



FOTODYNAMICKÁ TERAPIE



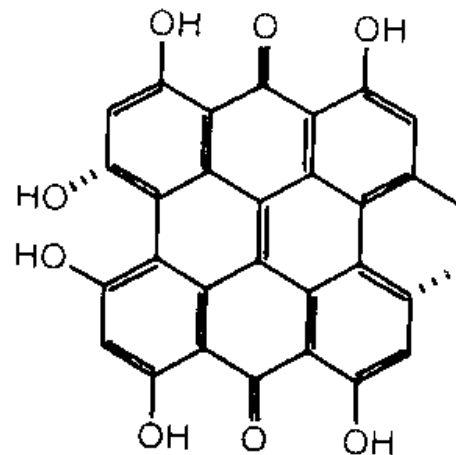
MŮŽE SVĚTLO ZABÍJET?



Třezalka tečkovaná
Hypericum perforatum L

Třezalka tečkovaná, rostlina kouzelná až magická, se využívala při léčení neobyčejných nemocí - náměsíčností počínaje a úderem blesku konče. Dokládají to i lidové názvy, říkalo se jí čarovník, prostřelenec, svatojanská bylina nebo třeba krevníček.

Dva poslední názvy nejspíš souvisí s **hypericinem, červeným barvivem, které je obsaženo v kanálcích v listech a jemuž se říkalo krev sv. Jana a zřejmě právě ono má také na svědomí pověry a legendy, opřádající tuto bylinu. Například když se krávy či kozy napásly třezalky ve větším množství, jejich mléko se zbarvilo do růžova. Jak si ve středověku vysvětlit tento nepochopitelný jev? Po ruce byly přece čarodějnice a magie!**



Hypericin

The origin of photosensitization as a science is usually attributed to the work of Oscar Raab at the turn of the century. Although there are several accounts of photosensitization reactions in the writings of the Egyptians, Indians and Chinese dating to at least 30 centuries ago, the modern era is conveniently recognized to begin in the year 1900.



Oscar Raab was a student of Hermann von Tappeiner. Raab was involved in a study of the toxicity of acridine towards paramecia. As is frequently the case in the research lab, Raab found that his results were quite variable. In this case, however, he was sufficiently observant and systematic to recognize that the apparent toxicity which he measured depended on the time of day when he performed his experiment. Near midday the toxicity was greatest. Raab realized that one of the variables in his work was the amount of light in the laboratory, and he subsequently demonstrated that paramecia in acridine solutions were inactivated more effectively if the solutions were kept near a bright window, than if they were kept in the dark.

Photosensitizer alone → No Effect

Light alone → No Effect

Photosensitizer AND **Light** → **Change in Organism**

**V ROCE 1904 BYL POPSÁN FOTODYNAMICKÝ JEV
ZAHRNUJÍCÍ SVĚTLO, FOTOSENSIBILIZÁTOR A
KYSLÍK**

**V ROCE 1999 BYLA ZAREGISTROVÁNA KYSELINA 5-
AMINOLEVULOVÁ JAKO LÉK**

- **EGYPT (1300 B.C.) VLIV SLUNEČNÍHO ZÁŘENÍ NA URČITÁ LÉČIVA**
- **HIPPOCRATICUM (460-375 B.C.) VLIV SLUNEČNÍHO ZÁŘENÍ NA LIDSKÉ TĚLO**
- **KOLEM ROKU 1200 A.C. FOTOSENSITIVNÍ ÚČINKY PRAVDĚPODOBNĚ PSORALENU**
- **F.W. HERSCHEL – 1800 - IČ SPEKTRUM**
- **J.W. RITTER – 1806 – UV ZÁŘENÍ**
- **E.WJ. WIDMARK - 1889 – DOKÁZAL ÚLOHU UV ZÁŘENÍ PŘI RUDNUTÍ POKOŽKY**
- **A.H. DOWNES A TP. BLUNT 1877 – OBJEV BAKTERICIDNÍCH ÚČINKŮ UV ZÁŘENÍ**

- CH. DARWIN K. DAMMANN POPSALI I NEGATIVNÍ VLIVY SLUNEČNÍHO ZÁŘENÍ ZA PŘÍTOMNOSTI „DROG“ – VYRÁŽKU U ZVÍŘAT PO POŽITÍ POHANKY (OBJEVOVALA SE U ZVÍŘAT SE SVĚTLEJŠÍ SRSTÍ A PO DELŠÍM POBYTU NA SLUNCI)
- J. PRIME – 1900 – OTOKY PRSTŮ, PUCHÝŘE U EPILEPTIKŮ LÉČENÝCH EOSINEM (OBSAHUJE BROMID JAKOŽTO POTENCIÁLNÍ ANTIEPILEPTICKOU SOUČÁST)
- O. RABB – VLIV AKRIDINU NA PRVOKY (NÁLEVNÍCI, TREPKY (STANOVOVAL PRAHOVOU HRANICI TOXICITY BARVIV, PROVEDL CCA 800 EXPERIMENTŮ, KTERÉ BYLY NEREPRODUKOVATELNÉ)
- O. RABB A TAPPEINER – 1900 – AKRIDIN, EOSIN, CHININ – TOXICITA SE LIŠILA V PRŮBĚHU DNE...USOUDILI NA VLIV FLUORESCENCE BARVIV A OZNAČILI REAKCI JAKO FOTODYNAMICKOU

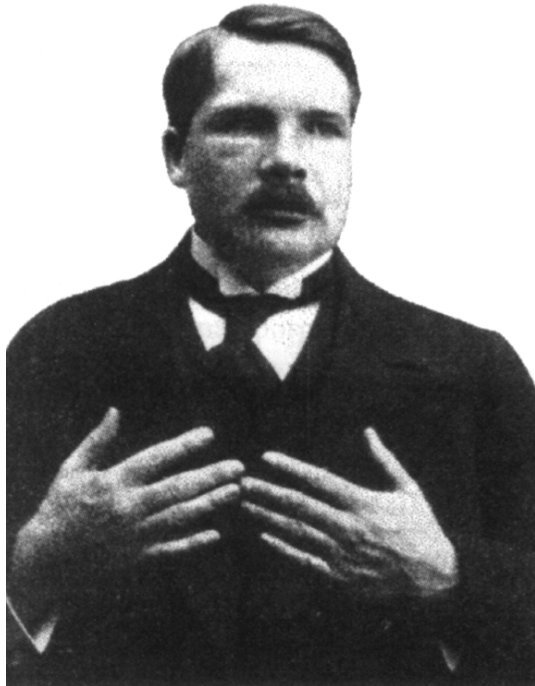
•JIŽ V ROCE 1895 DIEUDONNEÉ POPISOVAL BAKTERICIDNÍ ÚČINKY KYSLÍKU (ALE NEUVAŽOVAL KATALYTICKÝ VLIV FOTOSENSIBILIZÁTORU)

•1904 LEDOUX-LEBARDS DOKÁZAL, ŽE PRO FOTODYNAMICKOU REKACI JE NUTNÁ PŘÍTOMNOST KYSLÍKU (TREPKY RYCHLEJI UMÍRAJÍ V OTEVŘENÉ LAHVI ZA PŘÍTOMNOSTI KYSLÍKU NEŽ V LAHVI UZAVŘENÉ).

