickým efektem bývá nekróza a apoptóza nádorových buněk. ⁽¹⁰⁾



Obrázek 1: Schématický diagram PDT ⁽¹⁰⁾

2.4 Reaktivní formy kyslíku (ROS)

Reaktivní formy kyslíku jsou velmi toxické částice, které poškozují membrány buněk a další jejich komponenty. Patří sem volné kyslíkové radikály, s jedním nebo více nepárových elektronů, jako je $\text{OH}^\bullet$, $\text{O}_2^\bullet$ nebo neradikálové deriváty kyslíku jako je H_2O_2 nebo kyselina chlorná HOCl . Jejich toxický efekt může být zmírněn přítomností antioxidantů.

Poškození navozené reaktivními formami kyslíku je většinou navazuje na chemické nebo radiační poškození a je indukováno fagocytárními buňkami, destrukcí makrofágů, zánětlivým poškozením a dalšími. Kyslík normálně kompletně redukováný v mitochondriích se při jejich poškození nezredukuje a dochází k tvorbě výše zmíněných toxických derivátů, dochází k tomu při řadě enzymových reakcí v různých buněčných složkách a může být podstatně zrychlena dalšími stresovými faktory jako je například celkové poškození metabolismu nebo poklesem účinnosti antioxidačního systému.

Nejprve vznikne superoxid O_2^- , který může být redukován na peroxid vodíku H_2O_2 , který je svojí molekulární strukturou podobný vodě a je velice difusibilní uvnitř i mezi buňkami. H_2O_2 může regulovat expresi určitých genů.

Superoxid ani peroxid vodíku nejsou považovány za nejsilnější reaktivní formy kyslíku – jejich společný výskyt vede ke vzniku hydroxylového radikálu, jež je vysoce reaktivní a nespecificky atakuje biomolekuly a je schopen poškozovat polysacharidy, proteiny a nukleové kyseliny. Hydroxylový radikál reaguje téměř se všemi molekulami v živých buňkách. Vzniká také při expozici živých organismů ionizujícím zářením, kdy dochází ke štěpení O-H můstků ve vodě, což dává vzniknout $\text{H}^\bullet$ a $\text{OH}^\bullet$.

Všechny reaktivní formy kyslíku jsou extrémně reaktivní a cytotoxické pro celý organismus. Působením volných radikálů na živý organismus dochází k mnoha poškozením, která vedou od narušení buněčných stěn, přes nejrůznější mutace, až ke smrti buňky, potažmo celého organismu. Oxidativní stres působí na buňku třemi faktory: zvyšováním tvorby oxidantů, snížením účinnosti antioxidační ochrany a neschopností opravit oxidační poškození. Mezi nejvýznamnější cíle volných radikálů

patří proteiny, DNA a membránové lipidy. Negativní působení reaktivních forem kyslíku spočívá především v peroxidaci.

Lipidní peroxidace je významným mechanismem poškození buňky, je to chemický proces vyplývající z oxidativního poškození lipidů. Nejvíce náchylné jsou membránové lipidy s vysokým obsahem nenasycených mastných kyselin, které jsou součástí membrán. Během ataku reaktivními formami kyslíku dochází ke zkracování a zmenšování struktury kyselin a narušuje uspořádání soudržné lipidní dvojvrstvy a strukturní organizace. Lipidní peroxidace je jeden z hlavních mechanismů poškození buňky reaktivními formami kyslíku, což vyplývá z narušení buněčné membrány a ztráty aktivity na membrány vázaných enzymů a narušení semipermeability membrány. Během reakce radikálů s lipidy dochází ke vzniku mnoha produktů, z nichž některé jsou toxické a pak samy napadají další struktury. Peroxidace lipidů může vést k radikálové řetězové reakci.

Vzhledem ke klčovému postavení DNA v biologii, je považována za hlavní cíl pro reaktivní druhy kyslíku. Mohou způsobit změny ve struktuře DNA, narušení proteinové kostry, poškození deoxyribosy – fosfátové kostry a vznik specifických chemických modifikací purinových a pyrimidinových bazí. Ty se mohou projevit jako mutace, poškození deoxyribosy indukuje uvolnění base nebo řetězové zlomy DNA.

Aminokyseliny, stavební kameny peptidů a proteinů jsou také cílem reaktivních radikálů. Oxidace aminokyselin v proteinech vede k nezvratným fyziologickým změnám v proteinech samotných.

Nejdůležitější reakce volných radikálů v buňkách má tedy na svědomí kyslík a jeho radikálové deriváty. Velikost reaktivity volných radikálů je odhadnutelná z extrémně krátkého času života jednotlivých radikálů (tab.1). Tato reaktivita stoupá s nestabilní elektronovou konfigurací.⁽⁶⁾

Druh	Symbol	Poločas života při 37°C
Superoxid	O_2^-	1×10^{-6}
Hydroxylový radikál	OH°	1×10^{-9}
Singletový kyslík	1O_2	1×10^{-6}
Molekulární kyslík	O_2	$> 10^2$

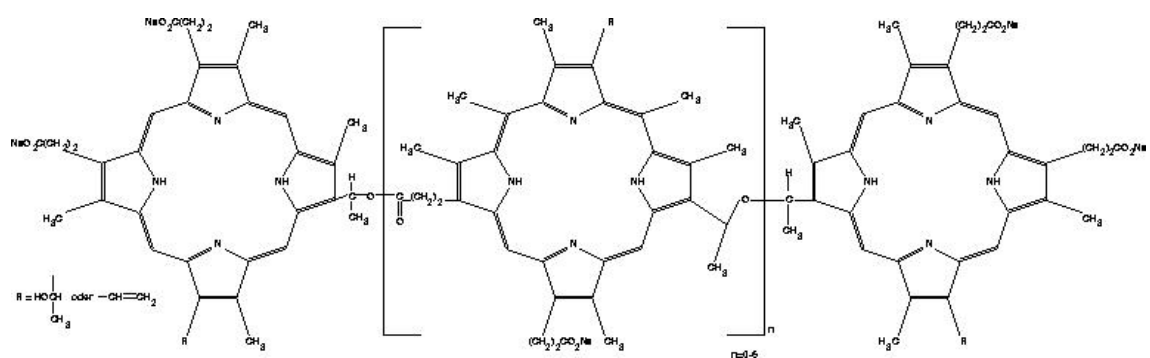
Tabulka 1: Poločasy života volných radikálů ⁽³⁾

2.5 Vlastnosti a typy sensitizérů

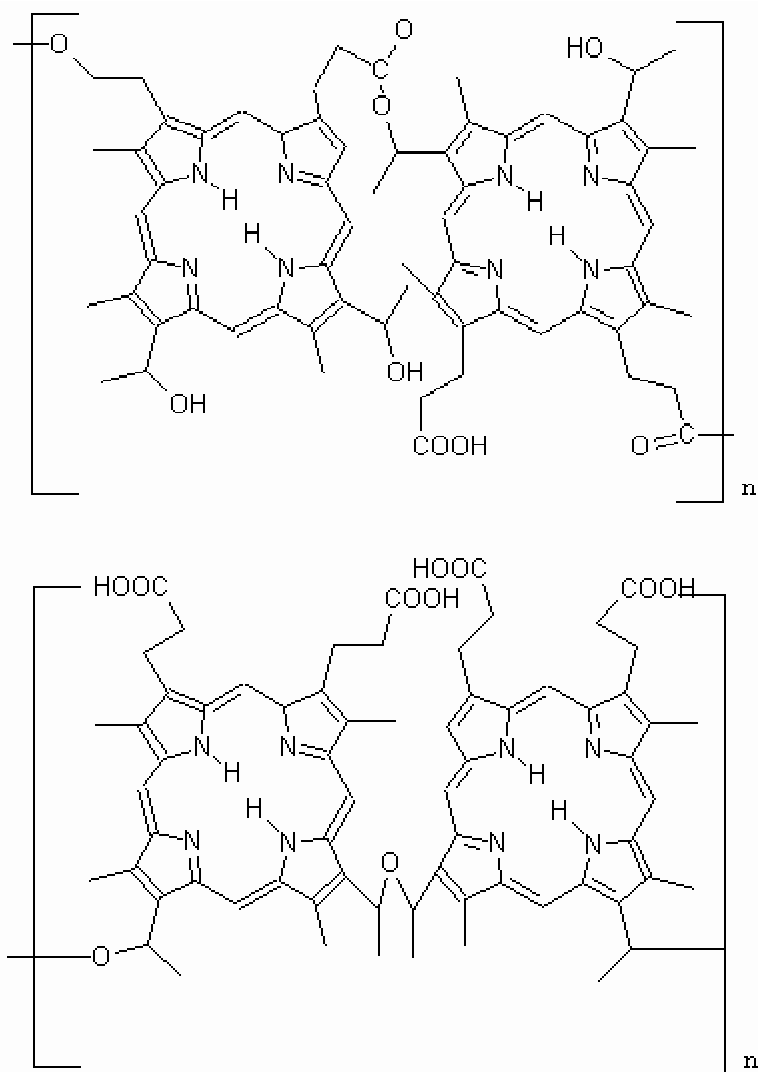
Sensitizery jsou látky se zvláštní schopností pohlcovat světelnou energii a tou pak vyvolat chemickou reakci ve svém okolí. Jsou to látky bez přístupu světla netoxické a mají schopnost zvýšené kumulace v buňkách, které vykazují rychlejší růst a proliferaci, in vivo 48 – 72 hodin po intravenózním podání ⁽¹⁾.

Sensitizer by měl být chemicky čistý a známého složení (u novějších sensitizérů se jedná většinou o dobře charakterizované látky), měl by mít minimální toxicitu ve tmě, nejlépe být toxický pouze po ozáření světlem vlnové délky vhodné pro jeho aktivaci. Měl by být schopen selektivní kumulace v nádorové tkáni, výrazně vyšší oproti kumulaci v jiných tkáních a s tím souvisí i požadavek na rychlou exkreci zbylého sensitizéru, který se nevstřebal v cílové tkáni z krevního řečiště. Vzhledem k omezené prostupnosti živých tkání pro viditelné světlo (hloubka penetrace se zvětšuje s vlnovou délkou světla), je potřebná silná absorpce s vysokými extinkčními koeficienty při delších vlnových délkách, kde penetrační schopnosti světla jsou maximální a energie je stále dostačující pro účinnou produkci singletního kyslíku. Nezanedbatelnými vlastnostmi sensitizérů je také jejich cena a dostupnost.

V klinické praxi se v současnosti používají sensitizery první generace. Je to Hematoporfyrin a jeho deriváty. Hematoporfyrin je vynikající sensitizer, ale špatně se lokalizuje v nádorech, a proto není vhodný v PDT. Proto složitým pročišťováním vznikl Photofrin® (obr.2), který se dnes již běžně používá v PDT, jeho nevýhodou je velká fotosenzitivita kůže, která trvá několik týdnů.



Obrázek 2: Photofrin® (11)



Obrázek 3: Složení Photofrinu II (12)

Sensitizery druhé generace jsou v současné době ve stadiu klinického testování a v brzké době se u některých z nich očekává schválení. Patří sem porfyritytové deriváty, ftalocyaniny, kyselina aminolevulová a mnoho dalších (obr.3).⁽¹⁾

2.6 Zdroje záření

V současné době se používají koherentní i nekoherentní zdroje světla. Světlo může být aplikováno na nádor buď přímo, nebo pomocí optického vlákna. Účinnost PDT je omezena rozdílnou penetrací světla do tkáně. Výběr vhodného zdroje tedy závisí na lokalizaci nádoru, typu sensitizeru a na potřebné dávce světelného záření. Využívají se jak lasery, tak i lampy. Lampy, jako širokopásmové zdroje se používají tehdy, když je možno světlo aplikovat přímo na nádor, bez nutnosti propojení zdroje světla pomocí optického vlákna.