•1909 – TAKÉ VON TAPPEINER NAVZDORY SVÝM MINULÝM PRACEM PROHLÁSIL, ŽE KYSLÍK JE ZODPOVĚDNÝ ZA FOTODYNAMICKÝ EFEKT.

• ANIŽ ZNAL MECHANISMUS TOHOTO JEVU, JIŽ V ROCE 1903 ZAPOČAL EXPERIMENTY NA LIDECH (RAKOVINA, SYFILIS, TUBERKULOZA).

•DRYER – ERYTHROSIN, ANTIBAKTERIÁLNÍ ÚČINKY, LUPENKA (ALE PACIENTI TRPĚLI SILNÝMI BOLESTMI A PROTO EXPERIMENTY UKONČIL)



F. Meyer-Betz before his self experiment



**After injection of 0,2 g hematoporphyrin
swelling of the sun-exposed right side of
the face and left arm**

1948 Figge and coworkers confirmed their results and proposed a use as photosensitizers for PDT due to good tumor-localizing effects.

1973, **Thomas Dougherty** reported on an impaired growth rate of transplanted mammary tumors in mice after sensitization with fluoresceine and light at 488 nm. Then he postulated the **criteria for a suitable photosensitizer for PDT**

- .Non toxicity at therapeutic dose
- .Defined uptake and accumulation in malignant tissue
- .Light activation above 600 nm
- .Photochemical activity

SVĚTLO

KYSLÍK



The diagram illustrates the photodynamic effect process. At the top left, a yellow box contains the word "SVĚTLO" (Light). At the top right, a light blue box contains "KYSLÍK" (Oxygen). Two green arrows point from these boxes towards a central red oval. Inside the red oval, the text "FOTODYNAMICKÝ JEV" (Photodynamic Effect) is written in bold black letters. Below the oval, a large green arrow points upwards towards the oval. At the bottom, a blue box contains the word "FOTOSENSIBILIZÁTOR" (Photosensitizer).

FOTODYNAMICKÝ JEV

FOTOSENSIBILIZÁTOR

FOTOCHEMIE

Molekula A v **elektronově excitovaném stavu** nepodléhá výlučně fotochemické reakci za vzniku produktu B.

Může se deaktivovat emisí záření o větší vlnové délce (**zářivý přechod**), nebo přeměnou elektronové energie v energii **vibrační (nezářivý přechod)** vedoucí ke zvýšení teploty systému.

Excitovaná molekula může být také v interakci s jinými molekulami, kterým může předat excitační energii (**zhášení, senzibilace**), předat nebo získat elektron (**přenos náboje**) nebo reagovat za vzniku společného produktu.

Přímá fotochemická reakce

Množství absorbovaných světelných kvant se mění s časem v důsledku poklesu koncentrace reagující složky a vzrůstu koncentrace reakčních produktů. Aktivační energie fotochemického procesu je velmi malá.

Fotoiniciace

Nutnou podmínkou pro vyvolání fotochemické reakce je, aby alespoň jedna z reakčních složek absorbovala dopadající světelné záření.

Vzhledem k tomu, že molekulární kyslík neabsorbuje světlo o vlnových délkách vyšších než 200 nm, **musí být absorbující složkou oxidovaný substrát**. Absorbuje-li substrát iniciující záření, může dojít k přímé fotochemické oxidaci, a to dvojitým mechanismem:

a) absorpcí světla substrátem **vznikají volné radikály**, které reagují přímo s dikyslíkem. Podle novějších názorů se molekulární kyslík může účastnit při vzniku radikálů jako akceptor elektronu. Tato reakce je spinově dovolená.

b) absorpcí světla se substrát dostává do **excitovaného tripletového stavu** a reaguje přímo s molekulárním kyslíkem. Reakce dvou částic v tripletovém stavu je rovněž spinově dovolená.

Nepřímá fotochemická reakce

Pokud žádná z reakčních složek neabsorbuje světlo, je možno k reakčnímu systému přidat další, v podstatě inertní, ale světlo absorbující složku - **senzibilizátor**, který umožní **nepřímou fotochemickou oxidaci**. Světelná energie absorbovaná senzibilizátorem se může přenést na jednu reakční složku, a tím iniciovat reakci.

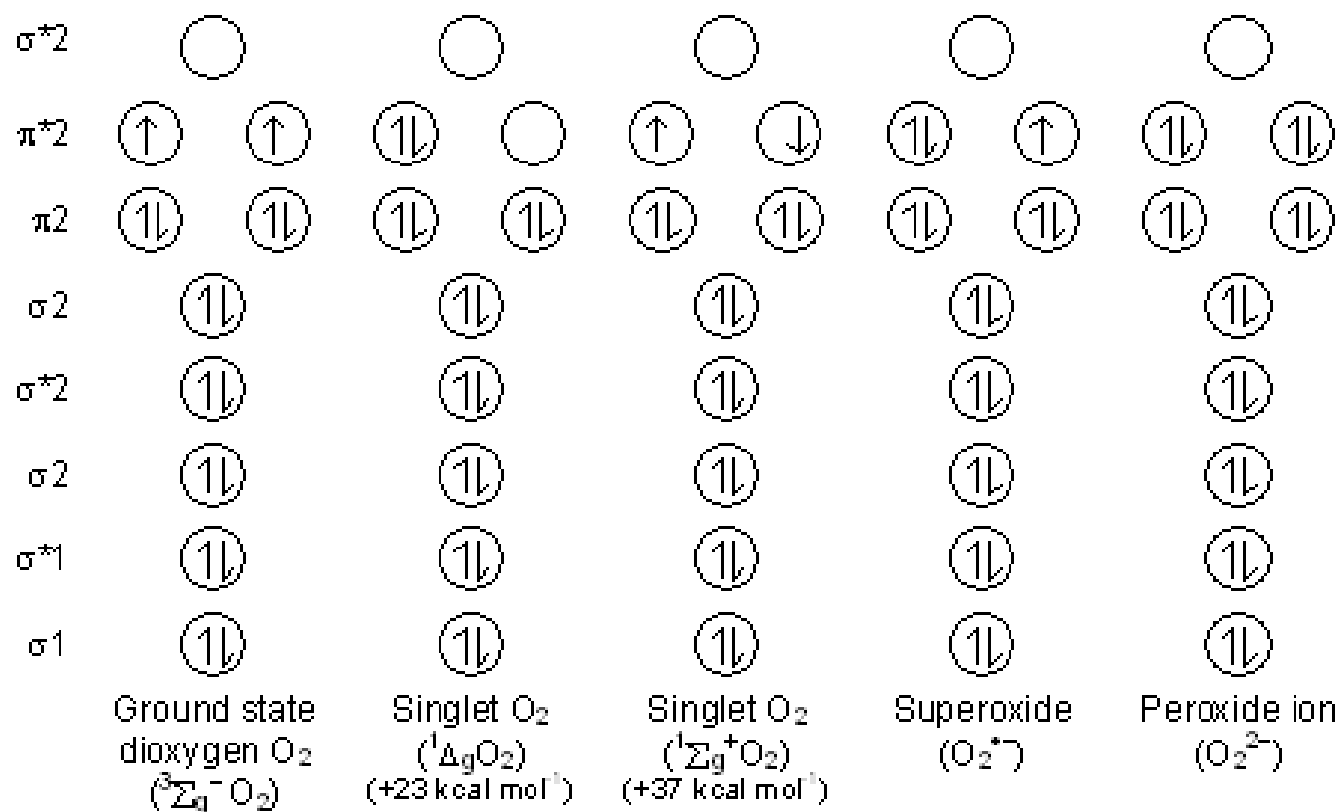
Jako senzibilizátory se většinou užívají organická barviva. Senzibilizující látka může rovněž vznikat v průběhu termické nebo fotochemické reakce.

Fotosenzibilizované reakce mohou probíhat dvěma různými mechanismy.

- 1. Senzibilizátor, který se absorpcí světla dostal do tripletového stavu, může převést získanou energii na molekulu substrátu za vzniku **volného radikálu** nebo molekuly substrátu v tripletovém stavu**
- 2. Senzibilizátor, který se absorpcí světla dostal do tripletového stavu, může převést získanou energii na molekulu kyslíku za vzniku **singletového kyslíku**.**

Molecular
Orbital

The electron configuration of the many forms of active oxygen [1].



1 Lainge M. (1989) The three forms of molecular oxygen. *J Chem Ed.* 66:453-455.

Fotodynamické poškození biologických soustav

Nejcitlivější jsou jednobuněčné organismy, neboť nejsou chráněny kůží. Kromě akridinu, užitého Raabem, byly jako senzibilizátory používány například:

akridinová oranž, akridinová červeň, methylenová modř a novome-tylenová modř, fenazin, tryptaflavin, fluorescein, eosin, erytrosin, rhodamin B, naftochinony, antrachinony, chlorofyly, sulfonamid, 3,4 - benzopyren, perlonin.

U většiny uvedených barviv byl pozorován toxický účinek i ve tmě, ale vlivem světla byl silně zvyšován. Nejúčinnější byly akridinové deriváty, méně fluorescein, ještě méně fenazin a naftochinonové deriváty byly účinné jen slabě. V řadě eosin, erytrosin, rose bengale ubývala fotodynamická účinnost se stoupající molekulovou hmotností barviva.

U savců je při fotodynamickém účinku ovlivněn jen **vnější povrch**, protože pronikání světla je omezeno jen na relativně tenkou vnější vrstvu.

Primární efekt v kůži může být doprovázen zřetelnými sekundárními efekty ve vzdálenějších orgánech, t.j. v orgánech cirkulačních a dýchacích a v centrálním nervovém systému.

Dále mohou podléhat fotodynamickému jevu všechny **tělní tekutiny**. Při senzibilaci teplokrevných zvířat může však docházet k značnému zeslabování účinku redukcí barviv v organismu, případně srážením jejich komplexů s bílkovinami. Tím se může stát, že běžně užívané nízké koncentrace (10^{-4} - 10^{-6} M) jsou *in vivo* neúčinné.

U rostlin byl fotodynamický jev studován mnohem méně než u živočichů. Větší počet prací byl věnován pouze účinku na bakterie a kvasinky.

U bakterií byla většinou pozorována ztráta antigenity, při silnějším účinku mutagenní a letální účinek, a to za přítomnosti různých barviv. Zdá se však, že bakterie jsou odolnější proti fotodynamickému jevu než prvoci. Pozorované rozdíly v senzitivitě blízké příbuzných jednobuněčných organismů k fotodynamickému jevu vysvětlují různí autoři jejich různou schopností zachycovat fotodynamicky účinná barviva a pigmenty. Při ozařování semen máčených v roztocích fotodynamicky účinných barviv bylo pozorované **zvýšení klíčivosti.**

Fotodynamicky účinná barviva

Senzibilizační účinnost, t.j. schopnost využít světelnou energii, byla zjištěna u řady barviv nejrůznější chemické struktury. Typ reakce není určován povahou barviva, ale podmínkami v systému, v němž reakce nastává. U řady azinových, fluoresceinových, rostlinných barviv byla fotodynamická účinnost potvrzena na nejrůznějších substrátech, o fotodynamické účinnosti jiných barviv se údaje rozcházejí. Mezi nejúčinnější fotosenzibilizátory patří **metylenová modř a eosin**, jejichž mechanismus účinku byl také nejvíc prostudován. Tato barviva byla spolu s **hematoporfyrinem, chlorofylem a riboflavinem** také nejčastěji používána pro kvantitativní studia na chemických individuích.