2.6.1 Lasery

Využití laserů v medicíně nastalo téměř okamžitě po uvedení prvního laseru do provozu. Jeho všestranné využití vyplývá z jeho vlastností – jeho energie a výkonu přenesené v úzkém vyzařovacím svazku, důležitá je také koherence a monochromaticnost. Lékaře přitahuje možnost koncentrace vysoké energie optického záření na malé ploše a možnost řezání a odpařování. Pro tyto vlastnosti získal laser významné postavení v chirurgii – používá se zde konverze laserového záření na teplo uvnitř tkáně. Výhodou techniky je možnost bezdotykového ostře ohraničeného řezu, bez případného zanesení infekce do rány a poškození okolí. Kromě terapeutických metod nacházejí lasery uplatnění i v diagnostice, kde je laserového záření využíváno k vyšetření oka, nebo tkání vnitřních orgánů (obr. 4).

Typy laserů:

- 1) Argonové lasery a barvivové lasery čerpané argonovým laserem, tyto lasery patří mezi neužívanější, emitují v oblasti 600 – 650 nm, což jsou vhodné vlnové délky pro excitaci porfyrinů. Výkon je v rozsahu

10 – 500 mW/cm². Pro účely PDT se tyto lasery používají většinou s optickým vláknem pro endoskopickou aplikaci.

- 2) Barvivové lasery čerpané laserem využívajícím páry kovů – lasery využívající par kovů, pracují na rozdíl od argonových pulsně s frekvencí 1 khz a používají se spíše jako čerpací zdroje pro lasery barvivové, které mají poměrně velkou plochu paprsku (až 3 cm²) a jsou proto vhodné pro léčbu rozsáhlejších nádorů.
- 3) Diodové lasery – jedná se o polovodičové lasery, které jsou vysoce kompaktní, všestranné a jednoduše ovladatelné. ⁽⁶⁾



Obrázek 4: Laser používaný pro PDT ⁽¹³⁾

2.6.2. Lamy

V oblastech nevyužívajících optická vlákna se používají lampy spolu s filtry pro určité vlnové délky a to například xenonové, wolframové, rtuťové výbojky, fluorescenční lampy a sodíkové lampy. Jsou daleko levnější, ale výkony v aktivačních

vlnových délkách nejsou dostatečné pro navození fotodynamického jevu. Z tohoto důvodu a také proto, že pro docílení fotodynamického efektu je třeba zajistit co nejkratší ozařovací časy s dostatečně velkou intenzitou záření, vyhovují jako zdroje především lasery. ⁽⁶⁾

2.6.3 Jiné zdroje

V dnešní době jsou ve vývoji další možné zdroje záření pro PDT, jedná se především o diodové zdroje (LED). LED emituje záření o vlnových délkách v rozmezí 350 – 1100 nm a o intenzitě asi 150 mW/cm². Jejich největší výhodou je jejich universálnost – mohou být uspořádány tak, aby pokryly větší plochu a mohou být napájeny bateriemi, což umožňuje jejich přenosnost. Nezanedbatelnou je i jejich nízká cena v porovnání s ostatními zdroji. ⁽⁶⁾

2.7 Poškození a zánik buňky

Normální buňka prodělává určité funkční i morfologické změny, dané jejím genetickým programem, a reaguje tak na požadavky svého metabolismu, rozvíjí se a provádí své specifické funkční zaměření. Reaguje na různé fyziologické podmínky, ale zůstává v určité dynamické rovnováze – homeostáze. Změnu okolí (zvýšenou fyziologickou zátěž, vnější patologické podmínky) dokáže do určité míry zvládnout buněčnými adaptačními mechanizmy, pokud je tato míra překročena dochází k poškození buňky. Poškození může být vratné (reversibilní), ze kterého se buňka může vzpamatovat a nebo nevratné (ireverzibilní), které končí její smrtí – nekrózou buňky (z řečtiny nekros = mrtvola). Zánik buňky v mnohobuněčném organismu může být i cílený proces. Je to naprogramovaný proces vedoucí k destrukci pro organismus již nepotřebných buněk – v tomto případě mluvíme o apoptóze.

K nekróze neboli pasivnímu zániku buňky dochází vždy, je-li ireverzibilně poškozena některá ze základních buněčných funkcí. K nekróze dochází důsledkem extrémních vnějších fyzikálních podmínek (extrémní teplota, tlak, osmolarita, pH) nebo

silného poškození buněk, které je vyvoláno chemickými látkami. Nekróza je obecně doprovázena ztrátou membránové integrity a metabolické homeostáze, což je způsobeno bezprostředním, neřízeným rozpadem buňky. Pasivní zánik buněk je charakterizován morfologickými změnami, jak je otok a protržení membrány. Nitrobuněčný obsah se vyplavuje do okolí buněk, kde navodí zánětlivou reakci a nakonec dochází k úplnému rozpadu buňky.

Apoptóza je jeden ze způsobů, kterým buňka může odumřít. Často se označuje i výrazem „programovaná buněčná smrt“ (i když podle většiny autorů je pojem programovaná buněčná smrt vůči apoptóze pojmem nadřazeným). Tento proces vyžaduje genovou expresi a spotřebu energie. Často je popisovaná i jako vysoce organizovaná sebevražda buňky (obr.6). Na rozdíl od nekrózy, která je rozpadem buňky v důsledku ireverzibilního poškození mechanického, toxického atd., je apoptóza odpovědí na signály přicházející z okolí nebo i zevnitř buňky. Během nekrózy buňka podléhá řadě změn, které jsou důsledkem narušené schopnosti plasmatické membrány kontrolovat pohyb iontů. Buňka i její organely zduří, chromatin vytvoří nepravidelné shluky. Vytékání buněčného obsahu způsobí zánětlivou reakci v okolí nekrotické buňky, která ostatně většinou není jedinou nekrotickou buňkou v dané oblasti.

Od nekrózy se apoptóza liší v několika ohledech. Jak již bylo zmíněno, apoptóza není náhodný děj, ale vysoce organizovaný proces, regulovaný na mnoha stupních. Apoptotická buňka se smrští a rozpadne na malé části zvané apoptotická tělíska. Tato tělíska jsou ohraničená plasmatickou membránou a obsahují buněčné organely a části jaderného chromatinu. Apoptotická tělíska jsou rychle fagocytována tkáňovými makrofágy. Velmi důležitý je fakt, že buňka, která zaniká tímto způsobem, nevyvolá zánětlivou reakci, protože její obsah neuniká do okolí.

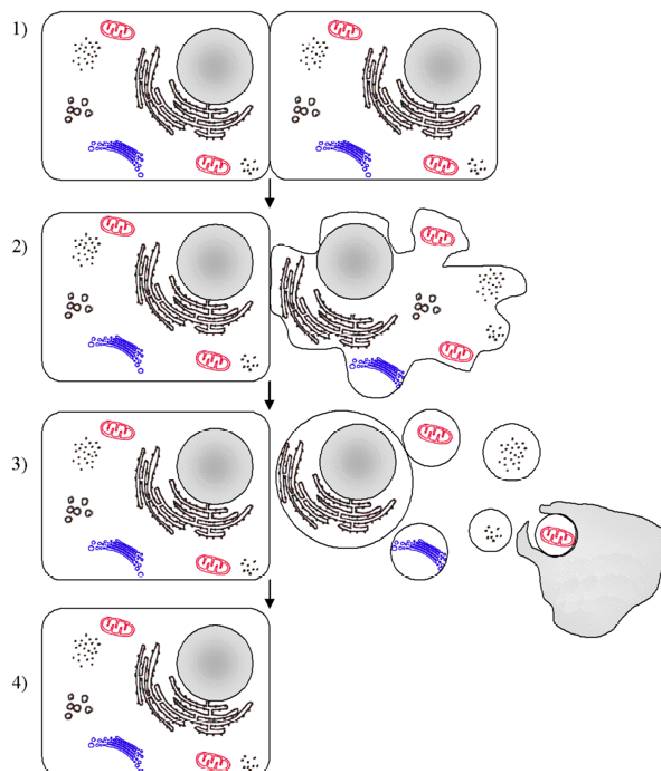
Signály, které apoptózu vyvolávají, můžou být různé. Patří mezi ně signální molekuly, které se chovají jako ligandy membránových receptorů, fyzikální a chemické faktory v sublimitních intenzitách, které by ve vyšších dávkách způsobily nekrózu, ale i nedostatek růstových faktorů. Důležitá je i okolnost, že takzvanou vnitřní cestou může apoptózu vyvolat i neopravitelné poškození DNA. Tímto způsobem vlastně buňka raději spáchá sebevraždu, než by poškozenou genetickou informací měla přenést na další

generace. Apoptotický signál spustí kaskádu reakcí, ve které má nejdůležitější úlohu skupina proteinů zvaných kaspázy. Na konci této kaskády stojí kaspázou aktivovaná DNAsa, enzym, který štěpí DNA na fragmenty délky typické pro apoptózu. Tyto pak mohou být detekovány pomocí elektroforézy, kde vytváří tzv. „DNA žebříček“. Mezi pět hlavních složek, které se účastní mechanismu apoptózy, patří kaspázy, proteiny Bcl-2 rodiny, role mitochondrií a mechanismy odehrávající se na buněčném povrchu a v jádře.

Mitochondrie je hlavní organelou účastnící se procesů spojených s apoptózou, směřují do ní signály apoptózy z vnitřního i vnějšího prostředí. Přijetím těchto signálů se zvýší propustnost mitochondriální membrány a některé proteiny mitochondrií se dostanou do cytoplazmy, kde aktivují kaspázovou kaskádu.

Kaspázy (CASPASES = Cysteine Aspartate Specific ProteASEs) jsou specifické cysteinové proteázy, které štěpí proteiny. Kaspázy se během apoptózy účastní všech důležitých hydrolytických reakcí.

Proteiny Bcl-2 rodiny regulují apoptózu v mnoha směrech – mohou apoptózu inhibovat nebo podporovat. Poměr mezi antiapoptickými a proapoptickými proteiny této rodiny určuje zda apoptóza proběhne či nikoliv. ⁽⁵⁾

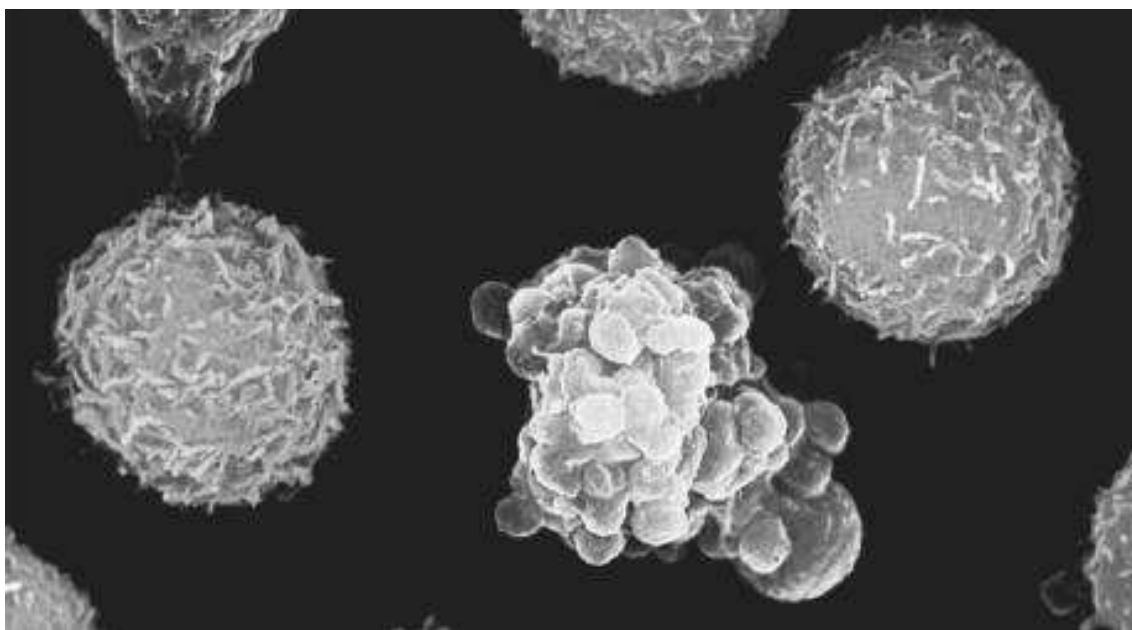


Obrázek 5: průběh apoptózy

Vlevo: zdravá buňka Vpravo: buňka podléhající apoptózy⁽¹⁵⁾

- 1) Zdravá buňka
- 2) Apoptotická buňka se zmenšuje.
- 3) Apoptotická buňka se rozpadá na apoptotická tělíska a je fagocytována
- 4) Apoptotická buňka je rozložena.