FOTODYNAMICKÁ TERAPIE

SVĚTLO

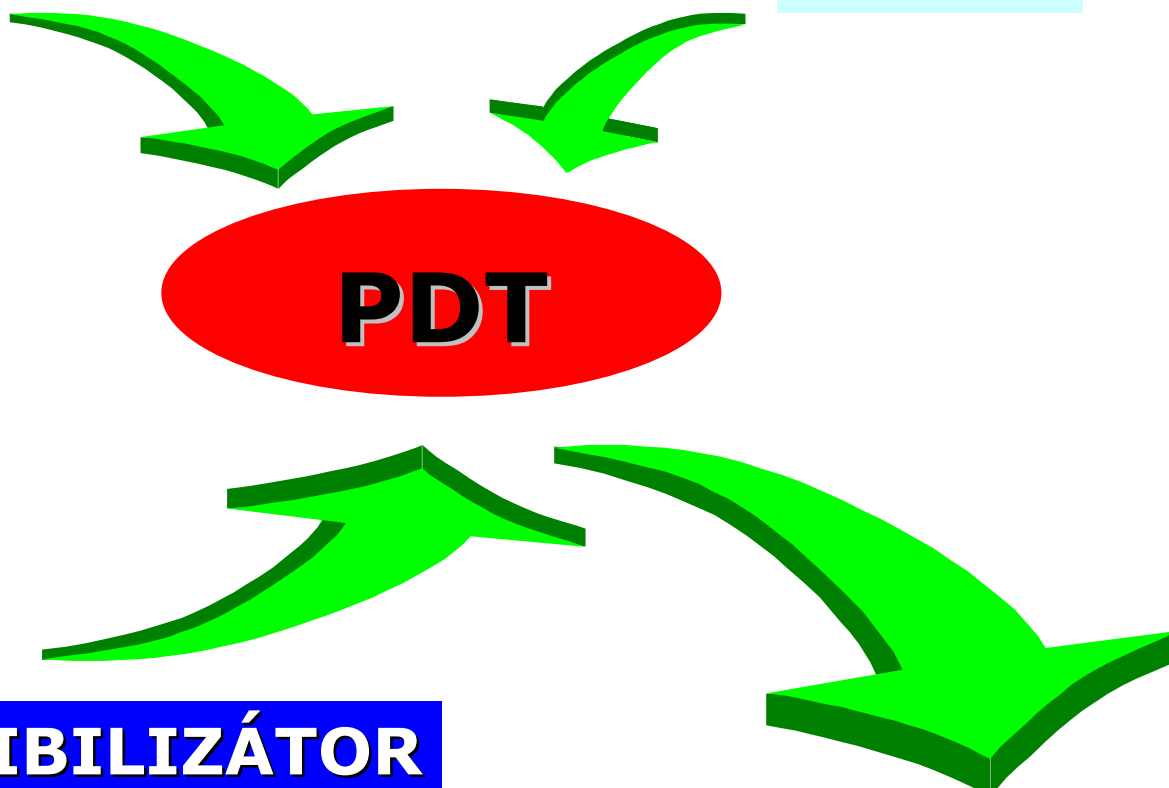
KYSLÍK

PDT

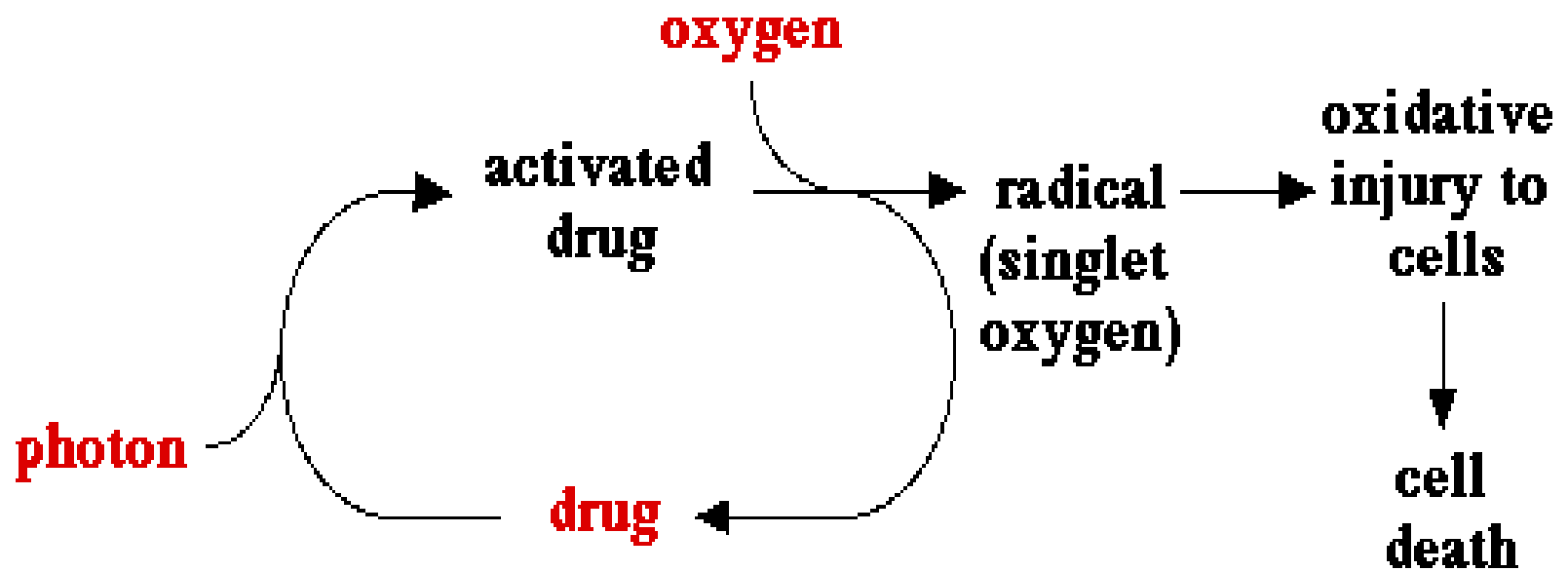
FOTOSENSIBILIZÁTOR

BUNĚČNÉ POŠKOZENÍ

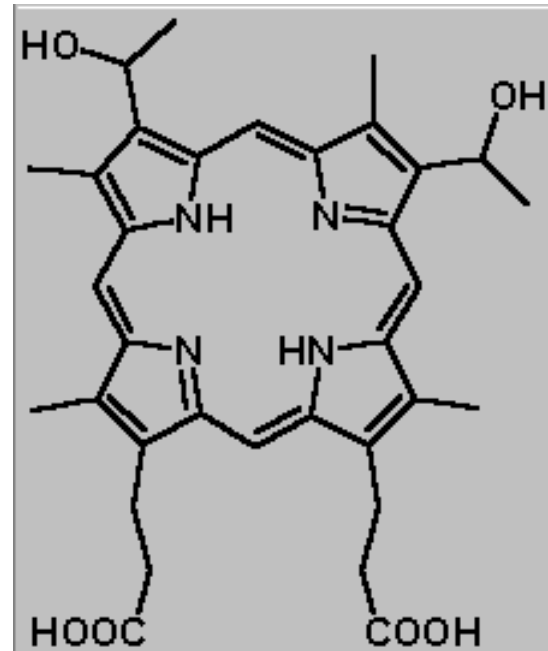
BUNĚČNÁ SMRT



PhotoDynamic Therapy (PDT)

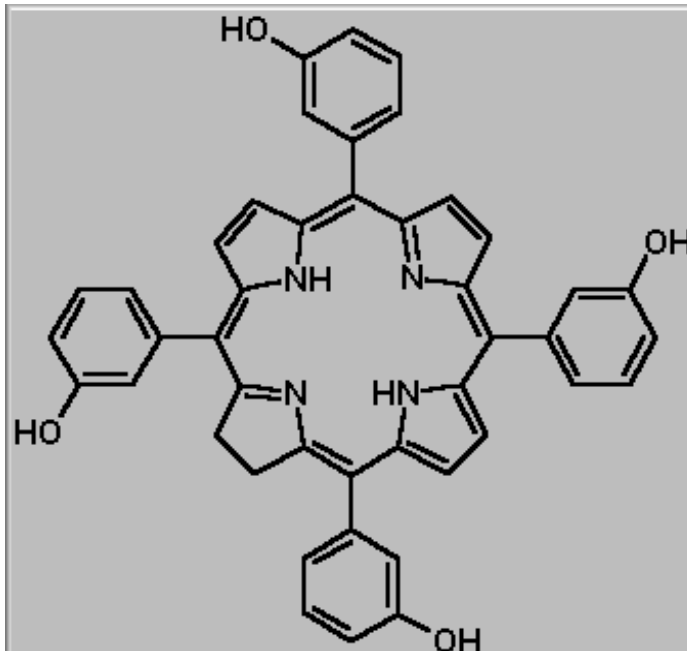


Porphyrins



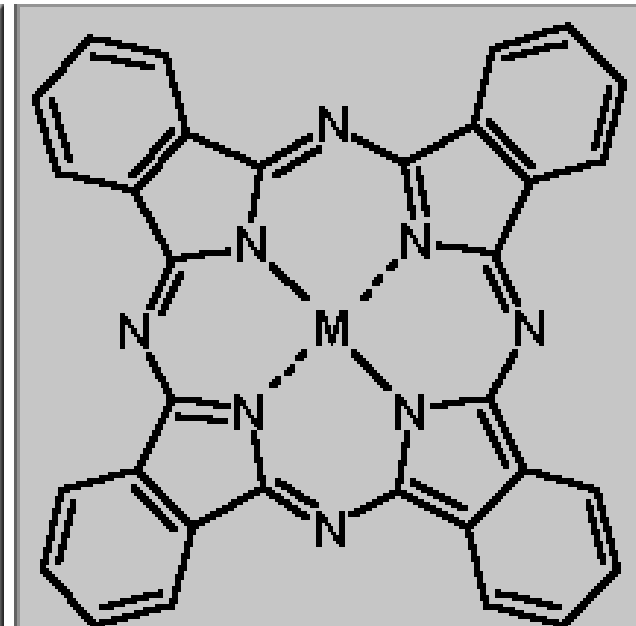
Haematoporphyrin

Chlorins



m-tetra hydroxyphenyl chlorin

Phthalocyanines



Phthalocyanine

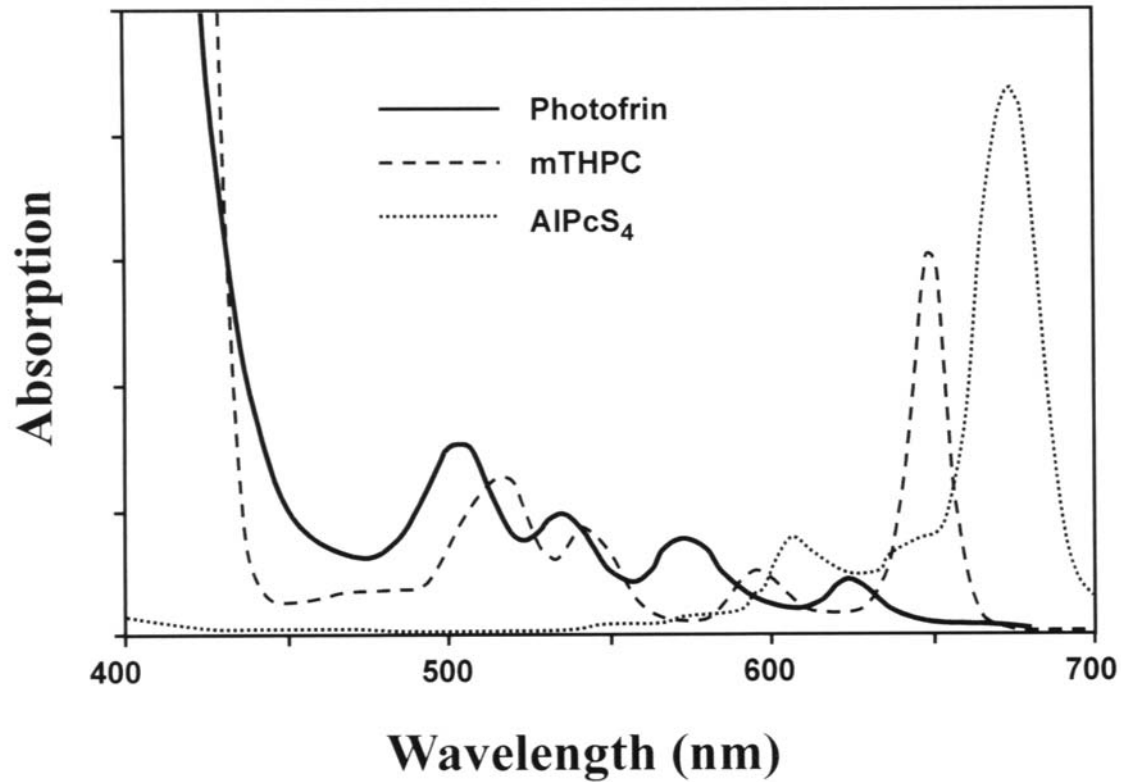


Figure 1. Absorption spectra of several photosensitizers used in PDT. Note the strong absorption peak in the far-red region (above 650 nm) for second-generation photosensitizers compared to the weak absorption at the maximum wavelength around 630 nm for the first-generation drug Photofrin.

AlPcS₄ - tetrasulfonated aluminum phthalocyanine
mTHPC (Foscan®) - m-tetrahydroxyphenylchlorin

- **Deriváty hematoporphyrinu jsou komerčně dodávány jako Photofrin**
- **Má řadu absorpčních píků mezi 400 a 650 nm, nejčastěji používaný je při 630 nm**
- **Po aplikaci je zadržována v pokožce až 10 týdnů**
- **Použití: rakovina plic, rakovina žaludku, rakovina děložního hrdla**

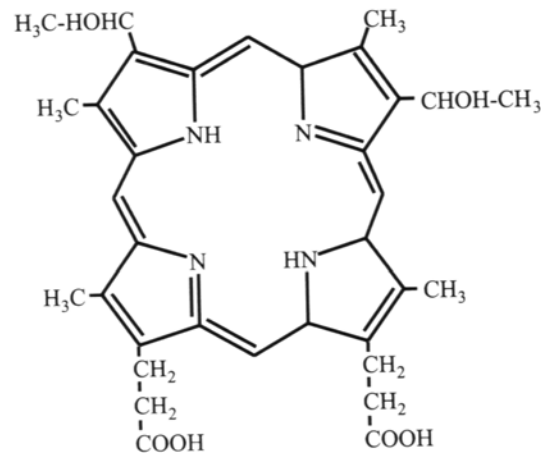


Figure 2. Haematoporphyrin Derivative (HPD).

Methylenová modř

- Používá se již staletí (např. barvení bakteriálních kmenů, diagnostika, marker nádorů)
- Inaktivuje viry
- Používá se na dekontaminaci krevní plasmy
- Nevýhoda: je redukována buněčnými enzymy na bezbarvou a tedy fotodynamicky neúčinnou formu

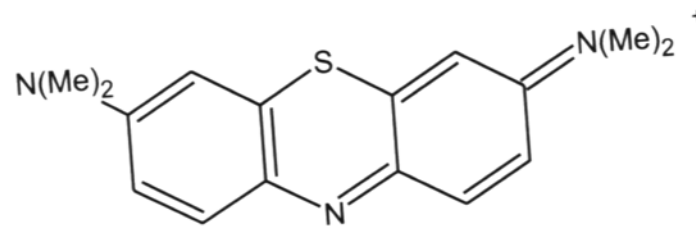


Figure 21. Methylene blue.