Při apoptóze ztratí buňka nejdříve asymetrii fosfolipidů v membráně. Jádro se svrašťuje a chromatin zhušťuje, tyto změny jsou provázeny fragmentací DNA na velké množství pravidelných úseků, která není již opravitelné a vede k nemožnosti transkripce DNA. Objem buňky se zmenší (úbytek vody spolu s elektrolyty), na buněčné membráně se vytvoří četné výběžky. V konečné fázi dochází ke kolapsu jádra a fragmentaci buňky na apoptotická tělíska, obklopená zbytky membrány. Odstranění apoptotických tělísek se děje fagocytózou pomocí mikrofágů (Obr.5).⁽⁵⁾



Obrázek 6: Buňka procházející apoptózou ve srovnání se zdravými buňkami ⁽¹⁶⁾

2.8 Parametry ovlivňující typ buněčné smrti po PDT

Stupeň poškození a typ buněčné smrti silně závisí na vnějších a vnitřních parametrech. Vnějšími jsou typ a koncentrace senzitizeru, jeho lokalizace, doba inkubace a ozařovací parametry, jako je dávka a výkon světelného zdroje. Mezi vnitřní parametry patří typ buněk, charakter tkáně, stav metabolismu a fáze buněčného cyklu. Chemické vlastnosti sensitizerů se pohybují od převážně hydrofilních po lipofilní.

Lipofilní látky se primárně lokalizují v membránách, při dosažení dostatečné koncentrace a po aplikaci vysoké dávky světla, začnou způsobovat změny v propustnosti membrán, ztrátě její pružnosti a k inaktivaci membránových enzymových systémů a receptorů – toto vede ke ztrátě buněčné homeostáze a následné nekróze buňky.

Apoptóza může být po fotodynamické terapii vyvolána nadměrnou produkcí reaktivních forem kyslíku v mitochondriích a v cytoplazmě. Oxidací lipidů na vnitřní straně mitochondriální membrány způsobuje pokles jejího potencionálu, tvorbu pórů a následnému osmotickému bobtnání mitochondrií, jež vede k jejich rozpadu. Destabilizace membrán mitochondrií a i endoplazmatického retikula má za následek

uvolňování vápníku do cytoplazmy, jenž má důležitou roli v aktivaci apoptózy. Hydrofilní senzitizery lokalizované v lysozomech způsobují uvolňování cathepsinu do cytoplazmy a tím přímo aktivují kaspazovou kaskádu. ⁽⁵⁾

2.9 Fluorescence

Fluorescenční metody se stále více používají nejen v biochemickém a biofyzikálním výzkumu, ale i v klinické chemii, genetických analýzách, monitorování prostředí a dalších oborech. V biomedicině se jedná především o identifikaci a dělení buněk v průtokové cytometrii, zobrazování buněčných složek ve fluorescenční mikroskopii a analýze obrazu, studium změn konformací a dynamiky buněčných systémů, aplikace v různých testech jako je ELISA a další, kdy fluorescenční metody často nahrazují metody využívající radionuklidové zářiče.

Luminiscence je spontánní (samovolné) záření (obvykle) pevných nebo kapalných látek, které vzniká jako přebytek záření tělesa nad úroveň jeho tepelného záření v dané spektrální oblasti při dané teplotě, přitom toto záření má určitou dobu dozívání, tedy trvá i po skončení budícího účinku.

Lze také říci, že luminiscence je děj, při němž záření o kratší vlnové délce (větší frekvenci) vyvolává v látce určitého složení vznik záření o delší vlnové délce (nižší frekvenci).

Luminiscence dělí na:

1. fluorescenci
2. fosforescenci
3. zpožděnou fluorescenci

Definice fluorescence:

1. Nastane-li emise záření z excitovaného elektronového stavu jedním či více spontánními energetickými přechody jedná se o fluorescenci.

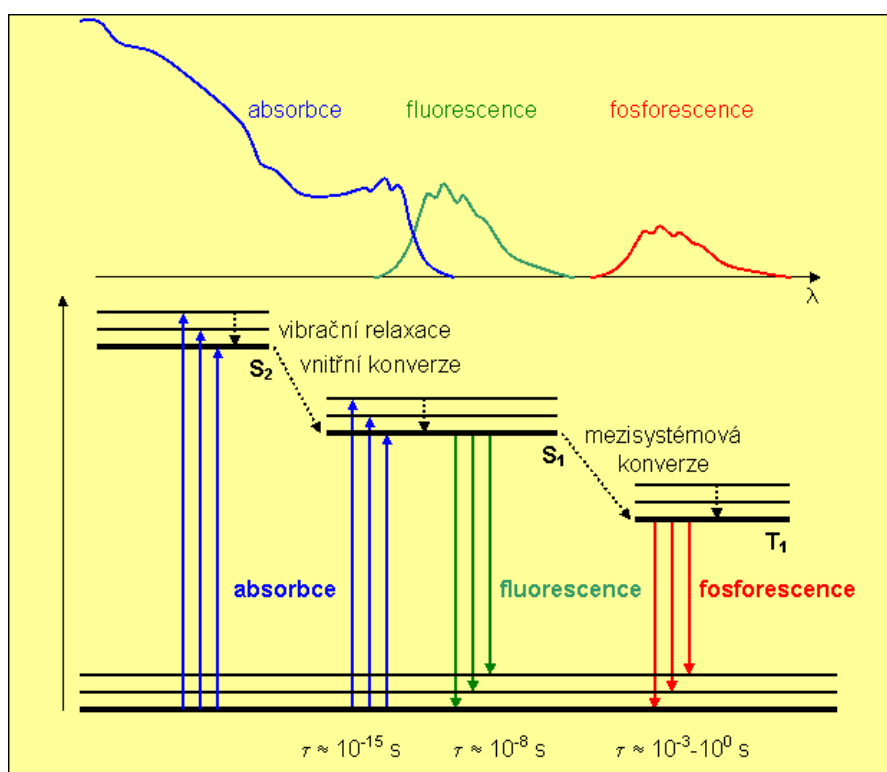
2. Praktické kritérium: fluorescenci pozorujeme během buzení a po jeho vypnutí prakticky ihned mizí (doba dohasínání je obvykle řádově 10^{-8} s).

Definice fosforescence:

1. Uplatňuje-li se při emisi záření z excitovaného elektronového stavu metastabilní hladina jedná se o fosforescenci.
2. Praktické kritérium: fosforescence má delší dobu dohasínání než fluorescence ($>>10^{-8}$ s) a obvykle ji nelze pozorovat v roztocích při pokojové teplotě.

Definice zpožděné fluorescence:

Zpožděná fluorescence je zářivý přechod z téhož singletního stavu (S_1) jako při fluorescenci, ale s delší dobou dohasínání danou časem, po který je molekula v metastabilním tripletovém stavu (Obr.7).⁽¹⁷⁾



Obrázek 7: Schéma zářivých a nezářivých přechodů mezi elektronově vibračními stavy složité molekuly (forma Jablonského diagramu) ⁽¹⁷⁾

2.9.1 Fluorescenční barviva

Většina složitých organických molekul nefluoreskuje, proto se k navození fluorescence využívají vnější fluorofory. Jsou přidávány ke vzorkům a navozují u nich vhodné fluorescenční vlastnosti, nesmí však měnit funkce těchto biologických systémů.

- Fluorescenční značky jsou nevlastní fluorofory, které se ke sledovaným biomolekulám (proteinům, peptidům, ligandům, oligonukleotidům a jiným) vážou kovalentní vazbou.
- Fluorescenční sondy jsou nevlastní fluorofory, které se ke sledované struktuře vážou nekovalentně a často přitom mění své fluorescenční vlastnosti. Volba fluorescenční sondy je klíčovou součástí experimentu ve

fluorescenční spektroskopii, neboť právě její vlastnosti umožňují získat potřebné informace.

2.9.2 Detekce reaktivního kyslíku

Existuje řada fluorescenčních sond umožňujících detekovat nebo generovat různé druhy reaktivního kyslíku, včetně singletového kyslíku, superoxidu, hydroxy radikálů a peroxidů. Tyto formy reaktivního kyslíku jsou fyziologicky produkovány v procesech jako je Alzheimerova choroba, apoptóza nebo fagocytóza a oxidují různé buněčné složky, jako NADH, NADPH, histidin, kyselinu askorbovou, tryptofan, tyrozin, cystein, glutathion, proteiny a nukleové kyseliny, a rovněž cholesterol a nenasycené mastné kyseliny (peroxidace lipidů).⁽⁶⁾

2.10 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie je založena na faktu, že některé molekuly emitují část světla, které před tím absorbovaly, opět jako světlo ale již o delších vlnových délkách. Jevu, kdy látka vysílá do prostoru světlo, říkáme luminiscence. Může k ní docházet při chemické reakci - enzym luciferáza oxiduje luciferin u světlušky - a potom hovoříme o chemiluminiscenci. Pokud k luminiscenci dochází po ozáření, hovoříme o fluorescenci nebo fosforescenci. Záření, které luminiscenci vyvolává, se nazývá excitační, záření vysílané látkou se nazývá emisní. Zatímco u fluorescence trvá vyzařování emisního světla krátkou dobu a po zhasnutí excitačního záření téměř okamžitě emise zhasíná (asi za 100 pikosekund), u fosforescence může k emisi docházet i dlouhou dobu po zhasnutí excitačního záření. Látka schopná fluorescence se nazývá fluorochrom.

Fyzikální podstata fluorescence a fosforescence spočívá ve vlastnostech elektronového obalu atomů v molekulách fluorochromu. Elektrony těchto látek jsou schopny absorbovat foton excitačního světla, čímž se zvýší jejich energie. Část této nově nabyté energie však elektron po chvíli vyžáří jako foton s nižší energií a tedy delší

vlnovou délkou. Protože došlo ke ztrátě energie, je vlnová délka emisního světla vždy delší než vlnová délka světla excitačního (Stokeovo pravidlo). Jelikož vlnová délka udává barvu světla, pozorujeme u emitovaného světla posun k červené části spektra.

Abychom mohli dobře pozorovat emisní záření jehož intenzita je vždy mnohem nižší než intenzita excitačního záření, používáme dvojici filtrů. Excitační filtr propouští z barevného spektra pouze část potřebnou pro excitaci fluorescence a zabraňuje průchodu světla o stejné či podobné vlnové délce jako světlo emisní, které by vytvářelo pozadí. Bariérový filtr propouští pouze emisní část spektra a zabraňuje průchodu excitačnímu světlu. Excitační světlo se od emisního sice liší barvou, ale je mnohem intenzivnější, takže by v něm emisní světlo nebylo lidským okem rozlišitelné.