Kyselina 5-aminolevulová

prekursor Protoporphyrinu IX

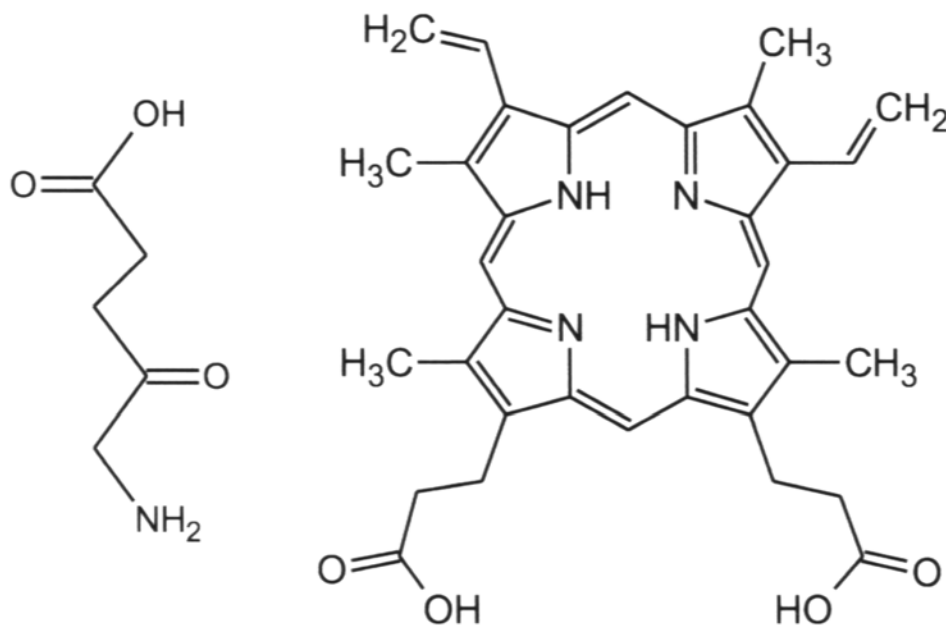


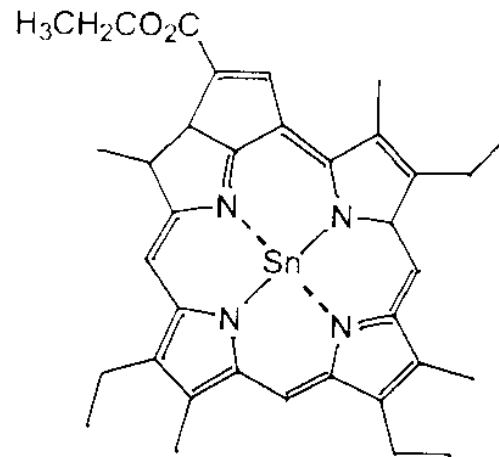
Figure 4. ALA (left) and PPIX (right).

Verteporfin

- **(Visudyne TM)**
- **Absorbuje při 690 nm**
- **Velmi rychle je absorbován nádorovou tkání;**
optimální koncentrace v této tkáni je dosaženo 30-150
minut po intravenózní aplikaci
- **Fotosensitizace pokožky se projevuje jen několik dnů**
- **Kožní nádory (ale ne melanomy), lupenka,**
revmatická artritida

Tin etiopurpurin

- (Puryltin TM)
- rakovina prostaty, rakovina prsu, Kaposiho sarkom (AIDS), lupenka



Tin etiopurpurin

Ftalocyaniny

- dlouho byly používány jako průmyslová barviva (ale i do kopírovacích přístrojů)
- nyní jsou intenzívně zkoumány hlavně kvůli jejich dobré rozpustnosti ve vodě a možnosti substituování
- absorbují při 680 nm
- rakovina trávicího traktu, kůže, prsu, plic
- potenciální sterilizace krevních komponentů

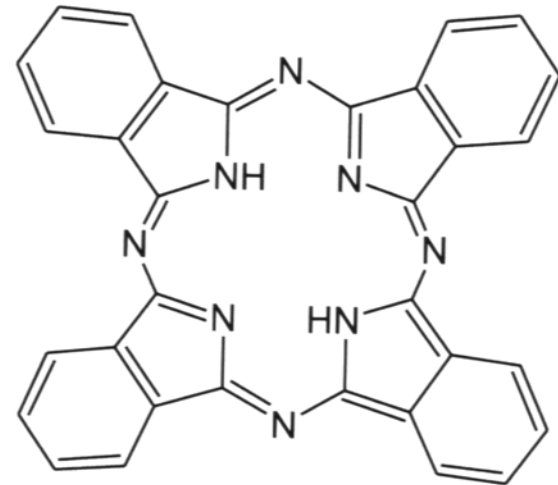
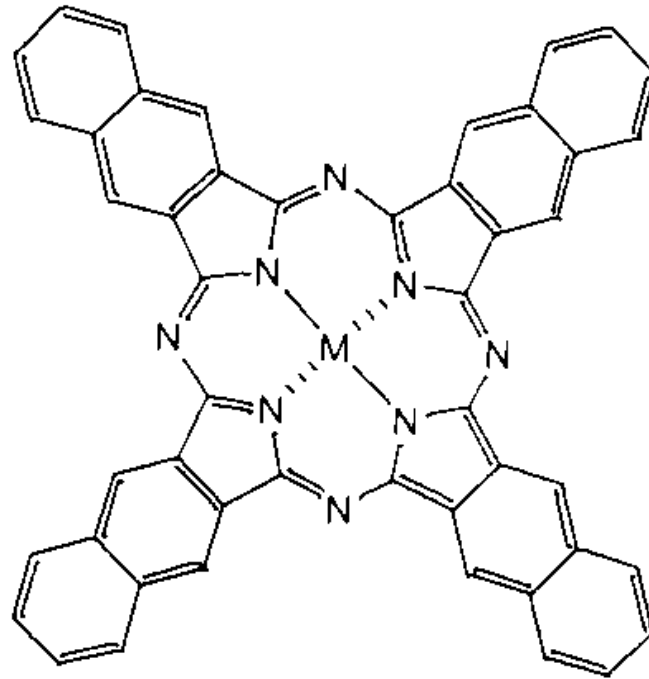


Figure 10. Phthalocyanine.

Naftalocyaniny

- Absorbují při 680 nm
- melanomy



Naphthalocyanines

N-aspartyl chlorin e6

- kožní nádory
- vykazuje minimální dobu fotosensitivity

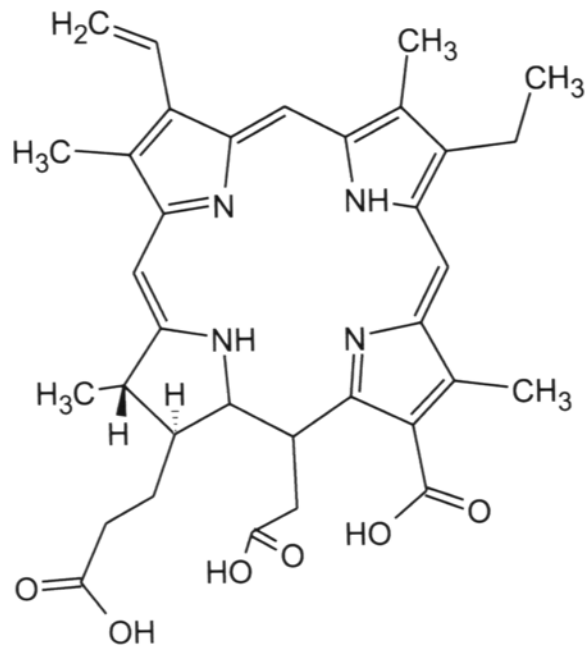


Figure 6. Chlorin e6.

Rhodamin 123

- mimo jiné výborná fluorescenční značka
- je specificky vychytáván mitochondriemi

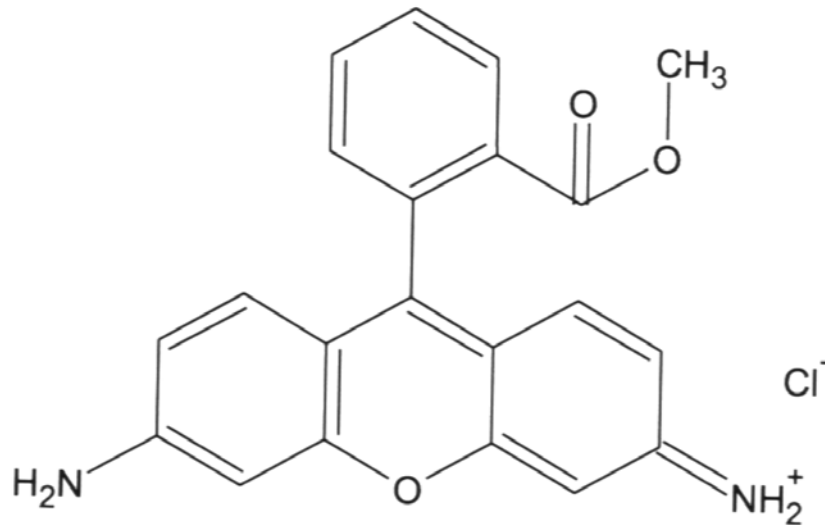


Figure 18. Rhodamin 123.