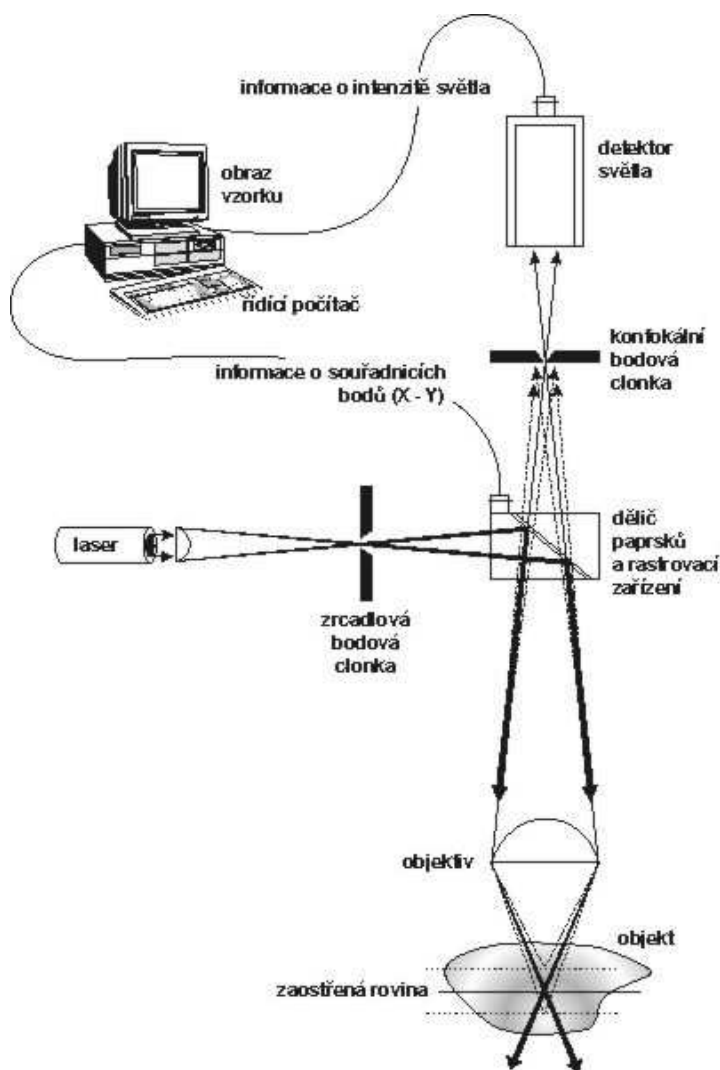
Fluorescenční metody se používají především, pokud potřebujeme zviditelnit určité látky a struktury v buňce. Některé fluorochromy (ethidium bromid, Hoechst, propidium jodid) se sami o sobě váží na určité molekuly (např. na DNA) a můžeme je tedy použít na zviditelnění těchto molekul. Tento postup se nazývá přímá fluorescence.

Pro většinu struktur v buňce bychom však nenašli fluorochrom, který by se na ně specificky vázal. V takovém případě používáme metody imunofluorescence. Jsou vypracovány postupy, s jejichž pomocí si dokážeme vyrobit protilátku, která se specificky váže na téměř jakýkoli druh molekuly. Máme-li takovouto protilátku, můžeme na ni kovalentně navázat fluorochrom a vyrobit tak fluoreskující molekulu specificky rozeznávající to, co potřebujeme. V tomto případě hovoříme o přímé imunofluorescenci.

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 detekce fotonů z roviny ostrosti (což zvyšuje cenu přístroje).⁽¹⁴⁾

2.11 Konfokální mikroskop

Princip laserového rastrovacího konfokálního mikroskopu je znázorněn na obrázku (Obr.8).



Obrázek 8: Princip konfokálního mikroskopu ⁽¹⁸⁾

Pozorovaný vzorek je osvětlován bodovým zdrojem světla. Tím je laserový paprsek fokusovaný na clonku, která je pak objektivem mikroskopu zobrazena na vzorek, do bodu o průměru rovnajícím se rozlišovací schopnosti objektivu (tzv. difrakční mez). Tentýž objektiv pak sbírá světlo vzorkem odražené nebo rozptýlené,

popřípadě jeho fluorescenci. Po zpětném průchodu tohoto sekundárního záření objektivem vznikne další obraz bodové clonky, který je pomocí děliče paprsků lokalizován před fotonásobič. Zde se nachází druhá, konfokální bodová clonka, blokující detekci záření pocházejícího z míst vzorku mimo rovinu, do které je mikroskop právě zaostřen. Obraz celé zaostřené roviny pak získáme jejím rastrováním bod po bodu, způsobem, který je v zásadě podobný tomu, jakým svazek elektronů vytváří obraz na televizní obrazovce. Existují tři základní metody rastrování: cestou rozmítání laserového paprsku nebo příčným posouváním vzorku před objektivem, popřípadě posouváním objektivu nad vzorkem.

Konfokální obrazy a rozlišovací schopnost konfokálního mikroskopu. Při rastrování je měřená intenzita světla registrována počítačem spolu s informací o souřadnicích analyzovaného bodu. Díky prostorové filtraci záření dopadajícího na detektor neobsahuje obraz vytvořený počítačem neostře pozadí pocházející z mimofokálních oblastí vzorku. V tomto smyslu jsou konfokální obrazy vždy zaostřené a představují optické řezy vzorkem. S objektivem o numerické apertuře $\sim 1,3$ a při použití modrozelené čáry argonového laseru ($\lambda = 488 \text{ nm}$) činí tloušťka optických řezů asi $0,4 \text{ }\mu\text{m}$. Prostým vertikálním posouváním vzorku vůči objektivu je navíc umožněno pozorovat optické řezy v různých hloubkách pod povrchem.⁽¹⁸⁾

3. Cíl práce

Cílem práce bylo ověření fotodynamických vlastností porfyrinu ZnTPPS_4 , který je možné využít pro navození fotodynamického jevu v nádorových buňkách, konkrétně v buňkách bronchogenního karcinomu A549. Účinnost fotodynamické reakce závisí na nalezení vhodné kombinace koncentrace fotodynamicky aktivní látky a intenzity viditelného záření, které způsobí buněčné poškození. Mezi nově vyvíjené fotodynamicky aktivní látky patří i ZnTPPS_4 . Vlivem absorpce světla dochází k excitaci senzitizeru navázaného v buňce a tato excitovaná forma senzitizeru potom dále reaguje přímo se substrátem 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. Cílem práce bylo tedy ověřit závislost tvorby reaktivních forem kyslíku na koncentraci senzitizeru při určité dávce ozáření a stanovení optimálních parametrů k navození fotodynamického jevu v nádorové buňce.

4. Experimentální část

4.1 Materiál

4.1.1 Použité experimentální buněčné linie

V experimentu byla použita nádorová buněčná linie bronchogenního karcinomu A549, kultivovaná a pomnožená v CO₂ inkubátoru při 37°C a 5% CO₂ v neutrálním DMEM. Buněčná linie byla pravidelně připravována k experimentům v Laboratoři růstových regulátorů, spadající pod Ústav experimentální botaniky AV ČR a Přírodovědecké fakulty UP v Olomouci.

Bronchogenní karcinom je onemocnění s nepříznivou prognózou a vysokou letalitou. Reálnou pravděpodobnost dlouhodobějšího přežívání mají jen nemocní, u kterých bylo onemocnění zjištěno v časném stádiu.

Bronchogenní karcinom se dle morfologie dělí na typy nemalobuněčné – cca 75 – 80% a malobuněčné 20 – 25%. K nejčastějším typům prvně zmíněné skupiny patří karcinomy epidermoidní, adenokarcinomy a karcinomy anaplastické velkobuněčné. Jen menšina – cca 20% všech nemocných - má v době stanovení diagnózy ještě časná vývojová stadia choroby, u kterých přichází v úvahu chirurgická terapie. Jejímu využití v předpokládaném rozsahu však brání častá komorbidita bronchogenního karcinomu s dalšími závažnými chorobami, které mohou být kontraindikací chirurgické léčby. Celkově je k chirurgické léčbě indikováno jen cca 11% nemocných.

Bronchogenní karcinom ohrožuje nemocného jednak lokálně intenzivním růstem, ale zejména metastázami do jater, mozku, kostní dřeně, nadledviny, dalších plicních laloků a dalších orgánů a také kachexií a metabolickým rozvratem. Ohrožení pro pacienta představuje i onkologická terapie – respektive její nežádoucí účinky (zvláště chemoterapie a radioterapie).⁽¹⁹⁾

4.1.2 Sensitizer

Byl použit porfyrinový sensitizer ZnTPPS₄ (zinečnatý derivát TPPS₄).

4.1.3 Fluorescenční značka

CM-H₂DCFDA (5-(a-6)-chloromethyl-2'7'-dichlorodihydrofluorescein diacetat acetyl ester) se využívá k pro detekci reaktivních forem kyslíku. Je to membránově propustný reagent. Po vstupu do buňky je tato látka přeměněna na buněčnou membránou nepropustný derivát CM-H₂DCF. Po reakci s reaktivní formou kyslíku dochází k jeho oxidaci a vzniku fluorescenčního produktu CM-DCF který zůstává zachycen uvnitř buňky a odpovídá množství intracelulární oxidace.⁽⁶⁾

4.1.4 Mikroskopie

Po 24 hodinách inkubace bylo růstové medium DMEM nahrazeno pufrém PBS s 5mM glukózou (0,099g do 100 ml) a k buňkám byla přidána fluorescenční značka CM-H₂DCFDA 5 μM. Po následné inkubaci 20minut ve tmě byly buňky ozářeny a sledovány pomocí inverzního fluorescenčního mikroskopu Olympus IX 70, digitální kamery Olympus a softwaru Olympus MicroImage (obr.12).

4.1.5 Měření produkce reaktivních forem kyslíku

Produkce ROS po fotodynamické reakci byla měřena pomocí spektrofotometru Synergy HT (BioTek, USA) při excitační vlnové délce 495nm a emisní vlnové délce 530 nm. (obr.14).

4.1.5 Zdroj světelného záření

K navození fotodynamické reakce byl použitý ozařovač složený z luminiscenčních diod umístěný uvnitř fluorescenčním readeru (LEDs; 670 nm) o hustotě výkonu $0,1 \text{ mW.cm}^{-2}$ po dobu 17 minut a následně byl použit externí ozařovač složený z luminiscenčních diod (LEDs; 670 nm) o hustotě výkonu 10 mW.cm^{-2} (obr.13) v celkové dávce 15 J.cm^{-2} po dobu 8 minut, kterým se ozařovalo mimo reader do cílové dávky.

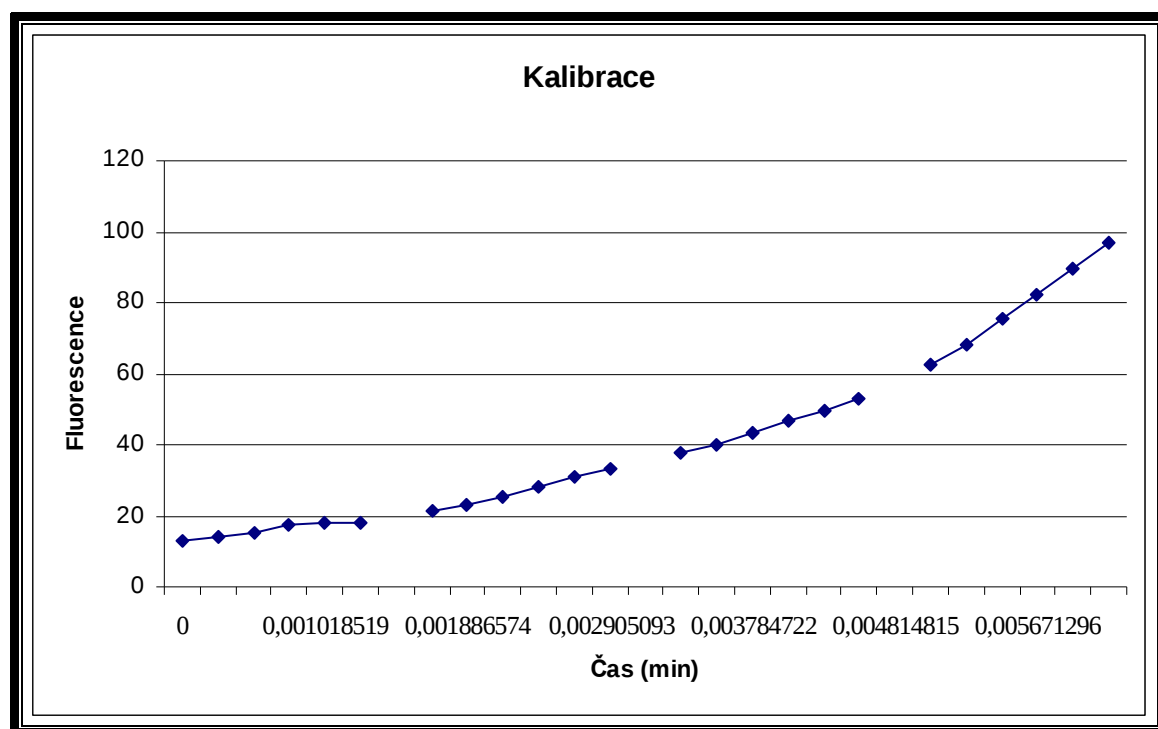
4.2 Metodika

Buňky lidského bronchogenního karcinomu A549 (ATTC USA) byly inkubovány 24 hodin v Petriho miskách (500 000/na misku) ve 2 ml kultivačního média DMEM v termostatu při 37°C a 5% atmosféře CO_2 . Po 24 hodinách byl ve flowboxu přidán do 2 ml média sensitizer ZnTPPS_4 o koncentraci 1, 10 a $100 \mu\text{M}$. Medium DMEM bylo nahrazeno 2ml PBS s 5mM glukózou a bylo přidáno 20 μl fluorescenční značky CM- H_2DCFDA (Invitrogen Corporation, USA) do 2 ml PBS a tím vznikla 5 μM koncentrace CM- H_2DCFDA v misce. Buňky byly dále inkubovány 20 minut ve tmě při 37°C a 5% atmosféře CO_2 .