Hypericin

- znám především pro *hypericismus*, tedy podráždění pokožky, horečky, často s následkem smrti
- absorbuje při 590 nm
- lupenka, rakovina kůže, bradavice

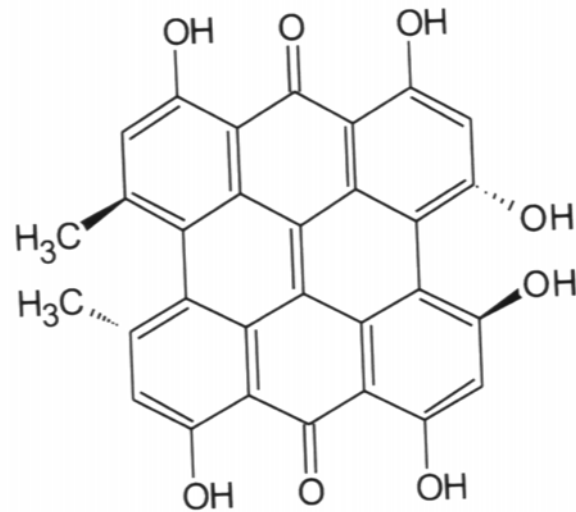
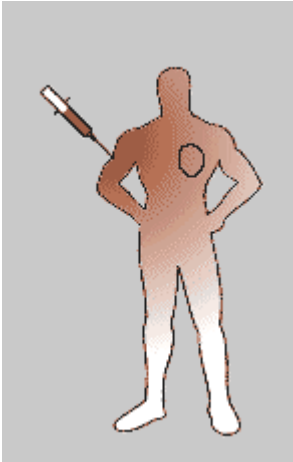
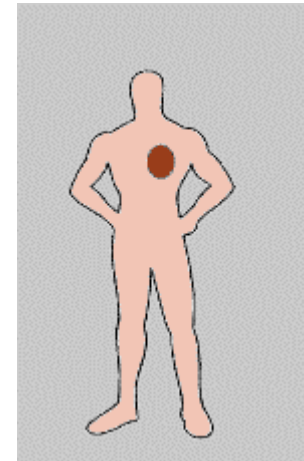


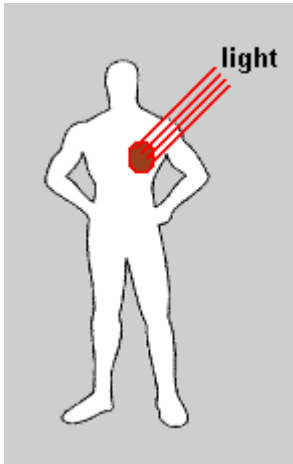
Figure 16. Hypericin.



**A patient comes to the clinic with a tumor.
The photosensitizer is given by injection.**

**After time the photosensitizer
concentrates in the tumor**





The photosensitizer is activated by light

The tumor is selectively destroyed

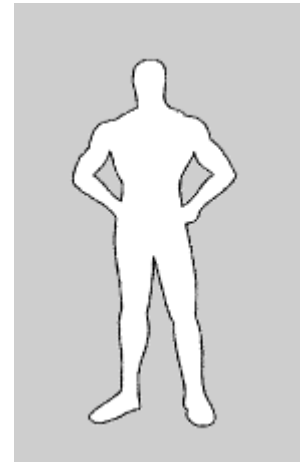




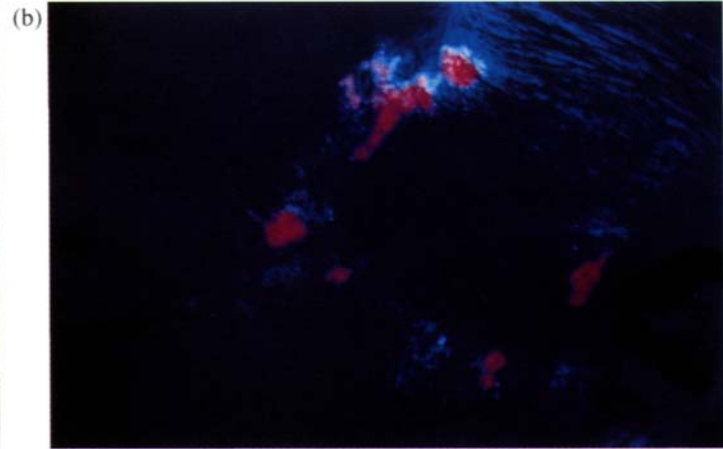
Figure 1. Superficial squamous cell carcinoma of the face before (a), soon after (b) and 4 weeks after topical ALA-PDT.



(a)



(b)



(a)

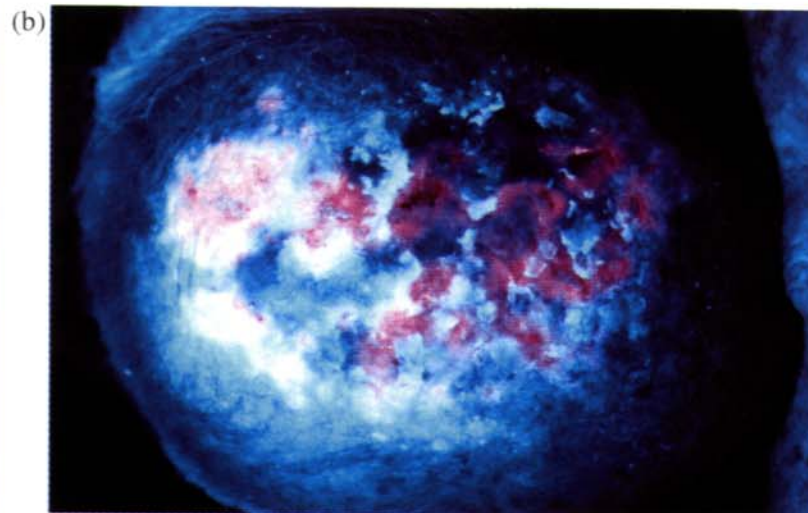


(b)