Fotodynamická reakce byla navozena světelným zářením o celkové dávce 15 J.cm^{-2} . Nejprve se ozařovalo ozařovačem, složeným z luminiscenčních diod, umístěným uvnitř fluorescenčního readeru o výkonu $0,1 \text{ mW.cm}^{-2}$. Následně byl vzorek dozářen na cílovou dávku externím ozařovačem o výkonu 10 mW.cm^{-2} . Konstrukce fluorescenčního readeru neumožnila zabudovat ozařovač o větším výkonu, ozáření v readeru sloužilo ke sledování kinetiky vzorků – následné dozáření externím ozařovačem bylo použito z časových důvodů experimentu, použití silnějšího zdroje světla výrazně zkrátilo dobu ozařování. Kontrolní vzorky představovaly buněčné linie pouze v kultivačním médiu a bez sensitizeru. Pro každou koncentraci byla provedena 4 nezávislá měření a vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Dále byla sestrojena kalibrační křivka, ze které se určila směrnice.

5. Výsledky

Kalibrační křivka se detekovala pomocí kinetického měření detekce H_2O_2 . Doisky 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 kinetického měření (graf 1) byla získána data, ze kterých se určily 4 hodnoty použité k sestrojení kalibrační křivky (graf 2).



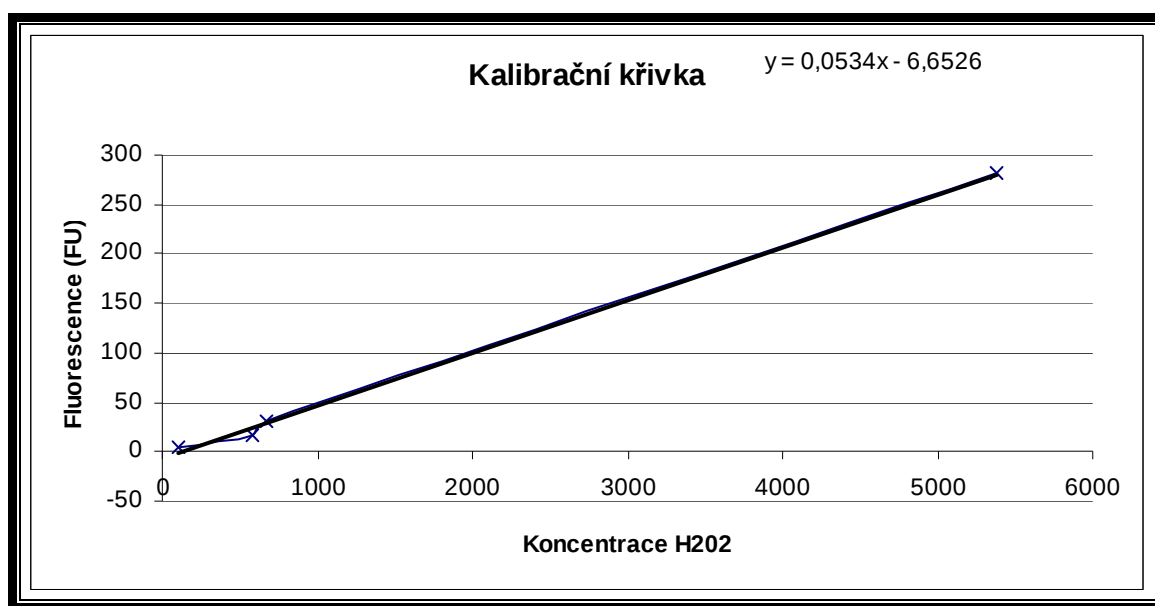
Graf 1: Křivka kinetického měření ROS po přidavku 10 μl 20 mM H_2O_2 , 25 μl 20 mM H_2O_2 , 50 μl 20 mM H_2O_2 a 50 μl 200 mM H_2O_2 .

Hodnoty ze kterých se kalibrační křivka sestrojovala byly vždy ustálené maximální hodnoty po přidavku určeného množství H_2O_2 (tab. 2).

Přídavek H ₂ O ₂ číslo:	Fluorescence (FU)	Koncentrace H ₂ O ₂ (μM)
1	15	99
2	16	583
3	31	678
4	281,25	5376

Tabulka 2: Naměřené hodnoty k sestrojení kalibrační křivky

Z kalibrační křivky se určila směrnice k , která se použila k přepočtu získaných dat z fluorescenčních jednotek (FU) na koncentraci (μM H₂O₂ na 500 000 buněk).



Graf 2: Kalibrační křivka

Směrnice křivky byla:

$$y = 0,0534x + 6,6526$$

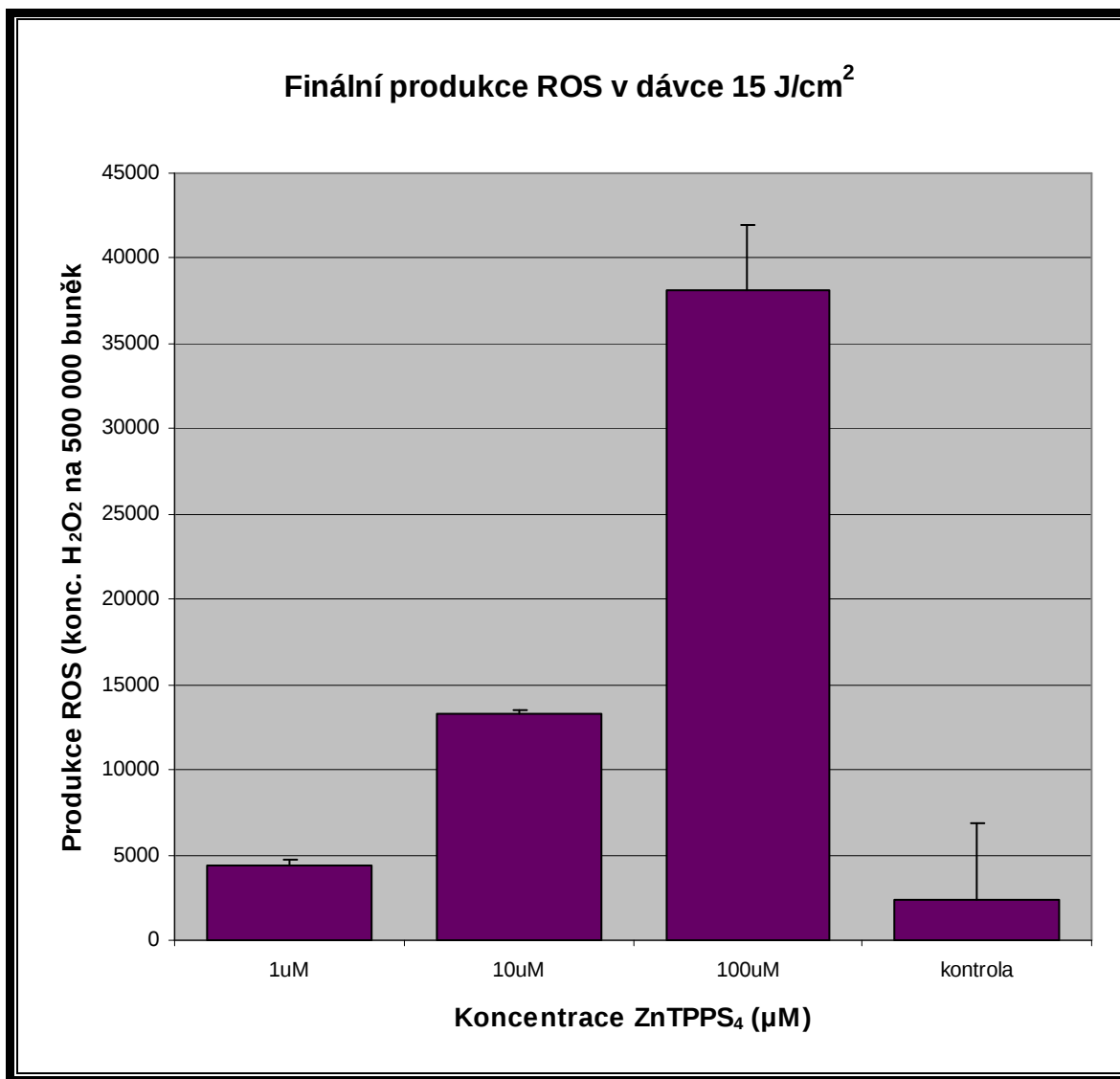
k bylo určeno podle obecného tvaru rovnice přímky

$$y = kx + q$$

čehož plyne, že $k = 0,5585$

Tato směrnice přímky byla použita k přepočtu fluorescenčních jednotek na koncentraci H_2O_2 .

Na grafu č. 3 je znázorněna produkce ROS v závislosti na koncentraci sensitizeru při dávce ozáření 15 J/cm^2 . Z naměřených výsledků vyplývá, že se vzrůstající koncentrací sensitizeru roste produkce ROS v buňkách.

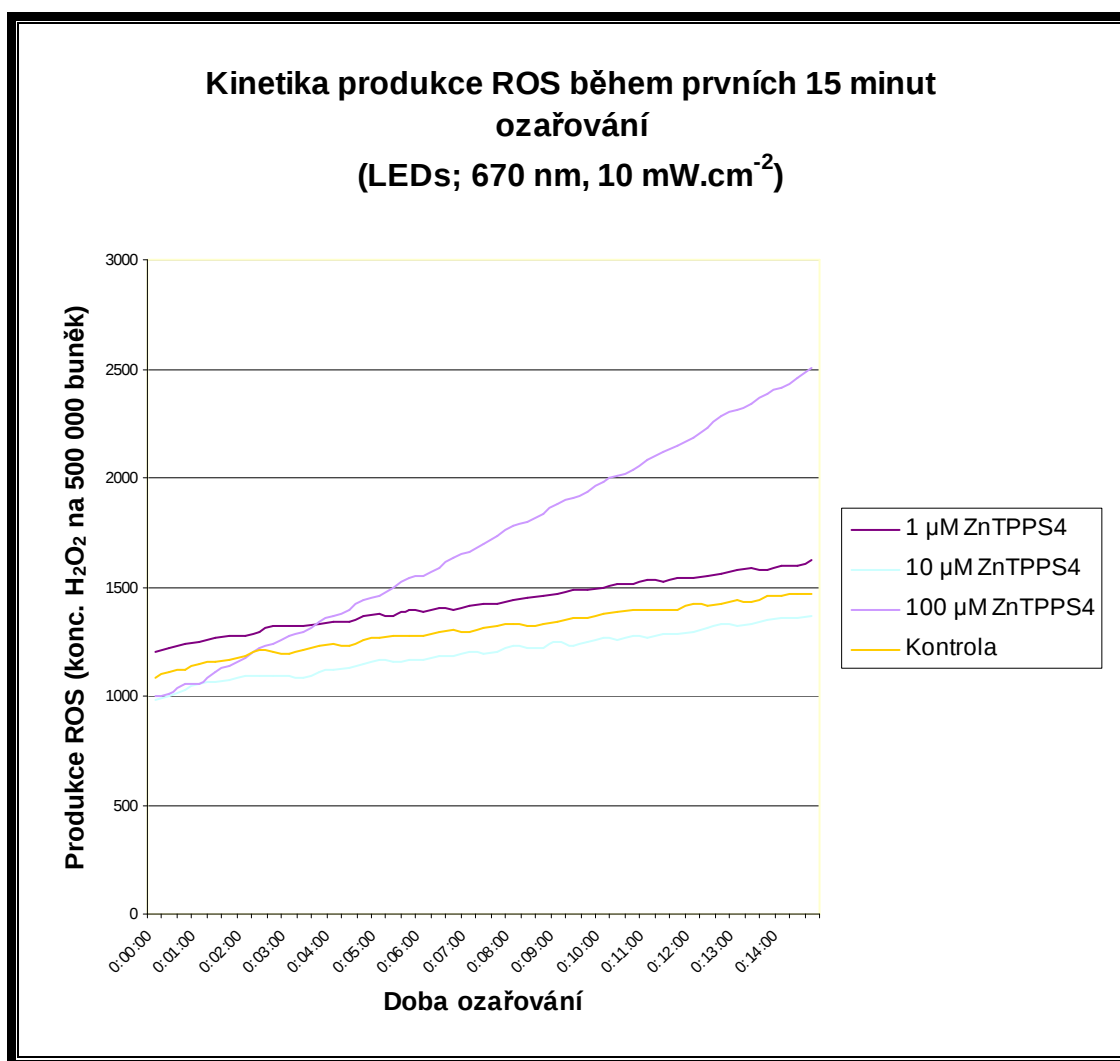


Graf 3: Produkce ROS po ozáření dávkou 15 J/cm^2 v koncentraci na 500 000 buněk

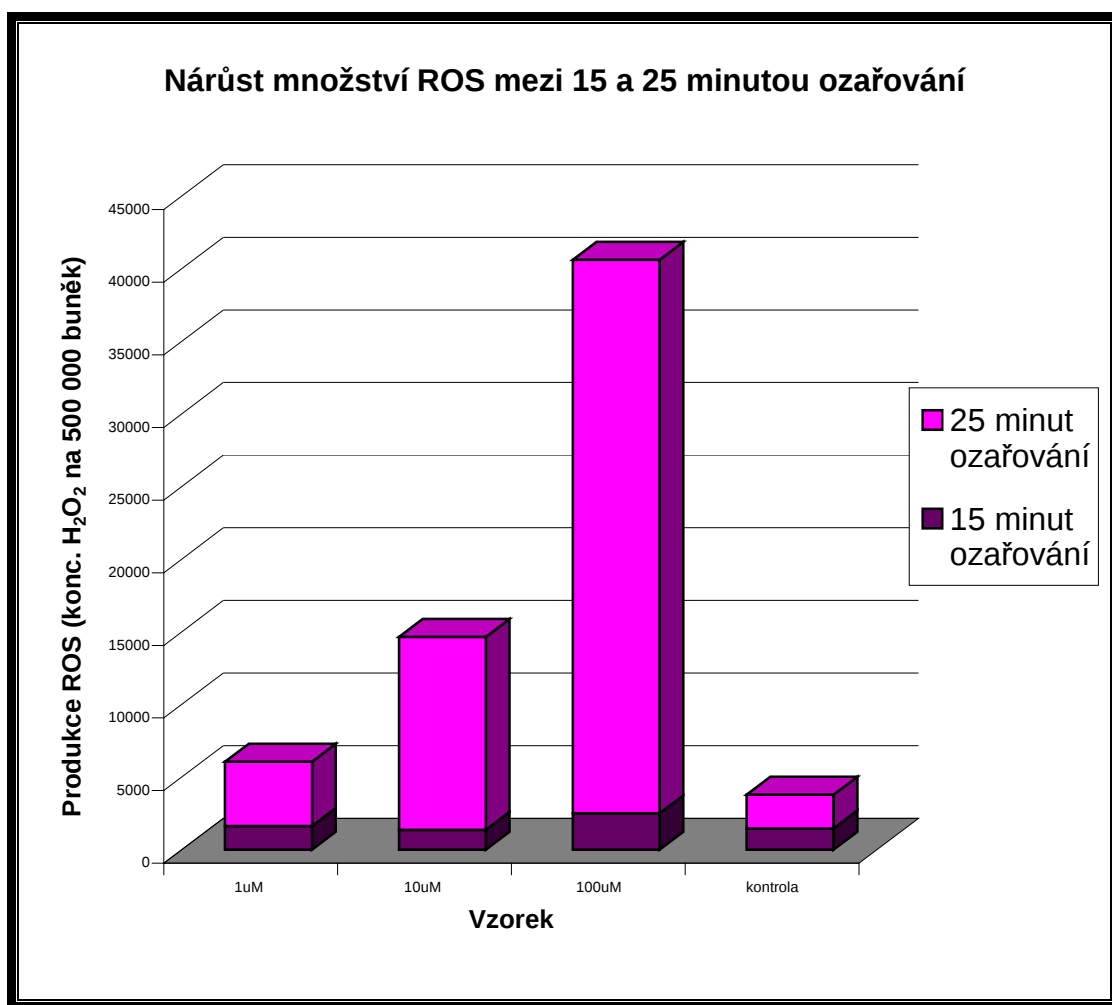
V tabulce č. 3 vyjádřena produkce ROS při ozařování v závislosti na čase. V grafu č. 4. je znázorněna kinetika produkce ROS během prvních patnácti minut ozařování zdrojem o hustotě výkonu $0,1 \text{ mW.cm}^{-2}$. Z výsledků vyplývá, že kinetická produkce ROS se v závislosti na čase zvyšuje. Na grafu č. 5 je vyjádřen rozdíl v produkci ROS mezi 15 a 25 minutami ozařování, kdy byl na posledních 7 minut použit silnější externí zdroj záření o hustotě výkonu 10 mW.cm^{-2} .

Koncentrace sensitizeru ZnTPPS₄	ROS produkce [$\mu\text{M/s H}_2\text{O}_2$] v prvních 20 sekundách	ROS produkce [$\mu\text{M/s H}_2\text{O}_2$] v 5 minutách	ROS produkce [$\mu\text{M/s H}_2\text{O}_2$] v 12minutách	ROS koncentrace v dávce 15 J/cm^2 [$\mu\text{M H}_2\text{O}_2$]
1 μM	1221,91 $\pm$ 42,6	1376,404 $\pm$ 77,7	1540,262 $\pm$ 100,3	4442,884 $\pm$ 265,3
10 μM	1001,873 $\pm$ 38,6	1161,049 $\pm$ 37,5	1296,816 $\pm$ 61,2	13286,52 $\pm$ 449,1
100 μM	1011,236 $\pm$ 47,7	1460,674 $\pm$ 51,3	2186,33 $\pm$ 83,1	38113,3 $\pm$ 2164,3
kontrola	1109,551 $\pm$ 51,9	1268,727 $\pm$ 46,6	1418,539 $\pm$ 36	2326,779 $\pm$ 142,9

Tabulka 3: Kinetická produkce ROS při ozařování ($\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ na 500 000 buněk) v prvních 20 sekundách, 5 minutách, 12 minutách a ve finální dávce 15 J.cm^2



**Graf 4: Produkce ROS během prvních 15 minut ozařování (dávkou 15 J/cm²
v koncentraci na 500 000 buněk)**

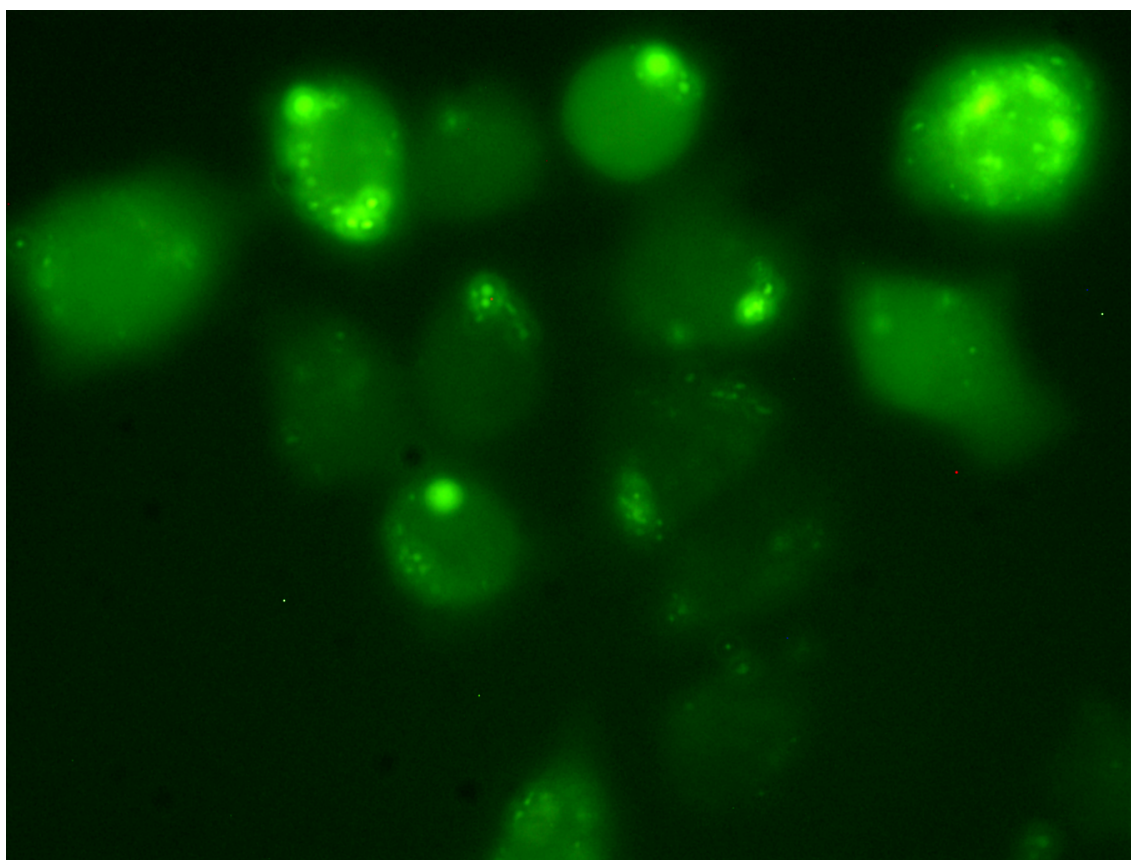


Graf 5: Produkce ROS po ukončení ozařování (dávkou 15 J/cm^2 v koncentraci na 500 000 buněk) a rozdíl mezi počtem ROS v 15 a 25 minutě