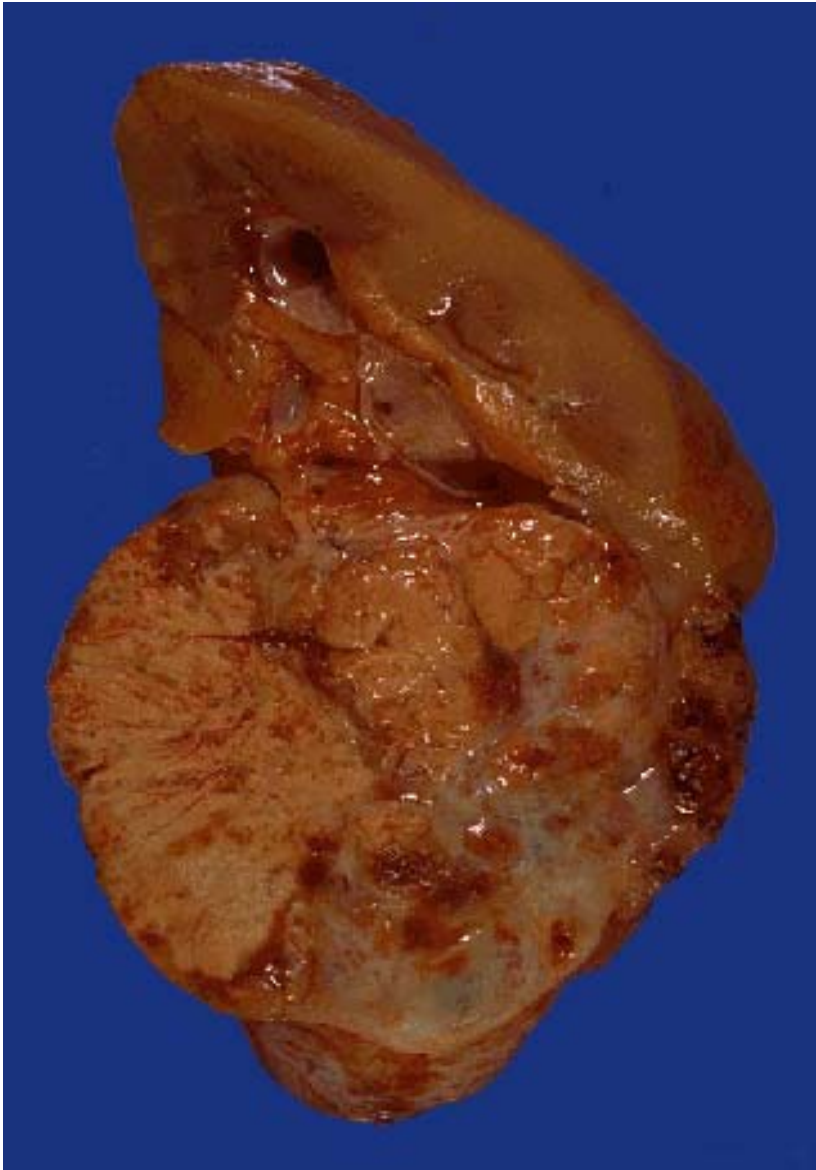
(c)





Liver Cancer





Kidney Cancer

Lung Cancer





a



b



c

Figure 4. Clinical PDT lasers. (a) argon-pumped dye laser, (b) KTP-pumped dye laser, (c) diode laser (courtesy Ceram Optics, Germany).



a



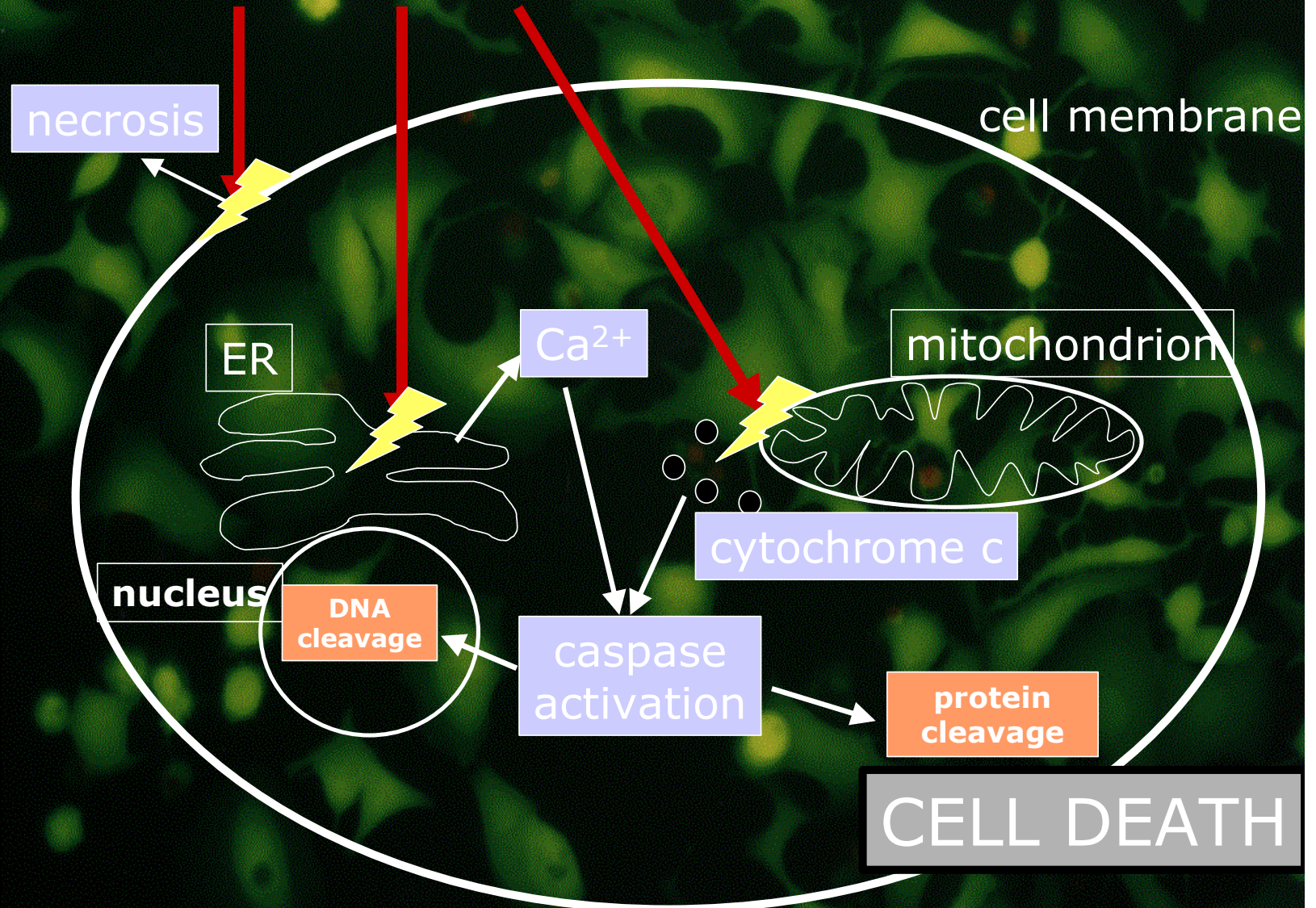
b



c

Figure 5. Light Emitting Diode (LED) sources for clinical PDT. (a) array for skin lesion treatments (courtesy EXFO Inc, Canada), (b) small array for intra-oral application (courtesy PRP Optoelectronics, England), (c) interstitial linear arrays (courtesy Light Sciences Inc., USA).

PHOTODYNAMIC THERAPY



P.G. CALZAVARA-PINTON, R.M. SZEIMES, B. ORTEL

**PHOTODYNAMIC THERAPY AND FLUORESCENCE
DIAGNOSIS IN DERMATOLOGY**

ELSEVIER 2001

T. PATRICE

PHOTODYNAMIC THERAPY

RSC (THE ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY) 2003

DĚKUJI ZA POZORNOST