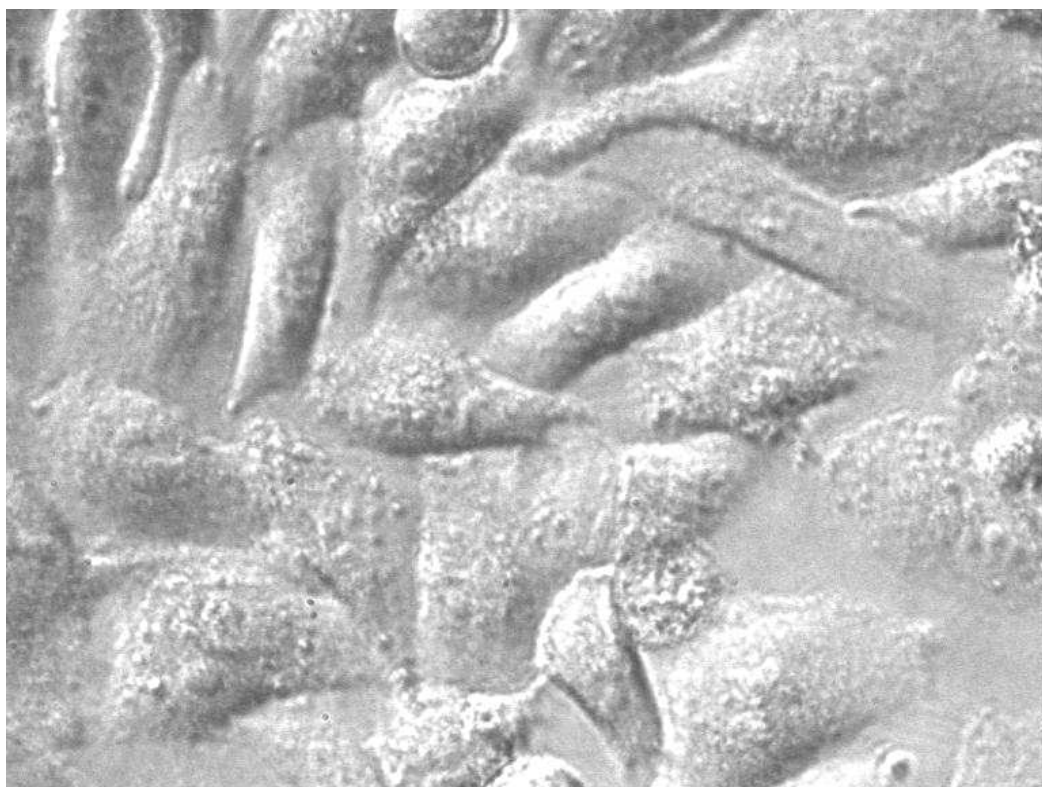
	Fluorescenční jednotky (FU)				
Doba měření	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4	Průměr
0:00:00	1198,502	1273,408	1198,502	1123,596	1198,502
0:00:20	1254,682	1273,408	1179,775	1179,775	1221,91
0:00:40	1273,408	1310,861	1217,228	1142,322	1235,955
0:01:00	1292,135	1348,315	1179,775	1179,775	1250
0:01:20	1292,135	1348,315	1235,955	1198,502	1268,727
0:01:40	1329,588	1367,041	1198,502	1217,228	1278,09
0:02:00	1292,135	1367,041	1217,228	1235,955	1278,09
0:02:20	1348,315	1367,041	1217,228	1254,682	1296,816
0:02:40	1367,041	1404,494	1273,408	1254,682	1324,906
0:03:00	1367,041	1423,221	1217,228	1273,408	1320,225
0:03:20	1385,768	1404,494	1235,955	1273,408	1324,906
0:03:40	1404,494	1441,948	1235,955	1254,682	1334,27
0:04:00	1385,768	1441,948	1273,408	1254,682	1338,951
0:04:20	1385,768	1423,221	1254,682	1310,861	1343,633
0:04:40	1441,948	1441,948	1273,408	1310,861	1367,041
0:05:00	1423,221	1479,401	1292,135	1310,861	1376,404
0:05:20	1441,948	1460,674	1273,408	1292,135	1367,041
0:05:40	1479,401	1479,401	1292,135	1310,861	1390,449
0:06:00	1441,948	1479,401	1292,135	1329,588	1385,768
0:06:20	1479,401	1516,854	1273,408	1329,588	1399,813
0:06:40	1479,401	1498,127	1273,408	1329,588	1395,131
0:07:00	1498,127	1498,127	1310,861	1348,315	1413,858
0:07:20	1498,127	1516,854	1348,315	1329,588	1423,221
0:07:40	1498,127	1516,854	1329,588	1348,315	1423,221
0:08:00	1498,127	1554,307	1367,041	1348,315	1441,948
0:08:20	1516,854	1535,581	1329,588	1404,494	1446,629
0:08:40	1535,581	1554,307	1348,315	1385,768	1455,993
0:09:00	1554,307	1573,034	1348,315	1404,494	1470,037
0:09:20	1535,581	1610,487	1385,768	1404,494	1484,082
0:10:00	1573,034	1610,487	1385,768	1423,221	1498,127
0:10:20	1573,034	1610,487	1404,494	1460,674	1512,172
0:10:40	1573,034	1647,94	1423,221	1423,221	1516,854
0:11:00	1610,487	1647,94	1423,221	1460,674	1535,581
0:11:20	1610,487	1647,94	1404,494	1441,948	1526,217
0:11:40	1610,487	1685,393	1441,948	1441,948	1544,944
0:12:00	1610,487	1666,667	1441,948	1441,948	1540,262
0:12:20	1610,487	1666,667	1441,948	1479,401	1549,625
0:12:40	1629,213	1685,393	1441,948	1498,127	1563,67
15 J/cm2	4644,195	4719,101	4044,944	4363,296	4442,884

Tabulka 4: Příklad hodnot kinetické a finální produkce ROS naměřených fluorescenčním readerem pro koncentraci 1 μ M ZnTPPS₄, ve fluorescenčních jednotkách FU přepočteno na 500 000 buněk.

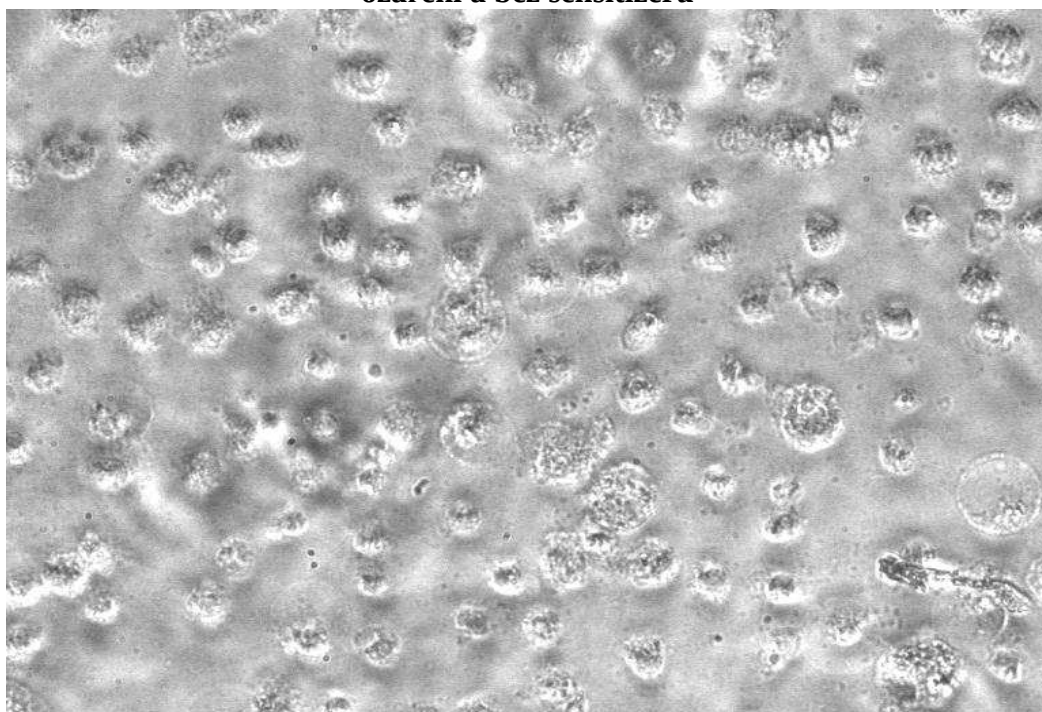
K ověření účinnosti PDT jsme také prováděli pozorování vzorků před i po terapii za pomoci fluorescenčního mikroskopu a následného zpracování pomocí softwaru Olympus MicroImage (obr.10 a 11). Rovněž bylo pomocí fluorescenčních značek sledováno rozložení produktů oxidace v buňkách (obr.9).



Obrázek 9: Fluorescenční obraz buněk po dodání značky CM-H₂DCFDA (5 μ M) a následném ozáření ukazuje rozložení oxidací vzniklého fluorescenčního produktu CM-DCF v buňce po fotodynamické terapii



Obrázek 10: Bronchogenní karcinom A549 - buňky v kultivačním médiu bez ozáření a bez senzitizeru



Obrázek 11: Bronchogenní karcinom A549 - buňky v kultivačním médiu po fotodynamické terapii.

6. Diskuse

Navození buněčné smrti fotodynamickou reakcí při současném působení sensitizeru, kyslíku a záření - fotodynamická terapie - je v dnešní době intenzivně studováno. Již dnes byl dokázán obrovský přínos pro léčbu nádorových (ale i mnoha nenádorových) onemocnění a PDT se začíná stávat další běžně používanou metodou léčby.⁽⁸⁾

Efektivita PDT je dána mnoha faktory, jako například fotofyzikální vlastnosti sensitizeru, koncentrace sensitizeru, vlnová délka světla, hloubka do které pronikne světlo ve tkáních, citlivost dané tkáně na singletní kyslík, atd..

Fotodynamická reakce vzniká při kombinaci čtyř složek: fotosensitizující látky, molekulárního kyslíku, světla optimální vlnové délky a biologického substrátu (proteiny, nukleová kyselina nebo jiné buněčné komponenty). Po vhodném podání sensitizeru, který je přednostně vychytáván v patologicky aktivní tkáni, se aplikuje viditelné světlo o vlnové délce shodné s absorpčním maximem daného fotosensitizeru a dochází k destrukci nádorových buněk, na níž se účastní převážně reaktivní formy kyslíku jako je superoxidový anion, peroxid vodíku a hydroxylové radikály.

Díky svým reaktivním chemickým vlastnostem, mohou ROS v dostatečné koncentraci navodit poškození buňky vedoucí k její smrti buď nekrózou nebo apoptózou. Tento poznatek má velký přínos pro léčbu rakoviny, jelikož většina rakovinných buněk je neustále ve zvýšeném oxidačním stresu a proto i více náchylná k poškození volnými radikály.⁽⁷⁾

Porfyriny jsou lipofilní a mají sklon k akumulaci v membránách a intracelulárních organelách jako jsou lysosomy a mitochondrie.⁽⁴⁾

Nicméně naše obrázky z fluorescenčního mikroskopu ukazují, že porfyrinový sensitizér (ZnTPPS₄) je homogenně distribuován v celé buňce bronchogenního karcinomu A549 s výjimkou jeho jádra.

Vzhledem k tomu, že efekt PDT je závislý na produkci ROS, zaměřil jsem se ve své práci na zjištění produkce ROS v těchto buňkách. Produkce byla indukována ozářením buněk viditelným světlem za přítomnosti sensitizeru. Použili jsme tři různé

koncentrace sensitizeru - 1, 10 a 100 μM s tím, že s rostoucí koncentrací by se měla zvedat produkce ROS a následně i efektivita PDT, tedy že nízké koncentrace nemají vliv na poškození buňky, zatímco vysoké dávky způsobují buněčnou smrt.⁽⁴⁾

Tato domněnka se potvrdila, nejvyšší produkce ROS bylo dosaženo při koncentraci 100 μM , ale už i při koncentraci 10 μM nastala masivní produkce ROS. Při koncentraci 1 μM byla produkce na velmi nízké úrovni, srovnatelná s úrovní v kontrolním vzorku, kde nebyl přítomen žádný sensitizer.

Při experimentu jsme vzorky ozařovali LED diodovými ozařovači – první ozáření po dobu 17 minut bylo provedeno ozařovačem umístěným uvnitř fluorescenčního readeru o výkonu $0,1 \text{ mW.cm}^{-2}$, zbytek ozáření do cílové dávky byl proveden ozařovačem o výkonu 10 mW.cm^{-2} po dobu 7 minut externím ozařovačem. Cílová dávka byla určena na základě předchozích výzkumů na 15 J/cm^2 , nižší dávky nejsou dostatečné pro navození smrti nádorových buněk.⁽⁶⁾ Při ozařování zdrojem světla o vyšším výkonu jsme sledovali rychlejší nárůst množství ROS ve vzorcích, což dokazuje přímou závislost produkce ROS na získané dávce ozáření.

Při mikroskopickém pozorování vzorků po ukončení fotodynamické terapie byla jasně patrná vysoká mortalita nádorových buněk již při koncentraci 10 μM sensitizeru ve vzorku. Při koncentraci 100 μM byl výsledný počet mrtvých buněk o něco vyšší, avšak riziko poškození zdravé tkáně je při této koncentraci mnohem pravděpodobnější. Malé množství sensitizeru totiž proniká z krevního řečiště i do ostatních tkání.⁽¹⁾ Z tohoto důvodu se koncentrace 10 μM zdá ideální pro svoji dostatečnou fototoxicitu a nižší riziko kontaminace ostatních tkání.

7. Závěr

V rámci této práce bylo dokázáno, že studovaný sensitizer porfyrin ZnTPPS₄ vhodný pro vyvolání fotodynamické reakce nádorových buněčných liniích *in vitro*. Byla prokázána nízká cytotoxicita a vysoká fotodynamická účinnost při aktivaci světlem vhodné vlnové délky.

Dále byla prokázána závislost tvorby reaktivních forem kyslíku na koncentraci sensitizeru při určité dávce ozáření (během předchozích experimentů určena vhodná hranice 15 J.cm⁻²) – bylo prokázáno, že se zvedající se koncentrací sensitizeru se zvedá i produkce reaktivních forem kyslíku a to tak, že už při koncentraci 10 μM dochází k produkci dostatečné pro navození buněčné smrti u sledovaného lidského bronchogenního karcinomu A549.

Výsledky této práce jasně prokázaly perspektivnost metody PDT pro léčbu nádorových onemocnění svojí účinností, při dodržení základních pravidel použití, jako koncentrace sensitizeru a dodaná dávka světelného záření vhodné vlnové délky.

8. Seznam literatury

1. Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W., et al. Photodynamic therapy, J. Natl. Cancer inst. 1998, s. 889 - 905
2. Florence T.M. Free radicals antioxidants and cancer prevention, Proc. Nutr. Soc. Aust. Annu. Conf, 1990, s. 88-93
3. Hippeli S., Elstner E.F. OH-radical type reactive oxygen species: a short review on the mechanism of OH-radical and peroxynitrite toxicity, Z. Naturforsch 1997 s. 555-563
4. Kolarova H., Bajgar R., Tomankova K., Nevrelouva P., Mosinger J. Comparison of sensitizers by detecting reactive oxygen species after photodynamic reaction in vitro. Toxicology in Vitro 2007 č.21, s. 1287-1291
5. Maceček J. Studium cytotoxicity fotodynamicky aktivních látek na nádorových buněčných liniích – disertační práce, Ústav lékařské biofyziky, LF UP 2005
6. Nevřelová P. Studium fotodynamických reakcí na nádorových buněčných liniích – disertační práce, Ústav lékařské biofyziky, LF UP 2006
7. Zhou, Y., et al. Free radical stress in chronic lymphatic leukemia cells and its role in cellular sensitivity to ROS – generating anticancer agents. BLOOD, 2003, vol. 101 č.10 s. 4098-4102
8. Zimčík, P., Miletín M. Fotodynamická terapie jako nová perspektivní metoda léčby nádorových onemocnění I. Historie, základní princip. Česká a slovenská farmacie: 2004, roč. 53, č.6 s.219-224

Internetové zdroje:

9. Kolářová, H. Fotodynamická Terapie (online)
<http://pdt.wz.cz/teorie%20PDT.htm> 26.listopad, 2007.
10. What is PDT (online)
<http://omlc.ogi.edu/pdt/articles/whatispdt.html> 10.leden, 2008
11. Photofrin – Drug description (online)
<http://www.rxlist.com/cgi/generic/photofrin.htm> 21.duben, 2008

12. Barviva jako léčiva (online)
<http://www.jergym.hiedu.cz/~canovm/barva/a/le.html> 21. Duben, 2008
13. The Science of PDT (online)
<http://www.bmb.leeds.ac.uk/pdt/science.htm> 26.listopad 2007
14. Fluorescenční mikroskopie (online)
<http://natur.cuni.cz/parasitology/parpages/mikroskopickatechnika/fluorescencni.htm> 23.duben 2008
15. Apoptóza (online)
<http://cs.wikipedia.org/wiki/Apopt%C3%B3za> 14.března 2008
16. What is apoptosis? (online)
<http://www.ccs.k12.in.us/chsBS/kons/kons/apoptosis.htm> 4.březen 2008
17. Principy fluorescenční spektroskopie (online)
<http://www1.lfl.cuni.cz/~zfisar/fluorescence/soubory/principy.htm#luminisence> 4.února 2008
18. Konfokální mikroskop (online)
<http://www.vesmir.cz/clanek.php3?CID=5053> 20. duben 2008
19. Bronchogenní karcinom (online)
<http://www.cls.cz/dokumenty2/postupy/t023.rtf> 18.duben 2008

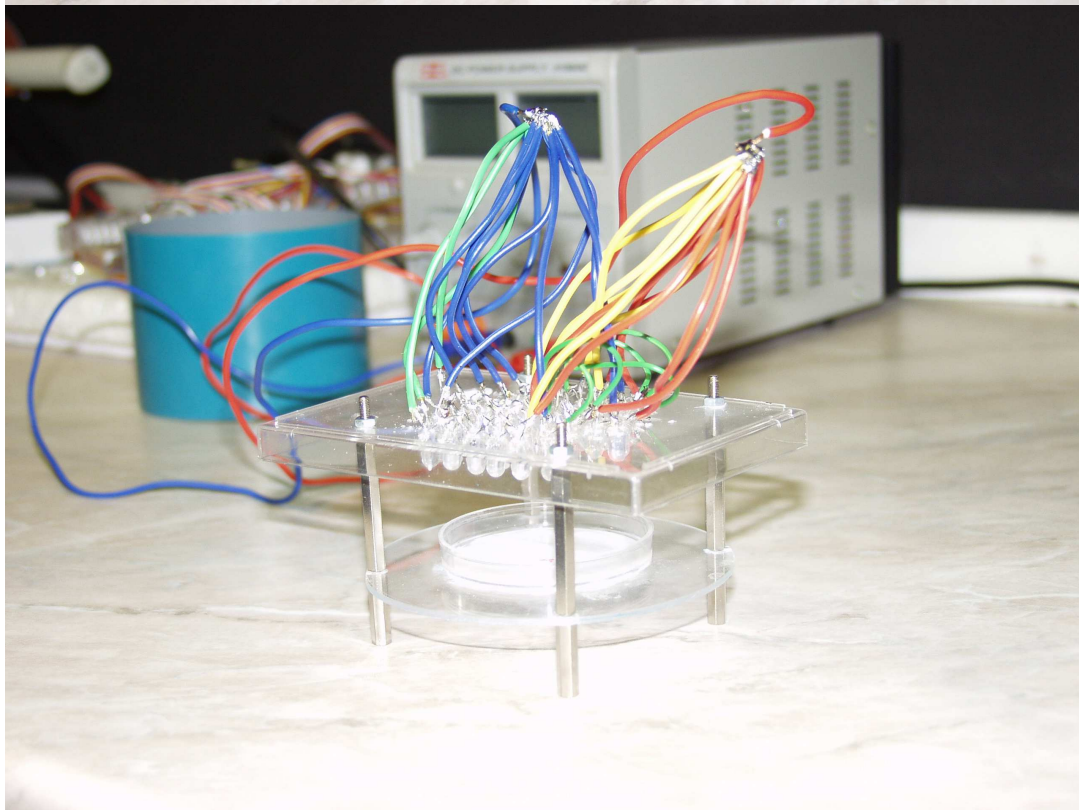
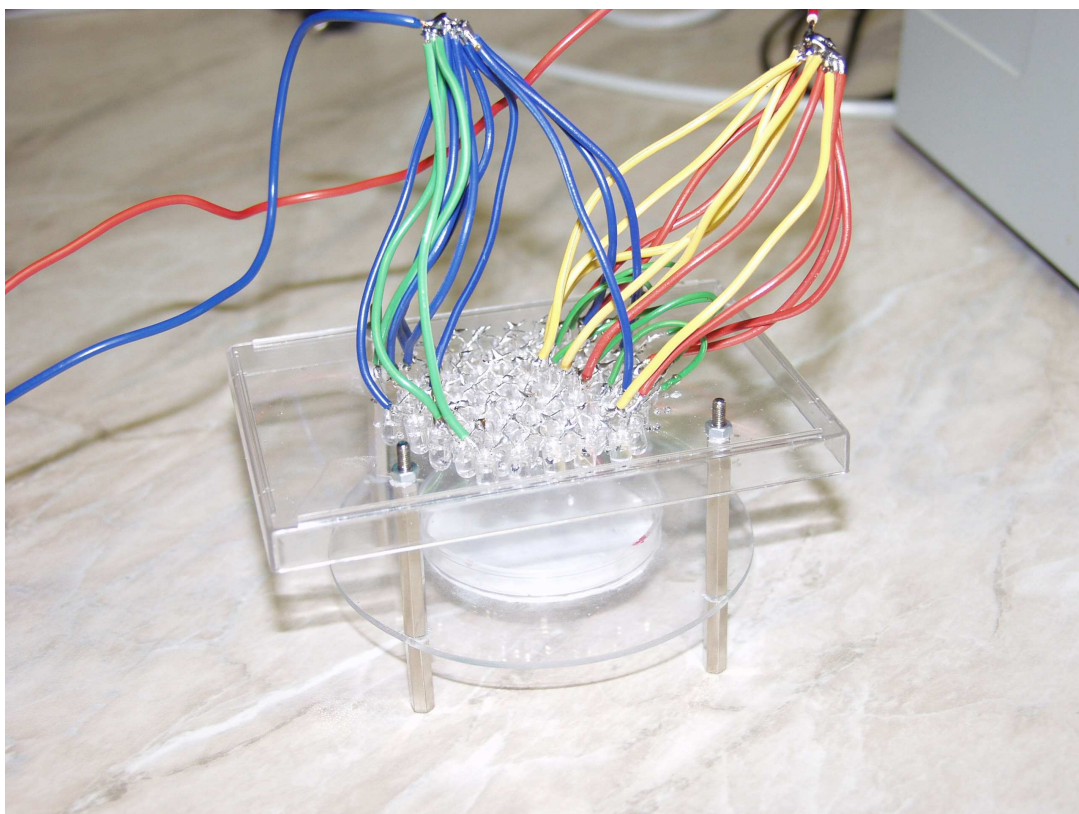
9. Seznam zkratek

A549	buněčná linie bronchogenního karcinomu
CASPASES	Cysteine Aspartate Specific ProteASEs
CM-DCF	5-(a-6)-chloromethyl-2'7'-dichlorodihydrofluorescein
CM-H ₂ DCFDA	5-(a-6)-chloromethyl-2'7'-dichlorodihydrofluorescein diacetat
CO ₂	oxid uhličitý
DMEM	kultivační medium
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FU	fluorescenční jednotka
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
H ₂ O	voda
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HpD	derivát hematoporfyrinu
In vitro	na buněčné linii nebo tkáňové kultuře
In vivo	na živém organismu
LASER	light amplification stimulated by emitted radiation
LED	light emitted diode
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
O ₂	molekulární kyslík
O ₂ [°]	superoxidový radikál
OH [°]	hydroxilový radikál
PBS	phosphate buffered saline
PDT	fotodynamická terapie
R*	oxidované radikály
ROS	reaktivní formy kyslíku
S*	excitovaný sensitizer
TPPS ₄	meso-tetrakis(4-sulfonatofenyl)porfyrin
ZnTPPS ₄	zinečnatý komplex sensitizeru TPPS ₄

10. Přílohy



Obrázek 12: fluorescenční mikroskop Olympus IX 70



Obrázek 13: ozařovač složený z luminiscenčních diod výkonu 10 mW.cm^{-2}



Obrázek 14: spektrofleurimetr Synergy HT (BioTek)